



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



MASTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA
ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Influencia de los espermatozoides afuncionales en la criopreservación de los funcionales en la especie porcina

Tesis de Master
Valencia, Julio 2011

Anthony Valverde Abarca

Directores:

Dr. Jordi Roca Aleu

Dra. Inmaculada Parrilla Riera

Universidad de Murcia





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.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

JORDI ROCA ALEU, Catedrático del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia e **INMACULADA PARRILLA RIERA** contratada “Ramón y Cajal” de la Universidad de Murcia,

INFORMAN:

Que **Anthony Valverde Abarca**, alumno del **Máster Interuniversitario en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción**, ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis de Máster titulada “**Influencia de los espermatozoides afuncionales en la criopreservación de los funcionales en la especie porcina**” en las instalaciones del grupo de investigación “Reproducción Animal” de la Universidad de Murcia a lo largo del curso académico 2010-2011.

Murcia a treinta de junio de 2011

Los estudios experimentales realizados para la presente Tesis de Máster han sido financiados por GERM (04543/07), Fundación Séneca, Región de Murcia.

*Yo soy de los que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es únicamente un técnico:
es también un niño colocado ante fenómenos naturales
que le impresionan como un cuento de hadas.*

Marie Skłodowska-Curie

DEDICATORIA

A la memoria de mis abuelos:

Claudio, Dinorah y Claudia

A la memoria de mi tío Alexander.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi compañera de Laboratorio, María José Martínez Alborcia, por sus innumerables aportes desinteresados durante el desarrollo de esta investigación y haber contribuido a su culminación, por su espíritu científico y de trabajo, entrega constante, apoyo intelectual, y sobre todo, por su amistad.

A mi director de Tesis; Dr. Jordi Roca Aleu, por haber confiado en mi persona, aceptarme en su equipo de investigación para desarrollar este trabajo, por su rigurosidad académica y por enseñarme a investigar.

A la Dra. Inmaculada Parrilla Riera, por su gran contribución en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Emilio Martínez García, Director del Departamento de Medicina y Cirugía animal, de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de Murcia, por permitirme colaborar en el grupo de "Reproducción Animal" y por su valiosa sencillez, de gran don de gentes.

Al Dr. Henry Soto Murillo, por ser un mentor e impulsarme a continuar estudios de postgrado.

Al Dr. Milton Villarreal Castro, por ser un ejemplo a seguir desde los ámbitos académico, profesional y humano.

Al M Sc. Arnoldo Gadea Rivas y al M Sc. Olger Murillo Bravo, por el apoyo incondicional brindado durante estos años de estudio.

Al Dr. Jonathan Sánchez-Osorio, Dra. M^a Antonia Gil Corbalán, Dra. Xiomara Lucas Arjona y a la Dra. Cristina Cuello Medina, por su calidad humana y profesional.

A mis padres, Rafael y Patricia, a quienes nunca podré agradecer suficiente todo lo que hacen por mi.

A mis hermanas Jennifer y Pamela. Jennifer, gracias por encargarte de innumerables asuntos personales durante mis estancias en Europa.

A mi hermano Alejandro, por su permanente apoyo para llegar a este momento.

A mi abuelo Rafael Valverde Rivera, que aunque no entienda este trabajo no importa, porque se siente orgulloso de sus nietos.

A mis amigos, en especial, Néstor Mora, Gabriela Solano, Andrea González, Luis Jiménez, Olivier Chaves, y Fernando Mora por estar siempre presentes a la distancia. Se les quiere mucho.

A mi compañero de maestría, Gerald Muça, por su amistad y los momentos compartidos durante este tiempo de estancia en la Universidad de Murcia.

A mis compañeros de departamento, especialmente a Tatiana, María Dolores (Lola), Carmen, Sonia, Diego, Jesús, Miguel Ángel, David, Tania, y Carolina, por los buenos momentos que compartimos juntos.

A mis compañeros del Máster, que si bien hacíamos honor al concepto de variabilidad por la diversidad de nacionalidades, Rommel, Carlos, Ronald, Allan, Virginia, Dianelys, Estrella, Gabriel, Rubén, Chiraz, David, Aldemar, Ayman e Iván.

Al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ), por toda la ayuda ofrecida durante los años de Maestría. En especial al Dr. Armando Occon Plazahola.

Al Instituto Tecnológico de Costa Rica, y en especial a la Escuela de Agronomía por apoyarme con los avales institucionales durante los estudios de Maestría.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología de la República de Costa Rica (MICIT) y al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por los aportes brindados.

A toda mi Familia, sin excepción.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.3 UTILIZACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES CONGELADOS-DESCONGELADOS EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	7
2.1.1 Aspectos generales.....	7
2.1.2 En la especie porcina.....	8
2.2 FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN ESPERMÁTICA.....	9
2.2.1 Aspectos generales.....	9
2.2.2 En la especie porcina.....	10
2.3 EFECTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA FUNCIONALIDAD Y ESTRUCTURA ESPERMÁTICA.....	11
2.3.1 Sobre las membranas celulares.....	12
2.3.2 Sobre el medio interno.....	12
2.3.3 Sobre el citoesqueleto.....	13
2.3.4 Sobre la motilidad.....	13
2.3.5 Sobre el núcleo.....	14
2.4 INFLUENCIA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DEL EYACULADO SOBRE LA CONGELABILIDAD ESPERMÁTICA.....	15
2.5 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (REACTIVE OXYGEN SPECIES, ROS).....	15
2.5.1 Radical libre y especie reactiva dependiente del oxígeno.....	15
2.5.2 Efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre las membranas celulares ...	21
2.5.3 Fluidez de membrana y función celular.....	22
2.5.4 Fluidez de la membrana y estado de capacitación.....	23
2.5.5 Envejecimiento y fluidez de membrana.....	24
2.5.6 Interacción entre las especies reactivas de oxígeno y los espermatozoides de porcino 25	
2.6 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.....	27
2.7 SELECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES.....	28
2.7.1 Migración.....	29
2.7.2 Filtración.....	29
2.7.3 Centrifugación de coloides.....	30
III. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 MATERIALES.....	33
3.1.1 Animales.....	33
3.1.2 Reactivos químicos y medios utilizados.....	33
3.2 MÉTODOS.....	40
3.2.1 Recolección del semen.....	40
3.2.2 Criopreservación espermática.....	41
3.2.3 Valoración de la cantidad y calidad espermática.....	45
3.2.4 Separación de espermatozoides mediante el gradiente Androcoll™-P (Large)..	56
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	57
3.3.1 Experiencia 1. Efecto de los espermatozoides afuncionales sobre la calidad espermática de los funcionales a la descongelación.	57
3.3.2 Experiencia 2. Efecto de la utilización, antes de la congelación, del coloide Androcoll™-P (Large) como gradiente de centrifugación, en la calidad espermática post-descongelación.....	58
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	59
IV. RESULTADOS	61
4.1 EXPERIENCIA 1. INFLUENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES AFUNCIONALES SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE LOS FUNCIONALES CONGELADOS-DESCONGELADOS.....	62
4.1.1 Características de calidad espermática de los eyaculados antes de la congelación.....	62
4.1.2 Características de calidad espermática en las muestras seminales congeladas-descongeladas.....	64

4.2 EXPERIENCIA 2. EFECTO DE LA UTILIZACIÓN, ANTES DE LA CONGELACIÓN, DEL COLOIDE ANDROCOLL™-P (LARGE), COMO GRADIENTE DE CENTRIFUGACIÓN, EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA POST-DESCONGELACIÓN.....	75
4.2.1 <i>Influencia del coloide Androcoll™-P (Large) en la calidad espermática antes de la congelación.</i>	75
4.2.2 <i>Parámetros de calidad espermática a la descongelación</i>	76
V. DISCUSIÓN	80
VI. CONCLUSIONES	94
VII. RESUMEN	96
RESUMEN	97
SUMMARY	98
RÉSUMÉ	99
VIII. BIBLIOGRAFÍA	100

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Reacciones de peroxidación lipídica en membranas biológicas.</i>	28
<i>Tabla 2. Composición del medio Beltsville Thawing Solution (BTS).</i>	35
<i>Tabla 3. Composición del medio Phosphate Buffered saline (PBS).</i>	36
<i>Tabla 4. Composición del medio básico de congelación espermática TRIS-Yema de huevo (TRIS-Y).</i>	36
<i>Tabla 5. Composición del diluyente de congelación espermática TRIS-Yema de huevo-Glicerol (TRIS-Y-G).</i>	37
<i>Tabla 6. Composición del medio Tris-Buffer modificado básico (TBMb) y suplementado (TBMc).</i>	37
<i>Tabla 8. Parámetros de calidad seminal de los eyaculados en el laboratorio y 24 horas post incubación. Medias \pm SEM y rangos entre paréntesis.</i>	63
<i>Tabla 9. Valores promedio \pm SEM de los parámetros de calidad espermática, a los 30 y 150 min post-descongelación, en las muestras control de 100 % de espermatozoides funcionales, según verraco.</i>	64
<i>Tabla 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de malonildialdehído (MDA) y los parámetros de calidad espermática a la descongelación.</i>	71
<i>Tabla 11. Valores medios \pm SEM y rangos entre paréntesis de cantidad y calidad espermática en los eyaculados antes y después de ser sometidos o no al gradiente de centrifugación empleando el coloide Androcoll™-P (Large).</i>	75
<i>Tabla 12. Porcentajes medios \pm SEM de calidad espermática observados en las muestras congeladas-descongeladas de 6 eyaculados que fueron tratados o no con el gradiente de centrifugación Androcoll™-P (Large) antes de la congelación.</i>	76
<i>Tabla 13. Porcentajes de recuperación medios \pm SEM de los criterios de calidad espermática post descongelación.</i>	77

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Las principales especies reactivas de oxígeno.</i>	17
<i>Figura 2. Configuración electrónica de algunas moléculas de oxígeno diatómico.</i>	19
<i>Figura 3. Representación esquemática de los espermatozoides después de la centrifugación coloide. Los espermatozoides están ubicados de acuerdo con sus puntos isopícnicos en función de su morfología.</i>	31
<i>Figura 4. Balanza analítica de precisión utilizada para el pesaje de los diferentes componentes de los medios de dilución y cultivo empleados experimentos.</i>	34
<i>Figura 5. pHmetro (pH METER GLP 22) para controlar el pH de los medios de dilución y cultivo empleados en los experimentos.</i>	34
<i>Figura 6. Osmómetro (Vapro®) empleado para controlar la osmolaridad de los medios de dilución y cultivo empleados en los experimentos.</i>	35
<i>Figura 7. Kit OXIS, Bioxytech® MDA-586™ ASSAY empleado para la determinación de la producción de malondialdehído por los muestras seminales.</i>	40
<i>Figura 8. Campana de gases NST 1200, Burdinola empleada para preparar las soluciones de trabajo para la cuantificación de Malondialdehído (MDA).</i>	40
<i>Figura 9. Centrifuga Megafuge 1.0R refrigerada a 17 °C empleada para concentrar el pellet de espermatozoides antes de iniciar el proceso de criopreservación.</i>	42
<i>Figura 10. Eliminación del sobrenadante (plasma seminal y diluyente) posterior a la centrifugación.</i>	42
<i>Figura 11. Recipiente con agua para el descenso gradual de temperatura y vitrina térmica a 5 °C.</i>	43
<i>Figura 12. Envasado manual de las pajuelas de 0'5 mL empleando para ello una jeringuilla de insulina.</i>	43
<i>Figura 13. Sellado de las pajuelas de semen mediante la selladora Ultraseal 21™.</i>	43
<i>Figura 14. Unidad de congelación para 20 pajuelas de 0'5 mL.</i>	44
<i>Figura 15. Descongelación de las pajuelas en el baño termostatzado a 37 °C.</i>	44
<i>Figura 16. Contador de núcleos espermáticos para valorar la concentración espermática.</i>	45
<i>Figura 17. Casetes para determinar la concentración espermática.</i>	46
<i>Figura 18. Sistema ISAS® para la valoración objetiva de los parámetros de motilidad espermática.</i>	47
<i>Figura 19. Cámara de Makler y placa calefactora Proiser empleadas para preparar las muestras seminales destinadas a evaluar los parámetros de motilidad espermática.</i>	47

<i>Figura 20. Fórmula empleada para definir el porcentaje de espermatozoides móviles recuperados tras la congelación-descongelación.</i>	47
<i>Figura 21. Citómetro de flujo (BD FACS Canto II™) empleado para los análisis de citometría.</i>	49
<i>Figura 22. Representación gráfica mediante diagrama de puntos e histogramas de las poblaciones de espermatozoides valoradas por citometría de flujo para la determinación de la desestabilización de la membrana plasmática.</i>	51
<i>Figura 23. Representación gráfica mediante diagrama de puntos e histogramas de las poblaciones de espermatozoides valoradas por citometría de flujo para la determinación de las especies oxígeno reactivas.</i>	53
<i>células viables con una alta producción de ROS (IP- ROS+). En los cuadrantes superiores izquierdo y derecho se encuentran los espermatozoides no viables.</i>	53
<i>Figura 24. Estufa para incubación de los reactivos del MDA.</i>	55
<i>Figura 25. Centrifuga MicroCL 21R.</i>	55
<i>Figura 26. Espectrofotómetro Bio-Tek.</i>	55
<i>Figura 27. Tubo Falcon mostrando el resultado de la centrifugación de una muestra de semen depositada en gradiente Androcoll™-P (Large). Nótese la capa intermedia de espermatozoides afuncionales.</i>	57
<i>Figura 28. Espermatozoides móviles totales expresados como porcentajes de recuperación ± SEM, a los 30 y 150 min post-descongelación según verraco en muestras espermáticas con diferente proporción de espermatozoides funcionales antes de la congelación.</i>	66
<i>Figura 29. Motilidad progresiva expresada como porcentaje de recuperación ± SEM de espermatozoides congelados-descongelados a los 30 y 150 min, según verraco en muestras espermáticas con diferente proporción de espermatozoides funcionales antes de la congelación.</i>	67
<i>Figura 30. Espermatozoides con Integridad de membrana plasmática y acrosomal en muestras de semen congeladas-descongeladas a los 30 y 150 min y según verraco en muestras espermáticas con diferente proporción de espermatozoides funcionales antes de la congelación.</i>	69
<i>Figura 31. Concentración de Malonildialdehído ± SEM (MDA $\mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides) según verraco en las muestras congeladas y descongeladas control (100 % espermatozoides funcionales).</i>	70
<i>Figura 32. Concentración de Malonildialdehído ± SEM (MDA $\mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides) en las muestras congeladas y descongeladas con diferentes porcentajes de espermatozoides funcionales antes de la congelación.</i>	70
<i>Figura 33. Producción intracelular de sustancias ROS expresada en unidades de fluorescencia en 10^{12} espermatozoides vivos ± SEM, en muestras congeladas-descongeladas con diferentes porcentajes de espermatozoides funcionales antes de la congelación, representadas según verraco y tiempo de incubación post-descongelación.</i>	73

Figura 34. Grado de capacitación espermática expresada como porcentaje de espermatozoides positivos a Merocianina540 (M540) \pm SEM en muestras espermáticas congeladas-descongeladas y sometidas a un proceso de capacitación espermática procedentes de muestras seminales con diferentes porcentajes de espermatozoides funcionales antes de la congelación. Los datos se representan según verraco y tiempo de incubación post-descongelación. _____ 74

Figura 35. Concentración de Malonildialdehído \pm SEM (MDA) en muestras congeladas-descongeladas y tratadas o no antes de la congelación con el coloide de centrifugación Androcoll™-P (Large). _____ 77

Figura 36. Intensidad de fluorescencia inducida \pm SEM expresada en unidades de fluorescencia en 10^{12} espermatozoides vivos, en muestras tratadas con y sin gradiente de centrifugación y congeladas-descongeladas. _____ 78

Figura 37. Porcentajes de capacitación espermática \pm SEM en muestras tratadas con y sin gradiente de centrifugación y congeladas-descongeladas. _____ 79

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La conservación de espermatozoides por largos periodos de tiempo es importante desde el punto de vista económico, de conservación de germoplasma, preservación de la diversidad genética y la mejora de la eficiencia reproductiva de los animales. Polge y cols., realizaron con éxito la primera congelación de material seminal en 1949, cuando demostraron la capacidad crioprotectora del glicerol.

Los primeros trabajos en congelación de semen porcino (Pursel y Johnson, 1975; Westendorf y cols., 1975) datan de hace más de 30 años. Desde entonces, se ha demostrado que los espermatozoides de verraco presentan más sensibilidad a los fenómenos asociados a la criopreservación, (Watson, 1995), que otras especies, como bovino y humana. El daño se produce en la membrana plasmática y organelas de la célula como resultado del estrés osmótico, el choque por frío y la formación de hielo intracelular (Mazur, 1984; Johnson y cols., 2000). La variabilidad en las tasas de viabilidad espermática post descongelación demuestra que aún existen factores no esclarecidos en esta especie, requiriéndose de estudios adicionales.

Actualmente, la criopreservación es el único procedimiento que se utiliza para conservar espermatozoides por periodos indefinidos. El uso de semen criopreservado permite maximizar los rendimientos productivos, tanto de las granjas de producción como en los núcleos de selección dentro de programas de mejora genética (Holt y Medrano 1997). Ello se debe principalmente a que el semen criopreservado permite rentabilizar el valor de los reproductores de alto mérito genético, así como potenciar la importación-exportación de dosis espermáticas y facilitar la creación de “bancos de semen” para abastecer las necesidades de las granjas y garantizar la existencia de dosis de inseminación cuando el comercio de las mismas está prohibido por problemas sanitarios (Courstens y Rety, 2001; Roca y cols., 2006a). Según Gadea (2004), el semen criopreservado, posibilita el intercambio de material genético entre países sin los problemas asociados a barreras zoonositarias y la conservación de razas en peligro de extinción mediante bancos genéticos. Estos bancos de genes podrían ser importantes a nivel comercial por eventuales cambios en los mercados, y asegurarían la conservación de líneas genéticas valiosas ante posibles situaciones desfavorables (epizootias, problemas de fertilidad/subfertilidad por altas temperaturas, entre otros). Sin embargo, apenas un 1% de las cerdas inseminadas lo son con semen criopreservado (Weitze, 2000), debido a que los resultados de fertilidad son más bajos que los obtenidos con semen fresco o la monta natural (Watson, 2000; Johnson y cols., 2000). Es por ello que hasta hace algunos años, el uso de semen criopreservado en inseminación artificial (IA), se encuentra mayoritariamente circunscrito a núcleos de selección y/o labores de investigación (Johnson, 1985; Waberski y cols., 1994). Actualmente, el uso de semen criopreservado ha demostrado resultados productivos interesantes (Roca y cols., 2011) y ha tomado auge en relación con lo que se refiere al control en la transmisión de patógenos, facilitar la distribución de genes favorables y con ello promover la mejora genética. Sin

embargo, a pesar de estas ventajas demostradas el uso de semen criopreservado no se utiliza rutinariamente por la industria (Bailey y cols., 2008)

Se han descrito una serie de factores que, de forma conjunta, determinan la calidad del semen descongelado y del propio proceso de congelación de los espermatozoides porcinos (Roca y cols., 2006b; Mazur y cols., 2008). En diversos estudios se ha demostrado una amplia variabilidad individual de respuesta a la criopreservación que presentan los espermatozoides de distintos verracos (Larson y Einarsson, 1976; Johnson, 1985; Medrano y cols., 2002; Hernández y cols., 2006), que afectan tanto a la viabilidad y motilidad de los espermatozoides tras la descongelación como a la fertilidad *in vivo* (Johnson y cols., 1981; Bwanga, 1991; Roca y cols., 2006b). Estas diferencias entre individuos, han permitido determinar una categorización de los verracos como “buenos” o “malos” congeladores espermáticos (Watson 1995; Medrano y cols., 2002). Debido a que no eran bien conocidas las causas de dicha variabilidad, las recomendaciones se planteaban en la vía de mejorar los procesos de congelación con el fin de reducir al máximo la variabilidad y descartar aquellos verracos realmente malos congeladores. Hasta hace poco, se han encontrado posibles explicaciones de base genética que justifican estas diferencias (Thurston y cols., 2002) y con ello se pueden desarrollar nuevas posibilidades de selección de reproductores en función de su capacidad de congelación.

Existen algunos factores que pueden mejorar la eficiencia del proceso de criopreservación *per se* y su capacidad fecundante, como por ejemplo: las condiciones óptimas para la descongelación (Fiser y cols., 1993; Hernández y cols., 2007), las diferencias en la capacidad de congelación de las diversas fracciones del eyaculado (Sellés y cols., 2001; Peña y cols., 2006; Saravia y cols., 2010), el método de preparación de las muestras seminales (Matás y cols., 2007), las condiciones en las que se produce la inseminación (Wabersky y cols., 1994; Bertani y cols., 1997; Bolarín y cols., 2006), así como el efecto de la estación, la línea genética y el verraco en la capacidad de congelación (Gadea y cols., 2003, Roca y cols., 2006b).

En los últimos años, los estudios se han enfocado en estudiar las alteraciones que produce la criopreservación de los espermatozoides, esto con el objetivo de comprender el proceso lesivo y proponer una manera práctica de reducir o minimizar los cambios en la función de dicha célula. En este sentido, se conoce desde hace décadas que el choque por frío, el estrés osmótico y la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación y posterior descongelación de los mismos inducen severas alteraciones en la estructura de la membrana espermática que llevan a la muerte celular (Pursel y cols., 1973; Watson y Morris, 1987; Mazur y cols., 1997; Watson, 2000). Según Roca y cols., (2005) estos daños provocan una disminución (aproximadamente del 50%) del número de espermatozoides viables. Uno de los efectos más nocivos de la criopreservación se produce sobre la composición,

distribución y estabilidad de los lípidos de la membrana espermática. Estos efectos son muy similares a los cambios que se producen durante la capacitación del espermatozoide (Cerolini y cols., 2001). Por esta razón, a éstas modificaciones se le ha denominado “capacitation like changes” (Watson, 1995; Green y Watson, 2001; Kaneto y cols., 2002; Bravo y cols., 2005). Además, recientemente, se han relacionado las modificaciones que se producen en las membranas espermáticas durante la criopreservación, con los procesos que intervienen durante la apoptosis celular (Peña y cols., 2003; Trzcinska y cols., 2006). Esta información sobre los procesos básicos celulares es de suma importancia para, posteriormente, ser aplicada en el diseño de nuevos protocolos que permitan minimizar el daño espermático. El proceso de criopreservación *per se* produce una alteración física y química de las membranas espermáticas que tiene como consecuencia la reducción de la viabilidad celular y de su capacidad fecundante. Las alteraciones producidas por la reducción de la temperatura están asociadas con el denominado estrés oxidativo, estando inducido por la generación de especies reactivas del oxígeno (Reactive Oxygen species, ROS; Chatterjee y cols., 2001b). La consecuencia final es la peroxidación de los lípidos y una alteración grave de la funcionalidad espermática.

El daño oxidativo que sufren los espermatozoides, ha sido estudiado ampliamente en la especie humana (Aitken y Krausz, 2001). Los espermatozoides de porcino presentan sensibilidad al daño peroxidativo debido a su contenido relativamente alto de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana plasmática (Cerolini y cols., 2000) y la relativa baja capacidad antioxidante del plasma seminal (Brezezinska-Slevbodzinska y cols., 1995). Se ha demostrado que muestras espermáticas con mayor viabilidad celular tras la congelación y descongelación se caracterizaron por presentar una alta actividad enzimática (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa selenio-dependiente) antes de la criopreservación (Cerolini y cols., 2001). Según Brouwers y cols. (2005) las ROS son producidas bajo condiciones aeróbicas por todas las células vivas. En la célula espermática se requieren para llevar a cabo los procesos capacitación y reacción acrosómica (de Lamirande y cols., 1998; O’Flaherty y cols., 2006). Guthrie y Welch, (2006), encontraron una reducción en la motilidad y fertilidad espermática asociada con la criopreservación, lo que podría explicarse debido al daño oxidativo por una excesiva o inadecuada formación de ROS. Este fenómeno estresante para las células desencadenará en el corto plazo la muerte de los espermatozoides y, además, debido a la liberación del exceso de ROS, potenciará el fenómeno de peroxidación lipídica en los espermatozoides que todavía mantenían la funcionalidad, lo cual da lugar al “envejecimiento prematuro”, que provocará la muerte espermática en un corto lapso de tiempo (Saleh y Agarwal, 2002; Brouwers y cols., 2005).

La calidad espermática del eyaculado condiciona su posterior congelabilidad. En este sentido se ha sugerido que eyaculados con más de un 20-30% de espermatozoides afuncionales, es decir inmóviles o con morfología y/o membranas alteradas, deberían ser

INTRODUCCIÓN

descartados (Roca y *cols.*, 2006b). Sin embargo, rentabilizar el valor de reproductores de alto mérito genético y/o conservar razas en peligro de extinción, puede exigir criopreservar eyaculados con dudosa calidad espermática. El significado de la presencia de espermatozoides afuncionales en el eyaculado y su influencia sobre la congelabilidad de los funcionales no es conocido. Si sabemos que los eyaculados con una alta población de espermatozoides afuncionales se criopreservan peor (Kessopoulou y *cols.*, 1992; Aitken y *cols.*, 1994; Roca y *cols.*, 2006b;). Entonces, es plausible que las células espermáticas dañadas antes y durante la criopreservación repercutan de manera importante y siempre negativa sobre los espermatozoides funcionales, condicionando su criosensibilidad. El presente trabajo de investigación tiene por objetivo demostrar dicha hipótesis, es decir, si los espermatozoides afuncionales condicionan la congelabilidad de los funcionales o viables. También es objetivo de la presente investigación evaluar procedimientos que permitan eliminar de manera eficiente y rentable los espermatozoides afuncionales para criopreservar tan solo la población de funcionales presentes en los eyaculados.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Utilización de los espermatozoides congelados-descongelados en inseminación artificial

2.1.1 Aspectos generales

En la historia de la reproducción, el año de 1949 marca un punto de inflexión importante al descubrirse, por casualidad (Polge, 1985), los efectos crioprotectores del glicerol. Este descubrimiento, realizado por los científicos británicos C. Polge, A. Smith y A. Parkes, revolucionaría la tecnología de conservación de semen y marcaría el inicio del desarrollo histórico de la criopreservación espermática. Esto, porque se realiza la primera experiencia exitosa de congelación en la célula espermática y poco tiempo después se demuestra que los espermatozoides descongelados conservaban su capacidad fecundante (Polge, 1951), con lo que se abre una etapa para el desarrollo de la inseminación artificial por la posibilidad de conservar la capacidad fecundante por largos períodos de tiempo (Holt, 2000).

Los trabajos pioneros de Polge, Smith y Parkes, se realizaron con semen de gallo, en 1950 se realizan trabajos con semen equino y en 1952 con semen bovino (Watson, 1990). Los primeros trabajos con semen de porcino se dan a conocer en 1956 (Watson, 1990), pero hasta 1970 no se obtiene la primera camada en cerdas inseminadas con semen descongelado (Polge y cols., 1970).

A lo largo de casi 60 años, se han desarrollado numerosas investigaciones que han permitido notables avances de tal manera que se dispone de métodos optimizados de dilución, protocolos de criopreservación, técnicas de análisis seminal (Watson, 1995; Curry, 2000). Sin embargo, como han afirmado algunos investigadores (Polge, 1970; Iritani, 1980; Curry, 2000), únicamente, la especie bovina ha conseguido explotar exitosamente esta tecnología en el campo de la inseminación artificial de forma comercial. Una de las razones de la afirmación anterior la ofrece Curry (2000), al mencionar que para que la técnica sea exitosa; desde el punto de vista comercial; es necesario o casi imprescindible que los resultados de fertilidad que se obtengan sean similares a los obtenidos en monta natural y esto únicamente ha sido posible en la especie bovina.

El notable éxito con semen de bovino no ha sido igualado en otros mamíferos como porcino, ovino. Estas diferencias entre especies se deben básicamente a dos fuentes de variabilidad (Holt, 2000), (1) las diferencias entre especies en la fisiología y bioquímica de las células espermáticas, y (2) las variaciones en la anatomía y la fisiología del transporte de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino. Son necesarias pocas decenas de miles de espermatozoides viables en bovinos para lograr la fertilización, mientras que en el porcino, por el contrario, se requiere de muchos millones. Si un gran número de espermatozoides son necesarios para la concepción, habrá menos margen de tolerancia de supervivencia de los

espermatozoides durante el proceso de criopreservación. También se podría argumentar que las especies que tienen grandes camadas deben generar un número mínimo de embriones, de lo contrario, no producen una concentración suficiente de los factores de reconocimiento de la gestación Holt, (2000).

2.1.2 En la especie porcina

Las primeras experiencias de criopreservación, entendida como la congelación y posterior descongelación, de semen las realiza Polge en 1956. Posteriormente, continúan los trabajos enfocados en trasladar la utilización de semen congelado-descongelado a la inseminación artificial pero los resultados son no satisfactorios. En 1970, (Polge y cols., 1970) afirman que la congelación ocasiona daños importantes en la membrana plasmática del espermatozoide, favoreciendo su posterior destrucción por leucocitos una vez en el tracto genital de la cerda. Einarsson (1971) y Graham y cols. (1971), presentan sus trabajos con éxito en inseminación artificial con semen descongelado por vía cervical. Posteriormente, los investigadores Pursel y Johnson en 1975, realizan modificaciones; específicamente en el uso de diluyentes basados en la utilización de la yema de huevo y el glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente (Orvus ES paste); en los métodos de congelación y descongelación que mejoraron la calidad y capacidad fecundante del semen (Johnson, 1985). Sin embargo hasta ese momento la fertilidad media obtenida era del 47% en comparación con el 79% reportado con semen fresco (Johnson y cols., 1981). En 1975, otro grupo de investigadores alemanes (Westendorf y cols., 1975) proponen otro protocolo práctico para congelación de semen de porcino y su principal aporte consistía en envasar el semen en pajuelas y congelarlo en vapores de nitrógeno líquido.

Desde 1985, se continúan las investigaciones y se demuestra que los espermatozoides de verraco son más sensibles a los eventos asociados a la criopreservación (Watson, 1995), que otras especies como bovinos y humanos; produciéndose daños en la membrana plasmática y organelas de la célula como resultado del estrés osmótico, el choque por frío y la formación de hielo intracelular (Johnson y cols., 2000). La variabilidad en las tasas de viabilidad espermática post descongelación demuestra que aún existen factores no esclarecidos en esta especie, requiriéndose de estudios adicionales. En los últimos años, nuevos sistemas para envasar las dosis espermáticas (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000); la optimización del protocolo de criopreservación (Carvajal y cols., 2004) y la necesidad de complementar los diluyentes con antioxidantes (Roca y cols., 2004 y 2005) han repercutido positivamente en mejorar la calidad espermática post-descongelación. Sin embargo, sigue siendo un objetivo mejorar los rendimientos productivos del semen criopreservado.

El uso de semen congelado en este sector representa apenas el 1 % del total de inseminaciones realizadas en el mundo (Roca y cols., 2006a); su utilidad ha quedado

restringida exclusivamente a núcleos de selección, bancos genéticos y transporte internacional (Almlid y Hofmo, 1996), perdiéndose la gran disponibilidad espacio/tiempo que ofrece el semen congelado. Otras causas de la baja utilización del semen congelado porcino son: alto costo, con un alto número de espermatozoides por dosis y un manejo complicado (Bolarín y cols., 2006), excesiva variabilidad de la congelabilidad entre razas, individuos y eyaculados Larson y Einarsson, (1976); Johnson, (1985); Reed (1985), imprecisión de los criterios de valoración del semen criopreservado en relación con su fertilidad, precapacitación y disminución de la vida útil espermática, factores extrínsecos e intrínsecos al individuo, que condicionan esta variabilidad observada en la criopreservación como la edad, raza, características del eyaculado antes de la congelación como factores intrínsecos y la frecuencia de recolección del eyaculado, estación, temperatura de transporte del semen, y celo excesivamente largo de la cerda como factores extrínsecos Hernández, (2007a).

Esta menor fertilidad, junto al elevado número de espermatozoides utilizados, representan las principales razones del uso limitado del semen criopreservado en los actuales programas de IA en la especie porcina Eriksson y cols. (2002).

2.2 Fundamentos de criopreservación espermática

2.2.1 Aspectos generales

En términos generales, cuando las células son congeladas, se someten a un proceso de deshidratación celular y concentración de solutos a nivel intracelular, con la consiguiente formación de cristales de hielo fuera de la célula por el choque hiperosmótico. Cuando las células se descongelan, se inicia un flujo de agua hacia el interior y como consecuencia se puede causar la interrupción del funcionamiento de la membrana celular (Mazur, 1984).

Básicamente existen dos formas de congelación, la lenta y la rápida. El efecto negativo de la congelación lenta se ha descrito por lo que la exposición prolongada de las células a las condiciones hiperosmóticas, y los solutos en el citoplasma son a la larga tóxicos para la célula. Las consecuencias perjudiciales de la congelación rápida consisten en la formación de cristales de hielo intracelular (Mazur y cols., 1970).

Se continúan investigando los mecanismos que ayuden a explicar el por qué algunos espermatozoides sobreviven al proceso de criopreservación intactos, mientras que otros sufren trastornos acrosómicos, daño de la membrana plasmática y la pérdida de la motilidad. Bioquímicamente, se ha descrito que la membrana plasmática del espermatozoide contiene una serie inusual de lípidos (Lin y cols., 1993; Parks y cols., 1987). De estos, los fosfolípidos representan el 65 – 70 % del total, y una gran proporción de éstos contienen una cadena lateral de ácido docosahexaenoico, que puede conferir fluidez a la membrana e inestabilidad.

Posiblemente, para contrarrestar estos efectos desestabilizadores, la membrana de los espermatozoides contiene cantidades variables de esteroides. Los lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide responden a los cambios de temperatura por alteraciones de estado en su fase física. Aunque las regiones de los lípidos en fase líquida y gel coexisten a temperaturas fisiológicas, cuando se reduce la temperatura del líquido a favor de gel, la presencia de los esteroides se cree que inhibe estos cambios de fase Holt, (2000).

Según Bailey y cols. (1994); Robertson y Watson, (1986.) al aumentar la temperatura después de la descongelación, la membrana plasmática se somete a los reordenamientos estructurales en los lípidos y las proteínas, dado que durante la congelación hubo una concentración de solutos a nivel intracelular. Estas alteraciones físicas en la membrana pueden ser responsables en parte, del mal control de la concentración de calcio intracelular que es evidente a temperaturas inferiores a 17 °C.

Esta es probablemente la razón de ser, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el citrato de los diluyentes de semen; los cuales son quelatos de calcio; disminuyan el gradiente de concentración a través de la membrana plasmática del espermatozoide. Las concentraciones de calcio intracelular de 0,1 mM son cuatro órdenes de magnitud menores que las de los ambientes externos. Los quelatos de EDTA y de otros iones metálicos, sin embargo, pueden actuar inhibiendo la peroxidación lipídica Holt, (2000).

2.2.2 En la especie porcina

Existen variaciones en la criopreservación según la especie, porque hay diferencias espermática en forma, volumen y composición (Medeiros y cols., 2002). En todas las especies, las diferencias entre los individuos parecen ser de origen genético. Se han identificado diferencias específicas en algunas secuencias del ADN entre verracos que se clasificaron por la calidad de su semen descongelado como buenos o malos (Thurston y cols., 2001).

Las diferencias en la composición de ácidos grasos y las relaciones entre los tipos de lípidos de los espermatozoides, son o constituyen factores importantes en la congelabilidad de los machos (Parks y Lynch, 1992). En los pequeños rumiantes, la inseminación artificial cervical con espermatozoides congelados-descongelados se han observado tasas de fertilidad media a baja (O'Meara y cols., 2005). Esto puede ser debido a varios factores, por una parte, el propio y perjudicial proceso de congelación-descongelación, la inestabilidad de las membranas plasmática y acrosomal, la capacitación de los espermatozoides congelados, la mortalidad embrionaria y otros factores relacionados con el sexo femenino como lo es sincronización del celo, la detección de celo y la inseminación a tiempo (Anel y cols., 2005; Aisen y cols., 2005).

Se está acumulando evidencia de que los cambios en la estructura de la membrana espermática y por lo tanto en las propiedades de la membrana son responsables de la disminución de la capacidad fertilizante de los espermatozoides almacenados. Por ejemplo, la capacidad de la organización molecular de la membrana de los espermatozoides para responder a la refrigeración puede verse afectada por una incapacidad para cambiar la fluidez (Buhr y *co/s.*, 1994). La fluidez está relacionada con la integridad de los lípidos de la membrana Stubbs y Smith, 1984 y los cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática por lo tanto pueden estar asociados con los efectos de enfriamiento y almacenamiento. Como las células espermatozoide se caracterizan por un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados, la peroxidación lipídica puede ser uno de los mecanismos bioquímicos responsables de la negativa y los cambios fisiológicos durante el almacenamiento de esperma.

Está demostrado que un alto porcentaje de los espermatozoides congelados-descongelados sufren una desestabilización prematura de las membranas equivalente a la que se observa durante el proceso de capacitación y reacción acrosómica (Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997). Estos cambios, si bien, pueden condicionar la fertilidad, parecen estar relacionados con modificaciones a nivel de la composición y dinámica de la bicapa fosfolipídica (Buhr y *co/s.*, 1994). Estas modificaciones, que no se presentan al menos, con la misma intensidad en la criopreservación de espermatozoides en otras especies domésticas como el vacuno, estarían relacionados con la peculiar composición lipídica de las membranas de los espermatozoides de verraco, membranas ricas en sus cadenas laterales en ácidos grasos poliinsaturados (Buhr y *co/s.*, 1994). Esta característica predispone a los espermatozoides de verraco al fenómeno de la peroxidación lipídica (White, 1993). Cerolini y *co/s.* (2000) demostraron que en los espermatozoides criopreservados de verraco, cuando la integridad de la membrana era baja tenían menores cantidades de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas que aquellos espermatozoides criopreservados procedentes de verracos con una integridad de membrana alta, esta circunstancia puede estar relacionada al fenómeno de la peroxidación lipídica, el cual provocaría una pérdida de ácidos grasos poliinsaturados y consecuentemente una drástica caída de la motilidad espermática. Nissen y Kreysel, (1983), demostraron que la peroxidación lipídica conllevaba una metabolización de los ácidos grasos poliinsaturados y la consiguiente pérdida de motilidad espermática.

2.3 Efectos de la criopreservación sobre la funcionalidad y estructura espermática

De manera tradicional, la calidad espermática post-descongelación se evalúa con base en dos importantes características espermáticas, la integridad de la membrana plasmática y la calidad de movimiento. Sin embargo, estos parámetros; si bien son importantes; no explican de forma satisfactoria la capacidad fecundante de los espermatozoides, ni la variabilidad observada en los eyaculados criopreservados. Se ha demostrado una correlación negativa (en algunos casos) entre la capacidad de los machos catalogados como "buenos" congeladores en

función de estas características y los porcentajes de fecundidad *in vitro*, Gil y cols. (2005). Esto hace notar las importantes limitaciones de las pruebas convencionales para evaluar la funcionalidad espermática. Un tipo de análisis, relativamente reciente, y que presenta grandes posibilidades, es el análisis de la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear. El interés en este tipo de análisis reside en la posibilidad de que la fertilidad de una muestra espermática pueda depender del grado de estabilidad de su cromatina y no tanto de otras características comúnmente evaluadas como la motilidad o la viabilidad, Gil y cols. (2005). Además, se ha demostrado que la integridad del ADN de espermatozoides porcinos puede verse afectada durante el proceso de congelación-descongelación Córdova y cols. (2002); Fraser y Strzezek, (2005, 2007).

2.3.1 Sobre las membranas celulares

La membrana plasmática es la estructura espermática que resulta más severamente dañada (Parks, 1997), aunque la membrana acrosómica externa y las membranas de la mitocondria también se ven afectadas (Watson, 1995). Estas alteraciones estructurales provocan pérdida de enzimas intracelulares y trastornos en el balance iónico, con pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana y trastornos en el metabolismo aeróbico y glucólisis anaeróbica, comprometiendo todas aquellas funciones celulares energético-dependientes, como la motilidad; de igual forma se produce pérdida de enzimas responsables de la metabolización de las especies reactivas del oxígeno (ROS, reactive oxygen species) y la disminución de compuestos antioxidantes (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, taurina, hipotaurina) en el medio extracelular tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación (Brouwers y cols., 2005).

La evaluación de la integridad de membrana se considera un indicador importante del éxito de la criopreservación ya que las membranas son altamente susceptibles a la criopreservación (Paks y Graham, 1992; Harrison, 1997; Holt y Medrano, 1997).

Buhr y cols. (1994) determinaron que el proceso de criopreservación altera tanto el contenido lipídico de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide como las interacciones dinámicas de los lípidos de estas membranas. Estos cambios podrían alterar de manera directa o indirecta los eventos que conllevan a la fertilización y ser responsables de las pérdidas de fertilización observadas con el semen porcino criopreservado.

2.3.2 Sobre el medio interno

Se producen alteraciones en el balance iónico del sodio, zinc y calcio, que se acumulan en el espacio intracelular, y del potasio y magnesio, que salen masivamente de la célula (Watson y Plummer, 1985). Aunque existen grandes diferencias individuales, el incremento de

calcio intracelular es muy característico de la especie porcina en comparación con otras especies, y se debe a una alteración de la bomba que lo regula (White, 1993), ya que las proteínas de membrana que funcionan como bomba de iones disminuyen su actividad con el descenso de la temperatura (Watson y Plummer, 1985).

2.3.3 Sobre el citoesqueleto

Muchas de las proteínas del citoesqueleto ejercen una función estabilizadora de la membrana plasmática (Holt y North, 1991), con un comportamiento de despolimerización y repolimerización dependiente de la temperatura (Watson, 1995). El glicerol, además, altera a los microtúbulos, lo que repercute indirectamente sobre la membrana. Por otro lado, los cambios acelerados del volumen celular influyen sobre el sostén esquelético de las membranas plasmática y acrosomal, aunque se conoce poco con relación a este mecanismo (Watson, 1995). En la alteración estructural de la membrana plasmática de la región acrosómica influyen las dimensiones de la cabeza espermática: en el espermatozoide de las especies más vulnerables ésta es alargada y plana, distinta de la más pequeña y convexa de las especies resistentes. El componente citoesquelético estabilizador parece no estar presente en la región anterior de la cabeza, con lo que las consecuencias del enfriamiento serían más graves en las especies con espermatozoides de cabeza plana y alargada (Watson y Plummer, 1985).

2.3.4 Sobre la motilidad

La motilidad ha sido uno de los parámetros de la calidad seminal más estudiados en el espermatozoide al ser ésta una de las más importantes expresiones de la función espermática, que según algunos autores puede ser uno de los factores que mejor se correlacionan con la fertilidad (Shanis y *co/s.*, 1989; Verstegen y *co/s.*, 2002). La motilidad espermática es comúnmente usada como un indicador de la viabilidad celular que puede ser reflejo, entre otras cosas, de la integridad de la membrana y de la funcionalidad del metabolismo intracelular (Davis y Siemers, 1995). Es necesaria una buena motilidad tanto para el transporte de un número suficiente de espermatozoides hasta el lugar de la fecundación (Hunter, 1980), como para el proceso de penetración de la zona pelúcida del ovocito (Yanagimachi, 1981).

La motilidad espermática se ve afectada por muchos factores durante el proceso de criopreservación. Se puede citar el descenso de la temperatura, la osmolaridad del medio y los fenómenos de peroxidación lipídica. De acuerdo con Brouwers y *co/s.* (2005), la peroxidación lipídica es particularmente intensa en la pieza intermedia, lo que explicaría la disminución de la motilidad espermática tras la descongelación. Este fenómeno de peroxidación lipídica va a afectar la motilidad espermática debido al daño oxidativo de una excesiva o inapropiada formación de ROS (De Lamarinde y Gagnon, 1992; Guthrie y Welch, 2006), e incluso puede afectar también la capacidad de fusión espermatozoide-ovocito (Aitken y Clarkson, 1987). La

reducción de la motilidad en los espermatozoides puede deberse a una lesión inducida por las especies reactivas de oxígeno sobre la utilización del ATP por las mitocondrias o a un daño en el sistema contráctil del flagelo (Guthrie y Welch, 2008). Los cambios cualitativos de la motilidad después de la descongelación (Cremades y cols., 2005), presentan similares características a los espermatozoides hiperactivados a consecuencia de la capacitación espermática previa a la fecundación (Schmidt y Kamp, 2004).

La osmolaridad tiene un papel importante en la motilidad espermática, por ello, se utilizan diluyentes hipertónicos (altas osmolaridades, 490 a 510 mOsm/kg). Estos registran mayores motilidades progresivas y generales post descongelación, y esto puede deberse a que los espermatozoides tratados con estos diluyentes hayan perdido agua libre intracelular antes de su congelación y esto reduce las posibilidades de formación de hielo intracelular (Zeng y cols., 2001).

La temperatura es una fuente importante de variación de la motilidad espermática. Holt y cols. (1988) observaron que al valorar a 16 °C espermatozoides de carnero, el 50 % de las piezas medias del flagelo formaban un arco, y si la temperatura tendía a bajar, disminuía la motilidad progresiva de los mismos, y todo el movimiento flagelar se perdía cuando se alcanzaban los 14 °C. En los espermatozoides de porcino estos efectos se ven disminuidos ya que se adquiere un grado de resistencia al choque por frío cuando se incuban por varias horas a temperatura ambiente antes del enfriamiento (Pursel y cols., 1972).

Otro factor que afecta la motilidad y la calidad espermática es el efecto animal y la alta variación entre y dentro de verraco (Kommissrud y cols., 2002). Fiser y cols. (1993) indican que para obtener una óptima medición de la motilidad espermática, una tasa de enfriamiento de – 30 °C/min y un descongelado de 1200 °C/min aseguraría tener al menos una tasa de supervivencia mayor al 50 %.

2.3.5 Sobre el núcleo

El fenómeno de supercondensación de la cromatina nuclear se ha constatado en espermatozoides criopreservados de verraco (Hamamah y cols., 1990), y se relaciona con una alteración de la capacidad fecundante y del desarrollo embrionario. Martín-Rillo y cols. (1999) asocian los trastornos del desarrollo embrionario a alteraciones en la organización de la cromatina nuclear, pues encuentran una mayor proporción de embriones en estadios menos avanzados del desarrollo, y también de embriones degenerados en cerdas inseminadas con semen descongelado, en comparación con otras que lo fueron con refrigerado. Un estudio de Fraser y Strzezek (2007) ha descrito un incremento de la fragmentación del ADN del núcleo de los espermatozoides porcinos tras el proceso de congelación-descongelación.

2.4 Influencia de la calidad y cantidad del eyaculado sobre la congelabilidad espermática

La cantidad y calidad espermática son factores condicionantes de la congelabilidad espermática. Al respecto Roca y cols. (2006b) afirman que una mayor concentración de espermatozoides, así como un porcentaje alto de espermatozoides con morfología normal y motilidad total antes de la congelación deberían presentar Buenos porcentajes de recuperación a la descongelación, esto por la correlación positiva, demostrada por el mismo investigador, entre los parámetros de cantidad y calidad espermática antes de la congelación y los de calidad de los espermatozoides después de descongelados. Sin embargo, debido a una gran cantidad de fuentes de variación aún no bien identificadas, se ha notado que en algunos casos, características de cantidad y calidad espermática como una alta concentración de espermatozoides, junto con una mayor proporción de espermatozoides morfológicamente normales y con alta motilidad antes de la congelación, no garantiza necesariamente la supervivencia de los espermatozoides después de la congelación y descongelación.

El proceso de criopreservación espermática está ligado a una mayor presencia de espermatozoides alterados y afuncionales. Aún obteniendo mejores porcentajes de integridad de membrana plasmática y acrosomal en los espermatozoides congelados-descongelados en porcino; lo que implicaría partir de eyaculados de buena calidad espermática, con un alto porcentaje de espermatozoides funcionales; el proceso de criopreservación *per se* provoca un incremento significativo de espermatozoides afuncionales, ya sea muertos, o con alteraciones morfológicas o pérdida de la integridad de sus membranas que les impide fecundar (Watson, 1996). Se ha demostrado, en humano, que los espermatozoides alterados y muertos son una fuente importante de generación de sustancias ROS (Kessopoulov y cols., 1992; Aitken y cols., 1994).

Saravia y cols. (2009) demostraron que la utilización de los primeros 10 mL de la fracción rica del eyaculado, presentaba un mayor porcentaje de motilidad en todas las etapas del proceso de crioconservación, incluida la descongelación, en comparación con los espermatozoides del resto del eyaculado. Esto hace evidente que la fracción del eyaculado puede condicionar la congelabilidad espermática y dicha congelabilidad puede disminuirse aún más si la calidad inicial del eyaculado es baja (Kessopoulov y cols., 1992; Aitken y cols., 1994.)

2.5 Especies reactivas del oxígeno (*Reactive oxygen species*, ROS)

2.5.1 Radical libre y especie reactiva dependiente del oxígeno

Las regiones del espacio atómico donde existe mayor probabilidad de encontrar un electrón (e-) se denominan orbitales atómicos. Existen varios tipos de orbitales, que se ubican en diferentes niveles energéticos alrededor del núcleo. En cada orbital hay parejas de electrones, que se distribuyen según su nivel energético. Éstos al girar sobre su propio eje producen una energía magnética definida por su número cuántico "spin", que posee los valores, $+\frac{1}{2}$ o $-\frac{1}{2}$, según el sentido de giro horario o antihorario respectivamente. Los e- del par de cada orbital tienen sentidos de giro opuestos, por lo que sus spines o campos magnéticos se anulan mutuamente, denominándose a ese átomo o molécula, diamagnética. Desde el punto de vista químico un radical libre es toda especie química, átomo, molécula o parte de ésta, cargada o no, que en su estructura presenta uno o varios e- desapareados o impares en su orbital más externo, dándole una configuración electrónica que genera gran inestabilidad (Venero Gutiérrez, 2002).

El e- desapareado o solitario tiene un momento magnético o spin no compensado, determinando que el átomo o molécula sea paramagnética. Los electrones tienden a la configuración energética más estable pareándose en su orbital. Por ello, el radical libre tiene una gran tendencia a recuperar la situación de estabilidad perdida, lo que se puede lograr de dos formas, bien cediendo el e- desapareado (agente reductor) o bien captando un e- (agente oxidante). Son muy reactivos, tienen una vida media corta que depende del tiempo que tardan en reaccionar con otro átomo para conseguir captar o ceder su electrón desapareado y así compensar el spin de su orbital más externo, por eso actúan cerca del sitio en que se forman ya que no tienen mucho tiempo para difundir (Basaga, 1989; Cheeseman y Slater, 1998a,b). En este proceso, el átomo atacado pierde o gana electrones, de manera que se puede convertir a su vez en otro radical libre.

El término especies reactivas del oxígeno, incluye tanto a los radicales libres relacionados con el oxígeno como a otras especies no radicáticas que siendo precursores y derivados de éstos, participan en reacciones que causan elevación de los agentes pro-oxidantes (Beckman y Koppenol, 1996; Naqui y cols., 1996). Aproximadamente, del 1 al 3 % del oxígeno consumido en el organismo deriva en la formación de especies reactivas dependientes del oxígeno (Crespo y cols., 1997; Beckman y Ames, 1998; Reiter, 1998).

El 21 % de la atmósfera es dioxígeno (O₂) y prácticamente todo es de origen biológico. El O₂ atmosférico es producto de la oxidación del agua que lleva a cabo el fotosistema II de las plantas, algas y cianobacterias con la luz solar. Se reduce el O₂ en agua y la energía de esta reacción, que originalmente provino del sol, se utiliza para formar ATP y para transportar iones y metabolitos a través de las membranas celulares. Aproximadamente el 80 % del ATP que se utiliza, se forma en las mitocondrias en donde se consume entre el 85 y el 90 % del O₂. La fotosíntesis oxigénica y la respiración forman un circuito continuo de oxidación del agua y reducción del O₂ Hansberg, (1999, Figura 1.).

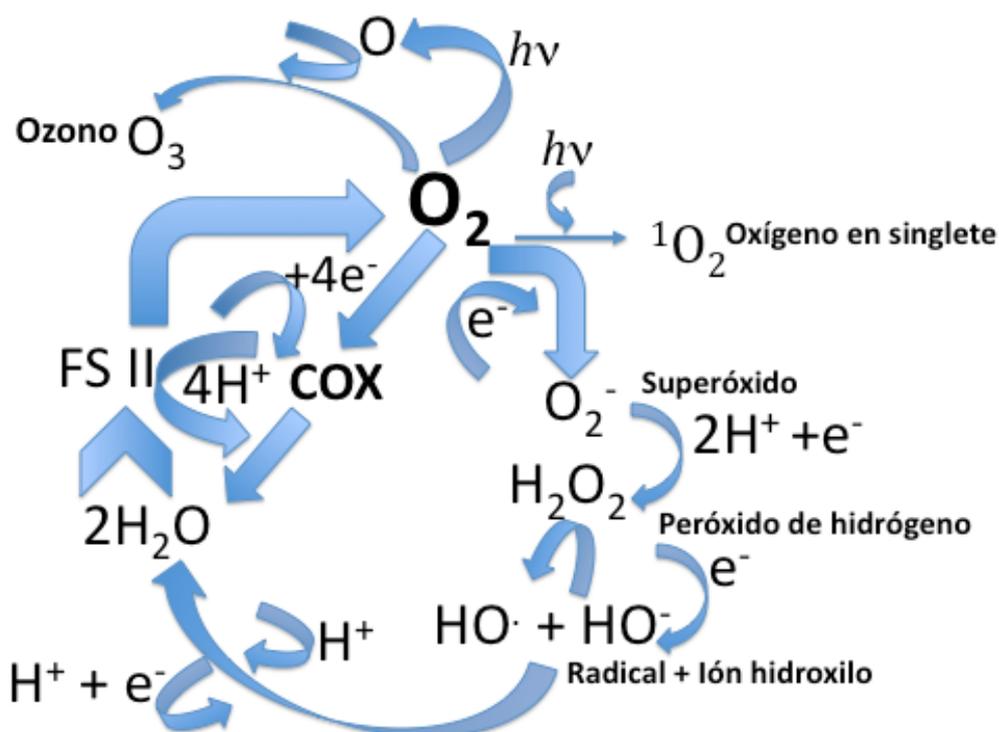


Figura 1. Las principales especies reactivas de oxígeno. Las especies de oxígeno reactivas se generan por la ruptura o la excitación del dioxígeno (O , O_3 , 1O_2) o por la reducción parcial del mismo (O_2^- , H_2O_2 , $HO\cdot$). El fotosistema II (FS II) lleva a cabo la oxidación completa del agua en dioxígeno (fotosíntesis) mientras que la oxidasa del citocromo c (COX) efectúa la reducción completa del dioxígeno en agua (respiración). Adaptado de Hansberg, 1999.

Las principales especies reactivas del oxígeno son (Halliwell y Gutteridge, 1999; Reiter, 1995; Jiménez-Jiménez y cols., 1996): el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-), el oxígeno singlete (1O_2), el óxido nítrico (NO), el peróxido ($ROO\cdot$), el alcoxilo ($RO\cdot$) y el ozono (O_3). Producen la oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN (Halliwell y Gutteridge, 1984; 1985; Halliwell, 1992; Halliwell y cols., 1992; Reiter, 1995; Jiménez-Jiménez y cols., 1996).

La toxicidad del O_2 se explica debido a la formación de las especies de oxígeno reactivas. Estas especies son derivados del O_2 que son más reactivos que éste en su estado basal de triplete. Las principales son: las especies que son producto de la ruptura o de la excitación del O_2 , es decir, el oxígeno atómico, el ozono y el oxígeno en singlete, y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, esto es, el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo Klotz y cols. (2000).

El O_2 es un dirradical, esto es, tiene dos electrones libres o desapareados. Estos electrones tienen el mismo giro, por lo que sólo pueden interactuar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Ésta es la razón

por la cual el O_2 no es muy reactivo. El oxígeno en singlete (1O_2) se forma cuando uno de los dos electrones libres capta energía y cambia de giro. Cuando eso sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre. Por eso hay dos especies de oxígeno en singlete, el $^1\Sigma_g^+$, que tiene los dos electrones desapareados pero con giros opuestos, y el $^1\Delta_g$, en el que estos electrones se han apareado (Figura 2.). El primero decae muy rápido y para la biología sólo tiene importancia el segundo. El $^1\Delta_g$ es también inestable, decae al estado basal, emitiendo un fotón a 1,268 nm, o reacciona porque, ahora sí, puede aceptar dos electrones, libres o apareados Halliwell y Gutteridge, (1999).

Las células tienen sustancias con color, tales como las flavinas, las porfirinas y sus derivados, las quinonas, las pterinas y, en los organismos que llevan a cabo la fotosíntesis, las clorofilas. Estos compuestos son excitados generalmente con la luz azul (430–490 nm) y el componente A de la luz ultravioleta (UVA 320–400 nm). Los compuestos excitados pueden transferir su energía al O_2 y formar el 1O_2 (1). También, en presencia de una sustancia reductora (que cede fácilmente electrones) el colorante se puede reducir y con el O_2 formar el ion superóxido (O_2^-). El 1O_2 también se forma en la dismutación espontánea del O_2^- , de la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), o de los ácidos hipohalogenosos. También los lipoperóxidos, generados por algunos radicales, pueden liberar 1O_2 Finkel, (1998).

El 1O_2 es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de compuestos celulares. El producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas; el producido dentro de las células reacciona con el ADN, las proteínas y los lípidos y otros compuestos celulares, cerca de donde se produce Lledías y Hansberg, (2000).

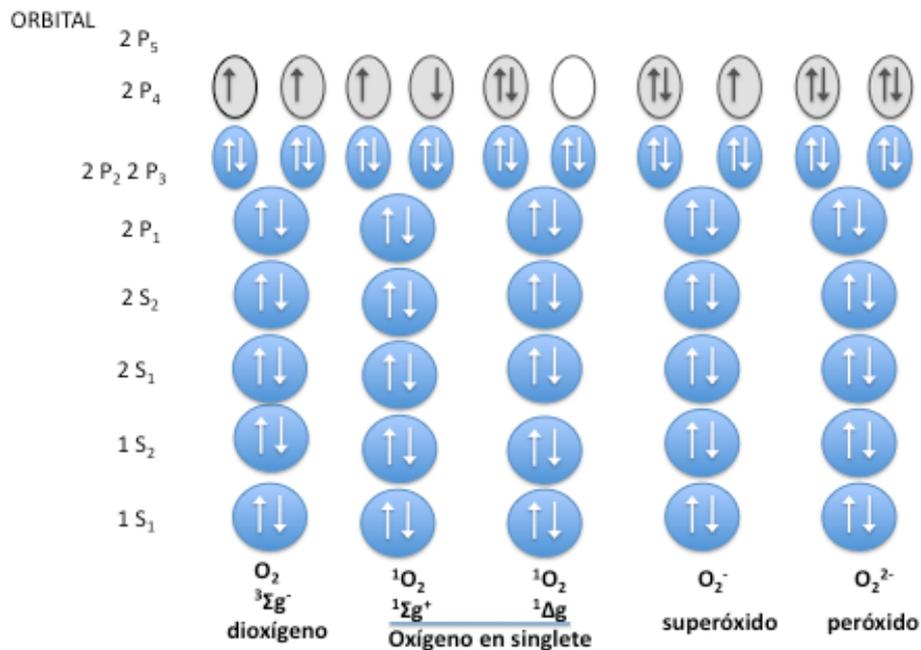


Figura 2. Configuración electrónica de algunas moléculas de oxígeno diatómico. A diferencia del superóxido y del ion peróxido, el oxígeno en singlete puede aceptar pares de electrones, lo cual lo hace muy reactivo. Figura modificada de la figura 1.12 de Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3a edición, Oxford University Press, Oxford.

El O₂⁻ se forma cuando el O₂ capta un electrón. Esto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria sale de ésta y es captada por el O₂. Esto ocurre principalmente a nivel de la semiquinona o del ubiquinol y también del complejo I (NADH coenzima Q reductasa). La ubiquinona puede aceptar con facilidad uno o dos electrones y cederlos al O₂. Alrededor del 1% del O₂ consumido en la respiración genera O₂⁻. Además de la cadena mitocondrial, las cadenas de transporte de electrones del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear también pueden generar O₂⁻. Los citocromos P450, una superfamilia de proteínas capaces de hidroxilar una gran variedad de xenobióticos, pueden generar O₂⁻. Algunas oxidasas como la oxidasa del NADPH, la oxidasa de xantina y algunas peroxidasas inespecíficas producen O₂⁻. El O₂⁻ también se puede formar a partir de la autooxidación de compuestos como el gliceraldehído o de las flavinas y las tetrahydropterinas reducidas. Se ha calculado que la concentración del O₂⁻ en la célula está en el intervalo de pico a nanomolar Halliwell y Gutteridge, (1999).

Contrario a lo que generalmente se piensa, el O₂⁻ es poco reactivo. Sólo reacciona a una tasa importante con las quinonas, los fenoles, con el hierro libre o unido a algunas

proteínas, por ejemplo los centros [Fe-S] y también con otros radicales (el propio O_2^- , el óxido nítrico y los radicales fenoxi). La dismutación espontánea del O_2^- ocurre sólo cuando uno de los O_2^- se protona para formar el radical hidroperoxilo (HO_2^-), por lo que la velocidad de reacción es mayor mientras más ácido sea el medio. El O_2^- inhibe algunas enzimas como la deshidrogenasa de 6-fosfogluconato, la aconitasa y la fumarasa lo que afecta la reducción del NAD⁺ y el metabolismo energético. También inhibe la tercera enzima de la vía de síntesis de los aminoácidos ramificados, la dihidroxiácidosdeshidratasa y la ribonucleótido reductasa que genera los desoxiribonucleósidos difosfato para la síntesis del ADN, y una fosfatasa proteica, la calcineurina, importante en la transducción de señales. El O_2^- reduce el Fe(III) en Fe^{2+} , reacciona con el ascorbato ($10^5 M^{-1} s^{-1}$) pero no reacciona con el NAD(P)H, con el ADN, con los lípidos, ni con los aminoácidos de las proteínas Hoffmann y *cols.* (2002).

La mayor parte del H_2O_2 o agua oxigenada proviene de la dismutación del O_2^- , aunque también algunas oxidasas lo producen como la oxidasa de xantina, las oxidasas de aminoácidos, las oxidasas de hexosas y las oxidasas de fenoles, entre otras. La concentración del H_2O_2 en las células varía mucho según el organismo o el tejido y va desde pico o nanomolar hasta cerca de 100 μM . El H_2O_2 es poco reactivo y se puede difundir a través de los compartimentos celulares aunque tiende a formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Reacciona poco con el ascorbato y no reacciona con compuestos como el NAD(P)H, el ADN, los lípidos, o la mayoría de las proteínas, inclusive a concentraciones milimolares. Algunas enzimas, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o la fosfatasa de fructosa-1,6-difosfato, sí se inactivan con el H_2O_2 . El H_2O_2 reacciona lentamente con algunos cetoácidos, como el piruvato o el α -cetoglutarato Halliwell y Gutteridge, (1999).

Tanto el O_2^- como el H_2O_2 son compuestos que reaccionan poco. Sin embargo, ambos son tóxicos principalmente porque generan 1O_2 y $HO\cdot$. El H_2O_2 es tóxico para la mayoría de las células a una concentración de 10 a 100 μM . Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado, por ejemplo, de un metal de transición como el Fe^{2+} o el Cu^+ , entonces se fragmenta y forma el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y el ión hidroxilo HO^- (reacción de Fenton). Este último es inocuo, se protona para formar agua; en cambio, el $HO\cdot$ es uno de los compuestos más reactivos que existen. El $HO\cdot$ casi no se puede difundir porque reacciona rápidamente ($10^9 M^{-1} s^{-1}$) y lo hace prácticamente con cualquier compuesto en el sitio en donde se produce. La urea es uno de los pocos compuestos con los que el $HO\cdot$ reacciona menos rápido ($10^5 M^{-1} s^{-1}$). La estimulación de la reacción de Fenton con el O_2^- es la reacción de Haber-Weiss ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow HO\cdot + HO^- + O_2$) ya que sólo ocurre en presencia de trazas de un metal de transición Hassanain y Goldschmidt-Clermont (2000).

La mayoría de los metales de transición contiene electrones desapareados. El Fe^{2+} tiene cuatro y el Fe(III) tiene cinco electrones desapareados; el Cu y el Cu^{2+} tienen un electrón

libre; el Cu^+ no tiene electrones desapareados pero acepta fácilmente uno para formar el Cu^{2+} . Por eso, muchos iones de los metales de transición son radicales y pueden participar donando o aceptando electrones. Así, el Fe^{2+} en solución cede un electrón al O_2 formando Fe(III) y O_2^- ; por el contrario, el Cu^{2+} y el Mn^{2+} aceptan un electrón del O_2^- con lo cual catalizan la dismutación del mismo. En cambio, el Zn^{2+} y el Al(III) no participan en reacciones de radicales. Tal vez por eso se utiliza el Zn^{2+} para estabilizar sobre todo las cisteínas de las proteínas como los factores de transcripción. En la célula, el hierro y el cobre pueden catalizar la autooxidación de compuestos como el NAD(P)H, el ascorbato, los tioles, las pteridinas reducidas y otros compuestos. La toxicidad del O_2^- y del H_2O_2 depende en gran medida de la disponibilidad y la distribución de estos metales de transición Babior y cols. (1997).

2.5.2 Efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre las membranas celulares

Las ROS son moléculas altamente reactivas que se producen normalmente en la célula aeróbica. Estas moléculas se caracterizan por tener un electrón desapareado y participan en reacciones de sustracción de hidrógeno, rotura de uniones y adición de radicales. Las ROS son capaces de oxidar lípidos de las membranas celulares, proteínas e hidratos de carbono, dañar ácidos nucleicos y despolimerizar al ácido hialurónico de forma tal que pueden llegar a producir la muerte celular (Fridovich, 1976).

Las membranas biológicas son estructuras laminares, finas, flexibles y relativamente estables que rodean a las células y sus orgánulos. Pueden considerarse como polímeros bidimensionales no covalentes que crean superficies químicas reactivas y que poseen funciones de transporte singulares entre los compartimientos. Son componentes versátiles y dinámicos, integrados de forma compleja en todos los procesos vivos, cuya función básica es actuar de barrera física selectiva impidiendo la salida de moléculas e iones fuera de la célula o de los orgánulos hacia sus alrededores, permitiendo la entrada oportuna de nutrientes y la eliminación de los productos de desecho. Además las membranas desempeñan un papel clave en el procesamiento de la información y la generación de energía (Mckee y Mckee, 2003).

Singer y Nicolson en 1972 propusieron un modelo, actualmente aceptado, que establece la disposición espacial de los lípidos y las proteínas en las membranas celulares, modelo del *mosaico fluido de membrana* (Singer y Nicolson, 1972; Paniagua y cols., 2003), en el que las proteínas, lípidos e hidratos de carbono, se sitúan en una configuración relativamente estable de baja energía libre. En éste modelo, la membrana está formada por una doble capa de lípidos, entre los que se intercalan proteínas que atraviesan total o parcialmente la bicapa. Los fosfolípidos se sitúan formando una bicapa con los restos acilo o colas hidrófobas situados en la parte central y las cabezas polares hidrófilas orientadas hacia los medios acuosos extra e intracelulares. Forman la matriz de la membrana. Hay unos cinco

millones de moléculas lipídicas por μm^2 de membrana. Entre los lípidos de las membranas de las células eucariotas destacan los fosfolípidos: fosfatidilcolina, esfingomiélin, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. También hay una concentración importante de esteroides, principalmente colesterol, que se incrusta paralelo al eje mayor del fosfolípido, con su grupo hidroxilo del carbono 3 orientado hacia las regiones hidrofílicas, mientras que la cadena lateral se dispone hacia la región hidrófoba de la bicapa de fosfolípidos. Las proteínas están intercaladas entre los lípidos a intervalos irregulares y se mantienen gracias a interacciones entre los lípidos y los dominios hidrofóbicos de las proteínas.

Las membranas celulares contienen fosfolípidos que tienen ácidos grasos con varios dobles enlaces. Estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monoinsaturados porque los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno (hidrógeno alílico). Las especies de oxígeno reactivas que pueden robar estos hidrógenos son el $\text{HO}\cdot$ y el $\text{HO}_2\cdot$. Una vez generado el radical carbono en un ácido graso, éste reacciona con el O_2 para formar un radical peroxilo. El radical peroxilo puede robar un hidrógeno alílico a otro metileno con lo cual se propaga la reacción. Así una reacción de iniciación puede generar muchos lipoperóxidos. El $^1\text{O}_2$ genera endoperóxidos con los ácidos grasos poliinsaturados que se descomponen en presencia de hierro formando radicales alcoxilo que contribuyen a la propagación de la lipoperoxidación. Los lipoperóxidos se pueden reducir mediante glutatión peroxidasas de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa A, que aumenta durante la tensión oxidativa Halliwell y Gutteridge, (1999).

2.5.3 Fluidez de membrana y función celular

La membrana se comporta como un fluido bidimensional anisotrópico donde las moléculas lipídicas y proteicas que lo constituyen se desplazan libremente en cualquier dirección del plano de la membrana, a diferencia de la viscosidad que es la resistencia al movimiento (Zimmer y Freisleben, 1988).

La fluidez de una bicapa lipídica, es decir la facilidad con la que las moléculas que la constituyen se desplazan en ella, es un factor determinante para su función y debe preservarse dentro de ciertos límites. Así, existe una fluidez óptima para funciones específicas de las membranas y su alteración modifica su función y puede presentar alguna patología (Reiter, 1998). El grado de fluidez de una bicapa lipídica depende de su composición y, sobre todo, de la naturaleza de las colas hidrocarbonadas de sus fosfolípidos: cuanto más regular y compacto sea su agrupamiento, más viscosa será la bicapa. El grado de empaquetamiento de las colas hidrocarbonadas en la bicapa lipídica depende de dos propiedades importantes: de su longitud y de su grado de insaturación, es decir, del número de enlaces dobles que contienen. Una menor longitud de la cadena reduce la interacción de las colas hidrocarbonadas entre sí y, por

ende, aumenta la fluidez en la bicapa. La longitud de las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos varía entre 14 y 24 átomos de carbono.

En cuanto a la insaturación, la mayoría de los fosfolípidos contienen una cola hidrocarbonada con uno o más enlaces dobles y una segunda que carece de ellos. Cada doble enlace en una cola insaturada determina la formación de una zona bisagra que dificulta el agrupamiento estrecho de las colas entre sí. Por ese motivo las bicapas lipídicas que contienen un alto porcentaje de colas hidrocarbonadas poliinsaturadas son más fluidas (Alberts y cols., 2006).

2.5.4 Fluidez de la membrana y estado de capacitación

La capacitación se define, como las modificaciones funcionales que hacen al espermatozoide capaz de 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, entre las células del cúmulo y la zona pelúcida del oocito (Ho y Suárez, 2001).

El colesterol es un componente lipídico de la membrana plasmática del espermatozoide. Niveles altos 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 presentan mejores propiedades crioresistentes que especies con bajos niveles de colesterol como el esperma de porcino y caprino (Parks y Lynch, 1992; Browers y cols., 2005).

Bailey y cols., (2008) indican que el enfriamiento y la criopreservación inducen en los espermatozoides de varias especies un estado similar a la capacitación y que esto puede ser una causa de la baja eficiencia de fertilización que presenta el semen post-descongelación. Esta capacitación inducida por la temperatura, se suele llamar criocapacitación (Cormier y cols., 1997).

Se supone que las transiciones de fase y las modificaciones en la arquitectura que experimentan 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 estado funcional inadecuado, similar a la capacitación (Bailey y cols., 2008). Actualmente, existe evidencia que demuestra que el proceso de criocapacitación no es equivalente a un estado de capacitación (Thomas y cols., 2006) y de acuerdo con los protocolos actuales que determinan el enfriamiento y controlan el congelado-

descongelado de los espermatozoides de porcino, no se induce a una capacitación espermática por si misma (Saravia y *cols.*, 2007).

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

Un método alternativo para la determinación de la capacitación es la tinción hidrofóbica merocianina 540 (M540). La merocianina 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; Langner y Hui, 1993), que se supone sucede en espermatozoides capacitados (Rathi y *cols.*, 2001).

Se ha detectado que la criopreservación causa la fragmentación del ADN del espermatozoide, la sobre condensación 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, la 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 y sanas (Anzar y *cols.*, 2002).

2.5.5 Envejecimiento y fluidez de membrana

El envejecimiento fisiológico es un proceso natural, complejo e irreversible, con múltiples manifestaciones, que tiene lugar a lo largo de la vida de un individuo y que se acompaña de un deterioro progresivo de la función celular (Yu, 1994; Crespo y *cols.*, 1997).

Existen dos grupos de teorías que intentan explicar las modificaciones biológicas asociadas al envejecimiento: las primeras son las de los cambios programados o teorías deterministas, que sostienen que las alteraciones de la edad están programadas genéticamente. El segundo grupo, el de las teorías estocásticas, que postulan que los cambios del envejecimiento son una consecuencia de la acumulación de daños aleatorios en moléculas vitales provocados por factores ambientales. Por ejemplo, el ácido desoxirribonucleico

experimenta cambios continuos en respuesta a agentes exógenos y factores intrínsecos, y se ha sugerido que el envejecimiento sería la consecuencia de mutaciones del ADN o de deficiencias de los mecanismos de su reparación. La teoría del envejecimiento causado por radicales libres pertenece a las estocásticas y sostiene que el envejecimiento es el resultado irremediable de nuestro metabolismo oxidativo. Entre los productos secundarios del metabolismo oxidativo se forman radicales libres tóxicos que reaccionan con el ácido desoxirribonucleico, el ácido ribonucleico, las proteínas y los lípidos, y son los responsables últimos del daño celular y de la pérdida de su función durante el envejecimiento (Harman, 1956).

Los lípidos de las membranas biológicas son muy sensibles a los efectos del envejecimiento. Entre sus cambios destacan: la peroxidación de los ácidos grasos insaturados, el incremento del contenido en colesterol y la pérdida de la asimetría funcional en la bicapa lipídica (Paniagua y cols., 2003). Se ha observado que en las ratas hay declive gradual de la fluidez de sus membranas con la edad, y que paralelamente se incrementa su contenido de lípidos saturados (Hubbard y Garratt, 1980). La expresión en las membranas biológicas de la teoría del envejecimiento mediado por radicales libres (Harman, 1956; Barber y Bernheim, 1967; Harman, 1984; Sohal y Weindruch, 1996) es su peroxidación lipídica que conlleva disminución de su fluidez (Vladimirov y cols., 1980).

2.5.6 Interacción entre las especies reactivas de oxígeno y los espermatozoides de porcino

El semen constituye un complejo sistema redox en donde interviene el potencial antioxidante del plasma seminal y de los espermatozoides con el potencial pro-oxidante del espermatozoide a través de la generación de ROS. El sistema de defensa antioxidante posee una actividad enzimática (superóxido dismutasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y catalasa), así como diversas sustancias con actividad antioxidante (glutatión reducido (GSH), urato, ácido ascórbico, vitamina E, taurina, hipotaurina, carotenoides y ubiquinonas). El glutatión (L-g- glutamil-L-cisteinilglicina) es un tri-péptido distribuido en todas las células del organismo y juega un papel decisivo en el mecanismo de defensa intracelular frente el estrés oxidativo. La enzima glutatión peroxidasa usa GSH como agente para reducir el peróxido de hidrógeno hasta agua y el lipoperóxido hasta alquil-alcohol. Por otro lado, la forma oxidada del glutatión (GSSG) se reduce hasta GSH mediante la enzima glutatión reductasa usando NADPH como cofactor. El contenido de glutatión (principal agente antioxidante no enzimático) se reduce durante el proceso de congelación (Bilodeau y cols., 2000, Gadea y cols., 2004; Molla y cols., 2004), así como se alteran las proteínas de la membrana espermática (Gadea y cols., 2004).

Los espermatozoides son particularmente sensibles al daño oxidativo debido a su composición estructural, aunque se encuentran protegidos contra la acción tóxica del O₂, debido a la presencia de la enzima glutatión- peroxidasa o la superóxido-dismutasa (Sanocka y Kurpisz, 2004), que están presentes tanto en el plasma seminal como en el gameto masculino. Estas enzimas antioxidantes son las principales defensas que posee el espermatozoide contra el daño por ROS (Storey, 1997).

La alteración del delicado balance entre la producción de ROS y la acción antioxidante de los sistemas de defensa, compromete las funciones normales del espermatozoide. En la especie humana se ha estudiado con profundidad la relación existente entre la excesiva producción de ROS y/o la disminución de los sistemas antioxidantes y la infertilidad (De Lamirande y cols., 1984). Las membranas del espermatozoide son muy susceptibles al ataque de ROS debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, lo que conlleva a generar peroxidación lipídica en la membrana plasmática, se altera su funcionalidad y se afecta finalmente la motilidad (Aitken, 1994). También se ha demostrado que las ROS disminuyen la concentración de ATP del espermatozoide, lo que conduce a una reducción en la fosforilación de proteínas del axonema y la consecuente inmovilización del espermatozoide (De Lamirande y cols., 1997).

Los espermatozoides requieren ROS para lograr la madurez funcional. Niveles basales fisiológicos de ROS son esenciales para que se consiga una fertilización normal, mediante la activación de la capacitación, de la hiperactivación, de la motilidad y de la reacción acrosómica (Griveau y Le Lannou, 1997; Agarwal y cols., 2004). Durante la capacitación, la concentración de Ca²⁺ intracelular, ROS y tirosín quinasa aumentan, lo que se traduce en un incremento de la cantidad de AMPc y a su vez, de la motilidad (Aitken y cols., 1995; Visconti y cols., 1995). Según Rivlin y cols. (2004), la generación de ROS ha sido relacionada con los procesos de capacitación y reacción acrosómica, sin embargo los mecanismos que regulan estos procesos no están hoy en día del todo claros.

Se han publicado numerosos estudios en los que se demuestra el papel de las ROS como promotores de la capacitación en modelos humanos y animales (De Lamirande y cols., 1997). En la capacitación espermática, se encuentran involucrados varios procesos bioquímicos entre los que se encuentran las reacciones redox que median en la fosforilación de la tirosina de las proteínas. Las ROS también ejercen su efecto sobre la interacción espermatozoide-ovocito, ya que bajos niveles de peroxidación lipídica provocan modificaciones de la membrana plasmática, facilitando la adhesión del espermatozoide al ovocito (Kodama y cols., 1996). Sin embargo, los niveles fisiológicos de ROS en el semen, así como la duración de la exposición a los mismos para poder provocar una función espermática normal que permita la fertilización, no están determinados.

La reacción acrosomal también puede ser inducida por ROS; el O_2^- y el H_2O_2 han sido detectados en estudios donde se indujo la reacción acrosomal con diferentes inductores (Aitken y cols., 1995; Griveau y cols., 1995). En el espermatozoide bovino, la reacción acrosomal puede ser inducida in vitro, por bajas concentraciones de H_2O_2 (25 mM), más aún, en esta especie, la célula espermática produce H_2O_2 en mayor cantidad que durante la capacitación O'Flaherty y cols. (1999; 2003).

2.6 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se define como el deterioro oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares. Este deterioro es autocatalítico y se propaga a lo largo de toda la bicapa lipídica, originando la pérdida progresiva de integridad y funcionalidad de la membrana (Tappel, 1973; Jones y Stewart, 1979; Svingen y cols., 1979; Kanner y cols., 1987). La aparición de este proceso peroxidativo va a depender de forma prioritaria de la capacidad de generar sustancias oxígeno reactivas, tanto por los propios espermatozoides alterados como por aquellos muertos (Wolff y Anderson, 1988; Aitken, 1994).

Los ácidos grasos poliinsaturados son componentes esenciales de las membranas celulares. Sin embargo, son muy vulnerables al ataque oxidativo de los radicales libres (Reilly y Bulkley, 1990; Gutteridge, 1995; Cadenas, 1997; Jerlick y cols., 2000; Venero-Gutiérrez, 2002).

La peroxidación lipídica representa una forma de daño celular que puede ser desencadenada por: 1O_2 , $ROO\cdot$, $RO\cdot$ y $\cdot OH$ (Kanner y cols., 1987; Halliwell y Gutteridge, 1990). Se inicia cuando un radical libre extrae un átomo de hidrógeno de la cola de ácido graso de un fosfolípido de la membrana, produciéndose a continuación un reordenamiento de los dobles enlaces del resto acilo, formando conjugados dienos, seguido de su combinación con una molécula de oxígeno, y de la formación de un $ROO\cdot$ y de otras moléculas como endoperóxidos y cicloperóxidos. El nuevo $ROO\cdot$ formado puede extraer un átomo de hidrógeno de un fosfolípido adyacente, iniciando así una reacción en cadena que se propaga por toda la membrana (Kanner y cols., 1987; Hunt y cols., 1988). Una vez formados, estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (Rangan y Bulkley, 1993).

Los factores que influyen en la magnitud de la peroxidación lipídica son: la naturaleza cualitativa y cuantitativa del agente iniciador, los contenidos de la membrana en ácidos grasos poliinsaturados y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, la presencia de hierro y el contenido celular de antioxidantes. La peroxidación lipídica se ha sistematizado en cuatro pasos: iniciación, propagación, ramificación y terminación (Tabla 1); sólo termina cuando los radicales libres interaccionan con moléculas antioxidantes o cuando se agota el sustrato, lo que implica la muerte celular. La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados en estas circunstancias produce su agotamiento y la formación de uniones cruzadas entre fosfolípidos o entre

fosfolípidos y proteínas (Bruch y Thayer, 1983; Curtis y cols., 1984). Esas alteraciones estructurales contribuyen a la pérdida de la fluidez y rigidez en las membranas biológicas cuando son expuestas a los radicales libres (Dobretsov y cols., 1977; Schroeder, 1984).

Un radical libre inicia una reacción en cadena que se extiende por toda la membrana pasando de un fosfolípido al vecino (Tabla 1). En (1.) la abstracción de un hidrógeno alílico genera un radical en un carbono, en (2.) éste puede migrar, con lo cual hay un reacomodo de los dobles enlaces. (3.) En presencia del dióxígeno se genera un radical peroxilo que se puede apropiarse de un hidrógeno de otro lípido, con lo que se propaga la reacción.

Tabla 1. Reacciones de peroxidación lipídica en membranas biológicas.

Paso	Mecanismo
1. Iniciación	$RH + RL \rightarrow R\cdot$
2. Propagación	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$
3. Ramificación	$ROOH \rightarrow RO\cdot + \cdot OH$ $2ROOH \rightarrow ROO\cdot + RO\cdot + H_2O$
4. Terminación	$RO\cdot + RO\cdot \rightarrow$ no polímeros $ROO\cdot + ROO\cdot \rightarrow$ no polímeros

Entre los productos generados durante el proceso oxidativo de los lípidos destacan el malonildialdehído (MDA) y los 4-hidroxiacetonales (4-HDA), moléculas cuantificadas en este trabajo como indicadores del grado de la peroxidación lipídica. Las moléculas generadas pueden ser muy tóxicas y capaces a su vez de provocar graves alteraciones en la membrana, como modificaciones en su fluidez (Bruch y Thayer, 1983; Garzetti y cols., 1993; Chen y Yu, 1994), en las proteínas que la integran (Esterbauer y cols., 1991; Subramaniam y cols., 1997; Refsgaard y cols., 2000; Zarkovic, 2003) e incluso la ruptura de la membrana (Halliwell y Gutteridge, 1990).

2.7 Selección de espermatozoides

La utilización de semen criopreservado en inseminación artificial, requiere de una mejora continua del proceso de congelación y además, minimizar la variabilidad individual demostrada entre verracos, con el objetivo de mejorar la congelabilidad de los eyaculados, (Roca y cols., 2006a). Las técnicas de separación de espermatozoides se utilizan ampliamente

en reproducción humana asistida (Henkel y Schill, 2003) para la eliminación de células de calidad inferior en el eyaculado o para disponer de células de mayor calidad en la IA, FIV o ICSI. En producción animal, las técnicas de separación han sido empleadas escasamente, ayudando a mejorar la calidad de los eyaculados de individuos de alto valor genético pero con calidades espermáticas inferiores lo que cada vez más se está volviendo atractivo para la industria del semen congelado. Además otro hecho interesante es que debido a que los métodos y procedimientos en el manejo de los espermatozoides a nivel de laboratorio puede en muchos casos ocasionar daños físicos a estas células, resulta interesante hacer una separación posterior a dichos procedimientos, de espermatozoides dañados, muertos o con pérdida de integridad de sus membranas y de esta manera disponer de una buena calidad espermática antes de un proceso de criopreservación (Morrell y cols., 2009f; Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009). Habida cuenta, que los espermatozoides afuncionales son perjudiciales, por su mayor producción de ROS por ejemplo, para la supervivencia de los espermatozoides funcionales a largo plazo (Hammadeh y cols., 2008), las técnicas de separación espermática constituyen una opción para la mejora de la calidad.

Existen diferentes técnicas para la separación y selección de los espermatozoides. La separación es el procedimiento más sencillo, en el que el único objetivo es separar los espermatozoides del plasma seminal y el método más utilizado es la centrifugación (Henkel y Schill, 2003). La selección tiene por objetivo separar al mismo tiempo los espermatozoides del plasma seminal y seleccionar una subpoblación de espermatozoides sobre la base de las características de calidad del eyaculado. La migración, la filtración y la centrifugación de coloides son tres técnicas disponibles para la selección de espermatozoides (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009).

2.7.1 Migración

La selección de espermatozoides por migración se basa en la capacidad de los espermatozoides móviles para desplazarse de un medio en suspensión a otro de composición diferente. La muestra original de esperma (semen diluido o lavado) puede alojarse por debajo, encima o al lado del medio de migración. Durante la fase de incubación, los espermatozoides migran activamente en el medio de selección (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009) de manera tal que el principal criterio de selección de los espermatozoides es más con base en la motilidad que en la morfología, la integridad de la cromatina, la viabilidad e integridad de acrosoma (Somfai y cols., 2002). La principal desventaja de la migración es la baja tasa de recuperación, lo que hace a la técnica poco práctica para su utilización en la preparación de dosis de inseminación artificial (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009).

2.7.2 Filtración

La filtración se logra por la interacción de los espermatozoides con las diferentes sustancias que conforman el filtro. Los espermatozoides no viables se adhieren más al sustrato del filtro en comparación con los espermatozoides móviles, lo que determina un aumento en la calidad de la filtración (Bussallou y *cols.*, 2008). La filtración permite el procesamiento de grandes volúmenes relativos, sin embargo, los leucocitos y las sustancias de desecho también atraviesan el proceso de filtración. Además, los espermatozoides se mantienen suspendidos en el mismo volumen que contiene el plasma seminal, lo que determina el requerimiento de un paso adicional de centrifugación (Henkel y Schill, 2003), o posiblemente una filtración para aumentar la concentración (Alvarenga y *cols.*, 2010).

2.7.3 Centrifugación de coloides

La centrifugación del semen a través de capas de coloides (una o más) se puede utilizar para separar espermatozoides del plasma seminal y para seleccionar una subpoblación de espermatozoides con buena motilidad, viabilidad e integridad de la cromatina (Pertoft, 2000). Las células se mueven hasta el punto en el gradiente de acuerdo con su densidad, es decir, su punto isopícnico, durante la centrifugación (Figura 3.) (Pretlow y Pretlow, 1989; Pertoft, 2000), en lugar de desplazarse activamente a través del coloide (Mortimer, 2000). Después de la centrifugación del mismo, el precipitado de espermatozoides se resuspende en un diluyente (medio de lavado) y se lava por centrifugación. El Percoll® fue el coloide utilizado por primera vez para la selección de los espermatozoides. En 1996, dicho gradiente estaba restringido para uso no clínico exclusivamente, debido a la posible toxicidad del producto (Avery y Greve, 1995; Mortimer, 2000). En la actualidad, diferentes coloides se han desarrollado según la especie. Recientemente, la mayor desventaja que presentaba la centrifugación coloide era la limitación en el volumen que podía ser procesado por centrifugación en tubo, y el tiempo que conllevaba la preparación de las diferentes capas de centrifugación del gradiente de densidad (DGC, Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009).

La centrifugación de una sola capa o capa única (SLC), ha sido descrita como una alternativa a la DGC para el procesamiento del semen, con resultados comparables en el rendimiento de recuperación de espermatozoides y características similares en la calidad del esperma (Morrell y *cols.*, 2008; Thys y *cols.*, 2009).. Además, la SLC puede ser utilizada para procesar grandes volúmenes de semen diluido (Morrell y *cols.*, 2009e) por tubo de centrifugación, lo que permitiría el procesamiento de todo un eyaculado.

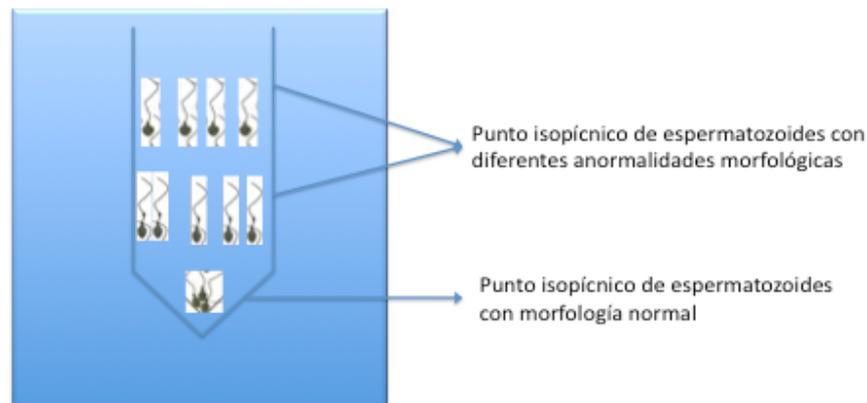


Figura 3. Representación esquemática de los espermatozoides después de la centrifugación coloidal. Los espermatozoides están ubicados de acuerdo con sus puntos isopícnicos en función de su morfología.

Entre las principales aplicaciones de la SLC se tiene: mejora de la calidad del espermatozoides en dosis de IA en equino (Mari, y cols., 2009); aumento de la "vida útil" *in vitro* en muestras de espermatozoides de equino Morrell y cols. (2009a) y porcino Morrell y cols. (2009b); eliminación de los patógenos Wallgren, y cols. (2010) Morrell (2009c) ; eliminación de espermatozoides muertos y moribundos antes de la criopreservación de los mismos; lo que mejoraría la criosupervivencia; o post-descongelación para seleccionar los espermatozoides vivos (Macías-García y cols., 2009a) Macías-García y cols. (2009b); selección de espermatozoides morfológicamente normales y con buena integridad de la cromatina para la IA García y cols. (2008), Morrell y cols. (2009d), ICSI Morrell y cols. (2010), o la fecundación *in vitro* Thys y cols. (2009), lo que aumentaría el rendimiento de los cigotos en desarrollo a la fase de blastocisto.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Andrología, del Grupo de Investigación “Reproducción Animal” de la Universidad de Murcia. Los métodos y procedimientos utilizados en la presente investigación han sido previamente valorados y aprobados por el Comité de Ética para la experimentación con animales de la Universidad de Murcia y se encuentran dentro de los Códigos de Buenas Prácticas de Investigación de la misma Universidad.

3.1 Materiales

3.1.1 Animales

Todos los eyaculados utilizados procedían de verracos adultos de las razas Duroc, Pietrain y Large White. Los verracos, de fertilidad contrastada y utilizados rutinariamente en programas de inseminación artificial, estaban ubicados en el Centro de Inseminación Artificial (CIA) que la Empresa AIM Ibérica tiene en la localidad murciana de Calasparra. En dicho CIA, los verracos se encontraban en jaulas individuales de unos 6 m² y bajo condiciones ambientales con temperatura controlada (23 ± 2 °C). Las jaulas estaban expuestas a la luz natural, la cual se suplementaba con luz eléctrica hasta completar un régimen luminoso de 16 h/d. Los verracos tenían a su disposición agua *ad libitum*. El régimen de manejo y alimentación era el propio de un CIA y corresponde a un requerimiento de energía que va desde 28'8 a 41'2 mega julios de energía digestible (MJ ED/d) para verracos de 100 a 350 kg respectivamente y sometidos a un ritmo de extracción de 2 veces por semana. El gasto mayor se asocia con las necesidades de mantenimiento, que suponen entre un 60-90 % del total de la energía consumida (desde 17 MJ ED/d para verracos de 100 kg hasta 26'9 y 35'3 MJ ED/d para verracos de 200 y 300 kg respectivamente). Las necesidades relacionadas con la producción seminal no representan más del 5 % de los requerimientos totales. Se asume un contenido de 13'0 a 13'5 MJ de ED (3 100-3 215 Kcal/kg), y se utilizaban niveles de alimentación entre los 2'2 kg/d para verracos de 100 kg de peso vivo (PV), hasta los 3'2 kg/d para animales de 350 kg con una temperatura ambiente de 20 °C. En la medida que disminuye la temperatura por debajo de los 20 °C aumentan las necesidades de mantenimiento para producir más calor metabólico, por lo que se incrementan las necesidades de energía en un 3 % (100 g extra de alimento concentrado por cada grado que disminuya la temperatura de la zona de confort térmico). Los requerimientos proteicos recomendados van desde un 15-17 % de proteína cruda con 0'7-0'8 % de lisina y 0'65 % aminoácidos azufrados (metionina + cistina) con una ingesta de proteínas de 250 g/d.

3.1.2 Reactivos químicos y medios utilizados

Todos los reactivos que se utilizaron fueron de la empresa Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA), salvo que se indique lo contrario. Los reactivos empleados en la

MATERIALES Y MÉTODOS

preparación de los medios y diluyentes fueron pesados en una balanza de precisión (Gram Precision Serie ST Mod. ST-120, A.R.W.T, Barcelona, España; Figura 4) y diluidos con agua bidestilada y purificada Milli-Q®, (Advantage A10® System, Millipore™, Billerica, MA. USA). Las diluciones fueron homogeneizadas con un agitador magnético (Mod. 234 P Agimatic, Selecta, Barcelona, España). El pH (Mod. GLP 21, Crison, Barcelona, España, Figura 5) y la osmolaridad (Mod. 5520, Vapro®, Vapor Pressure Osmometer, Wescor Inc. MA, USA, Figura 6) fueron comprobados tras la preparación de cada medio.



Figura 4. Balanza analítica de precisión utilizada para el pesaje de los diferentes componentes de los medios de dilución y cultivo empleados experimentos.



Figura 5. pHmetro (pH METER GLP 22) para controlar el pH de los medios de dilución y cultivo empleados en los experimentos.

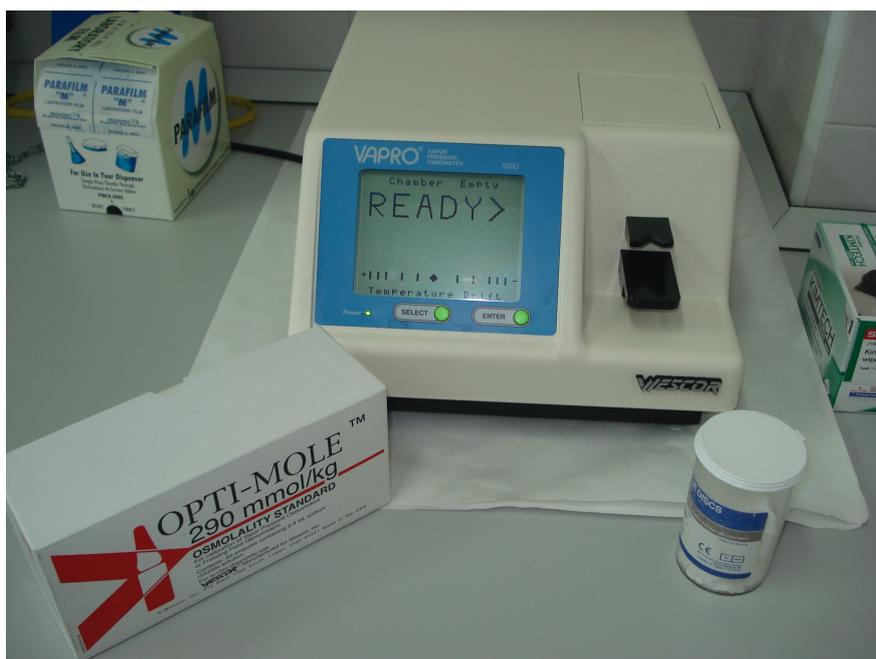


Figura 6. Osmómetro (Vapro®) empleado para controlar la osmolaridad de los medios de dilución y cultivo empleados en los experimentos.

3.1.2.1 Medios de dilución

Para la dilución del semen, tanto fresco como tras la descongelación, se empleó el medio Bestville Thawing Solution (BTS) descrito por Pursel y Johnson (1975) y cuya composición se muestra en la Tabla 2. El BTS también se utilizó en la determinación del Malondialdehído (MDA). El BTS fue preparado en una cámara de flujo laminar (Micro-R, Telstar, Terrassa, Barcelona, España) y, una vez confirmado que el pH y la osmolaridad se encontraban dentro del rango especificado, fue envasado en tubos Falcon de 15 ó 50 mL (BD Biosciences, San Jose, Ca, USA) y almacenado en un refrigerador a 5 °C hasta su uso, siempre dentro de la misma semana de su preparación.

Tabla 2. Composición del medio Beltsville Thawing Solution (BTS).

Componente	mM
Glucosa (G-6152, Sigma Aldrich)	205'0
Citrato de Sodio (G-4641, Sigma Aldrich)	20'4
Bicarbonato de Sodio (G-5761, Sigma Aldrich)	15'0
EDTA ¹ (ED-2SS, Sigma Aldrich)	3'6
Cloruro de Potasio (P-3911, Sigma Aldrich)	10'0
Kanamicina (K-4000, Sigma Aldrich)	0'07

pH: 7'2-7'4; Osmolaridad: 290±5 mOsm/kg

¹ Ácido etilendiaminetetraacético por sus siglas en inglés (Ethylenediaminetetraacetic acid)

El tampón fosfato salino (Phosphate Buffered saline, PBS) fue el medio específico que se empleó para diluir los fluorocromos utilizados en las distintas determinaciones citométricas de la calidad y funcionalidad espermática (Tabla 3).

Tabla 3. Composición del medio Phosphate Buffered saline (PBS).

Referencia	Componentes	mM
9888S	Cloruro de Sodio	137
P-3911	Cloruro de Potasio	2'7
S9638	Na ₂ HPO ₄	0'86
S-9390	Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	6'2

pH: 6'8; Osmolaridad: 292±2'2 mOsm/kg

Para la congelación espermática se utilizaron dos diluyentes, el primero fue el medio básico TRIS-Yema de huevo (TRIS-Y), con el cual fue se diluyó el pellet espermático a 17 °C, después de la centrifugación de la muestra seminal y la eliminación del sobrenadante (compuesto principalmente de plasma seminal y BTS). La composición cualitativa y cuantitativa del TRIS-Y se enumera en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio básico de congelación espermática TRIS-Yema de huevo (Carvajal y cols., 2004).

Referencia	Componentes	mM
T-1503	Trizma® base ¹	111mM
G-6152	Glucosa	185mM
C-1990	Acido cítrico monohidratado	31'4mM
K-4000	Kanamicina	80 µg/l
irrelevante	Yema de huevo	20%

pH: 6'0-6'3; Osmolaridad: 320-330 mOsm/kg

¹Trizma®: tris(hidroximetil) aminometano

La yema de huevo procedió de huevos frescos y se recogió bajo estrictas condiciones de asepsia. Para ello, antes de la manipulación, a los huevos se les limpió la cáscara con etanol y, una vez rotos, se separó cuidadosamente la yema de la clara con ayuda de un papel de filtro. Las yemas obtenidas se depositaron en una probeta estéril y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

Una vez elaborado el TRIS-Y se centrifugó a una velocidad de 4.300 x g durante 30 min a 5 °C. Después de dicha centrifugación se observaron tres fracciones de coloración diferente por cada tubo. Se descartó la primera y tercera fracción, y únicamente se utilizó la fracción intermedia, la cual se depositó en tubos Falcon estériles de 15 mL y se conservó a -20 °C hasta su empleo.

El medio TRIS-Yema de huevo-Glicerol (TRIS-Y-G) es el segundo diluyente de congelación, el cual se añadió después del segundo descenso de temperatura cuando la muestra alcanzó 5 °C. Dicho diluyente se elaboró el mismo día de la congelación a partir del medio TRIS-Y al que se le añadió un crioprotector (glicerol) y un detergente (Equex STM (Nova Chemical Sales Inc., Scituate, Mass, USA), tal y como se especifica en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición del diluyente de congelación espermática TRIS-Yema de huevo-Glicerol (TRIS-Y-G; Carvajal y cols., 2004).

Componentes	%
TRIS-Y	89'5
Glicerol (G5150, Sigma Aldrich)	9
Equex STM Paste	1'5

pH: 6'0-6'3; Osmolaridad: 1650-1750 mOsm/kg

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 6. El medio TBMb una vez preparado se conservó a 5 °C durante un máximo de 15 d. Para preparar el TBMc, al medio TBMb se le agregó cloruro de calcio, cafeína y BSA 2 h antes de su utilización. 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 6. 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 de sodio (mM)	5'0	5'0
T1503	Trizma [®] base ¹ (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 ² (mg/mL)	---	2'0

Osmolaridad (mOsm/L), TBMb = 290-310. TBMc = 290-310

¹Trizma[®] base: tris(hidroximetil)aminometano; ²BSA: albúmina sérica bovina.

3.1.2.2 Preparación de los fluorocromos

Para la valoración, se preparó una solución stock de bis Benzimide trihydrochloride (H-42; Hoechst-33342; B2261, Sigma-Aldrich), diluyendo la solución madre hasta 5 mg/mL (p/vol) en agua bidestilada. Esta dilución se almacenó a 4 °C en alícuotas de 1 mL. Previo a su utilización se preparó y se diluyó 1:100 (vol/vol) en PBS (10 µL Hoechst-33342 + 990 µL PBS). Posteriormente se elaboró la solución stock de Yoduro de propidio (IP) (componente B del kit de viabilidad espermática LIVE/DEAD (L-7011); Molecular Probes Europa, Leiden Holanda), a una concentración de 1 mg/mL a partir de la dilución en agua purificada de la solución madre de 2'4 mM. Al momento de su utilización se realizó una nueva dilución 1:2 (vol/vol) en PBS para alcanzar una concentración de 0'5 mg/mL (50 µL PI+50 µL PBS). El último fluorocromo utilizado para la triple tinción de viabilidad fue el conjugado de lecitina de *Arachis hypogaea* con Fluoresceína-Isotiocianato (PNA-FITC, Sigma L-7381). Para ello, se realizó una dilución de la solución stock hasta 200 mg/mL y se prepararon alícuotas de 250 mL. Todos los reactivos fueron almacenados a 4 °C protegiéndolos de la luz hasta su utilización.

La tinción de Merocianina 540 (M540) y Yo-Pro 1 [(Quinolinium, 4-0(((3-methyl-2(3H)-benzoxazolyli- dene) methyl)-1-03-(trimethylammonio) propyl)-, di-iodide, YP1], se empleó para evaluar la estabilidad de la membrana plasmática siguiendo una modificación del protocolo descrito por Harrison y *co/s.* (1996). La M540 es una tinción hidrofóbica usada para monitorizar el desorden lipídico de la membrana celular, lo que indica cierta desestabilización de la membrana, similar a la que sucede durante el proceso de capacitación espermática (Harrison, 1997), mientras que el YP1, es una carbocianina impermeable a la membrana que se liga al ácido desoxirribonucleico (DNA), indica la viabilidad de la célula espermática. Inicialmente, 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 1.755 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solución se almacenó en alícuotas de 5 µL y se conservaron a - 20 °C hasta su utilización. La solución de trabajo se preparó añadiendo 500 µL de PBS a una alícuota, para obtener una concentración de 1 mM de M540. Esta solución se puede conservar hasta 2 semanas a 4 °C. Para la tinción de 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 µL YP1 + 200 µL de PBS) para lograr una concentración de 25 µM. La solución final se conservó a 4 °C durante una semana.

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)-clormetil-2', 7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína, acetil ester]. El fluorocromo CM-H₂DCFDA (C6827, Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, USA) es estable, permeable, penetra libremente a través de la membrana plasmática de 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), que 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 mg) 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*-butilhidroperóxido (TBHP, en 70 % H₂O, C₂H₁₀O₂, B2633, Sigma Aldrich, St. Louis, MO- USA). El TBHP provocará en los espermatozoides, en mayor o menor medida, en función 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 prepara diariamente antes de cada experimento. La solución inductora final fue de 1 mM (1 µL de TBHP 1 M en 1000 µL de muestra diluida).

3.1.2.3 Preparación de soluciones del kit MDA-586

Para la determinación de la cantidad de Malondialdehído (MDA) producida por las muestras seminales se empleó el kit comercial OXIS Bioxytech MDA-586-KIT (OxisResearch, Burlingame, California, USA, Figura 7), basado en el procedimiento descrito por Gerard-Monnier y cols. (1997) y Erdelmeier y cols. (1997) que contempla las siguientes soluciones de trabajo, las cuales deben ser preparadas el mismo día de lectura en una campana de flujo de gases (Modelo NST 1200, Burdínola, Amoroto Bizkaia, España, Figura 8). La solución de trabajo de MDA (20µM) se preparó haciendo una dilución 1/500 del estándar de MDA en ddH₂O y se refrigera a 0-4 °C. Luego, se diluyen 3 µL de estándar de MDA en 1'5 mL de ddH₂O. Previamente, la solución de trabajo R^{*1} se hizo agregando un volumen de metanol a tres volúmenes de reactivo R¹ y se refrigera a 4 °C. Esta solución es estable durante 2 d. Debido a que estos reactivos se evaporan muy rápidamente, es necesario que a la cantidad que se requiere para las muestras, se le añada el 20% del total para evitar que al evaporarse las muestras puedan quedar incompletas. Por lo que, para 4 pajuelas y considerando la curva de calibración, se necesitará 3.168 µL de R¹ + 1.056 µL de metanol. La solución para la muestra control, y de la misma forma que la solución anterior, debe considerar el 20% extra sobre el total que se utilizará para procesar las muestras. Se preparó (considerando 4 pajuelas y 2 controles por cada una) una mezcla de un volumen de metanol con tres volúmenes de acetonitrilo, es decir 384 µL de metanol + 1.152 µL de acetonitrilo. Por último la solución de Fe²⁺/Ascorbato (para liberar el MDA) fue preparada al mezclar 11 mg de FeSO₄·7H₂O (melanterita) y 40 mg de ascorbato de sodio en 10 mL de ddH₂O (4 mM Fe²⁺/20 mM de ascorbato). Una vez preparada, la mezcla se envasó en tubos falcon con la menor

* Solución de N-methyl-2-phenylindole en acetonitrilo.

cámara de aire posible, y, una vez selladas con parafilm, para evitar la evaporación, se conservaron a 5 °C hasta el momento de su utilización.



Figura 7. Kit OXIS, Bioxytech® MDA-586™ ASSAY empleado para la determinación de la producción de malondialdehído por los muestras seminales.



Figura 8. Campana de gases NST 1200, Burdinola empleada para preparar las soluciones de trabajo para la cuantificación de Malondialdehído (MDA).

3.2 Métodos

3.2.1 Recolección del semen

Cada eyaculado se recogió por el método manual y se descartaron las fracciones pre y post- espermáticas, de esta manera únicamente se procedió a recolectar la fracción rica en un recipiente previamente atemperado. Inmediatamente después de la recogida, el eyaculado se colocó en un baño termostatzado a 37 °C y se diluyó 1:1 (vol/vol) en BTS. A continuación, se evaluó, mediante técnicas estándar de laboratorio, la cantidad y calidad espermática. Después de depositar el semen en tubos falcon de 50 mL, precalentados y protegidos de la acción directa de la luz, las muestras seminales se refrigeraron lentamente hasta los 17 °C. Los eyaculados se trasladaron, en cajas de poliespán debidamente selladas y con monitorización de la temperatura interior del envase (Miniature data logger, Gemini Data Loggers, Ltd., Chichester, UK.), al Laboratorio de Andrología del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia. Las muestras seminales llegaron al laboratorio entre 5 y 6 h después de su recogida.

3.2.2 Criopreservación espermática

Para todas las experiencias desarrolladas se emplearon eyaculados individualizados y la criopreservación se realizó mediante el procedimiento descrito por Thurston y *cols.* (2001) y modificado por Carvajal y *cols.* (2004) y Hernández y *cols.* (2007). En el laboratorio, la fracción rica diluida fue centrifugada a 2400 x g durante 3 min a 17 °C utilizando para ello una centrífuga refrigerada (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0R; Hanau, Alemania, Figura 9) y el sobrenadante fue descartado (Figura 10). Los espermatozoides sedimentados en el fondo de los tubos fueron re-diluidos, dentro de una vitrina térmica a 17 °C (IMV, L'Aigle, Francia), en diluyente TRIS-Y hasta alcanzar una concentración de 1.5×10^9 espz/mL. A continuación, se procedió al enfriado de los espermatozoides re-diluidos hasta 5 °C a lo largo de 150 min; este descenso de temperatura fue gradual, por lo que los tubos fueron sumergidos en agua a 17 °C, en recipientes colocados en el interior de la vitrina térmica (Modelo 230V14335/0403, Minitüb,; Figura 11). Una vez alcanzados los 5 °C, se añadió el diluyente TRIS-Y-G hasta alcanzar una concentración de 1×10^9 espz/mL. Inmediatamente fueron envasadas manualmente en pajuelas de 0.5 mL (Figura 12), las cuales fueron selladas mediante el empleo de una selladora automática (Ultraseal 21™, Minitüb, Tiefenbach, Alemania; Figura 13) dentro de la vitrina térmica a 5 °C. La congelación de las pajuela se realizó empleando dos rampas de congelación. La primera se llevó a cabo sometiendo las pajuelas a la acción de los vapores de nitrógeno líquido durante 20 min, empleando para ello en una caja de poliespán preparada para tal fin (Modelo 15043/0636, Minitüb, Figura 14). La distancia establecida entre las pajuelas y el nitrógeno líquido fue de 4 cm. Posteriormente, las pajuelas se sometieron a la segunda rampa de congelación, para lo cual se sumergieron por completo

MATERIALES Y MÉTODOS

en el interior del nitrógeno líquido (-196 °C), hasta alcanzar dicha temperatura, lo cual sucede en unos 2-3 min. Una vez congeladas las pajuelas, se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido (MVE XC47/11-10, MVE Inc, Burnsville, MN, USA.) hasta el momento de su evaluación. En todos los casos se procedió a la descongelación de las pajuelas tras 7-15 d después de su congelación.



Figura 9. Centrifuga Megafuge 1.0R refrigerada a 17 °C empleada para concentrar el pellet de espermatozoides antes de iniciar el proceso de criopreservación.



Figura 10. Eliminación del sobrenadante (plasma seminal y diluyente) posterior a la centrifugación.



Figura 11. Recipiente con agua para el descenso gradual de temperatura y vitrina térmica a 5 °C.



Figura 12. Envasado manual de las pajuelas de 0'5 mL empleando para ello una jeringuilla de insulina.



Figura 13. Sellado de las pajuelas de semen mediante la selladora Ultraseal 21™.



Figura 14. Unidad de congelación para 20 pajuelas de 0'5 mL.

Las descongelaciones se realizaron en un baño termostatzado (Huber Polystat cc1, LabWrench, Midland, ON, Canadá, Figura 15) a una temperatura de 37 °C agitando las pajuelas de manera suave y constante durante 20 s en su interior. Transcurrido este tiempo, las pajuelas se retiraron del baño y se procedió al secado de las mismas para eliminar la totalidad del agua superficial. Posteriormente, tras cortar el extremo de la pajuela, su contenido fue vertido a un tubo eppendorf graduado. El contenido de cada pajuela fue mezclado y diluido inmediatamente en BTS (1:2, vol/vol) a 37 °C. Temperatura a la que fue mantenida la mezcla seminal hasta finalizar las pruebas analíticas de calidad espermática.



Figura 15. Descongelación de las pajuelas en el baño termostatzado a 37 °C.

3.2.3 Valoración de la cantidad y calidad espermática

3.2.3.1 Concentración espermática y porcentaje de espermatozoides con morfología normal

La evaluación de la concentración espermática se llevó a cabo con el contador de núcleos de espermatozoides (Chemometec, NucleoCounter® SP-100™ system AN-101, Allerød, Denmark, Figura 16). Una vez establecido el factor de dilución adecuado para el ámbito de concentración de la muestra seminal a evaluar, se añadió 5'0 μ L de la muestra seminal a 1000 μ L de solución reactivo Reagent (Reagent S100, Chemometec). Después de agitar homogéneamente se tomo una muestra mediante aspiración, presionando el pistón del casete (SP1-Cassette, Chemometec, Figura 17). Los resultados de concentración fueron expresados en millones de espermatozoides por mililitro (mill espz/mL).

Para determinar la morfología espermática, las muestras seminales fueron diluidas 1:100 (vol/vol) en solución salina al 0'9 % de cloruro de sodio (S-9888, Sigma-Aldrich) suplementada con 0'3 % (vol/vol) de formaldehído al 37 % (F-1635, Sigma-Aldrich). Posteriormente, se determinó 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 y se clasificaron en dos categorías: con morfología normal o anormal. Este último grupo contemplaba los defectos morfológicos de la cabeza, pieza intermedia y cola espermática, además de las gotas citoplasmáticas proximales. Los resultados se expresaron como espermatozoides morfológicamente normales.



Figura 16. Contador de núcleos espermáticos para valorar la concentración espermática.

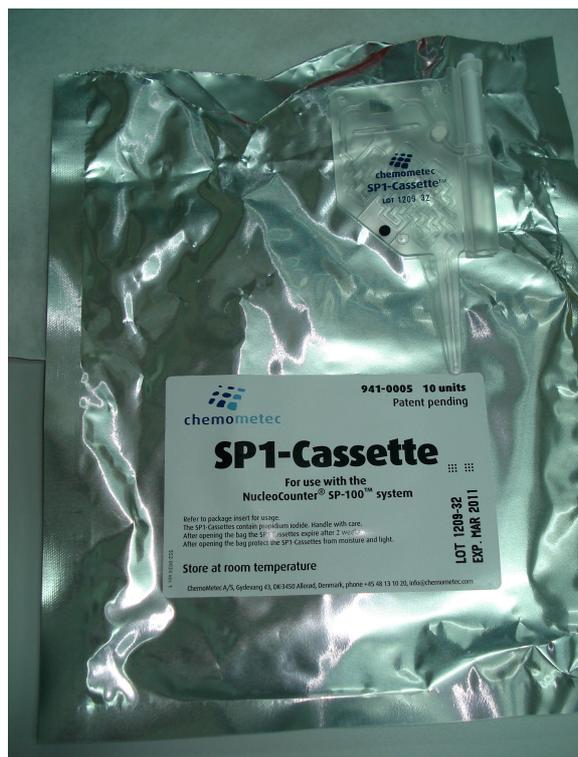


Figura 17. Casetes para determinar la concentración espermática.

3.2.3.2 Parámetros de motilidad espermática

El análisis de la motilidad y la cinética del movimiento espermático se realizó mediante un sistema de análisis objetivo de la motilidad (Integrated Semen Analysis System ISAS[®], ISAS, Proiser SL, Valencia, España, Figura 18). Según el protocolo descrito por Cremades y cols. (2005), las muestras espermáticas se diluyeron de forma seriada hasta una concentración final de 30×10^6 espz/mL. De cada una de las muestras, se depositó una alícuota de 5 μ L en una cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments; Haifa, Israel, Figura 19) atemperada en una placa térmica a 38 °C (Proiser, Ser. : 2010040, Figura 19). Dicha muestra se visualizó en un microscopio de contraste de fases (UOP; Model UB 200 i Series, Proiser SL, Valencia, España) equipado con una placa térmica (HT400, Minitüb; Tiefenbach, Alemania) con el objetivo de 10x de campo oscuro. Para la captura o adquisición de las imágenes se incorporó al microscopio una cámara de video (ISAS 782 M) conectada a un ordenador (Intel[®] Core™ i3) dotado del programa informático ISAS V.1.2. Cada una de las muestras fue sometida a 6 capturas de series de imágenes, siendo el número mínimo de espermatozoides analizados por muestra de 600. La motilidad se registró en porcentaje del total de espermatozoides móviles (espermatozoides con una velocidad media de la trayectoria, VAP, ≥ 20 μ m/s) y de aquellos que presentaban movimiento progresivo (espermatozoides con una velocidad rectilínea, VSL, ≥ 40 μ m/s). Asimismo, la motilidad se expreso o bien tal y como se registró o como porcentajes de recuperación (Figura 20). Es decir, espermatozoides móviles totales y móviles progresivos recuperados a la

descongelación respecto a los porcentajes existentes en las mismas muestras seminales antes de congelar (muestras conservadas 24 h a 17 °C).

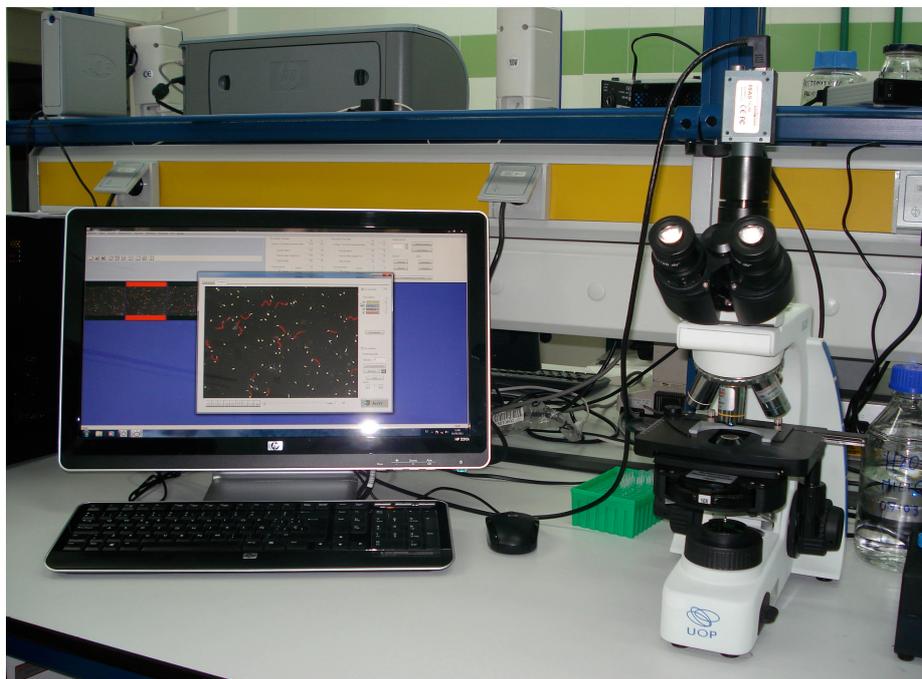


Figura 18. Sistema ISAS[®] para la valoración objetiva de los parámetros de motilidad espermática.

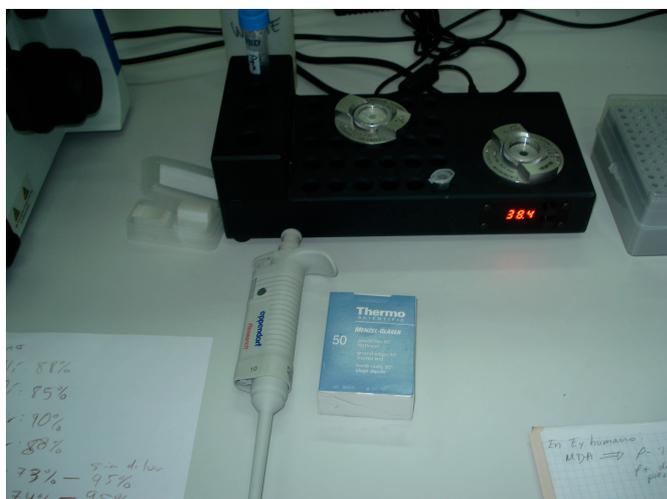


Figura 19. Cámara de Makler y placa calefactora Proiser empleadas para preparar las muestras seminales destinadas a evaluar los parámetros de motilidad espermática.

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Espermatozoides móviles antes de congelar (\%)} \times 100}{\text{Espermatozoides móviles al descongelar (\%)}}$$

Figura 20. Fórmula empleada para definir el porcentaje de espermatozoides móviles recuperados tras la congelación-descongelación.

3.2.3.3 Viabilidad espermática e integridad acrosómica

La viabilidad y la integridad acrosómica fueron expresadas como el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática y acrosomal intacta. Estas características fueron evaluadas simultáneamente utilizando una triple tinción fluorescente según el protocolo descrito por Gillan *y cols.* (2005), con modificaciones y adaptada para espermatozoides de porcino y citometría de flujo. Esta tinción incluye la utilización de los fluorocromos H-42, IP y PNA-FITC. El H-42, que penetra en todos los espermatozoides y se une al ADN de los mismos, permite identificar las células espermáticas dentro de la muestra y así descartar posibles errores de lectura debido a la presencia de otras partículas presentes en el medio (restos de yema de huevo) que puedan interferir en el análisis. El IP, fluorocromo con afinidad por el ADN, tiñe de rojo la cabeza de los espermatozoides que presentan pérdida de integridad de la membrana plasmática. El conjugado PNA-FITC, que marca de verde el interior y la membrana acrosómica de aquellos espermatozoides con daño acrosomal. Los espermatozoides se diluyeron gradualmente en BTS hasta una concentración de $25\text{-}30 \times 10^6$ espz/mL. A 100 μL de esta dilución se le añadieron 2'5 μL de H-42, 2'0 μL de IP y 5'0 μL de PNA-FITC. Las muestras se incubaron 10 min en una estufa (MIR 153 incubator, Sanyo; Gunma, Japón) a 38 °C. Posteriormente, tras la incubación, se realizaron los análisis mediante un citómetro de flujo (BD FACS Canto II™, Becton, Dickinson & Co, San Jose, Ca. USA, Figura 21). Los fluorocromos fueron excitados por un láser azul ión-argón de 488 nm y un láser violeta de 405 nm. La fluorescencia roja de IP se detectará con un filtro de paso largo (LP) de 670 nm, la fluorescencia verde de PNA-FITC se medirá con un filtro de paso de banda (BP) de 530/30 nm y la fluorescencia azul de H-42 con un BP de 450/50 nm. Se evaluaron 10.000 espermatozoides por muestra, considerando como espermatozoides viables y con el acrosoma íntegro a los positivos al H-42 a la vez que negativos a IP y FITC-PNA. El resultado, igual que en la motilidad, fue considerado como porcentaje de espermatozoides viables y con el acrosoma intacto presente en la muestra de semen antes de la congelación o después de la descongelación, y/o como porcentaje de recuperación a la descongelación.



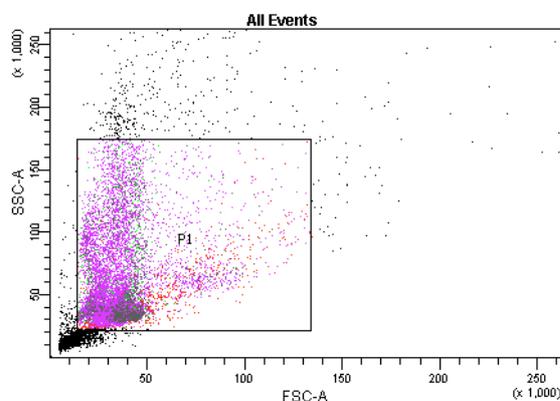
Figura 21. Citómetro de flujo (BD FACS Canto II™) empleado para los análisis de citometría.

3.2.3.4 Funcionalidad espermática

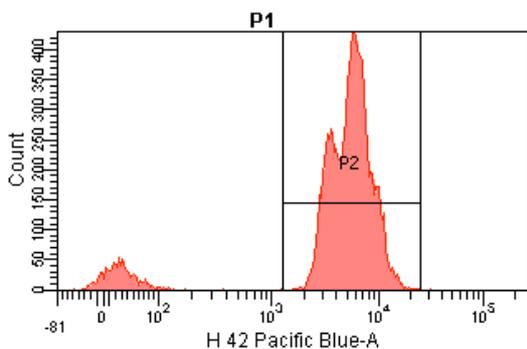
La funcionalidad espermática se valoró en términos del grado de desestabilización de la membrana plasmática en espermatozoides sometidos a un proceso de capacitación *in vitro*. Para evaluar el grado de desestabilización de la membrana plasmática se utilizó la triple tinción fluorescente compuesta por H-42 (Figura 22a,b), M540 (identifica el desorden lipídico) y el YP1 (identifica espermatozoides no viables, Figura 22c). Para ello, se tomaron 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, posterior a su incubación a 37 °C durante 8 min en la estufa, se le agregó 2'6 μ L de M540 (1 mM en PBS). Después de incubarlo durante 2 min, se procedió a la lectura por citometría. Los resultados se expresaron como el porcentaje de espermatozoides viables (negativos a YP1) con membrana plasmática inestable o desestabilizada (positivos a M540). Los fluorocromos fueron excitados por un láser azul ión-argón de 488 nm y un láser violeta de 405 nm. 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 paso largo (LP) de 670 nm, la fluorescencia de YP1 se cuantificó con un filtro de paso de banda (BP) de 530/30 nm y la fluorescencia azul de H-42 con un BP de 450/50 nm. Las subpoblaciones espermáticas (Figura 22d) fueron subdivididas en tres cuadrantes en los que se observaba 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. Los datos se presentan como porcentajes de M540 positivo normalizado. El dato porcentual de M540 positivo que arroja el citómetro se calcula como porcentaje sobre el total de células viables y no viables, de tal manera que la normalización incluye un nuevo cálculo ponderacional para determinar; en términos porcentuales igualmente; cuál es el equivalente de M540 positivo proveniente únicamente de la población de espermatozoides viables. Además, se consideraron sólo aquellos espermatozoides con M540 alta, es decir que mostraban signos de capacitación espermática.

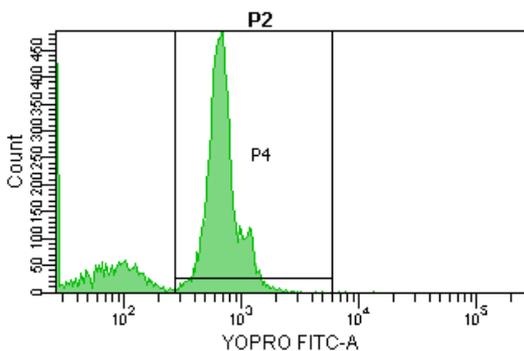
a.



b.



c.



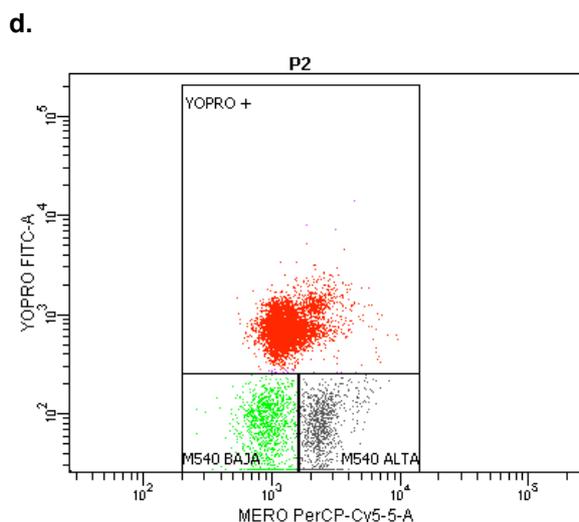


Figura 22. Representación gráfica mediante diagrama de puntos e histogramas de las poblaciones de espermatozoides valoradas por citometría de flujo para la determinación de la desestabilización de la membrana plasmática. **(a)** Población total de eventos, en el interior del recuadro se selecciona las células espermáticas en función de su tamaño y grado de complejidad (P1). **(b)** Población (en porcentaje) de espermatozoides teñidos con H-42, que deriva de P1. **(c)** Porcentaje de células no viables (YP1+) **(d)** El cuadrante inferior izquierdo contiene células viables (YP1 negativo) y con membrana plasmática estable (M540 negativo). El cuadrante inferior derecho presenta células viables (YP1 negativo) y con membrana plasmática inestable o desestabilizada (M540 positivo). En el cuadrante superior se encuentran los espermatozoides no viables (YP1 positivo).

3.2.3.5 Producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (ROS)

La producción intracelular de ROS en los espermatozoides vivos tras el proceso de congelación-descongelación fue determinado mediante la utilización de forma conjunta de los fluorocromos H-42, CM-H₂DCFDA e IP, y cuantificada por citometría de flujo de acuerdo con una modificación del método descrito por Guthrie y Welch (2006). A partir de una muestra seminal diluida a 30×10^6 espz/mL, se prepararon tres sub-muestras de 1 mL (950 μ L de BTS a 37 °C + 50 μ L de la muestra seminal), cada cual con una concentración de 1.5×10^6 células (dilución 1:20 vol/vol). A cada sub-muestra se le agregaron 1.25 μ L de H-42 y 1.0 μ L de IP. Posteriormente, a dos de las sub-muestras, se le adicionaron 1.0 μ L de la solución CM-H₂DCFDA y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Asimismo, a una de estas dos sub-muestras se le adicionó, previo a la incubación, 1.0 μ L de la solución de TBHP con el objetivo de inducir la generación intracelular de ROS. A la cantidad final de ROS (cuantificada como intensidad de fluorescencia) producida en cada una de las dos sub-muestras mencionadas se le restaron los niveles de ROS detectados en la tercera sub-muestra a la que solamente se le agregaron H-42 e IP, para obtener los niveles basales e inducidos de ROS. Las tinciones fueron excitadas con un láser de argón de 488 nm. La fluorescencia verde de CM-H₂DCFDA, fue identificada con un filtro de 525 nm, la fluorescencia roja del IP con uno de 620 nm y la fluorescencia azul del H-42 con uno de 450/50 nm. La intensidad de

fluorescencia de DCF (Figura 23c) fue expresada inicialmente como unidades de fluorescencia (UF) por millón de espermatozoides vivos y posteriormente como UF en 10^{12} espermatozoides al multiplicar por el factor 1×10^6 . La población total de eventos que pasaron por el láser del citómetro, la población de células teñidas con H-42 y la población de espermatozoides teñidos con IP se presenta en las Figuras 23a, 23b y 23d, respectivamente. Los datos se presentan en los resultados como intensidad de fluorescencia inducida (F_{IND}). Esta fluorescencia se obtiene al sustraer a la fluorescencia con inductor (F_{TBH}), la fluorescencia Basal ($F_{IP,H42}$). Las ecuaciones de las F_{TBH} y $F_{IP,H42}$ se describen a continuación.

$$F_{TBH} = (F_{TBH} / 10^6 \text{ espz vivos}) * (10^{12} \text{ espz})$$

$$F_{BASAL} = (F_{IP,H42} / 10^6 \text{ espz vivos}) * (10^{12} \text{ espz})$$

$$F_{IND} = F_{TBH} - F_{BASAL}$$

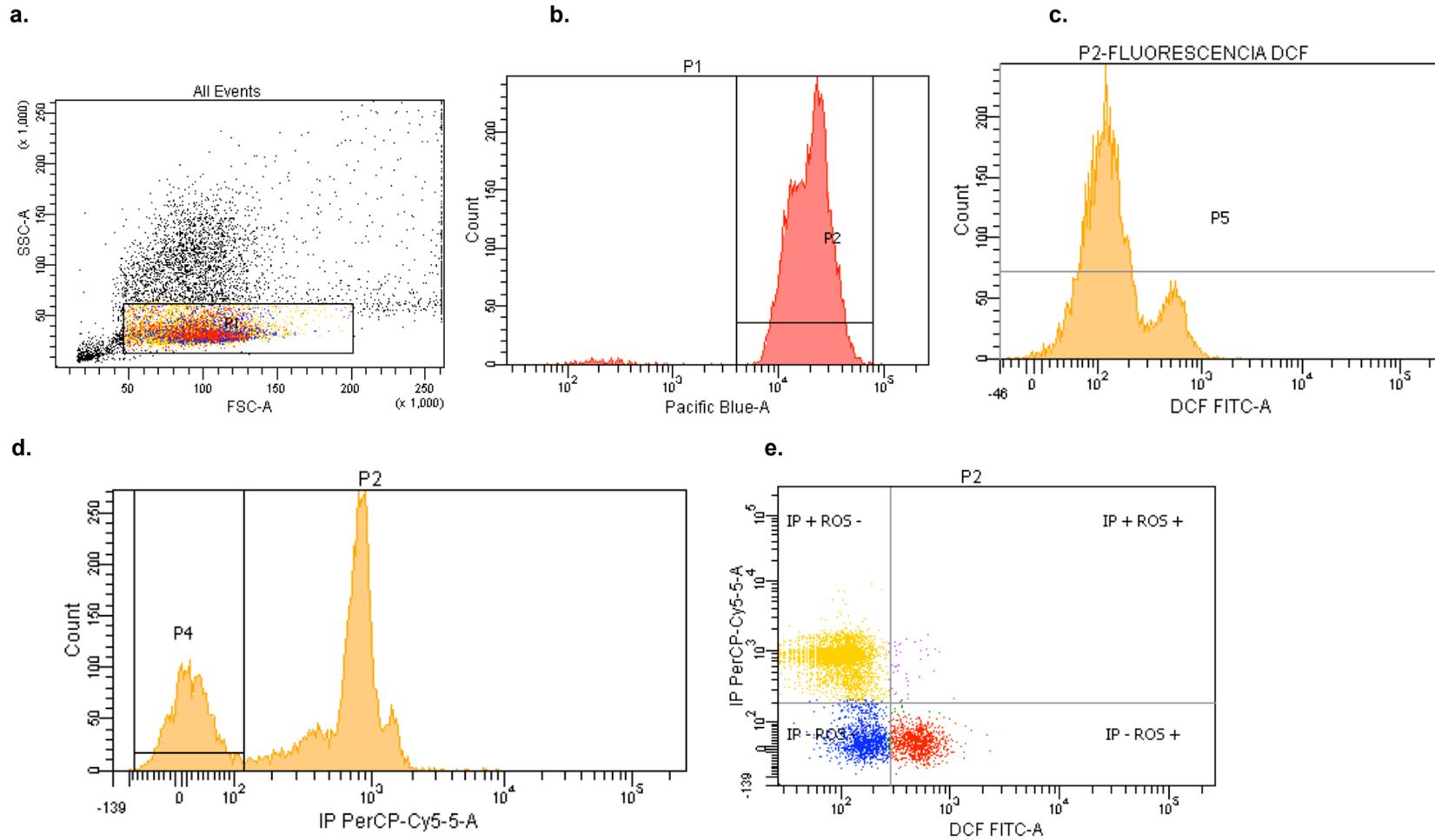


Figura 23. Representación gráfica mediante diagrama de puntos e histogramas de las poblaciones de espermatozoides valoradas por citometría de flujo para la determinación de las especies oxígeno reactivas. (a) Población total de eventos, en el interior del recuadro se selecciona las células espermáticas en función de su tamaño y grado de complejidad (P1). (b) Población (en porcentaje) de espermatozoides teñidos con H-42, que deriva de P1. (c) Intensidad de fluorescencia del DCF. (d) Porcentaje de células vivas (IP negativo). (e) El cuadrante inferior izquierdo contiene células viables con un nivel intracelular bajo de sustancias oxígeno reactivas (IP- ROS-). El cuadrante inferior derecho presenta células viables con una alta producción de ROS (IP- ROS+). En los cuadrantes superiores izquierdo y derecho se encuentran los espermatozoides no viables.

3.2.3.6 Determinación de la concentración de Malonildialdehído (MDA)

Para preparar la muestra para los análisis, de cada pajuela descongelada [500×10^6 espz y diluida 1:2 (vol/vol) en BTS] se tomaron $60 \mu\text{L}$ (30×10^6 espz) y se depositaron en un eppendorf que contenía $500 \mu\text{L}$ de BTS y estaba atemperado a 37°C , al que se la añadió a continuación BTS hasta completar un volumen de $1000 \mu\text{L}$. A partir de esta muestra se prepararon 6 sub-muestras, 4 de ellas para medir la concentración de MDA y otras 2 como controles, de $100 \mu\text{L}$ cada una. A cada una de las 4 sub-muestras destinadas a medir la concentración de MDA se les agregó la solución FE^{2+} /Ascorbato a razón de 1/100 ($1 \mu\text{L}$ de la solución en los $100 \mu\text{L}$ de sub-muestra). Las 6 sub-muestras se incubaron durante 30 min a 37°C en una cámara oscura. Después de este tiempo, $50 \mu\text{L}$ de cada sub-muestra fueron depositados en nuevos eppendorf. En este momento se prepararon 6 eppendorf, también con $50 \mu\text{L}$ de agua bidestilada y cantidades de concentración conocida de MDA para la recta calibración, tal y como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Soluciones de la curva patrón de MDA.

Concentración, μM	0	1	2	4	8	16
Volumen de ddH ₂ O, μL	50	47,5	45	40	30	10
Solución trabajo MDA ($20\mu\text{M}$), μM	0	2,5	5	10	20	40

A los 12 eppendorf (6 con semen y 6 de la recta de calibración), se les añadieron $2 \mu\text{L}$ de probucol (componente del kit comercial). Inmediatamente después, se añadieron $160 \mu\text{L}$ de la solución de trabajo R^{*1} (componente del kit comercial) a todos los eppendorf, excepto a los 2 controles a los que se les añadieron $160 \mu\text{L}$ de la solución para las muestra control (ver preparación de soluciones del kit MDA-586). Se agitaron todos los eppendorfs en el vórtex (Velp Scientific, Modelo ZX3, Italia). Se agregaron $37,5 \mu\text{L}$ del reactivo R^{*2} (componente del kit comercial) a cada eppendorf y se agitaron nuevamente con el vórtex. Luego se incubaron los eppendorf en una estufa (Jouan, Modelo EB115, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA.) a 47°C (Figura 24) durante 1 h. Después de transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron (MicroCL 21R Centrifuge, Thermo electron corporation, Barcelona, España, Figura 25) todos los eppendorf a $10.000 \times g$ durante 10 min a temperatura de laboratorio ($23\text{-}24^\circ\text{C}$). Una vez centrifugados, se transfirieron $200 \mu\text{L}$ del sobrenadante de cada eppendorf a un pocillo de la placa de 96 pocillos del espectrofotómetro (Bio-Tek, Power Wave, Winooski, Vermont, USA, Figura 26). Se añaden $200 \mu\text{L}$ de ddH₂O a 2 pocillos libres (muestras blanco). Posteriormente, se tomaron 3 mediciones de la absorbancia a 590 nm en cada pocillo.

* Solución de N-methyl-2-phenylindole en acetonitrilo.

* Solución concentrada de ácido clorhídrico.



Figura 24. Estufa para incubación de los reactivos del MDA.



Figura 25. Centrífuga MicroCL 21R.

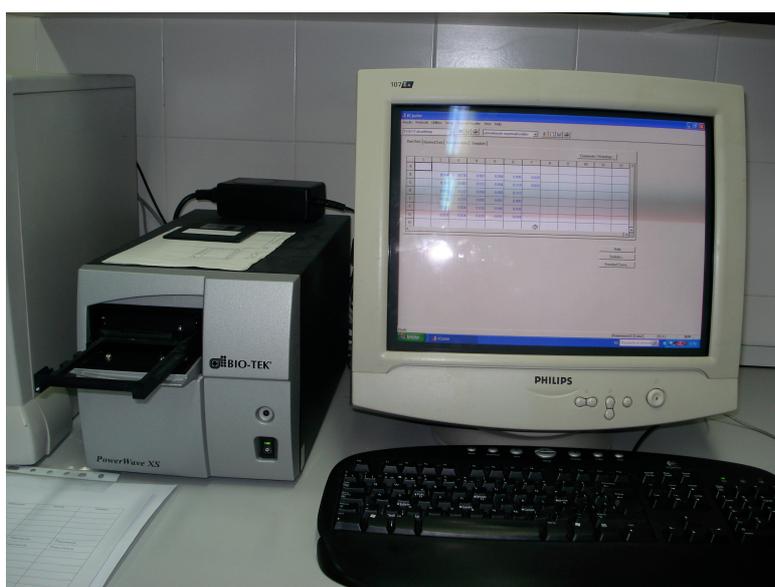


Figura 26. Espectrofotómetro Bio-Tek.

Al interpolar la curva para obtener las concentraciones de cada pocillo, y para realizar la interpretación de los datos se utilizaron los valores "Blanked" proporcionados por el espectrofotómetro. Los cálculos que se realizaron fueron los siguientes: la substracción de la absorbancia de las muestras blanco a la obtenida en todos los demás pocillos. Posteriormente se generó la curva de calibración con la fórmula $A_{590} = a[MDA] + b$. Se sustrae la absorbancia de los controles a la cuantificada en las muestras destinadas a medir la concentración de MDA. La fórmula para calcular la concentración de MDA en cada una de las 4 sub-muestras destinadas a medir la concentración de MDA es la siguiente: $((A_{590} - b) / a) * df$

Donde:

[MDA] se dará en $\mu\text{M} / 30 \times 10^6$ espermatozoides

A590: Absorbancia a 590 nm corregida.

a: coeficiente de regresión de la curva de calibración.

b: intercepto de la curva de calibración

df: Factor de dilución $(50 + 2 + 160 + 37.5) / 50 = 4.99$.

3.2.4 Separación de espermatozoides mediante el gradiente Androcoll™-P (Large).

Para la separación de espermatozoides mediante el gradiente Androcoll™-P (Large) se siguió el protocolo descrito por Morrell y cols. (2009). Antes de su utilización, se equilibró a temperatura ambiente. Después se diluyó el eyaculado (1:2, vol/vol), con BTS, hasta una concentración de 100×10^6 spmz/mL. A temperatura ambiente de laboratorio se depositaron 15 mL del coloide Androcoll™-P (Large) en un tubo Falcon de 50 mL utilizando una técnica aséptica (pipeta Pasteur de plástico estéril). Inmediatamente después a dicho tubo se agregaron 18 mL de semen muy cuidadosamente y mediante una aguja de 23g1 para evitar que se forme interfase y en un ángulo de 45°. Posteriormente, se centrifugó a 500 xg durante 20 min (Figura 27). Después de la centrifugación, se retiró la mayor parte de sobrenadante sin alterar el pellet de espermatozoides. Por último, se aspiró el pellet de espermatozoides utilizando una pipeta Pasteur estéril y se transfirió a un tubo Falcon con diluyente BTS, añadiendo más o menos diluyente según la concentración de trabajo deseada.



Figura 27. Tubo Falcon mostrando el resultado de la centrifugación de una muestra de semen depositada en gradiente Androcoll™-P (Large). Nótese la capa intermedia de espermatozoides afuncionales.

3.3 Diseño experimental.

3.3.1 Experiencia 1. Efecto de los espermatozoides afuncionales sobre la calidad espermática de los funcionales a la descongelación.

El experimento incluyó 15 eyaculados, 3 por cada uno de los 5 verracos en estudio. Todos los eyaculados tenían una concentración igual o superior a 200×10^6 sperm/mL, con al menos un 85% de espermatozoides con morfología normal y un porcentaje de espermatozoides móviles y viables igual o superior a 75% y 85%, respectivamente. Al llegar al laboratorio de Andrología, se separaron 50 mL de cada eyaculado (diluido 1:1, vol/vol, en BTS) para obtener la población de espermatozoides afuncionales. Para ello, el tubo conteniendo los 50 mL de semen se sumergió en nitrógeno líquido a -196°C durante 9 min. Inmediatamente después, se introdujo la muestra en un baño termostatizado a 37°C durante 3 min. Pasado este tiempo, la muestra se introdujo en un recipiente con agua a 80°C hasta su total descongelación. Para confirmar la afuncionalidad de los espermatozoides, se comprobó que ningún de ellos mantenía íntegras las membranas plasmática y acrosomal.

A continuación se procedió a realizar las mezclas de espermatozoides funcionales y afuncionales en cuatro proporciones diferentes. La muestra seminal con el hipotético 100% de espermatozoides funcionales equivale a la muestra seminal recogida directamente del

eyaculado, muestra que en realidad contiene un mínimo de 85 % de espermatozoides funcionales, es decir de espermatozoides con membranas plasmática y acrosomal íntegras. Las otras tres mezclas se realizaron mezclando diferentes proporciones de la muestra seminal 100% y de la muestra de espermatozoides afuncionales. Las proporciones finales fueron:

- Solo muestra seminal recogida en el centro de inseminación (100 % de espermatozoides funcionales).
- 75% de muestra seminal recogida en el centro de inseminación y 25% de la muestra con espermatozoides afuncionales (75 % de espermatozoides funcionales).
- 50% de muestra seminal recogida en el centro de inseminación y 50% de la muestra con espermatozoides afuncionales (50 % de espermatozoides funcionales).
- 25% de muestra seminal recogida en el centro de inseminación y 75% de la muestra con espermatozoides afuncionales (25 % de espermatozoides funcionales).

Una vez preparadas, las muestra seminales fueron incubaron durante un periodo de 24 h a 17 °C antes de proceder a la criopreservación. El hecho de incubarlas durante 24 h a 17 °C responde a que dicha práctica es actualmente habitual en los protocolos de criopreservación espermática (Guthrie y Welch, 2005; Juárez y cols., 2011).

Se descongelaron 3 pajuelas de cada tratamiento o muestra seminal, por cada uno de los eyaculados (replicados) y por cada uno de los verracos, las cuales fueron diluidas, tal y como se menciona anteriormente, y conservadas en incubación a 37 °C durante 150 min. La calidad espermática a la descongelación se evaluó de la siguiente manera:

- Los parámetros de motilidad y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal se valoraron a los 30 y 150 min post-descongelación.
- La concentración de MDA a los 15 min después de la descongelación.
- La producción intra-celular de ROS y la desestabilización de la membrana plasmática a los 30 min post-descongelación.

3.3.2 Experiencia 2. Efecto de la utilización, antes de la congelación, del coloide Androcoll™-P (Large) como gradiente de centrifugación, en la calidad espermática post-descongelación.

El objetivo de este experimento fue evaluar la eficacia del coloide Androcoll™-P (Large) para eliminar espermatozoides afuncionales de los eyaculados y la repercusión que dicha eliminación podría tener sobre la congelabilidad de los funcionales. Para ello, se utilizaron 6 eyaculados provenientes de otros tantos verracos. La característica común de todos los eyaculados era que mostraban una sub-óptima calidad espermática. Una vez en el laboratorio de Andrología, cada eyaculado se subdividió en 2 mitades. La primera (control) fue procesada siguiendo el protocolo estándar de congelación espermática. La segunda, [Androcoll™-P (Large)] fue sometida, antes de la congelación, a un proceso de centrifugación

con el coloide, tal y como se ha descrito anteriormente. Después de la centrifugación y antes de la congelación, se evaluó la cantidad y calidad de los espermatozoides recuperados. A la descongelación, ambas muestras por eyaculado fueron sometidas al mismo procesado que en el experimento anterior para evaluar la calidad espermática.

3.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los datos recogidos en cada una de las dos experiencias fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS (SPSS-15, SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). Se estimaron valores promedio, mínimos y máximos así como el error estándar de la media (SEM) para todas las variables analizadas. El efecto de las diferentes fuentes de variación que afectan las características de calidad seminal durante el proceso de congelación-descongelación se evaluó a través de análisis de variancia, utilizando modelos lineales fijos del tipo,

$$y = X\beta + \epsilon$$

donde: y es el vector de observaciones, β es el vector de parámetros en el modelo estadístico utilizado para el análisis, X es la matriz de incidencia y ϵ es el vector de errores experimentales.

En la experiencia 1, las diferencias entre verracos y entre tratamientos (porcentajes de espermatozoides funcionales y afuncionales) en los parámetros de calidad espermática durante el proceso de congelación-descongelación; los parámetros de calidad espermática a la descongelación expresados como porcentajes de recuperación; la concentración de MDA; la generación de ROS, así como en la desestabilización de la membrana plasmática (bajo un tratamiento de capacitación) en las muestras seminales congeladas-descongeladas fueron evaluadas mediante análisis de variancia mixtos; considerando una P (Error Tipo I $\leq 0'05$); en el que el efecto verraco y el tratamiento, así como la interacción verraco x tratamiento fueron los factores fijos. La pajuela de semen descongelada (tres por tratamiento, excepto en el caso de las sustancias ROS y la desestabilización de la membrana plasmática donde se descongelaron dos pajuelas) considerada como replicado en todos los análisis, fue considerada como el factor aleatorio.

En la experiencia 2, se evaluaron diferencias entre las características de calidad seminal en espermatozoides frescos y congelados-descongelados sometidos a un procedimiento de centrifugación en coloide y un grupo control sin centrifugación en coloide, mediante un análisis de variancia mixto, en el que la utilización o no del gradiente de centrifugación, el verraco y la interacción entre ambos fueron considerados como factores fijos.

Se realizaron también, análisis de variancia para determinar diferencias entre generación ROS y desestabilización de la membrana plasmática (en muestras sometidas y no sometidas a un procedimiento de capacitación espermática), respectivamente. También se realizó un análisis de variancia para determinar el grado de influencia del verraco y el gradiente de centrifugación sobre la concentración de MDA en muestras congeladas-descongeladas. El modelo mixto contemplaba el verraco y el procedimiento o no de centrifugación en coloide como efectos fijos. Además, se realizó un análisis de correlación mediante coeficientes de correlación de Pearson, para evaluar el grado de asociación entre la concentración de MDA ($\mu\text{mol } 30 \times 10^6$ espermatozoides) y las variables de calidad espermática a la descongelación, como la motilidad total, la motilidad progresiva y la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.

Previo a los análisis, cuando los datos en porcentaje no mostraban una distribución normal, estos fueron transformados mediante la utilización de la función $y = \text{ArcoSeno}(x)$. Cuando los análisis de variancia mostraron diferencias estadísticamente significativas, los datos fueron comparados utilizando el test de Bonferroni. Los datos fueron expresados como media de mínimos cuadrados (LSM) \pm error estandar (SEM).

IV. RESULTADOS

4.1 Experiencia 1. Influencia de los espermatozoides afuncionales sobre la calidad espermática de los funcionales congelados-descongelados.

4.1.1 Características de calidad espermática de los eyaculados antes de la congelación.

Todos los eyaculados procedían del mismo centro de inseminación artificial, los verracos se encontraban en las mismas condiciones de manejo, alimentación y formaban parte de los programas rutinarios de producción de dosis seminales para inseminación artificial. En la Tabla 8, se presentan las medias \pm SEM para las características de calidad espermática en el momento en que los eyaculados diluidos (1:1 vol/vol) en un diluyente comercial llegaron al laboratorio de Andrología (0 h) y a las 24 h después de la incubación según las cantidades porcentuales de espermatozoides funcionales y afuncionales en cada uno de los tratamientos. Los datos de la Tabla 8, a las 24 h y en cada uno de los parámetros de calidad espermática corresponden al grupo de 100 % de espermatozoides funcionales. Se observaron diferencias ($P < 0'01$) entre verracos en los parámetros de calidad espermática. De este modo, el verraco 2 muestra la mayor concentración, sin embargo presenta una motilidad total baja en las dosis conservadas a las 24 h y un mayor porcentaje de morfoanomalías. En contrapartida, en términos generales, el verraco 3, muestra una mejor calidad espermática, tanto a las 0 h como a las 24 h. En cuanto al efecto del tiempo de conservación entre 0 y 24 h, en todos los verracos existe un efecto significativo ($P < 0'05$) aunque dicho efecto es diferente según el verraco y no afecta, dentro de cada verraco, a todos los parámetros de calidad espermática. En términos generales, se observa una pérdida de calidad tras las 24 h de conservación.

RESULTADOS

Tabla 8. Parámetros de calidad seminal de los eyaculados en el laboratorio y 24 horas post incubación. Medias \pm SEM y rangos entre paréntesis.

Variable	Verracos				
	1	2	3	4	5
Concentración					
espermática ($\times 10^6$ espz/mL)	254'1 ^a \pm 21'2 (229'7-296'2)	426'3 ^b \pm 50'5 (329'8-497'2)	247'1 ^a \pm 11'5 (224'3-261'5)	312'0 ^{ab} \pm 11'8 (288'3-324'2)	233'8 \pm 34'4 ^a (175'0-294'0)
Motilidad total (%)					
0h ^{α}	84'3 \pm 2'3 (80'0-88'0)	84'3 ₁ \pm 2'7 (79'0-88'0)	85'3 \pm 0'3 (85'0-86'0)	79'3 \pm 4'7 (70'0-84'0)	86'7 \pm 0'7 (86'0-88'0)
24h ^{β}	81'0 \pm 2'0 (76'0-87'0)	74'67 ₂ \pm 2'7 (66'0-80'0)	83'3 \pm 0'4 (82'0-84'0)	69'0 \pm 4'2 (57'0-80'0)	82'7 \pm 1'2 (79'0-85'0)
Motilidad progresiva (%)					
0 h ^{α}	51'7 ₁ \pm 4'8 (42'0-57'0)	46'7 \pm 3'0 (41'0-51'0)	41'3 \pm 1'9 (39'0-45'0)	45'0 \pm 8'0 (37'0-61'0)	51'3 \pm 8'6 (39'0-68'0)
24 h ^{β}	40'67 ₂ \pm 4'6 (26'0-48'0)	41'67 \pm 5'0 (26'0-52'0)	54'67 \pm 6'0 (39'0-72'0)	54'0 \pm 6'7 (33'0-67'0)	49'3 \pm 5'8 (31'0-59'0)
Integridad de membrana plasmática y acrosomal (%) ^{χ}					
0 h ^{α}	90'0 \pm 1'0 (88'0-91'0)	92'0 ₁ \pm 2'3 (88'0-96'0)	89'7 \pm 0'9 (88'0-91'0)	90'0 \pm 2'3 (86'0-94'0)	89'0 ₁ \pm 1'2 (87'0-91'0)
24 h ^{β}	89'7 ^a \pm 0'5 (88'0-91'0)	80'3 ^b ₂ \pm 1'5 (76'0-84'0)	85'0 ^{ab} \pm 1'6 (80'0-88'0)	84'5 ^{ab} \pm 2'2 (77'5-89'0)	83'3 ^{ab} ₂ \pm 0'8 (81'0-85'0)
Morfología					
espermática como formas normales (%)	96'7 ^a \pm 2'9 (91'0-100'0)	55'7 ^b \pm 4'1 (48'0-62'0)	94'0 ^a \pm 2'3 (90'0-98'0)	92'7 ^a \pm 2'2 (90'0-97'0)	98'0 ^a \pm 0'6 (97'0-99'0)

^{α} Dato adquirido después de que el eyaculado llegara al Laboratorio de Andrología.

^{β} Tiempo de incubación de los espermatozoides funcionales con los espermatozoides afuncionales. Los datos corresponden al primer tratamiento, es decir, "100 %" de funcionales.

^{χ} Valoración realizada con fluorocromos SYBR-14, IP y PNA-FITC.

^{a,b} Superíndices con diferente letra indican diferencias significativas dentro de filas ($P < 0'05$)

^{1,2} Subíndices diferentes dentro del mismo verraco y parámetro seminal difieren significativamente entre 0 h y 24 min post-incubación para ($P < 0'05$).

4.1.2 Características de calidad espermática en las muestras seminales congeladas-descongeladas.

La calidad espermática fue evaluada a los 30 y 150 min post-descongelación en muestras espermáticas incubadas a 37 °C. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0'001$) entre verracos tanto a los 30 como a los 150 min post-descongelación (Tabla 9). Dentro de cada verraco, el tiempo de incubación influyó, con una pérdida de calidad espermática entre los 30 y 150 min post-descongelación.

Tabla 9. Valores promedio \pm SEM de los parámetros de calidad espermática, a los 30 y 150 min post-descongelación, en las muestras control de 100 % de espermatozoides funcionales, según verraco.

Parámetros (%)	Tiempo (min)	Verraco					SEM
		1	2	3	4	5	
Motilidad total	30	71'6 ^a ₁	44'9 ^b ₁	73'0 ^a ₁	59'6 ^{ac} ₁	53'0 ^{bc} ₁	4'2
	150	50'5 ^a ₂	31'7 ^b ₂	54'5 ^a ₂	45'3 ^{ab} ₂	34'9 ^b ₂	3'9
Motilidad progresiva	30	60'1 ^a ₁	35'1 ^b ₁	55'0 ^a ₁	40'0 ^b	37'2 ^b ₁	3'3
	150	45'9 ^a ₂	25'3 ^{bc} ₂	46'5 ^a ₂	36'8 ^{ac}	25'7 ^{bc} ₂	3'6
Integridad de membrana plasmática y acrosomal	30	70'2 ^a ₁	54'1 ^b ₁	71'7 ^a ₁	59'5 ^{ab} ₁	52'8 ^b ₁	4'8
	150	63'4 ^a ₂	48'8 ^b ₂	62'1 ^{ac} ₂	52'4 ^{bc} ₂	43'9 ^b ₂	2'6

^{a,b} Valores con diferentes superíndices dentro de cada hilera y cada parámetro de calidad espermática, indican diferencias entre verracos para $P < 0'05$.

^{1,2} Subíndices diferentes dentro del mismo verraco y parámetro seminal difieren entre 30 y 150 min post-descongelación para $P < 0'05$.

4.1.2.1 Espermatozoides recuperados mótils totales

En la Figura 28, se muestran los porcentajes de recuperación de espermatozoides mótils totales a los 30 y 150 min post-descongelación y según verraco. Se observan diferencias entre verracos, en dichos porcentajes. Sin embargo, los máximos porcentajes de recuperación en todos los verracos y en ambos tiempos de incubación post-descongelación siempre se dan en las muestras espermáticas con un 100 % de espermatozoides funcionales antes de la congelación. Así mismo, los porcentajes más bajos de recuperación se presentan en la muestras espermática con un 50 y 25 % de espermatozoides funcionales antes de la

congelación. Además, es notorio que las diferencias en el porcentaje de recuperación son más evidentes a los 150 min que a los 30.

En el verraco 1 se puede notar diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de recuperación entre los grupos de 100 y 75 % con respecto a los grupos de 50 y 25 %, lo que indica que más del 80% de los espermatozoides que había inicialmente en las muestras de 100 y 75 %, son recuperados y mótils a los 30 min post-descongelación. A los 150 min post-descongelación, el porcentaje de espermatozoides mótils totales disminuye como es de esperar, sin embargo se continúan observando diferencias significativas entre el grupo de 100 % con respecto a los demás tratamientos para este mismo verraco. En el verraco 3 se observa una tendencia similar.

En uno de los verracos, el número 5, no se observaron diferencias significativas ($P > 0'05$), entre los tratamientos para los 30 min, observándose dichas diferencias ($P < 0'05$) a los 150 min.

4.1.2.2 Espermatozoides recuperados mótils progresivos

El porcentaje de recuperación de espermatozoides con motilidad progresiva se presenta en la Figura 29. Se observan diferencias entre verracos tanto a los 30 como a los 150 min post-descongelación. De la misma manera que ocurría en el porcentaje de espermatozoides mótils totales, en las muestras con un 100 % de espermatozoides funcionales, se observan, en todos los verracos, las más altas tasas de recuperación tanto a los 30 como a los 150 min post-descongelación. Sin embargo, en algunos verracos y en algunos tiempos no hubo diferencias significativas ($P > 0'05$) entre tratamientos en el porcentaje de recuperación, en concreto, en el verraco 2 para los 150 min post-descongelación y para el verraco 5 a los 30 min post-descongelación. Si exceptuamos estos dos casos, en todos los demás verracos y tiempos de incubación post-descongelación, las muestras espermáticas con 50 y 25 % de espermatozoides funcionales antes de la congelación mostraron los peores porcentajes de recuperación a la descongelación.

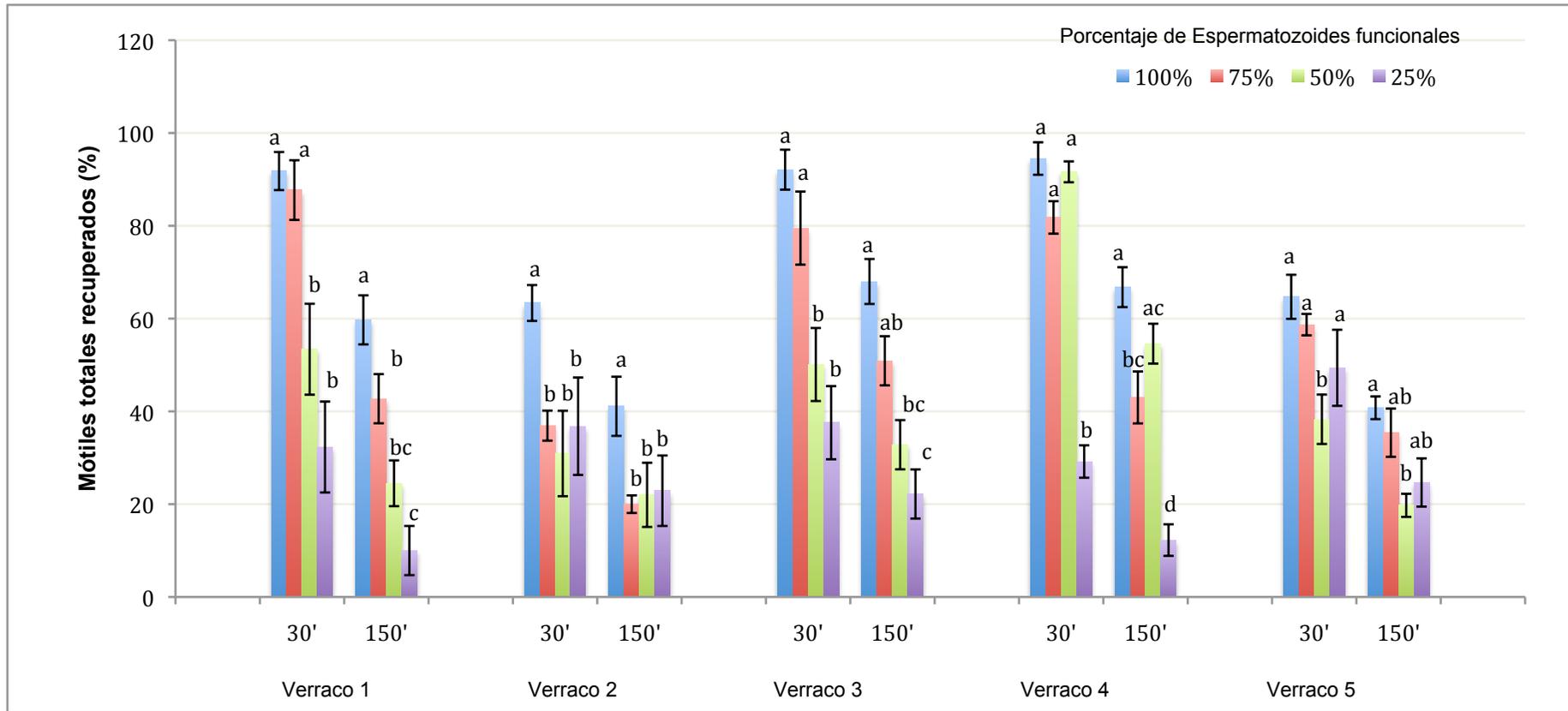


Figura 28. Espermatozoides móviles totales expresados como porcentajes de recuperación \pm SEM, a los 30 y 150 min post-descongelación según verraco en muestras espermáticas con diferente proporción de espermatozoides funcionales antes de la congelación.

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada verraco y tiempo de análisis ($P < 0.05$).

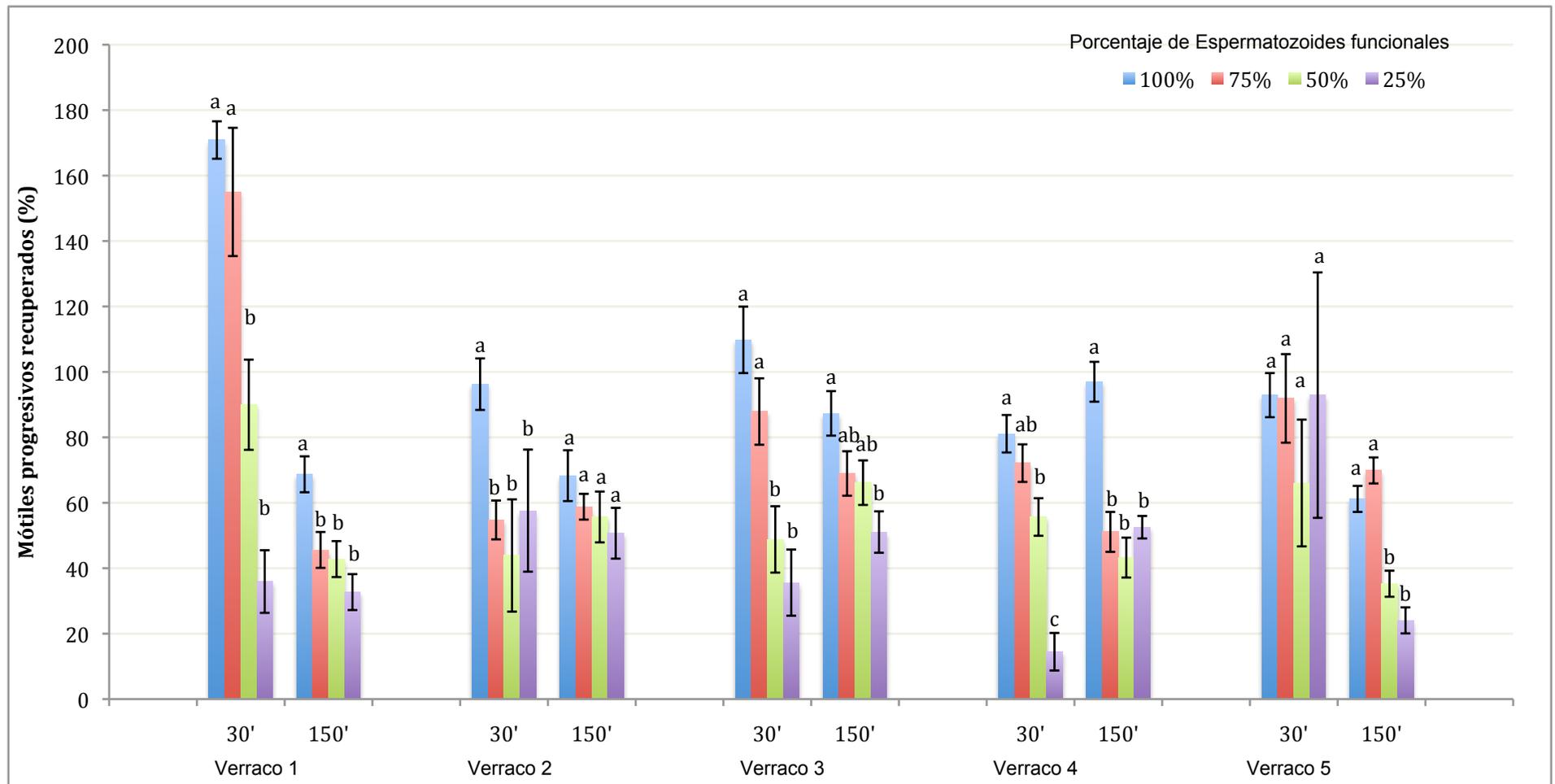


Figura 29. Motilidad progresiva expresada como porcentaje de recuperación \pm SEM de espermatozoides congelados-descongelados a los 30 y 150 min, según verraco en muestras espermáticas con diferente proporción de espermatozoides funcionales antes de la congelación.

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada verraco y tiempo de análisis ($P < 0.05$).

4.1.2.3 Espermatozoides recuperados con integridad de membrana plasmática y acrosomal

Los porcentajes de espermatozoides recuperados con membrana plasmática y acrosomal íntegra, se representan en la Figura 30. De la misma forma que en los parámetros anteriores se observaron diferencias entre verracos. Así mientras en los verracos 1 y 2 hubo diferencias significativas ($P < 0'01$) entre tratamientos en ambos tiempos de incubación post-descongelación, en los verracos 3, 4 y 5 no existieron tales diferencias ni a los 30 ni 150 min. En los dos verracos que mostraron diferencias entre tratamientos, los porcentajes más elevados de recuperación se observaron en las muestras con 100 % de espermatozoides funcionales.

4.1.2.4 Concentración de Malonildialdehído (MDA) en las muestras congelada-descongeladas

En la Figura 31 se presentan las concentraciones de MDA en las muestras congeladas-descongeladas control, es decir, aquellas que tenían el 100 % de espermatozoides funcionales, según verraco. Se observa un efecto significativo ($P < 0'001$) del verraco, mostrando los verracos 1 y 4 las concentraciones más bajas.

Las concentraciones de MDA según el tratamiento porcentual de espermatozoides funcionales se presenta en la Figura 32. El efecto del verraco así como el del tratamiento, resultaron significativos ($P < 0'001$). Sin embargo, la interacción verraco x tratamiento no lo fue ($P > 0'05$), considerando, por lo tanto, que el patrón de variación entre tratamientos era idéntico en los cinco verracos. Las concentraciones más bajas ($10'5 \pm 0'8 \mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides) se cuantificaron en las muestras con un 100 % de espermatozoides funcionales. La concentración fue aumentando progresivamente en las muestras del 75 y 50 %, alcanzando los valores más elevados en las muestras del 25 % ($15'4 \pm 0'8 \mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides).

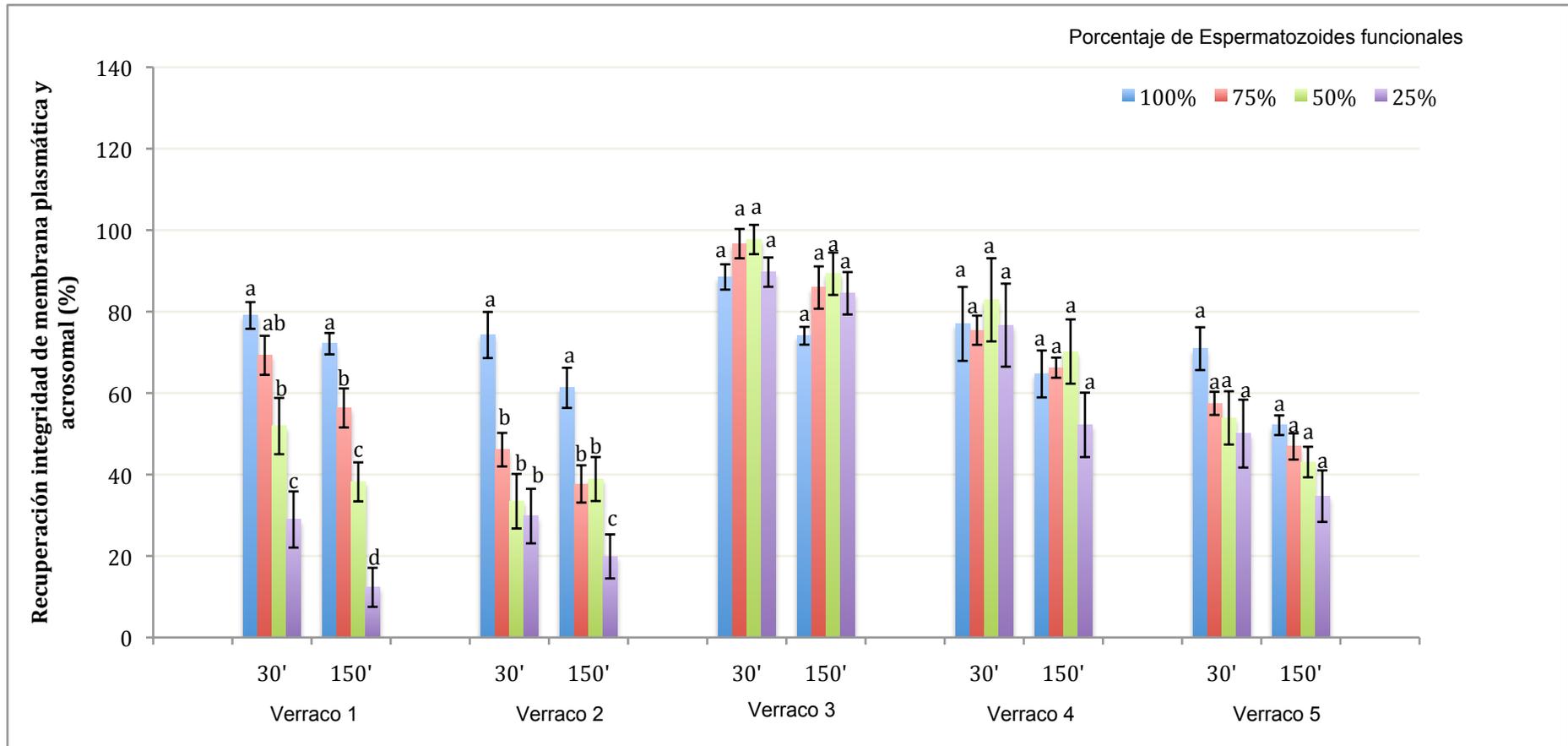


Figura 30. Espermatozoides con Integridad de membrana plasmática y acrosomal en muestras de semen congeladas-descongeladas a los 30 y 150 min y según verraco en muestras espermáticas con diferente proporción de espermatozoides funcionales antes de la congelación. Datos expresados como porcentajes de recuperación \pm SEM.

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas dentro de cada verraco y tiempo de análisis ($P < 0.01$).

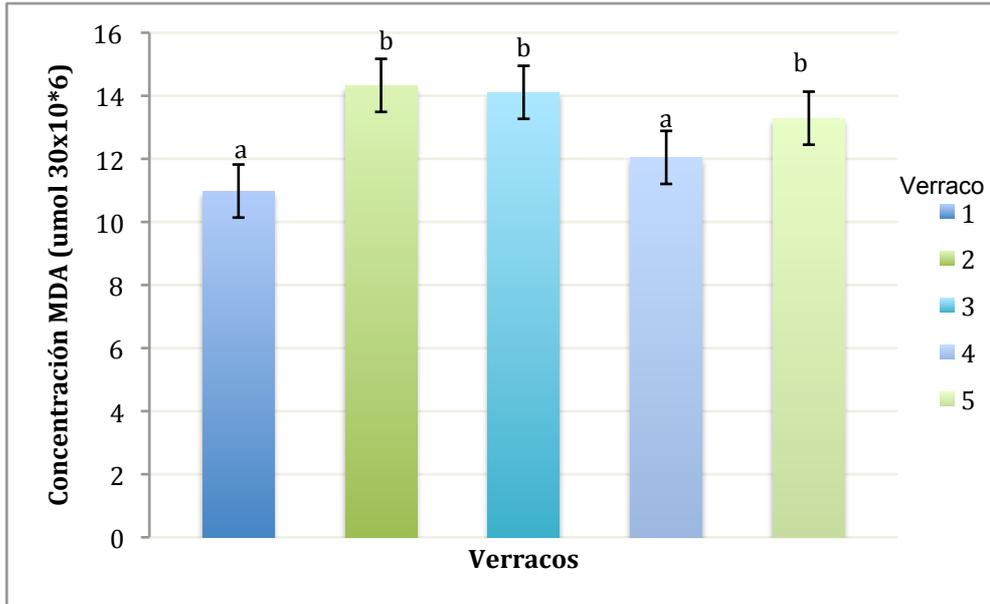


Figura 31. Concentración de Malonildialdehído \pm SEM (MDA $\mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides) según verraco en las muestras congeladas y descongeladas control (100 % espermatozoides funcionales).

^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas entre verracos ($P < 0.05$).

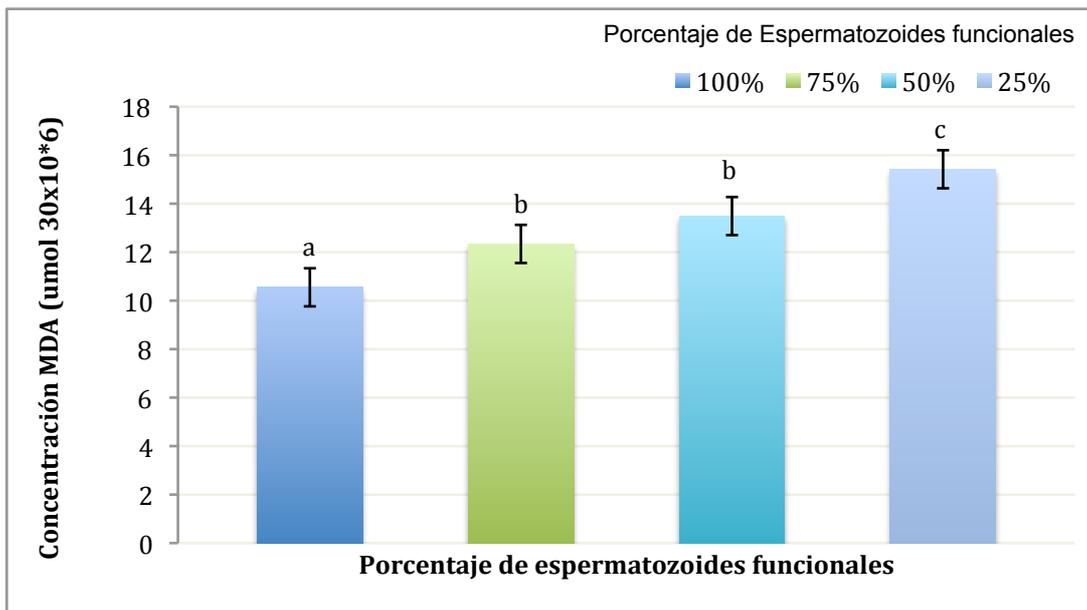


Figura 32. Concentración de Malonildialdehído \pm SEM (MDA $\mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides) en las muestras congeladas y descongeladas con diferentes porcentajes de espermatozoides funcionales antes de la congelación.

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencias significativas entre muestras ($P < 0.01$).

4.1.2.5 Correlación entre la concentración de MDA y los parámetros de calidad espermática a la descongelación

La concentración de MDA en las muestras espermáticas descongeladas presentó, independientemente del porcentaje de espermatozoides funcionales antes de la congelación, una correlación negativa significativa ($P < 0'001$) con los porcentajes de espermatozoides mótils totales, espermatozoides mótils progresivos y de espermatozoides con integridad de membranas plasmática y acrosomal (Tabla 10).

Tabla 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de malonildialdehído (MDA) y los parámetros de calidad espermática a la descongelación.

Parámetro (%)	Concentración de MDA ($\mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides)	
	Tiempo post-descongelación (min)	
	30	150
Motilidad total	-0'5**	-0'5**
Motilidad progresiva	-0'5**	-0'5**
Integridad de membrana plasmática y acrosomal	-0'4**	-0'4**

** $P < 0'001$

4.1.2.6 Producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las muestras congeladas-descongeladas

En la Figura 33, se representa la producción de ROS expresada como intensidad de fluorescencia inducida en las muestras congeladas-descongeladas e incubadas durante 30 y 150 min post-descongelación, según su porcentaje de espermatozoides funcionales antes de la congelación. Los efectos del verraco, tratamiento así como el tiempo post-descongelación fueron significativos ($P < 0'001$). Las interacciones verraco x tratamiento, tratamiento x tiempo presentaron fueron significativas ($P < 0'001$). La interacción verraco x tiempo no fue significativa ($P > 0'05$). A pesar de las mencionadas interacciones, es común en todos los verracos y en los dos tiempos post-descongelación que la intensidad de fluorescencia inducida aumente conforme el porcentaje de espermatozoides funcionales disminuya. Así, en todos los verracos y en los dos tiempos de incubación, la menor intensidad se observa en las muestras con un 100 % de espermatozoides funcionales y la mayor intensidad en las muestras con un 25 % de espermatozoides funcionales.

4.1.2.7 Grado de desestabilización de la membrana plasmática en las muestras congeladas-descongeladas

En la Figura 34, se representan los porcentajes normalizados de espermatozoides positivos a M540 en muestras espermáticas congeladas-descongeladas y sometidas a un proceso de capacitación espermática, de acuerdo con el porcentaje de espermatozoides funcionales antes de la congelación, según el verraco y el tiempo de post-descongelación. El efecto de verraco, el tratamiento porcentual de espermatozoides funcionales utilizado, así como el tiempo de post-descongelación resultaron significativos ($P < 0'001$). Además, las interacciones verraco x tratamiento y verraco x tiempo fueron también significativas ($P < 0'05$). En contraste, la interacción tratamiento x tiempo no fue significativa ($P > 0'05$).

En los verracos 1, 3 y 5, el porcentaje de espermatozoides positivos a M540 a los 30 min post-descongelación, aumentó significativamente ($P < 0'001$) a medida que disminuía el porcentaje de espermatozoides funcionales en la muestra espermática. Este mismo patrón se evidenció a los 150 min post-descongelación en el verraco 3. En contraste, en los verracos 2 y 4, para ambos tiempos de incubación, y en el verraco 1, a los 150 min post-descongelación, no se apreciaron diferencias significativas ($P > 0'05$) entre tratamientos.

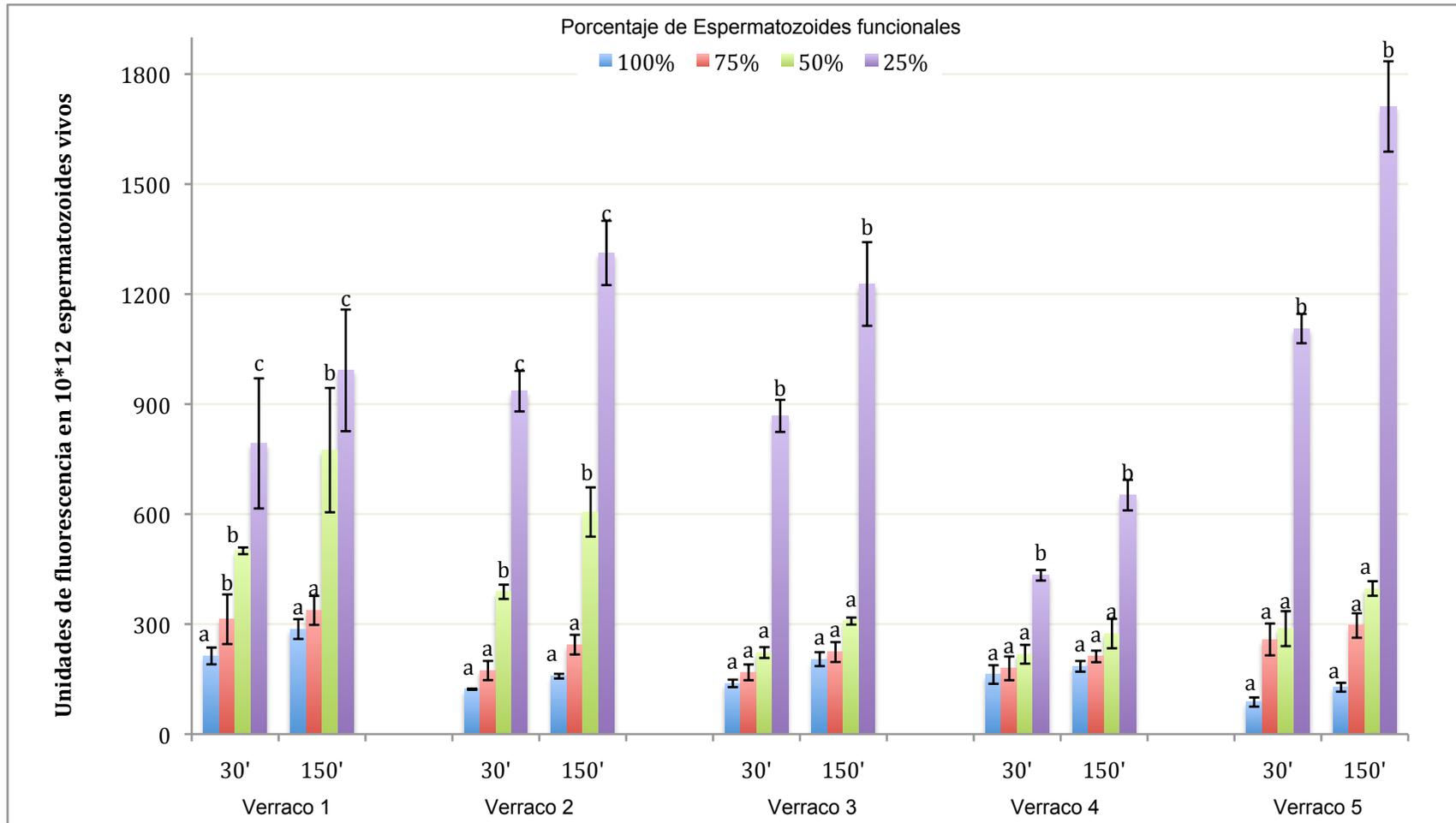


Figura 33. Producción intracelular de sustancias ROS expresada en unidades de fluorescencia en 10^{12} espermatozoides vivos \pm SEM, en muestras congeladas-descongeladas con diferentes porcentajes de espermatozoides funcionales antes de la congelación, representadas según verraco y tiempo de incubación post-descongelación.

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada verraco y tiempo de incubación ($P < 0.05$).

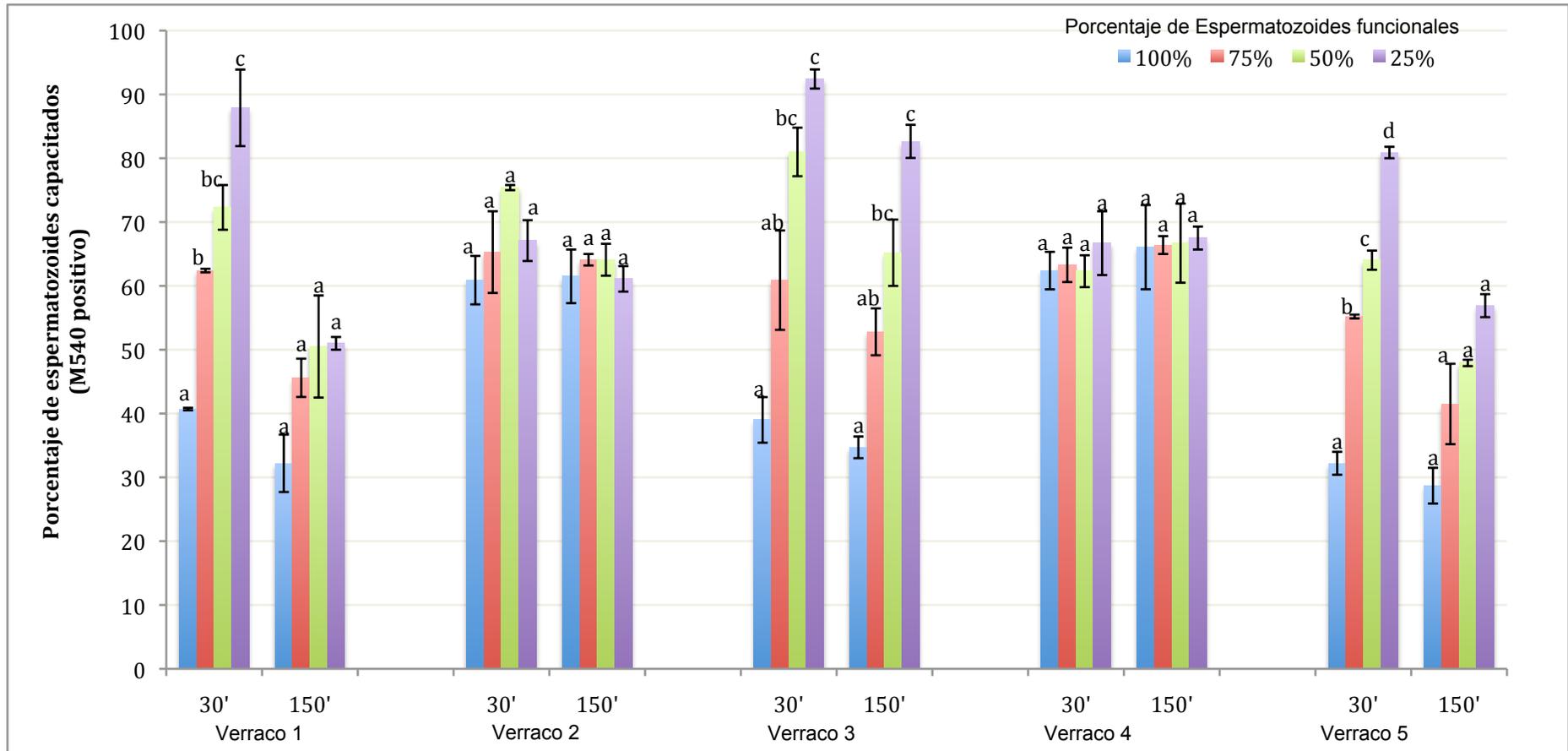


Figura 34. Grado de capacitación espermática expresada como porcentaje de espermatozoides positivos a Merocianina540 (M540) \pm SEM en muestras espermáticas congeladas-descongeladas y sometidas a un proceso de capacitación espermática procedentes de muestras seminales con diferentes porcentajes de espermatozoides funcionales antes de la congelación. Los datos se representan según verraco y tiempo de incubación post-descongelación.

^{a,b,c} Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de cada verraco y tiempo de incubación ($P < 0.05$).

4.2 Experiencia 2. Efecto de la utilización, antes de la congelación, del coloide Androcoll™-P (Large), como gradiente de centrifugación, en la calidad espermática post-descongelación.

4.2.1 Influencia del coloide Androcoll™-P (Large) en la calidad espermática antes de la congelación.

En la Tabla 11, se representan los valores medios de cantidad y calidad espermática en los eyaculados antes y después de ser sometidos al gradiente de centrifugación empleando el coloide Androcoll™-P (Large). Aunque no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) en ninguno de los parámetros de cantidad y calidad espermática evaluados, probablemente debido al escaso número de eyaculados procesados ($n = 6$), si se muestra una clara tendencia en algunos de los parámetros espermáticos. Se observa una pérdida en el número de espermatozoides totales recuperados tras la aplicación del gradiente de centrifugación. Pérdida que, sin embargo, se ve minimizada cuando se evalúa el número medio total de espermatozoides morfológicamente normales, ya que el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales recuperados se encuentra alrededor del 74 %. En cuanto a la calidad espermática, no existen diferencias ($P > 0.05$) entre antes y después al tratamiento, indicando que la centrifugación en un coloide no afecta la calidad espermática.

Tabla 11. Valores medios \pm SEM y rangos entre paréntesis de cantidad y calidad espermática en los eyaculados antes y después de ser sometidos o no al gradiente de centrifugación empleando el coloide Androcoll™-P (Large).

Parámetro	Control	Androcoll™-P (Large)	Prob
Espz totales (*10 ⁶)	5350'0 \pm 1405'9 (3000-10 500)	3027'5 \pm 915'5 (1445-7315)	ns
Espz morfológicamente normales (%)	60'4 \pm 8'4 (25'0-81'0)	78'3 \pm 9'1 (38'0-95'0)	ns
Espz totales normales (*10 ⁶)	3402'0 \pm 1131'4 (750-8400)	2513'9 \pm 925'9 (665'8-6876'1)	ns
Porcentajes de recuperación			
Espz Totales		56'6 \pm 5'1 (40'9-70'6)	ns
Espz normales		74'0 \pm 4'3 (63'7-88'8)	ns
Motilidad total (%)	74'8 \pm 3'7 (54'0-95'0)	77'5 \pm 3'7 (55'0-95'0)	ns
Motilidad progresiva (%)	34'1 \pm 2'2 (28'0-52'0)	41'4 \pm 3'0 (28'0-56'0)	ns
Integridad de membrana plasmática y acrosomal (%)	85'9 \pm 3'9 (57'3-96'0)	83'1 \pm 3'9 (55'5-96'0)	ns

Prob = probabilidad; ns = no significativo ($P > 0.05$)

Espz = espermatozoides

Entre paréntesis se muestra el rango.

4.2.2 Parámetros de calidad espermática a la descongelación

El porcentaje de espermatozoides móviles totales, así como el de espermatozoides con motilidad progresiva fue diferente significativamente ($P < 0'001$) entre las muestras no tratadas y las procesadas con el gradiente de centrifugación Androcoll™-P (Large). Estas diferencias se observaron tanto a los 30 como a los 150 min post-descongelación (Tabla 12). La integridad de membrana plasmática y acrosomal también presentó diferencias significativas ($P < 0'001$) entre muestras tratadas con o sin gradiente de centrifugación y estas diferencias fueron observadas en los dos tiempos post-descongelación.

Tabla 12. Porcentajes medios \pm SEM de calidad espermática observados en las muestras congeladas-descongeladas de 6 eyaculados que fueron tratados o no con el gradiente de centrifugación Androcoll™-P (Large) antes de la congelación.

Parámetro (%)	Tiempo (min)	Gradiente de centrifugación		SEM
		Control (Sin gradiente)	Androcoll™-P (Large)	
Motilidad total	30	37'7 ^a (6'0-66'0)	56'5 ^b (8'0-84'0)	10'3
	150	20'2 ^a (5'0-37'0)	35'0 ^b (6'0-63'0)	5'5
Motilidad progresiva	30	28'3 ^a (4'0-57'0)	47'3 ^b (6'0-75'0)	8'9
	150	16'0 ^a (3'0-31'0)	29'0 ^b (4'0-53'0)	4'8
Integridad de membrana plasmática y acrosomal	30	35'0 ^a (13'4-56'5)	51'2 ^b (18'0-69'7)	6'5
	150	33,9 ^a (9'4-50,7)	29'0 ^b (4'0-53'0)	5'9

^{a,b} Valores con diferentes superíndices dentro de cada fila difieren en $P < 0'001$. Entre paréntesis se muestra el rango.

4.2.2.1 Porcentajes de recuperación de espermatozoides móviles totales, móviles progresivos y de espermatozoides con integridad de membranas plasmática y acrosomal

En relación con los porcentajes de recuperación, tanto los de espermatozoides móviles totales, los de espermatozoides con motilidad progresiva como los que mostraban integridad de las membranas plasmática y acrosomal, fueron significativamente diferentes ($P < 0'05$) entre las muestras no tratadas y las procesadas con el gradiente de centrifugación Androcoll™-P (Large). En todos los casos hay un mayor porcentaje de recuperación en las muestras procesadas con el gradiente de centrifugación Androcoll™-P (Large). Estas diferencias se observaron tanto a los 30 como a los 150 min post-descongelación (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentajes de recuperación medios \pm SEM de los criterios de calidad espermática post descongelación.

Parámetro (como % de recuperación)	Tiempo (min)	Gradiente de centrifugación		SEM
		Control (Sin gradiente)	Androcoll™-P (Large)	
Motilidad Total	30	47'8 ^a (11'1-85'3)	59'4 ^b (39'3-102'4)	11'6
	150	25'6 ^a (9'2-43'5)	40'3 ^b (28'9-79'4)	6'4
Motilidad progresiva	30	82'9 ^a (14'3- 203'5)	95'6 ^b (52'7-203'6)	24'1
	150	45'5 ^a (10'7-86'1)	67'2 ^b (41'9-164'3)	13'5
Integridad de membrana plasmática y acrosomal	30	39'7 ^a (23'4-62'4)	59'9 ^b (32'4-84'7)	6'1
	150	38,1 ^a (16,4-55,9)	50'7 ^b (25'8-64'7)	5'2

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

4.2.2.2 Concentración de MDA en muestras congeladas-descongeladas

La concentración de MDA fue diferente significativamente ($P < 0'001$) entre las muestras espermáticas tratadas o no con el gradiente de centrifugación. En la Figura 35, se representan las respectivas concentraciones de MDA para ambas muestras. Las muestras no tratadas con el gradiente Androcoll™-P (Large) presentaron una concentración media de MDA de $22'3 \pm 2'5 \mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides, mientras que el grupo tratado con el Androcoll™-P (Large) tuvo una concentración media de $16'4 \pm 2'5 \mu\text{mol} / 30 \times 10^6$ espermatozoides.

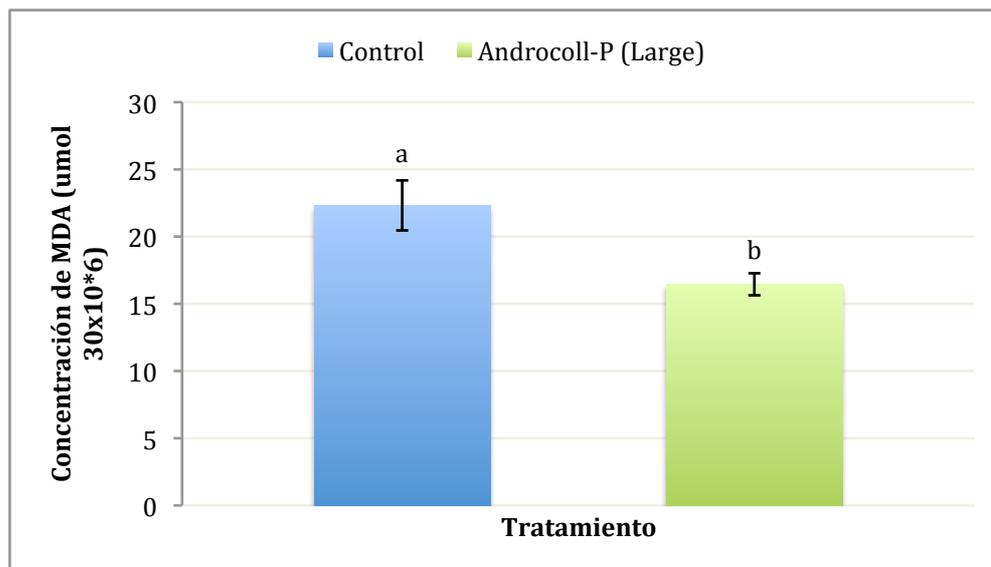


Figura 35. Concentración de Malonildialdehído \pm SEM (MDA) en muestras congeladas-descongeladas y tratadas o no antes de la congelación con el coloide de centrifugación Androcoll™-P (Large).

^{a,b} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0'001$).

4.2.2.3 Producción intracelular de ROS en las muestras congeladas-descongeladas

En la Figura 36, se representan las intensidades de fluorescencia inducidas indicativas de la producción intracelular de ROS en muestras tratadas o no con el gradiente de centrifugación Androcoll™-P (Large) tanto a los 30 como a los 150 min post-descongelación. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos grupos, así como tampoco se detectaron diferencias ($P > 0.05$) entre los tiempos post-descongelación ni hubo interacción tratamiento x tiempo.

4.2.2.4 Grado de desestabilización de la membrana plasmática en las muestras congeladas-descongeladas

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las muestras tratadas o no con el Androcoll™-P (Large), en el porcentaje de espermatozoides con desestabilización de la membrana plasmática a la descongelación, en muestras previamente sometidas a un procedimiento de capacitación espermática (Figura 37).

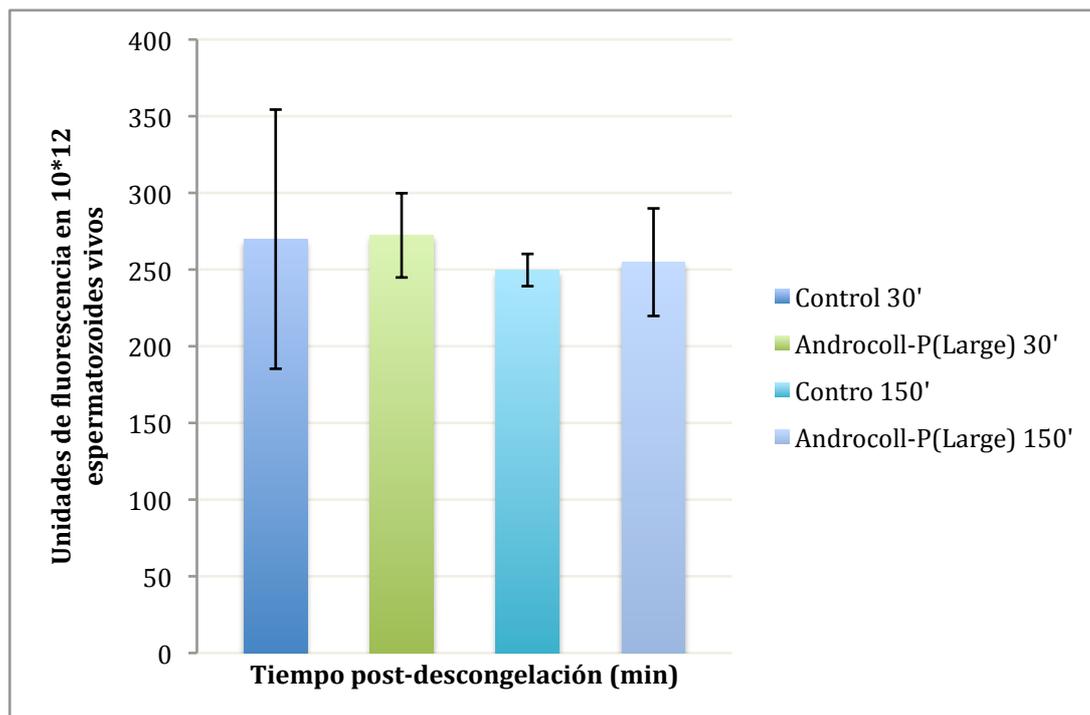


Figura 36. Intensidad de fluorescencia inducida \pm SEM expresada en unidades de fluorescencia en 10^{12} espermatozoides vivos, en muestras tratadas con y sin gradiente de centrifugación y congeladas-descongeladas.

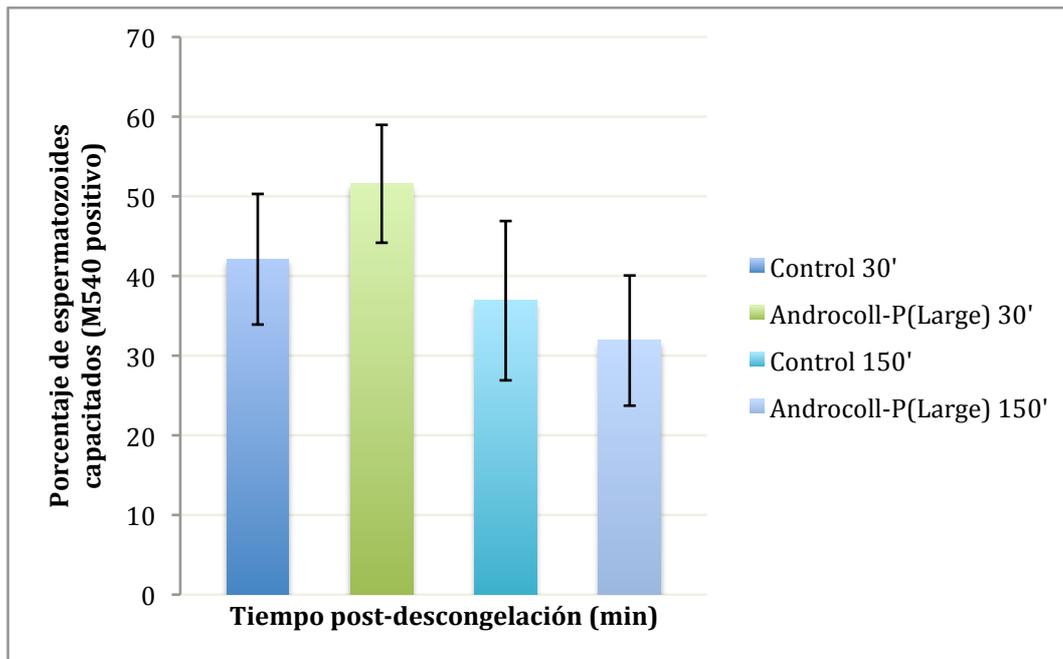


Figura 37. Porcentajes de capacitación espermática \pm SEM en muestras tratadas con y sin gradiente de centrifugación y congeladas-descongeladas.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo científico demuestra por primera vez la influencia negativa de los espermatozoides afuncionales sobre la congelabilidad de los funcionales en la especie porcina. En la especie humana ha sido ampliamente demostrado el efecto negativo que los espermatozoides con morfoanomalías y la peroxidación lipídica de los espermatozoides afuncionales ejercían sobre parámetros de calidad espermática como la motilidad (Alvarez y *co/s.*, 1987; Aitken y Clarkson, 1987; Aitken y Fisher, 1994; Sharma y Agarwal, 1996; Aitken, 2004). En espermatozoides de porcino, Roca y *co/s.* (2006b) demostraron que las morfoanomalías condicionan la congelabilidad espermática. El grado de influencia negativa de los espermatozoides afuncionales sobre la congelabilidad de aquellos funcionales es proporcional al porcentaje de espermatozoides alterados, con morfoanomalías y/o con pérdida de integridad de sus membranas (Aitken y Fisher, 1994; Aitken, 1995).

En condiciones normales, en centros destinados a producción de dosis de inseminación no es habitual encontrar animales que presenten eyaculados con una alta proporción de espermatozoides afuncionales. En la primera experiencia de este estudio, justificamos la razón de utilizar muestras espermáticas con un alto porcentaje de espermatozoides afuncionales para demostrar, por un lado, el efecto negativo que ejerce esta subpoblación sobre la congelabilidad de los funcionales, pero también, que dicho efecto negativo es proporcional al porcentaje de espermatozoides afuncionales presentes en el eyaculado. Además, otra justificación, radica en el hecho que la evaluación de los efectos de los espermatozoides afuncionales es complicado ya que se han utilizado eyaculados de verracos pertenecientes a centro de inseminación y usualmente en estos centros se dispone de eyaculados con calidades espermáticas relativamente elevadas (Wolf y Smital, 2009) por lo que disponer de eyaculados con una alta proporción de espermatozoides afuncionales se hace difícil. De esta manera, para evaluar el efecto de los espermatozoides afuncionales sobre la congelabilidad de los funcionales, se debe inducir la afuncionalidad provocando la pérdida de integridad de membranas. En algunas ocasiones, verracos seleccionados por determinadas características de producción como el rendimiento magro o el espesor de grasa dorsal y con un elevado mérito genético pueden tener eyaculados de mala calidad y por eso, conociendo los efectos negativos de los espermatozoides afuncionales en dichos eyaculados resulta de utilidad ver que mecanismos existen para eliminar estas poblaciones espermáticas de los eyaculados, como se tratará posteriormente en este trabajo.

Cabe destacar que al trabajar con animales seleccionados, que forman parte de programas de inseminación artificial y que por tanto están sujetos a sistemas de manejo estandarizados y a un control estricto de las posibles fuentes de variación externas, se esperaría que las diferencias entre verracos para las características de calidad espermática a la descongelación fuesen mínimas, sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre verracos, resultados que confirman los obtenidos por Larson y Einarsson, (1976); Johnson, (1985); Reed (1985); Thurston y *co/s.* (2001); Park y Yi. (2002), Roca y *co/s.*

(2006b) donde se demuestra que existe una variación individual entre verracos en la criopreservación. Sin embargo, en este trabajo se demuestra por primera vez que el impacto negativo que los espermatozoides afuncionales ejercen sobre los funcionales, varía en función del verraco, es decir, que los mecanismos de acción de los espermatozoides afuncionales difieren entre verracos. Existen verracos que se pueden considerar malos congeladores (Medrano y cols., 2002; Hernández y cols., 2007a) y en nuestros resultados observamos, por ejemplo, que el verraco 4 presenta un baja calidad seminal a la descongelación en condiciones estándar (grupo 100 % espermatozoides funcionales), sin embargo, este verraco, presenta altos porcentajes de recuperación en la integridad de membranas plasmática y acrosomal en las muestras con mayor porcentaje de espermatozoides afuncionales (75, 50 y 25 %), lo que demuestra una mayor resistencia de los espermatozoides funcionales de este verraco a la influencia negativa de los espermatozoides afuncional. Por el contrario en el verraco 1 se observa una buena calidad seminal a la descongelación, pero, hay menor recuperación en integridad de membranas conforme hay más espermatozoides afuncionales en la muestra, sugiriendo una mayor influencia de los espermatozoides afuncionales sobre los funcionales en este caso. Esto implica que en un animal buen congelador, sus espermatozoides no están, necesariamente, mejor protegidos frente a un aumento de los espermatozoides afuncionales en la muestra. Es decir, existen variaciones entre verracos respecto al efecto negativo de los espermatozoides afuncionales sobre los funcionales y esto se refleja en la obtención de elevados porcentajes de recuperación de espermatozoides funcionales en algunos verracos. Este indicio de sensibilidad de los espermatozoides funcionales con respecto a los afuncionales y que difiere entre verracos, podría estar asociado con la composición de la membrana plasmática de los espermatozoides de porcino. Al respecto, Cerolini y cols. (2001) y Maldjian y cols. (2005) observaron diferencias en la composición de ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas de espermatozoides de porcino, frescos y congelados-descongelados, plasma seminal (Hernández y cols., 2007) y enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa Cerolini y cols. (2001). El hecho que existan verracos con altos porcentajes de recuperación en parámetros de calidad espermática, aún cuando aumente progresivamente el porcentaje de espermatozoides afuncionales en la muestra, sería motivo de futuras investigaciones a nivel de membrana de estos espermatozoides.

La calidad espermática de los verracos se ve afectada considerablemente por la criopreservación (Almlid y Johnson, 1988; Eriksson y Rodríguez-Martínez, 1996; Rodríguez-Martínez y cols., 1996; Woelders y cols., 1996.). En el presente estudio, los parámetros de calidad espermática, es decir, la motilidad total, la motilidad progresiva y viabilidad espermática (medida como la integridad de las membranas plasmática y acrosomal), se redujo significativamente después de la congelación y descongelación. Observándose una reducción aproximada del 40 al 50 % en la motilidad espermática y del 30 al 40 % en la viabilidad. La pérdida de calidad espermática difiere de acuerdo con la calidad inicial, es

decir, una mala calidad espermática en términos de mayor porcentaje de espermatozoides afuncionales en la muestra, se vio más afectada, como lo demuestran los porcentajes bajos de recuperación de espermatozoides en muestras con un 50 y 25 % de espermatozoides funcionales respecto de la motilidad, la motilidad progresiva y la integridad de membranas plasmática y acrosomal. En contraste, Woelders y cols. (1996) concluyeron que la calidad espermática antes y después de la congelación no se encuentran relacionadas, sin embargo, una explicación de estos resultados, que son contradictorios en relación con los nuestros, propuesta por estos investigadores es o radica en el hecho que partían en sus experimentos de eyaculados con buena calidad espermática antes de la criopreservación.

En relación con la motilidad espermática, se ha demostrado que algunas organelas citoplasmáticas como las mitocondrias, necesarias para el aporte de ATP para el movimiento flagelar, son quizás las estructuras más sensibles de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Cummins y cols., 1994). Esto es de particular importancia ya que este parámetro se ha correlacionado con la fertilidad *in vivo* (Hirai y cols., 2001). La actividad mitocondrial es la principal responsable de la generación de agentes oxidantes como resultado de una disrupción en el transporte de electrones (Halliwell y Gutteridge, 1999). El acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa permite mantener un potencial de membrana mitocondrial alto, requisito necesario para la formación de ATP en la mitocondria (Cramer y Knaff, 1990). Para protegerse, la célula espermática porcina presenta altos niveles de actividad superóxido dismutasa tanto a nivel mitocondrial como en el citoplasma (Mennella y Jones, 1980; Guthrie y Welch, 2006). La membrana plasmática es la estructura celular espermática que resulta dañada en mayor medida durante la criopreservación (Parks, 1997), aunque la membrana acrosómica externa y las membranas de la mitocondria también se ven afectadas (Watson, 1995). Estas alteraciones estructurales provocan pérdida de enzimas intracelulares y trastornos en el balance iónico, con pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana y trastornos en el metabolismo aeróbico y glucólisis anaeróbica, comprometiendo todas aquellas funciones celulares energético-dependientes, como la motilidad. Nuestros resultados indican que hay una disminución de la motilidad total y progresiva a la descongelación conforme aumenta proporcionalmente la cantidad de espermatozoides afuncionales. Esto supone que, debido al menor número de células espermáticas capaces de mantener su actividad metabólica normal y por consiguiente su actividad mitocondrial, la calidad espermática medida en términos de la motilidad total y progresiva, se reduce de manera significativa. De la misma manera, se presenta una menor recuperación de espermatozoides móviles totales y progresivos, demostrándose la influencia negativa de los espermatozoides afuncionales sobre estos parámetros de calidad espermática.

En la especie porcina, durante la criopreservación, se utiliza solamente la fracción rica, con una reducida cantidad de plasma seminal. El plasma seminal, aunque no es

precisamente rico en compuestos con capacidad antioxidante (Brooks, 1990; Watson, 1990), puede disminuir el impacto negativo de la criopreservación. El proceso de centrifugación predispone a dos circunstancias favorecedoras de la generación de sustancias ROS (Carvajal, 2004), la primera deriva de su propia función, es decir, la de concentrar las células espermáticas mediante el proceso físico *per se* y la segunda, el efecto traumático que supone todo proceso de centrifugación para las células espermáticas. Comaschi y cols. (1989), evaluaron el fenómeno de síntesis de sustancias ROS en espermatozoides de porcino centrifugados y observaron que dicha centrifugación inducía una alta producción de MDA, utilizado como indicador indirecto del proceso de peroxidación lipídica, y que las sustancias ROS más frecuentes eran los radicales alcóxilos (RO[•]) e hidroperóxilos (HO₂[•]). En nuestro estudio no determinamos el efecto de la centrifugación sobre la formación de sustancias ROS extracelulares, pero sometimos todas las muestras a centrifugación previa antes de ser criopreservadas, y los resultados obtenidos indican que conforme disminuye el porcentaje de espermatozoides funcionales en la muestra, se predispone a una mayor producción de MDA, indicando de forma indirecta igualmente, que existe una mayor peroxidación lipídica y como tal, los espermatozoides afuncionales ejercen un impacto negativo sobre los funcionales en la criopreservación. Dawra y cols. (1983) habían llegado, anteriormente, a conclusiones similares con espermatozoides de toro, demostrando que el centrifugado exacerbaba la peroxidación lipídica y que el plasma seminal era capaz de controlar esta peroxidación. En cuanto al efecto de la centrifugación y la eliminación del plasma seminal, al extraer las sustancias antioxidantes se incrementa la sensibilidad del semen de porcino, dado que se pierde el entorno favorecedor del plasma seminal. Hernández y cols. (2007b) observaron una mayor generación extracelular de sustancias ROS al eliminar proteínas totales y enzimas intracelulares como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa. Juárez y cols. (2011) describieron una mayor resistencia al enfriamiento rápido en espermatozoides incubados 24 h en su propio plasma seminal, sin embargo, esto favorece una mayor generación extracelular de sustancias ROS en el eyaculado, tal y como hemos observado en nuestros resultados al incrementarse proporcionalmente la cantidad de espermatozoides afuncionales. En espermatozoides humanos, se ha demostrado que dicho proceso físico implica un incremento de las sustancias ROS (Shekarris y cols., 1995). Estos autores, demuestran que el tiempo de centrifugación más la velocidad a la que se centrifuga son o constituyen un factor importante para inducir la formación de sustancias ROS.

Está bien establecido que la criopreservación induce la peroxidación lipídica en espermatozoides de mamíferos. Alvarez y Storey (1992) demostraron que el proceso de congelación y descongelación predispone a una mayor peroxidación de los lípidos de la membrana espermática de espermatozoides humanos. Del mismo modo, Chantterjee y Gagnon (2001) demostraron cómo los procesos de congelación y descongelación causan un aumento de la peroxidación lipídica en espermatozoides bovinos. Hasta el presente estudio,

no hubo datos disponibles sobre el efecto de los espermatozoides afuncionales sobre la criopreservación y diferentes parámetros de calidad espermática, entre ellos, la peroxidación lipídica de los espermatozoides funcionales. Los peróxidos lipídicos, derivados de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, son muy inestables y se descomponen para formar una serie compleja de compuestos. Estos incluyen compuestos carbonilo, de los cuales el más abundante es el malonildialdehído (MDA). Por lo tanto, la medición del MDA se utiliza ampliamente como un indicador de la peroxidación de lípidos en una variedad de tipos celulares, incluyendo espermatozoides (Sikka, 1996). En el presente estudio, la producción de MDA se utilizó para determinar los niveles de peroxidación de los espermatozoides descongelados.

Las membranas de los espermatozoides de verraco presentan una particular composición lipídica ya que sus cadenas laterales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Buhr y cols., 1994). Esta característica predispone a los espermatozoides de verraco al fenómeno de la peroxidación lipídica (White, 1993). Nissen y Kreysel (1983), demostraron que la peroxidación lipídica conllevaba una metabolización de los ácidos grasos poliinsaturados y la consiguiente pérdida de motilidad espermática. Nuestros resultados indican que existe una mayor peroxidación lipídica a la descongelación conforme disminuye el porcentaje de espermatozoides funcionales. Este fenómeno se podría asociar a una menor integridad de las membranas plasmática y acrosomal, tal y como se observa por los bajos porcentajes de recuperación, para este parámetro, obtenidos en muestras con escasa cantidad de espermatozoides funcionales. Estos resultados coinciden con los reportados por Cerolini y cols. (1999) donde se demuestra que en los espermatozoides criopreservados de verraco, cuando la integridad de la membrana era baja tenían menores cantidades de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas que aquellos espermatozoides criopreservados procedentes de verracos con una integridad de membrana alta. Esta circunstancia puede estar relacionada al fenómeno de la peroxidación lipídica, el cual provocaría una pérdida de ácidos grasos poliinsaturados y consecuentemente una drástica caída de la motilidad espermática tal y como se ha observado en nuestros resultados, y discutido anteriormente, conforme disminuye la cantidad de espermatozoides funcionales. La concentración de MDA en las muestras espermáticas descongeladas está correlacionada de forma negativa, independientemente del porcentaje de espermatozoides funcionales antes de la congelación, con los porcentajes de espermatozoides móviles totales, espermatozoides móviles progresivos y de espermatozoides con integridad de membranas plasmática y acrosomal. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bell y cols. (1993) que observaron una correlación negativa entre la motilidad y la peroxidación lipídica durante la criopreservación de espermatozoides humanos. Igualmente, Alvarez y Storey (1992) demostraron que la criopreservación favorece una mayor peroxidación lipídica en espermatozoides humanos.

La particular composición de los lípidos de las membranas espermáticas en la especie porcina junto con el proceso de criopreservación, provocan la generación intracelular de sustancias ROS y el fenómeno de peroxidación lipídica, asociado a ROS extracelulares. Estos fenómenos causan la pérdida de integridad de las membranas plasmática y acrosomal tal y como hemos demostrado en nuestro trabajo, así como baja fertilidad y prolificidad de los espermatozoides criopreservados de porcino (Roca y cols., 2006a). Los efectos negativos de la peroxidación lipídica han sido demostrados sobre la fertilidad espermática en la especie humana (Aitken, 1999). Este investigador considera que una de las principales acciones negativas del estrés oxidativo y de la peroxidación lipídica radica en su capacidad de fragmentar el ADN del núcleo del espermatozoide, de forma tal que no se le imposibilita para fecundar pero sí para desarrollar embriones viables. En este sentido, se podrían realizar estudios en dónde se evalúe cómo la presencia de espermatozoides afuncionales afecta la capacidad de fecundación de los espermatozoides funcionales en un eyaculado.

Hoy en día es aceptado en la comunidad científica que la criopreservación induce la formación de ROS, tanto intracelular como extracelular, y que esto es una de las causas de la disminución en la calidad espermática a la descongelación (Watson, 2000; Chatterjee y Gagnon, 2001). El proceso de peroxidación induce alteraciones estructurales, una rápida e irreversible pérdida de la motilidad, un profundo cambio en el metabolismo y un aumento en la tasa de liberación de componentes intracelulares (Jones y Mann, 1977). Esta pérdida de motilidad que estos autores mencionan, se exagera conforme menos espermatozoides funcionales estén presentes en el momento de la criopreservación tal y como se confirma en el presente estudio con la obtención de una correlación negativa y significativa entre la concentración de MDA y la motilidad total. El proceso de criopreservación, que induce una mayor producción de sustancias ROS intra y extracelulares, está ligado a una mayor presencia de espermatozoides alterados y afuncionales (Aitken y Clarkson, 1987; Aitken y cols., 1994). Aún obteniendo mejores porcentajes de integridad de membrana plasmática y acrosomal en los espermatozoides congelados-descongelados en porcino, lo que implicaría partir de eyaculados de buena calidad espermática, con un alto porcentaje de espermatozoides funcionales, el proceso de criopreservación *per se* provoca un incremento significativo de espermatozoides afuncionales, ya sea muertos, o con alteraciones morfológicas que les impide fecundar (Watson, 1996). Se ha demostrado, en humano, que los espermatozoides alterados y muertos son una fuente importante de generación de sustancias ROS (Kessopoulov y cols., 1992; Aitken y cols., 1994). Estos resultados, si bien son en espermatozoides humanos, coinciden con los obtenidos en este trabajo con respecto a espermatozoides de porcino y demuestran, una vez más, que los espermatozoides afuncionales favorecen la generación de sustancias ROS extracelulares. En nuestro estudio la formación de sustancias ROS ha sido determinada indirectamente por la concentración de MDA cuya generación es proporcional a la cantidad de espermatozoides afuncionales en la muestra (Cerolini y cols., 2000).; y confirma los resultados descritos por Kessopoulov y cols.

(1992) y Aitken y *cols.* (1994) en la especie humana.

Para que el estrés oxidativo, inherente al fenómeno de la peroxidación lipídica, se produzca, además de la presencia de una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas espermáticas, es necesario que existan sustancias oxígeno reactivas (Aitken, 1995). En los protocolos de criopreservación espermática concurren una serie de etapas, comunes en todos ellos, que favorecen la producción de las sustancias ROS intracelulares. Así, la ausencia de plasma seminal, la centrifugación del semen previa a la dilución y congelación y por último, la consecuencia lógica del proceso de criopreservación con la presencia de un mayor número de espermatozoides alterados, ya sea con morfoanomalías o con pérdida de la integridad de sus membranas plasmática y acrosomal por la propia dinámica de los cambios físicos que en él se producen; son situaciones que garantizan la generación intracelular de sustancias ROS. Según Brouwers y *cols.* (2005) se produce pérdida de enzimas intracelulares responsables de la metabolización de las ROS y la disminución de compuestos antioxidantes (alfa-tocoferol, ácido ascórbico, taurina, hipotaurina) en el medio extracelular tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación. Debido a esto, y con base en nuestros resultados obtenidos de sustancias ROS con diferentes porcentajes de espermatozoides funcionales, la mayor generación intracelular de sustancias ROS podría explicarse en el hecho que aunque hay un menor número de células espermática funcionales, la actividad mitocondrial metabólica normal que se produce en estas células genera compuestos oxidativos y en presencia de cantidades reducidas de enzimas antioxidantes a nivel intracelular y de compuestos antioxidantes extracelulares, se predispone a una mayor generación intracelular de sustancias ROS porque estos no se pueden metabolizar rápidamente y debido a su naturaleza química inestable, buscan el equilibrio de su último orbital electrónico, reaccionan con compuestos cediendo o aceptando electrones, y de esta manera se desestabiliza la membrana al iniciarse reacciones en cadena con el fin de buscar la estabilidad química que resulta, no obstante, en un detrimento de la función de la célula. Además, otro factor importante, es que debido a la presencia de espermatozoides afuncionales, con pérdida de integridad de sus membranas, al haber salida de fluidos celulares a medio extracelular, esto favorece la formación de sustancias ROS extracelulares que podrían estar implicadas y ser copartícipes del daño en las membranas de los espermatozoides funcionales, dado que estas son también afectadas por las sustancias ROS intracelulares, sin embargo esta hipótesis está sujeta a ser confirmada en estudios de investigación posteriores.

Las ROS intracelulares intervienen de forma notable en la funcionalidad espermática (Aitken, 1995). Se ha descrito en la bibliografía que la existencia de ciertos niveles de sustancias ROS son necesarios para que se produzcan fenómenos tales como la capacitación (de Lamirande y Gagnon, 1995), la hiperactivación (Griveau y *cols.*, 1994), y la reacción acrosómica en condiciones fisiológicas (Griveau y *cols.*, 1995; Zini y *cols.*, 1995,

Zhang y Zheng, 1996). Sin embargo, una alta concentración de sustancias ROS intracelulares, podría resultar perjudicial para la calidad espermática. En este sentido, en el presente trabajo, se demuestra que una mayor generación de sustancias ROS intracelulares coincide con una presencia mayor de espermatozoides afuncionales en la muestra y esto influye de manera negativa sobre la recuperación de espermatozoides móviles totales a la descongelación. Estos resultados de motilidad observados en nuestro estudio coinciden con los descritos por Sharma y cols. (1996) quienes reportaron que, los niveles elevados de ROS intracelular están implicados con una reducción de la motilidad de los espermatozoides, una disminución en la capacidad de fusión del espermatozoide con el ovocito y una reducción de la fertilidad *in vitro*. De esta manera, se demuestra que las sustancias ROS perjudican a la motilidad espermática, y además en nuestro estudio se demuestra que esta disminución en motilidad es proporcional a la cantidad de espermatozoides afuncionales en el eyaculado.

En el sistema reproductivo femenino, durante la capacitación espermática, la albúmina y algunas lipoproteínas presentes van a favorecer la salida y eliminación de colesterol que se encuentra en la membrana plasmática de los espermatozoides, (Wolf y cols., 1986; Flesch y cols., 2001a; Visconti y cols., 2002), y este fenómeno ocasiona un incremento en la fluidez de la membrana necesario para la capacitación espermática, además de inducir a la fusión de membranas durante la reacción acrosómica y la interacción espermatozoide-ovocito (Primakoff y Myles, 2002). La presencia de ión bicarbonato va a desempeñar un papel determinante en la habilidad de los espermatozoides para experimentar la capacitación tanto *in vivo* como *in vitro* (Okamura y cols., 1985; Visconti y cols., 1995b; Harrison, 1996; Harrison y cols., 1996). Según Harrison, (1996); Visconti y Kopf, (1998) y Watson y Green, (2000) se puede generar desestabilización de la membrana de los espermatozoides, en condiciones de capacitación *in vitro*, si éstos se incuban en medios adecuados a temperatura fisiológica, en presencia de ión bicarbonato, albúmina, ión calcio y sustratos energéticos como glucosa, piruvato y/o lactato. Nuestros resultados indican que cuanto más espermatozoides afuncionales estén presentes en las muestras criopreservadas, los espermatozoides funcionales son más susceptibles a la capacitación espermática, es decir, responden más rápidamente a un tratamiento de capacitación. Estos interesantes hallazgos, deben ser confirmados mediante la realización de más estudios adicionales en donde se evalúen y se confirmen el o los efectos de los espermatozoides afuncionales sobre la capacitación espermática de aquellos funcionales y su impacto en la fertilidad. El procedimiento de capacitación cumple con las características anteriormente citadas, empleando un medio, el Tris-buffer modificado básico suplementado (Abeydeera y cols., 1997) que si bien no incorpora ión bicarbonato, es un medio de capacitación ampliamente utilizado en aquellas experiencias destinadas a evaluar capacitación espermática (Caballero y cols., 2009, Juárez y cols., 2011) o para producir embriones *in vitro* (Gil y cols., 2007) en la especie porcina.

Está demostrado que un alto porcentaje de los espermatozoides congelados-descongelados sufren una desestabilización prematura de las membranas equivalente a la que se observa durante el proceso de capacitación y reacción acrosómica (Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997). Estos cambios, si bien, pueden condicionar la fertilidad, parecen estar relacionados con modificaciones a nivel de la composición y dinámica de la bicapa fosfolipídica (Buhr y cols., 1994). En nuestras condiciones experimentales, la alteración del orden lipídico se detectó con Merocianina 540 (M540). El grado de desestabilización de los lípidos de la membrana plasmática se vio afectado según el porcentaje de espermatozoides funcionales presentes antes de la criopreservación. Las muestras con mayor porcentaje de espermatozoides funcionales presentaron un mayor porcentaje de células viables y con bajo desorden lipídico mientras que las muestras con menor proporción de espermatozoides funcionales presentaron un mayor grado de desestabilización de la membrana plasmática y por lo tanto mayor grado de espermatozoides con signos tempranos de capacitación como era de esperar y en concordancia con los resultados obtenidos de generación intracelular de sustancias ROS. Todo ello pone de manifiesto la mayor estabilidad de las muestras espermáticas con mayor proporción de espermatozoides funcionales a la que se ha hecho referencia anteriormente. Esta, aparentemente, alta predisposición a la capacitación de los espermatozoides funcionales, hará que estos pierdan su capacidad fecundante antes de llegar al sitio de la fecundación. Sin embargo, esto debe ser estudiado con mayor precisión, ya que como hemos observado también en nuestro trabajo, existen diferencias entre verracos al tratamiento de capacitación y además, un hecho no demostrado hasta ahora, que los espermatozoides afuncionales influyen de forma diferente sobre los funcionales en tratamientos de capacitación. Este último fenómeno, se ha notado en los verracos 2 y 4 en donde las muestras con diferentes porcentajes de espermatozoides funcionales no han presentado diferencias significativas durante la capacitación. Por el contrario, en los verracos 1, 3 y 5 si ha habido diferencias significativas en capacitación espermática según la cantidad de espermatozoides funcionales en la muestra por lo que la influencia del verraco sobre el efecto que ejercen los espermatozoides afuncionales sobre la capacitación es un factor de variación importante. Esto radica en el hecho, que si bien, esperaríamos que un espermatozoide afuncional conceptualmente definido, ejerciera la misma influencia en muestras similares, esto no se observa así, por lo que hacemos notar que existen diferencias entre espermatozoides afuncionales y estas diferencias se demuestran por lo anteriormente citado en capacitación espermática. Además, teniendo en consideración que una mayor producción de ROS intracelulares y la formación de sustancias ROS extracelulares resultado de la peroxidación lipídica, estimularía a los espermatozoides funcionales y los haría más sensibles a la capacitación, según se ha visto en nuestros resultados, no se sabe con certeza aún qué niveles de ROS se asocian con una capacitación espermática como tal.

La selección de espermatozoides por centrifugación coloidal es interesante desde el punto de vista de eliminación de espermatozoides con problemas de motilidad,

morfoanomalías e integridad de membranas plasmática y acrosomal. Esta separación se basa en cambios de densidad celular, es decir cambios en el punto isopícnico de las células, lo que determina una mayor o menor movilización a través de un coloide cuando este se somete a un proceso de centrifugación (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2009). Además, los mismos autores han descrito, en experimentos con espermatozoides equinos, la eliminación de plasma seminal, patógenos y ROS. En diversos experimentos se han utilizado diferentes gradientes de centrifugación (Mehmood y *cols.*, 2009, Maxwell, y *cols.*, 2007) con resultados satisfactorios de calidad espermática, sin embargo, debido a los bajos volúmenes utilizados, estos resultados no son de utilidad práctica ni aplicables en eyaculados de porcino donde normalmente se emplean grandes volúmenes. Por lo anterior, resulta interesante que una de las aplicaciones del gradiente de centrifugación Androcoll-P (Large), es que permite el empleo y procesamiento de mayores volúmenes de muestra espermática. En nuestro trabajo, aunque se emplearon volúmenes de 15 mL de semen y 15 mL de Androcoll-P (Large), que se podrían considerar volúmenes bajos, son relativamente altos si los comparamos con los volúmenes de otros coloides de centrifugación como Puresperm® o Porcisure®. Además, parece ser que el Androcoll-P (Large) permite la utilización de volúmenes mayores de semen, del orden de 100 mL hasta 250 mL inclusive (Van Wiene y *cols.*, 2011), sin embargo, esto tiene que ser estudiado más ampliamente para observar si los resultados son concluyentes.

En espermatozoides de porcino, se han realizado pocos trabajos de investigación y actualmente el gradiente Androcoll-P (Large) se encuentra en fase experimental, por lo que se requiere de más estudios adicionales que validen los resultados expuestos en la literatura hasta el día de hoy y que vayan destinados, principalmente, a estudiar la aplicación práctica que esta técnica pudiese tener. En este sentido, en nuestro trabajo tratamos de eliminar, en la medida de lo posible, los espermatozoides afuncionales de eyaculados con una mala calidad inicial y determinar si dicha eliminación podría influir de forma positiva sobre la congelabilidad de los espermatozoides funcionales. Los eyaculados que se utilizaron fueron de verracos que presentaban una mala calidad espermática. No utilizamos las mismas poblaciones de espermatozoides funcionales y afuncionales que en la experiencia 1 porque no es común encontrar en centros de inseminación artificial, machos cuyos eyaculados sean de muy baja calidad, característica que si se presentara, estaría relacionada con alguna patología en el animal. Además, la utilidad práctica que esta técnica pudiera tener, radica en el hecho que si un determinado verraco cuyo potencial genético sea de alto mérito pero que presentase calidades espermáticas reducidas, cuyo orden de magnitud no sea excesivamente reducido, la centrifugación coloide podría resultar una alternativa para mejorar esa calidad espermática.

Es bien reconocido que los procesos de congelación y descongelación no sólo inducen la muerte celular, sino que también provocan daños subletales en la mayoría de los

espermatozoides que sobreviven a la criopreservación. Estos daños subletales o envejecimiento prematuro conllevan a una reducción en la vida útil de los espermatozoides criopreservados. Ortega-Ferrusola y cols. (2008), en espermatozoides de equino, indicaron que posteriormente a la utilización del Androcoll-E, la mayor parte de los indicadores de calidad espermática evaluados fueron comparables a los de espermatozoides recién eyaculados. van Wienen y cols. (2011) en espermatozoides de porcino, y Morrell y Rodríguez-Martínez (2009) en espermatozoides de equino, reportaron que la morfología espermática se mejoraba significativamente en las muestras centrifugadas con el coloide Androcoll-P (Large) y Androcoll-E, respectivamente, en comparación con los controles no seleccionados. En el presente estudio, la morfología espermática se mejoró, y pasó de un 60 % al 78 %. Aunque esta mejoría es evidente, no fue significativa dado al escaso tamaño de muestra utilizado. Es importante hacer notar que este estudio es preliminar y se deben realizar más experiencias con un mayor número de eyaculados y evaluar estos parámetros de calidad espermática.

El procesamiento de los eyaculados con el coloide Androcoll-P (Large) no perjudicó la calidad de los mismos. Este hallazgo, además de indicar que la utilización del gradiente de centrifugación no altera la motilidad e integridad de las membranas plasmática y acrosomal, puede indicar la utilidad del gradiente de centrifugación para conseguir una mejora en la calidad espermática post-descongelación como se demuestra posteriormente. Estos hallazgos en cantidad espermática son consistentes con las observaciones formuladas anteriormente para espermatozoides de equino por Morrell y cols. (2009a, 2009d) y previamente para espermatozoides de porcino por Morrell y cols. (2009f). Sin embargo, en otro estudio realizado por Morrell y Rodríguez-Martínez (2009), en espermatozoides de equino reportaron diferencias significativas para la motilidad espermática en muestras tratadas con el gradiente Androcoll-E antes de la congelación donde se observó una mayor motilidad. Esta divergencia podría asociarse a un efecto individual, donde debido a las variaciones entre sementales, en algunos se mejoraría la motilidad y en otros no. En todo caso, no hay ningún estudio fundamentado, donde se demuestre que el Androcoll, empeore la calidad espermática.

La utilización del Androcoll-P (Large) mejoró significativamente los parámetros de calidad espermática como la motilidad, la motilidad progresiva y la integridad de membranas plasmática y acrosomal en muestras congeladas-descongeladas. En el presente estudio, se demuestra por primera vez el efecto del gradiente de centrifugación Androcoll-P (Large) en espermatozoides criopreservados de porcino. Estos resultados coinciden con los observados previamente en equino con Androcoll-E por Morrell y cols. (2009e); Macías-García y cols. (2009) y en bovino por Olds-Clarke, (1996) y Thys y cols. (1998). Los resultados sugieren que el empleo del gradiente de centrifugación puede considerarse como un método eficaz para mejorar la calidad espermática en muestras congeladas-descongeladas, partiendo de

eyaculados de baja calidad, y con el conocimiento previo, demostrado en este trabajo, que los eyaculados con un alto porcentaje de espermatozoides afuncionales, condicionan significativamente la congelabilidad de los espermatozoides funcionales.

La eliminación de la mayor parte del plasma seminal mediante centrifugación simple ha mejorado algunos parámetros de calidad espermática como la motilidad y esto se refleja en una mayor supervivencia de espermatozoides equinos en dosis de inseminación artificial (Brinsko y cols., 2000; Loomis, 2006; Aurich, 2008). Sin embargo, este procedimiento no selecciona los mejores espermatozoides del eyaculado, es decir, la centrifugación simple no discrimina entre espermatozoides funcionales y afuncionales (Rodríguez-Martínez y cols., 1997). Además, como se ha comentado anteriormente, la centrifugación simple favorece la peroxidación lipídica de los espermatozoides. La ventaja comparativa de la centrifugación coloide radica en el hecho constatado de que permite hacer una selección previa de los espermatozoides presentes en un eyaculado y de esta manera, evitar el posible condicionamiento que ejercen los espermatozoides afuncionales sobre los funcionales durante el proceso de criopreservación. Con respecto a la centrifugación simple, este estudio demuestra que los espermatozoides seleccionados con Androcoll-P (Large) producen menos MDA a la descongelación que en muestras no centrifugadas con dicho gradiente. Este fenómeno podría estar relacionado por la menor presencia de espermatozoides afuncionales en las muestras tratadas y por lo tanto, una menor producción de sustancias ROS extracelulares, ya que son los espermatozoides afuncionales los que generan y liberan al medio las sustancias ROS. En este sentido, la peroxidación lipídica es reconocida como un proceso perjudicial que conlleva a la pérdida de la motilidad y la disminución de la capacidad fertilizante de los espermatozoides en muchas especies, incluyendo la humana (Alvarez y Storey, 1984; Whishart, 1984; Aitken y cols., 1989; Gagnon y cols., 1991; De Lamirande y Gagnon, 1992; Hammerstedt, 1993; Aitken, 1994; Lenzi y cols., 1996). Los resultados observados en relación con la producción de MDA, reflejan que existe una mayor peroxidación lipídica en las muestras espermáticas que no son tratadas con el coloide Androcoll-P (Large) y esto demuestra que la selección y eliminación de espermatozoides afuncionales en el gradiente de centrifugación mejora la calidad espermática, que se hace evidente al detectar menores niveles de peroxidación lipídica en las muestras procesadas con dicho gradiente de centrifugación. Se ha visto que la peroxidación de lípidos se produce de forma espontánea en los espermatozoides de mamíferos (Alvarez y Storey, 1989), y en la especie humana es mucho mayor en eyaculados con mayor proporción de espermatozoides afuncionales (Aitken y cols., 1993).

Los resultados obtenidos en relación con la integridad de las membranas plasmática y acrosomal indican que la eliminación parcial de los espermatozoides muertos y con morfoanomalías antes de la congelación, mediante la centrifugación coloide con Androcoll-P (Large), mejora la supervivencia y la calidad espermática a la descongelación. Como se ha

indicado anteriormente, los espermatozoides afuncionales (muertos, moribundos y/o con morfoanomalías) favorecen la generación de ROS extracelular. Las ROS se consideran perjudiciales para la motilidad de los espermatozoides y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal (Pérez-Crespo y *cols.*, 2008), aunque también las ROS pueden afectar la fluidez de la membrana espermática (Lenzi y *cols.*, 2002) y la integridad de la cromatina (Baumber y *cols.*, 2003). Este resultado es consecuente con resultados anteriores en espermatozoides equinos, donde a través de Androcoll™-E se seleccionaron espermatozoides funcionales del resto del eyaculado (Johannisson y *cols.*, 2009).

La generación de ROS intracelular (medida en unidades de fluorescencia) fue incrementándose a lo largo del tiempo de incubación conforme disminuía el porcentaje de espermatozoides funcionales. Los espermatozoides que son centrifugados con el coloide Androcoll-P (Large) no generaron mayor cantidad de ROS intracelular que los no centrifugados. Este fenómeno indica que el efecto de un largo tiempo de centrifugación que requiere este gradiente no modifica la generación intracelular de ROS, por lo tanto se puede afirmar que la centrifugación con el coloide Androcoll-P (Large) no genera más agentes oxidantes por el propio hecho del proceso físico como tal, ni tampoco como consecuencia de una mayor actividad mitocondrial (Guthrie y Welch, 2005). Además, el presente estudio demuestra que las muestras centrifugadas con Androcoll-P (Large) no presentan una mayor sensibilidad al proceso de capacitación espermática medida con M540.

El Androcoll-P (Large) parece ser que funciona para centrifugar grandes volúmenes de eyaculado y este hecho determina su utilidad en la especie porcina como un tratamiento previo a la criopreservación de eyaculados con porcentajes relativamente elevados de espermatozoides afuncionales, demostrando además su eficiencia para una mejor congelabilidad de los espermatozoides funcionales sin alterar su capacidad de respuesta a un tratamiento de capacitación espermática. Sin embargo, cabe destacar que es necesario continuar validando el uso de esta técnica de separación para el procesado de mayores volúmenes de eyaculado y es por ello que se deben realizar estudios prospectivos en este sentido.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La presencia de espermatozoides afuncionales influye negativamente sobre la crio-resistencia de los espermatozoides funcionales y el grado de influencia parece ser proporcional al porcentaje de espermatozoides afuncionales presentes en la muestra.
2. La influencia de los espermatozoides afuncionales no sólo afecta los parámetros tradicionales de calidad espermática a la descongelación tales como la motilidad y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, sino que también afecta negativamente la capacidad antioxidante de los espermatozoides como respuesta frente a las agresiones oxidativas.
3. La presencia de espermatozoides afuncionales en el eyaculado parece que sensibiliza, en mayor medida, a los espermatozoides a responder más rápidamente a tratamientos de capacitación espermática.
4. La utilización de gradientes de centrifugación tales como el Androcoll™-P (Large) puede ser de utilidad para eliminar parcialmente los espermatozoides afuncionales en los eyaculados de porcino y de este modo, mejorar la crio-supervivencia de los espermatozoides presentes en dichos eyaculados.

VII. RESUMEN

7.1 Resumen

A partir de la hipótesis de que la calidad espermática en los eyaculados de porcino puede condicionar su posterior congelabilidad, los objetivos de esta investigación fueron: (1) demostrar si los espermatozoides afuncionales (espermatozoides con alteraciones morfológicas y/o funcionales) presentes en el eyaculado condicionan la congelabilidad de los funcionales; y (2) evaluar procedimientos que permitan eliminar de manera eficiente y rentable los espermatozoides afuncionales del eyaculado para criopreservar tan solo la población de funcionales. En una primera experiencia, destinada a evaluar como los espermatozoides afuncionales presentes en el eyaculado condicionan la congelabilidad de los funcionales, se utilizaron 15 eyaculados con buena calidad espermática (>85% de espermatozoides funcionales) procedentes de 5 verracos (3 eyaculados/verraco). En cada eyaculado se provocó la afuncionalidad en una población espermática (congelación brusca en nitrógeno líquido) que luego se mezcló en diferentes proporciones con la de espermatozoides funcionales (eyaculado original con más del 85% de espermatozoides funcionales) para originar 4 muestras con 100, 75, 50 y 25 % de espermatozoides funcionales. Antes de la congelación las muestras seminales fueron incubadas 24 h a 17 °C. El protocolo de congelación incluía la dilución en 2 etapas en un medio Tris-Yema-Glicerol-Equex, y el envasado en pajuelas de 0'5 mL y una velocidad media de congelación de -40 °C/min. Tras 7 d de conservación a -196 °C, las pajuelas se descongelaron individualmente a 37 °C durante 20 s. La calidad espermática, medida en términos de motilidad (Sistema CASA y expresada como porcentaje de espermatozoides mótils totales y mótils progresivos) y de integridad de membranas plasmática y acrosomal, medida por citometría de flujo con una triple tinción fluorescente [Hoechst-33342 (H-42), yoduro de propidio (IP) y el conjugado de lecitina de *Arachis hypogaea* con fluoresceína-isotiocianato, (PNA-FITC)], se valoró antes de la congelación y post-descongelación (30 y 150 min de incubación a 37 °C). La funcionalidad espermática [desestabilización de la membrana plasmática valorada con Merocianina 540 (M540) e Yo-Pro 1] fue evaluada post-descongelación (30 min) por citometría en muestras diluidas en un medio capacitante e incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂. La peroxidación lipídica, medida por espectrofotometría e indirectamente cuantificada por la concentración de Malondialdehído (MDA), y la producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (ROS) medida por citometría con el fluorocromo CM-H₂DCFDA [5-(y-6)-clormetil-2', 7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína, acetil ester] y *tert*-butilhidroperóxido, TBHP) fueron también evaluadas post-descongelación en muestras incubadas 15 y 30 min a 37 °C, respectivamente. Aunque hubo diferencias entre verracos ($P < 0'05$), tanto la calidad como la funcionalidad espermática, la producción de MDA y de ROS intracelular post-descongelación se vieron influenciadas ($P < 0'05$) por la presencia de espermatozoides afuncionales en el eyaculado, observándose la peor calidad y funcionalidad y la mayor producción de MDA y ROS en las muestras con mayores proporciones de espermatozoides afuncionales. En la 2ª experiencia, se emplearon 6 eyaculados de baja calidad espermática procedentes de otros tantos verracos. Los eyaculados se fraccionaron en dos mitades, aplicando el gradiente de centrifugación coloide Androcoll™-P (Large) antes de la congelación a una de ellas para eliminar los espermatozoides afuncionales. Una vez evaluada la cantidad y calidad de los espermatozoides recuperados tras el tratamiento, ambas muestras seminales (control y tratada) se criopreservaron y evaluaron siguiendo el mismo protocolo que en la experiencia 1. Mientras que la funcionalidad espermática y la producción intracelular de ROS no se vieron afectadas ($P > 0'05$) por el gradiente de centrifugación, en las muestras tratadas con el Androcoll™-P se observó mejor ($P < 0'05$) calidad espermática y menor ($P < 0'05$) producción de MDA. De estos resultados se concluye que la presencia de espermatozoides afuncionales en los eyaculados de porcino influye negativamente sobre la congelabilidad de los funcionales; y que la utilización de gradientes de centrifugación, tales como el Androcoll™-P (Large), pueden ser de utilidad para eliminar parcialmente los espermatozoides afuncionales, mejorando la congelabilidad de los espermatozoides funcionales.

7.2 Abstract

From the hypothesis that sperm quality in boar ejaculates may influence subsequent frozen, the aims of this research were: (1) demonstrate whether non-functional sperm (sperm with morphological and / or functional) present in the ejaculate the freezability of the functional, and (2) evaluate procedures to efficiently remove non-functional and cost-effective sperm cryopreservation of the ejaculate for only the functional population. In an experiment, designed to assess how non-functional sperm in the ejaculate present condition the freeze function, we used 15 ejaculates with good quality sperm (> 85% of functional sperm) from 5 boars (3 ejaculates / boar). In each ejaculate caused the non-functional sperm in a population (sudden freeze in liquid nitrogen) which is then mixed in different proportions of functional sperm (ejaculate original with more than 85% of functional sperm) to originate 4 samples with 100, 75, 50 and 25% of functional sperm. Before freezing the semen samples were incubated 24 h at 17 ° C. The freezing protocol included 2-stage dilution in Tris-egg yolk-Glycerol-Equex, and packaged in straws of 0.5 mL and an average speed of freezing -40 ° C / min. After 7 d of storage at -196 ° C, straws were thawed individually at 37 ° C for 20 s. sperm quality, measured in terms of motility (CASA system and expressed as percentage of total motile sperm and progressive motile) and plasma membranes integrity and acrosome measured by flow cytometry with a triple fluorescent staining [Hoechst-33342 (H- 42), propidium iodide (PI) and the conjugate of lecithin *Arachis hypogaea* fluorescein isothiocyanate (PNA-FITC)] was assessed before freezing and post-thaw (30 and 150 min of incubation at 37 ° C). The functionality sperm [destabilization of the plasma membrane assessed by merocyanine 540 (M540) and Yo-Pro 1] was evaluated post-thaw (30 min) by flow cytometry in samples diluted in capacitation medium and incubated at 37 ° C and 5% CO₂. Lipid peroxidation, as quantified by spectrophotometry and indirectly by the concentration of malondialdehyde (MDA) and intracellular production of reactive oxygen species (ROS) measured by flow cytometry with the fluorochrome CM-H₂DCFDA [5 - (and-6)-clormetil- 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetate, acetyl ester] and tert-butylhidroperóxido, TBHP) were also evaluated post-thaw in samples incubated 15 to 30 min at 37 ° C, respectively. Although there were differences among boars (P <0.05), both the quality and sperm function, the production of intracellular ROS and MDA post-thaw were influenced (P <0.05) by the presence of non-functional sperm in the ejaculated, showing the worst quality and functionality and greater production of MDA and ROS in the samples with higher proportions of non-functional sperm. In the 2nd experience, we used 6 ejaculates of low sperm quality from as many boars. The ejaculates were split into two halves, using the gradient centrifugation colloid Androcoll™-P (Large) before freezing at one sperm to remove non-functional. After evaluating the quantity and quality of sperm recovered after treatment, two semen samples (control and treated) were cryopreserved and assessed following the same protocol as in experiment 1. While sperm function and intracellular ROS production were not affected (P > 0.05) by gradient centrifugation, the samples treated with Androcoll™-P were best (P <0.05) sperm quality and lower (P <0.05) production of MDA. From these results we conclude that the presence of non-functional sperm in the boar ejaculate adversely affect the functional freezability, and that the use of centrifugation gradients, such as Androcoll™-P (Large) can be useful for partially remove sperm non-functional, improving functional sperm freezability.

7.3 Résumé

De l'hypothèse que la qualité du sperme chez éjacule sanglier peut influencer ultérieures congelés, les objectifs de cette recherche était: (1) de démontrer si la non-fonctionnelle des spermatozoïdes (spermatozoïdes avec morphologiques et / ou fonctionnels) présents dans l'éjaculat congélation de la fonctionnelle, et (2) évaluer les procédures d'éliminer efficacement la cryoconservation du sperme non fonctionnel et rentable de l'éjaculat pour seulement la population fonctionnelle. Dans une expérience visant à évaluer comment la non-fonctionnelle des spermatozoïdes dans l'état actuel éjaculent la fonction de gel, nous avons utilisé 15 éjacule avec le sperme de bonne qualité (> 85% des spermatozoïdes fonctionnels) de 5 sangliers (3 éjacule / sanglier). Dans chaque éjaculat causé le sperme non fonctionnels dans une population (gel soudaine dans l'azote liquide) qui est ensuite mélangé dans des proportions différentes de sperme fonctionnel (éjaculent originale avec plus de 85 % des spermatozoïdes fonctionnels) pour 4 échantillons proviennent de 100, 75, 50 et 25 % des spermatozoïdes fonctionnels. Avant la congélation des échantillons de sperme ont été incubées 24 h à 17 °C. Le protocole de congélation inclus 2-étape de dilution dans du Tris-jaune d'œuf-glycérol-Equex, et emballés dans des paillettes de 0.5 ml et une vitesse moyenne de congélation -40 °C / min. Après 7 jours de stockage à -196 °C, les pailles ont été décongelés individuellement à 37 °C pendant 20 s. l'intégrité de la qualité du sperme, mesurée en termes de mobilité (système CASA et exprimée en pourcentage de spermatozoïdes mobiles totale et mobiles progressifs) et les membranes plasmiques et acrosome mesurée par cytométrie de flux avec une coloration fluorescente triple [Hoechst-33342 (H-42), l'iodure de propidium (PI) et le conjugué de la lécithine Arachis hypogaea isothiocyanate de fluorescéine (PNA-FITC)] a été évaluée avant la congélation et après décongélation (30 et 150 min d'incubation à 37 °C). Le sperme fonctionnalité [déstabilisation de la membrane plasmique évalué par mérocyanine 540 (M540) et Yo-Pro 1] a été évaluée après décongélation (30 min) par cytométrie en flux dans les échantillons dilués dans le milieu de capacitation et incubées à 37 °C et 5% de CO₂. Peroxydation lipidique, telle que quantifiée par spectrophotométrie et indirectement par la concentration de malondialdéhyde (MDA) et la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) mesurée par cytométrie de flux avec le fluorochrome CM-H2DCFDA [5 - (et 6)-clormetil-2', 7'-diclorodihydrofluorescéina diacétate, ester acétyl] et de tert-butylhydroperoxyde, TBHP) ont également été évalués d'après-dégel dans les échantillons incubés 15 à 30 min à 37 °C, respectivement. Bien qu'il y ait des différences entre les sangliers (P <0.05), à la fois la qualité et la fonction des spermatozoïdes, la production de ROS intracellulaire et MDA après décongélation ont été influencés (P <0.05) par la présence de non-fonctionnelle des spermatozoïdes dans l'éjaculation, montrant la mauvaise qualité et une fonctionnalité et une plus grande production de MDA et de ROS dans les échantillons avec des proportions plus élevées de non-fonctionnelle des spermatozoïdes. Dans l'expérience de 2ème, nous avons utilisé six éjacule de la qualité des spermatozoïdes à partir de nombreux sangliers. Le sperme était divisé en deux moitiés, en utilisant le gradient de centrifugation colloïdes Androcoll™-P (Large) avant congélation à un spermatozoïde pour éliminer les non-fonctionnel. Après avoir évalué la quantité et la qualité des spermatozoïdes récupérés après le traitement, deux échantillons de sperme (contrôle et traitement) ont été cryoconservés et évalué suivant le même protocole que dans l'expérience 1. Alors que la fonction du sperme et la production de ROS intracellulaires n'ont pas été affectés (P > 0,05) par centrifugation en gradient, les échantillons traités avec Androcoll™-P a été la meilleure qualité du sperme (P <0.05) et inférieure (P <0.05) la production de MDA. De ces résultats, nous concluons que la présence de non-fonctionnelle des spermatozoïdes dans l'éjaculat sanglier affecter le gel fonctionnel, et que l'utilisation des gradients de centrifugation, comme Androcoll™-P (Large) peut être utile pour enlever partiellement des spermatozoïdes non fonctionnels, l'amélioration congélation du fonctionnelle spermatozoïdes.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abeydeera, L.R. y Day, B.N. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 46, 537-544.
- Agarwal, A.; Nallella, K.P.; Allamaneni, S.S. 2004. *Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reprod Biomed Online.* 8: 616.
- Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. 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
- Aitken, R.J.; Clarkson, J.S.; Fishel, S. 1989. *Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod* 40: 183-197.
- Aitken, R.J.; Harkiss, D.; Buckingham, D.W. 1993. *Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. J Reprod Fertil* 98: 257-265.
- Aitken, R.J. 1994. *A free radical theory of male infertility. Reprod Fertil Dev.* 6: 19-23.
- Aitken, R.J.; Fisher, H. 1994. *Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays* 16: 259-268.
- Aitken, R.J.; West, K.; Buckingham, D. 1994. *Leukocyte infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. J Androl* 15, 343-352.
- Aitken, J. 1995. *Mechanisms and prevention of lipid peroxidation in human spermatozoa.* In: Fenichel, P.; Parinaud, J. (eds), *Human sperm acrosome reaction.* Inst. Natl. Sante Recherche Medicale, Paris, pp. 339-353.
- Aitken, R.J.; Paterson, M.; Fisher, H.; Buckingham, D.W.; Van Duim, M. 1995. *Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. J Cell Sci.* 108: 2017-2025.
- Aitken, R.J. 1999. *The Amoroso lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? J Reprod Fertil* 115: 1-7.
- Aitken, R.J.; Krausz, C.; 2001. *Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction* 122, 497-506.
- Aitken, R.J. 2004. *Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. Reprod Fertil Dev* 16: 655-664.
- Aisen, E.; Quintana, M.; Medina, V.; Morello, H.; Venturino, A. 2005. *Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. Cryobiology* 50:239-249.
- Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2006. *Introducción a la biología celular.* Madrid, Editorial Médica Panamericana.
- Almid, T.; 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.
- Almid, T.; Hofmo, P.O. 1996. *A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. Reprod Domest Anim* 31(1): 169-173.
- Alvarenga, M.A.; Melo, C.M.; Magalhães, L.C.O.; Papa, F.O. 2010. *A new method to concentrate equine sperm. Anim Reprod Sci* 121: 186-187

- Alvarez, J.G.; Storey, B.T. 1984. *Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa*. *Biol Reprod* 30: 833-841.
- Alvarez, J.G.; Storey, B. 1989. *Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation*. *Gamete Research* 23: 77-90.
- Alvarez, J.G., Storey, B.T. 1992. *Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode for sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation*. *J Androl* 13: 232-241.
- Alvarez, J.G.; Touchstone, J.C.; Blasco, L.; Storey, B.T. 1987. *Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa*. *J Androl* 8: 338-348.
- Anel, L.; Kaabi, M.; Abroug, B.; Alvarez, M.; Anel, E.; Boixo, J. 2005. *Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay*. *Theriogenology* 63:1235-1247.
- Anzar, M.; He, L.; Burh, M.M.; Kroetsch, T.G.; 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.
- Aurich, C. 2008. *Recent advances in cooled-semen technology*. *Anim Reprod Sci* 107: 268-275.
- Avery, B.; Greve, T. 1995. *Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination*. *Theriogenology* 44: 871-8.
- Babior, B.M.; Benna, J.E.; Chanock, S.J.; Smith, R.M. 1997. *The NADPH oxidase of leukocytes: the respiratory burst oxidase*. *En: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios JG. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 737-783.
- Bailey, J.L.; Robertson, L.; Buhr, M.M. 1994. *Relationships among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro Ca^{2q} flux in bovine spermatozoa*. *Can J Anim Sci* 74: 53 - 58.
- Bailey, J.L.; Lessard, C.; Jacques, J.; Breque, C.; Dobrinski, I.; Zeng, W.; Galantino-Homer, H. 2008. *Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry*. *Theriogenology* 70, 1251-1259.
- Barber, A.A.; Bernheim, F. 1967. *Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues*. *Adv Gerontol Res* 2: 355-403.
- Basaga, H.S. 1989. *Biomedical aspects of free radicals*. *Biochem Cell Biol* 68: 989-998.
- Baumber, J.; Ball, B.A.; Linfor, J.J.; Meyers, S.A. 2003. *Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa*. *J Androl*, 24: 621-628.
- Beckman, J.S.; Koppenol, W.H. 1996. *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1424-1437.
- Beckman, K.b.; Ames, B.N. 1998. *Mitochondrial aging: open questions*. *Ann N Y Acad Sci* 854: 118-127.
- Bell, M.; Wang, R.; Hellstrom, W.J.G.; Sikka, S.C. 1993 *Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human spermatozoa*. *J Androl* 14: 472-478.
- Bertani, G.R.; Scheid, I.R.; Fialho, F.B.; Rubin, M.I.B.; Wentz, I.; Gonçalves, P. B. D. 1997.

Effect of the time of artificial insemination with frozen-thawed or fresh semen on embryo viability and early pregnancy rate in gilts. Theriogenology 48:933-945.

Bilodeau, J.F.; Chatterjee, S.; Sirard, M.A.; Gagnon, C. 2000. *Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev* 55(3): 282-288.

Bolarín, A.; Roca, J.; Rodríguez-Martínez, H.; Hernández, M.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A. 2006. *Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. Theriogenology* 65: 669-80.

Bravo, M.M.; Aparicio, I.M.; García-Herreros, M.; Gil, M.C.; Peña, F.J.; García-Marin, L.J.; 2005. *Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. Mol Reprod Dev* 71: 88-96.

Brezczynska-Slebodzinska, E.; Slebodzinski, A.B.; Prietas, B.; Wieczorek, G.; 1995. *Antioxidant effect of Vitamin E and Glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. Biol Trace Elem Res* 47: 69-74.

Brinsko, S.P., Crockett, E.C.; Squires, E.L. 2000. *Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. Theriogenology* 54: 129-136.

Brooks, D.E. 1990. *Biochemistry of the male accessory glands*. (Chapter 6). In: Lamming, GE (Ed.), *Marshall's physiology of reproduction*. Vol. 2: Reproduction in the male. (4th Edn.), Edinburgh, Churchill Livingstone. PP: 569-690.

Brouwers, J.F.; Silva, P.F.; 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.

Bruch, R.C.; Thayer, W.S. 1983. *Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. Biochim Biophys Acta* 733(2): 216-222.

Buhr, M.M.; Curtis, E.F.; Kakuda, N.S. 1994. *Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. Cryobiology* 31: 224-238.

Bussallou, E.; Pinart, E.; Rivera, M.M. 2008. *Effects of filtration of semen doses from subfertile boars through neuter Sephadex columns. Reprod Domest Anim* 43: 48-52.

Bwanga, C.O. 1991. *Cryopreservation of boar semen. I: A literature review. Acta Vet Scand* 32: 431-53.

Caballero, I.; Vazquez, J.M.; Mayor, G.M.; Almiñana, C.; Calvete, J.J.; Sanz, L.; Roca, J.; Martínez, E.A. 2009. *PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. J Androl* 32: 505-513.

Cadenas, E. 1997. *Biochemistry of oxygen toxicity. Annu Rev Biochem* 58: 79-110.

Carvajal, G.; Cuello, C.; Ruiz, M.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.; Roca, J. 2004. *Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. J Androl* 25:389-396.

Carter, W.O.; Narayanan, P.K.; Robinson, J.P. 1994. *Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. J Leukoc Biol* 55: 253-258.

Cerolini, S.; Maldjian, A.; Surai, P.; Noble, R.; 2000. *Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. Anim Reprod Sci* 58: 99-111.

Cerolini, S.; Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.M.; 2001. *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Reproduction* 121: 395-401.

- Chatterjee, S.; De Lamirande, E.; Gagnon, C. 2001a. *Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione*. *Mol Reprod Dev* 60, 498-506.
- Chatterjee, S.; Gagnon, C. 2001b. *Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing*. *Mol Reprod Dev* 59: 451-458.
- Chen, J.J.; Yu, B.P. 1994. *Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products*. *Free Radic Biol Med* 17(5): 411-418.
- Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. 1998a. *Free Radicals in Medicine*. *Br Med Bull* 49: 118- 121.
- Cheeseman, K.H.; Slater, T.F. 1998b. *An introduction to free radical biochemistry*. *Br Med Bull* 49: 481-493.
- Comaschi, V.; Lindner, L.; Farruggia, G.; Gesmundo, N.; Colombi, L.; Masotti, L. 1989. *An investigation of lipid peroxidation mechanisms in boar spermatozoa*. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 769-775
- Córdova, A.; Pérez-Gutiérrez, J.F.; Lleó, B.; García-Artiga, C.; Álvarez, A.; Drobchak, V. 2002. *In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 mL straws*. *Theriogenology* 57: 2119-2128.
- Cormier, N.; Sirard, M.A.; Bailey, J.L. 1997. *Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation*. *J Androl* 18: 461-468.
- Courtens J.L.; Rety, J.M. 2001. *Numerical simulation for freezing and thawing mammalian spermatozoa. Evaluation of cell injuries at different depth in bags or straws during all steps of the technique*. *Gen Select Evol* 33 (Suppl 1): 85 – 104.
- Cramer, W.A.; Knaff, D.B. 1990. *Energy Transduction in Biological Membranes*. Springer Advanced Texts in Chemistry, Springer-Verlag, New York 545 pp
- Cremades, T.; Roca, J.; Rodríguez-Martínez, H. Abaigar, T.; Vazquez, J.M.; Martínez, E. 2005. *Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa*. *J And* 26:610-618.
- Crespo, E.; Macías, M.; García, J.J.; Martín, M.; Arauzo, M.; León, J.; Escames, G.; Acuña-Castroviejo, D. 1997. *Mecanismos de neuroprotección de la melatonina durante el envejecimiento*. *Arch Neurocién (Mex)* 2(4): 247-257.
- Cummins, J.M.; Jequier, A.M.; Kan, R. 1994. *Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress*. *Mol Reprod Dev* 37: 345-362.
- Curry, M.R. 2000. *Cryopreservation of semen from domestic livestock*. *Reviews of Reproduction* 5: 46-62.
- Curtis, M.T.; Gilfor, D.; Farber, J.L. 1984. *Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes*. *Arch Biochem Biophys* 235(2): 644-649.
- Davis, R.O.; Siemers, R.J. 1995. *Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion*. *Reprod Fertil Dev* 7: 857-69.
- Dawra, R.K.; Sharma, O.P.; Makkar, H.P. 1983. *Lipid peroxidation in bovine semen*. *Int J Fertil* 28 (4): 231-234.
- De Lamirande, E.; Belles-Isles, M.; Gagnon, C. 1984. *Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility*. *Ann N Y Acad Sci*. 438: 25-31.

- De Lamirande, E.; 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.
- De Lamirande, E.; Gagnon, C. 1995. *Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa*. *Free Radic Biol Med* 18: 487-496.
- De Lamirande, E.; Jiang, H.; Zini, A.; Kodama, H.; Gagnon, C. 1997. *Reactive oxygen species and sperm physiology*. *Reviews of Reproduction*. 2: 48-54.
- De Lamirande, E.; Tasi, C.; Harakat, A.; Gagnon, C. 1998. *Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates*. *J Androl* 19:585-594.
- Dobretsov, G.E.; Borschevskaya, T.A.; Petrov, V.A.; Vladimirov, Y.A. 1977. *The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation*. *FEBS Lett* 84(1): 125-128.
- Einarsson, S. 1971. *Studies on the composition of epididymal content and semen in the boar*. *Acta Vet Scand Supl.* 36.
- Erdelmeier, I.; Gérard-Monnier, D.; Yadan, J.-C.; Chaudière, J. 1998. *Reactions of N-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Mechanistic Aspects of the Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation*. *Chem Res Toxicol* 11 (10):1184–1194.
- Eriksson, B.M.; Rodríguez-Martínez, H. 2000. *Deep-freezing of boar semen in plastic film "cochettes"*. *J Vet Med A*, 47: 89-97.
- Eriksson, B.M.; Petersson, H.; Rodríguez-Martínez, H. 2002. *Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container*. *Theriogenology* 58:1065–1079.
- Esterbauer, H.; Schaur, R.J.; Zollner, H. 1991. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. *Free Radic Biol Med* 11(1): 81-128.
- Finkel, T. 1998. *Oxygen radicals and signaling*. *Curr. Opin. Cell Biol* 10:248-253.
- Fiser, P.S.; Fairfull, R.W.; Hansen, C.; Panich, P.L.; Shrestha-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.; Gadella, B.M. 2001. *Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane*. *J Cell Sci* 114: 3543-55.
- Fraser, L.; Strzezek, J. 2005. *Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by neutral comet assay*. *Reprod Dom Anim* 40: 530-536.
- Fraser, L.; Strzezek, J. 2007. *Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing?* *Theriogenology* 68: 248-257
- Fridovich, I. 1976. *Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism*. *Adv Exp Med Biol* 74: 530-9.
- Gadea, J. 2003. *Semen extenders used in the artificial insemination of swine*. Review. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1, 17-27.
- Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M.A.; Coy, P.; Matás, C.; Romar, R.; Ruiz, S. 2004. *Decrease in glutathione content in boar sperm alter cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders*. *Theriogenology* 62: 690-701.
- Gagnon, C.; Iwasaki, A.; de Lamirande, E.; Kovalski, N. 1991. *Reactive oxygen species and*

human spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci* 637: 436-444.

García, B.M.; Fernández-Gonzalez, L.; Morrell, J. 2008. *Single layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm sub- population structure of frozen-thawed stallion spermatozoa. Anim Reprod Sci*; in press.

Garzetti, G.G.; Tranquilli, A.L.; Cugini, A.M.; Mazzanti, L.; Cester, N.; Romanini, C. 1993. *Altered lipid composition, increased lipid peroxidation, and altered fluidity of the membrane as evidence of platelet damage in preeclampsia. Obstet Gynecol* 81(3): 337-340.

Gérard-Monnier, D.; Erdelmeier, I.; Régnard, K.; Moze-Henry, N.; Yadan, J-C.; Chaudière, J. 1998. *Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. Chem Res Toxicol* 11 (10): 1176–1183

Gil, M.A.; Roca, J.; Cremades, T.; Hernández, M.; Vázquez, J.M.; Rodríguez-Martínez, H.; Martínez, E.A. 2005. *Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?. Theriogenology* 64:305– 316.

Gil, M.A.; Almiñana, C.; Cuello, C.; Parrilla, I.; Roca, J.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A. 2007. *Brief coincubation of gametes in porcine in vitro fertilization: Role of sperm: oocyte ratio and post-coincubation medium. Theriogenology* 67: 620-626.

Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. 2005. *Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology* 63: 445-457

Graham, J.K.; Rajamannan, A.H.J.; Schmehl, M.K.L.; Maki-Laurila, M.; Bower, R.E. 1971. *Fertility studies with frozen boar spermatozoa. A.I. Dig* 19: 16-18.

Green, C.E.; Watson, P.F. 2001. *Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. Reproduction* 122: 889-898.

Griveau, J.F.; Renard, P.; Le Lannou, D. 1994. *An in vitro promoting role of human sperm capacitation for hydrogen peroxide. Int J Androl* 17: 300-307.

Griveau, J.F.; Renard, P.; Le Lannou, D. 1995. *Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. Int J Androl* 18: 67-74.

Griveau, J.F.; Le Lannou, D. 1997. *Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. Int J Androl* 20: 195-200.

Guthrie, H.D.; Welch GR. 2005. *Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. Theriogenology* 63(2): 396-410.

Guthrie, H. D.; Welch, G. R. 2006. *Determination on 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.; Welch, G.; Long, J.A. 2008. *Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. Theriogenology. 70:1209-1215.*

Gutteridge, J.M. 1995. *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem* 41(12 Pt 2): 1819-1828.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. 1984. *Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet* 1(8391): 1396- 1397.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. 1985. *Oxygen radicals and the nervous system. Trends in Neurosciences* 8: 22-26.

- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. 1990. *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol* 186: 1-85.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.; Cross, C.E. 1992. *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? J Lab Clin Med* 119(6): 598-620.
- Halliwell, B., 1992. *Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem* 59, pp. 1609–1623.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press.
- Hamamah, S.; Royère, D.; Nicolle, J.C.; Paquignon, M.; Lansac, J. 1990. *Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. Reprod Nutr Dev* 30: 59-64.
- Hammadeh, M.E.; Al Hassani, S.; Rosenbaum, P.; Schmidt, W.; Fischer, H.C. 2008. *Reactive oxygen species, total anti-oxidant concentration of seminal plasma and their effect on sperm parameters and outcome of IVF/ICSI patients. Arch Gynecol Obstet* 277: 515-26.
- Hammerstedt, R.H. 1993. *Maintenance of Bioenergetic Balance in Sperm and Prevention of Lipid Peroxidation. – A Review of the Effect on Design of Storage Preservation Systems. Reprod Fertil Dev* 5: 675-690.
- Hansberg, W. 1999. *La biología del dioxígeno en singulete. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, FES Zaragoza, UNAM* 2:47-55.
- Harman, D. 1956. *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol* 11(3): 298-300.
- Harman, D. 1984. *Free radical theory of aging: The "free radical" diseases. Age* 7: 111-131.
- Harrison, R.A. 1996. *Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev* 8: 581-594.
- Harrison, R.A.; Ashworth, P.J.; 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.
- Harrison, R.A. 1997. *Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. J Reprod Fertil Suppl* 52: 195-211.
- Hassanain, H.H.; Goldschmidt-Clermont, P.J. 2000. *Rac, superoxide, and signal transduction. En: Antioxidant and redox regulation of genes. Sen ChK, Sies H y Baeuerle PA. Academic Press, San Diego. pp. 47-79.*
- Henkel, R.R.; Schill, W.B. 2003. *Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol* 1: 108-42.
- Hernández, M.; Roca, J.; Ballester, J.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Johannisson, A.; Saravia, F.; Rodríguez-Martínez, H. 2006. *Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. Int J Androl* 29: 583-91.
- Hernández, M.; Roca, J.; Gil, M.A.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; 2007a. *Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. Theriogenology* 67 (9): 1436–1445.
- Hernández, M.; Roca, J.; Calvete, J.J.; Sanz, L.; Muiño-Blanco, T.; Cebrián-Pérez, J.A.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A. 2007b. *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.
- Hirai, M.; Boersma, A.; Hoeflich, A.; Wolf, E.; Foll, J.; Aumüller, R. 2001. *Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (Sus scrofa): relation to fertility and seminal plasma growth factors. J Androl* 22: 104-110.
- Ho, H.C.; Suarez, S.S. 2001. *Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. Reproduction* 122: 519-526.
- Hoffmann, B.; Hecht, H.J.; Flohé, L. 2002. *Peroxiredoxins. Biol Chem* 383:347-364.
- Holt, W.V. 2000. *Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology* 53: 47-58.
- Holt, W.V.; Medrano, A. 1997. *Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. J Reprod Fertil Suppl.* 52: 213-222.
- Holt, W.V.; Morris, G.J.; Coulson, G.; 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.; North, R.D. 1991. *Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. J Reprod Fertil* 91: 451-461.
- Hubbard, R.E.; Garratt, C.J. 1980. *The composition and fluidity of adipocyte membranes prepared from young and adult rats. Biochim Biophys Acta* 600(3): 701-704.
- Hunt, J.V.; Simpson, J.A.; Dean, R.T. 1988. *Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins. Biochem J* 250(1): 87-93.
- Hunter, R.H.F. 1980. *Physiology and Technology of Reproduction in the Female.* Pub. Academic Press, London. pp 122-127.
- Iritani, A. 1980. *Problemas en la congelación de células espermáticas de las diferentes especies animales. 9nd Inter. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Madrid.* 1: 115-132.
- Jerlick, A.; Pitt, A.R.; Schaur, R.J.; Spickett, C.M. 2000. *Patway of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL, detected by LC-MS. Free Rad Biol Med* 28(5): 673-682.
- Jiménez-Jiménez, F.J.; De Bustos, F.; Gasalla, T.; Ortí-Pareja, M. 1996. *Estrés oxidativo y sistema nervioso central. Rev Neurol* 11(supl. 3): 13-22.
- Johnson, L.A.; Aalbers, J.G.; Willems, C.M.T.; Sybesma, W. 1981. *Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows from 36 farms. J Anim Sci* 52: 1130-1136.
- Johannisson, A.; Morrell, J.M.; Thorén, J.; Jonsson, M.; Dalin, A.M.; Rodríguez-Martínez, H. 2009. *Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. Anim Reprod Sci* 116: 119-128.
- Johnson, L.A. 1985. *Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. In: Johnson L.A, Larsson K. (eds), Deep freezing of boar semen. Proc. 1st Int Conf Deep Freezing of Boar Semen.* Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden; pp. 199-222.
- Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fiser, P.; Maxwell, W.M.C. 2000. *Storage of boar semen. Anim Reprod Sci* 62: 143 –172.

- Jones, R.; Mann, T. 1973. *Lipid peroxidation in spermatozoa. Proc R Soc Lond S Biol Sci* 184: 103-107.
- Jones, R.C.; 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.
- Juárez, J.D.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; Martínez, E.; Roca, J. 2011. *Boar semen can tolerate rapid cooling rates prior to freezing. Reprod Fertil Dev* 23: 681–690
- Kaneto, M.; Harayama, H.; Miyake, M.; Kato, S. 2002. *Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine- phosphorylated sperm proteins. Anim Reprod Sci* 73: 197-209.
- Kanner, J.; German, J.B.; Kinsella, J.E. 1987. *Initiation of lipid peroxidation in biological systems. Crit Rev Food Sci Nutr* 25(4): 317- 364.
- Kessopoulov, E.; Tomlinson, M.J.; Barratt, C.L.R.; Bolton, A.E.; Cooke, I.D. 1992. *Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? J Reprod Fertil* 94: 463-470.
- Kodama, H.; Kuribayashi, Y.; Gagnon, C. 1996. *Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. J Androl* 17: 151-157.
- Kommisrud, E.; Paulenz, H.; Sehested, E.; 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.
- Klotz, L.O.; Briviba, K.; Sies, H. 2000. *Signaling by singlet oxygen in biological systems. En: Antioxidant and redox regulation of genes. Sen, Ch.K.; Sies, H.; Baeuerle, P.A. Academic Press, San Diego. pp. 3-20.*
- Langner, M.; Hui, S.W. 1993. *Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. Biochim Biophys Acta* 1149: 175-179.
- Larsson, K.; Einarsson, S. 1976. *Fertility of deep frozen boar spermatozoa: influence of thawing diluents and of boars. Acta Vet Scand* 17:43–62.
- Lenzi, A.; Picardo, M.; Gandini, L.; Dondero, F. 1996. *Lipids of sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acid considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. Hum Reprod Update* 2: 246–256.
- Lenzi, A.; Gandini, L.; Lombardo, F.; Picardo, M.; Maresca, V.; Panfili, E. 2002. *Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHG- Px: From basic to clinic. Contraception* 65:301–304.
- Lledías, F.; Hansberg, W. 2000. *Catalase modification as a marker for singlet oxygen. Methods Enzymol* 319:110-119.
- Lin, D.S.; Connor, W.E.; Wolf, D.P.; Neuringer, M.; Hachey, D.L. 1993. *Unique lipids of primate spermatozoa — desmosterol and docosahexaenoic acid. J Lipid Res* 34: 491 – 499.
- Loomis, P.R. 2006. *Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. Vet Clin North Am Equine Pract* 22: 663–676.
- Macías-García, B.; Morrell, J.M.; Ortega-Ferrusola, C.; González-Fernández, L.; Tapia, J.A.; Rodríguez-Martínez, H.; Peña, F.J. 2009a. *Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. Anim Reprod Sci* 114: 193–202,.
- Macías-García, B.; Fernández, L.G.; Morrell, J.; Ferrusola, C.O.; Tapia, J.; Martínez, H.;

- Peña, F. 2009b. *Single-layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm subpopulation structure of frozen-thawed stallion spermatozoa*. *Reprod in Domest Anim* 44: 523–526.
- Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.; Cerolini, S.; Penny, P.; Noble, R. 2005. *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen*. *Theriogenology* 63: 411–421.
- Mari, G.; Iacono, E.; Kutvölgyi, G.; Mislei, B.; Rodriguez-Martinez, H.; Morrell, J.M. 2009. *Stallion spermatozoa prepared by Single Layer Centrifugation with Androcoll-E are capable of fertilization in vivo*. *Reprod in Domest Anim*. In press.
- Martin, S.J.; Reutelingsperger, C.P.M.; McGahon, A.J.; Rader, J.A.; Van Schie, R.C.; La Face, D.M.; 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.; De Alba-Romero, C.; Corcuera, B.; García-Artiga, C.; Lleó-Casanova, B. 1999. *Efecto del semen congelado porcino sobre el desarrollo embrionario*. En: "II Congreso Ibérico de Reproducción Animal". Lugo, España. Libro de ponencias y comunicaciones: 396-376
- Matás, C.; Decuadro, G.; Martínez-Miró, S.; Gadea, J. 2007. *Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen*. *Theriogenology* 67: 1087–1091.
- Maxwell, W.M.C.; Johnson, L.A. 1997. *Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation*. *Theriogenology* 48: 209-19.
- Maxwell, W.M.C.; Parrilla, I.; Caballero, I.; Garcia, E.; Roca, J.; Martinez, E.A.; Vazquez, J.M.; Rath, D. 2007. *Retained Functional Integrity of Bull Spermatozoa after Double Freezing and Thawing Using PureSperm® Density Gradient Centrifugation*. *Reprod Dom Anim* 42: 489–494.
- Mazur, P.; Leibo, S.P.; Farrant, J.; Chu, E.H.Y.; Hanna, M.G.J.; Smith, L.H. 1970. *Interactions of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells*. In: Wolstenholme, Ž . G.E.W., O'Connor, M. Eds. *The Frozen Cell*, Churchill, London, pp. 69 – 88.
- Mazur, P. 1984. *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. *Anim J Physio* 247: 125-142.
- Mazur, P. 1997. *The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates*. *Cryobiology* 14: 251-272.
- Mazur, P.; Leibo, S.P.; Seidel, G.E.; 2008. *Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions*. *Biol Reprod* 78: 2- 12.
- Mckee, T.; Mckee, J.R. 2003. *Bioquímica: La base molecular de la vida*. McGraw-Hill. Interamericana.
- Medrano, A.; Watson, P.F.; Holt, W.V. 2002. *Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope*. *Reproduction* 123: 315–322.
- Medeiros, C.M.; Forell, F.; Oliveira, A.T.; Rodriguez, J.L. 2002. *Current status of sperm cryopreservation: why isn't better*. *Theriogenology* 57:327–344

- Mehmood, A.; Anwar, M.; Saqlan Naqvi, S.M. 2009. *Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen-thawed buffalo semen. Anim Reprod Sci* 111: 141–148
- Mennella, M.R.T.; Jones, R. 1980. *Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal ion-catalyzed lipid peroxidation reactions in semen. Biochem J* 191: 289–297.
- Molla, M.; Selles, E.; Marco, M.; Remohi, J.; Ballejeros, A.; Gadea, J. 2004. *Freezing procedure produces a reduction in the human spermatozoa glutathione content. J Androl* 25 (Suppl.) 45. abstr.
- Morrell, J.M.; Dalin, A.M.; Rodríguez-Martínez, H. 2008. *Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. Equine Vet J* 40: in press.
- Morrell, J.M.; Dalin, A.M.; Rodríguez-Martínez, H. *Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. Equine Vet J* 41: 53–58, 2009a.
- Morrell, J.M.; Saravia, F.; van Wienen, M.; Rodríguez-Martínez, H.; Wallgren, M. 2009b. *Sperm survival following colloid centrifugation varies according to the part of the sperm-rich fraction used. Society of Reproduction and Fertility* 66: 85–86.
- Morrell, J.M. 2009c. *Prevention of pathogen transmission through breeding in horses. Reprod Domest Anim* 44: supplement 3, abstract 15.3.
- Morrell, J.; Johannisson, A.; Dalin, A.M.; Rodríguez-Martínez, H. 2009d. *Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. Reprod Domest Anim* 44: 512–517.
- Morrell JM.; Johannisson A.; Strutz H.; Dalin A-M.; Rodríguez-Martínez, H. 2009e. *Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage. J Equine Vet Sci*, 29:24-32.
- Morrell, J.M.; Saravia, F.; Wallgren, M.; van Wienen, M.; Rodríguez-Martínez, H. 2009f. *Selection of boar spermatozoa using centrifugation on a glycidoxypropyltrimethoxy-silane-coated silica colloid. J Reprod Dev* 55: 547-552
- Morrell, J.M.; Rodríguez-Martínez, H. 2009: *Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review. The open Andrology Journal* 1:1-9
- Morrell, J.M.; Colleoni, S.; Lagutina, I.; Rodríguez-Martínez, H.; Lazzari, G.; Galli, C. 2010. *Stallion spermatozoa selected by Single Layer Centrifugation with Androcoll™-E have normal functionality after ICSI. Anim Reprod Sci* 121S: S196–S197.
- Mortimer, D. 2000. *Sperm preparation methods. J Androl* 21: 357-366
- Naqui, A.; Britton, C.; Cadenas, E. 1996. *Reactive oxygen intermediates in biochemistry. Annu Rev Biochem* 55: 137-166.
- Nissen, H.P.; Kreisel, H.W. 1983. *Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. Andrología* 15:264–9.
- O'Flaherty, C.M.; Beorlegui, N.B.; Beconi, M.T. 1999. *Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. Theriogenology* 52: 289–301.
- O'Flaherty, C.; Beorlegui, N.; Beconi, M.T. 2003. *Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. Int J Androl* 26: 109-14.

- O' Flaherty, C.; de Lamirande, E. ; Gagnon, C. 2006. *Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events*. *Free Radic Biol Med* 41:528- 540.
- Okamura, N.; Tajima, Y.; Soejima, A.; Masuda, H.; Sugita, Y. 1985. *Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase*. *J Biol Chem* 260: 9699-705.
- Olds-Clarke, P. 1996. *How does poor motility alter sperm fertilizing ability*. *J Androl* 17: 183-186.
- O' Meara, C.; Hanrahan, J.; Donovan, A.; Fair, S.; Rizos, D.; Wade, M.; Boland, M.; Evans, A.; Lonergan, P. 2005. *Relationship between in vitro fertilization of ewe oocytes and the fertility of ewes following cervical artificial insemination with frozen thawed semen*. *Theriogenology* 64:1797–1808
- Ortega-Ferrusola, C.; Sotillo-Galán, Y.; Varela-Fernández, E.; Gallardo-Bolaños, J.M.; González-Fernández, L.; Tapia, J.A.; Peña, F.J. 2008 *Detection of apoptosis like changes during the cryopreservation process in equine sperm*. *J Androl* 29: 213–221.
- Paniagua, R.; Nistal, M.; Sesma, P.; Álvarez-Uría, M.; Fraile, B.; Anadón, R.; Sáez, F. 2003. *Biología celular*. Madrid, McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.
- Park, C.S.; Yi, Y.J. 2002. Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Anim Reprod Sci* 73: 53-61.
- Parks, J.E.; Arion, J.W.; Foote, R.H. 1987. *Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa*. *Biol Reprod* 37: 1249-1258.
- Parks, J.E.; Graham, J.K. 1992. *Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes*. *Theriogenology* 38: 209-222.
- Parks, J.E.; Lynch, D.V. 1992. *Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes*. *Cryobiology* 29: 255-266.
- Parks, J.E. 1997. *Hypothermian and mammalian gametes*. In: Karow, A.M. and Critser, J.K. (eds.) *Reproductive tissue banking: scientific principles*. Academic Press, San Diego, EEUU. Pp: 229-261.
- Peña, .F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; 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.; Saravia, F.; Nuñez-Martínez, I.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodríguez Martínez, H. 2006. *Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?* *Anim Reprod Sci* 93: 101-113.
- Perez-Crespo, M.; Moreira, P.; Pintado, B.; Gutiérrez-Adán, A. 2008. *Factors from damaged sperm affect its DNA integrity and its ability to promote embryo implantation in mice*. *J Androl* 29: 47 – 54.
- Pertoft, H. 2000. *Fractionation of cells and subcellular particles with Per-coll*. *J Biochem Biophys Methods* 44: 1-30.
- Polge, C.; Smith, A.U.; Parkes. A.S. 1949. *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*. *Nature* 164: 666.
- Polge, C. 1951. *Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79 °C*. *Nature*

London, 167: 949-950.

Polge, C.; Salamon, S.; Wilmut, I. 1970. *Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination*. *Vet Rec* 87: 424-428.

Polge, C. 1985. *Sperm freezing, past, present and future*. In: Johnson, L.A. and Larsson, K. (eds.). *Deep freezing of boar semen*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden; pp. 167-173.

Pretlow, T.G.; Pretlow, T.P. 1989. *Cell separation by gradient centrifugation methods*. *Meth. Enzymol.* 171: 462-483.

Primakoff, P.; Myles, D.G. 2002. *Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction*. *Science*. 21: 2183-5.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Rampacek, G.B. 1972. *Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock*. *J Anim Sci* 34: 278 – 283.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Schulman, L.L.; 1973. *Effect of dilution, seminal plasma, and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa*. *J Anim Sci* 37: 528- 531.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A. 1975. *Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure*. *J Anim Sci* 40: 99-102.

Rangan, U.; Bulkley, G.B. 1993. *Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury*. *Br Med Bull* 49(3): 700-718.

Rathi, R.; Colenbrander, B.; Bevers, M.M.; Gadella, B.M. 2001. *Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa*. *Biol Reprod* 65: 462-470.

Reed, H.C.B. 1985. *Current use of frozen boar semen – Future need of frozen boar semen*. In: Johnson, L.A.; Larsson, K. (eds.). *Deep freezing of boar semen*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. pp. 225-237.

Refsgaard, H.H.; Tsai, L.; Stadtman, E.R. 2000. *Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(2): 611-616.

Reilly, P.M.; Bulkley, G.B. 1990. *Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites*. *Br J Surg* 77(12): 1323-1324.

Reiter, R.J. 1995. *Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain*. *FASEB J* 9(7): 526-533.

Reiter, R.J. 1998. *Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin*. *Prog Neurobiol* 56(3): 359-384.

Rivlin, J.; Mendel, J.; Rubinstein, S.; Etkovitz, N.; Breitbart, H. 2004. *Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction*. *Biol Reprod* 70: 518-522.

Robertson, L.; Watson, P.F.; 1986. *Calcium transport in diluted or cooled ram semen*. *J. Reprod Fertil* 77: 177 – 185.

Roca, J.; Gil, M.A.; Hernandez, M.; Parrilla, I.; Vazquez, J.M.; 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.; Vázquez, J.M.; 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.; Rodríguez-Martínez, H.; Vázquez, J.M.; Bolarín, A.; Hernández, M.; Saravia, F. 2006a. *Strategies to improve the fertility of frozen-thawed boar semen for artificial insemination*. In: Control of pig reproduction VII, Ashworth CJ, Kraeling RR (Eds), Nottingham: Nottingham University Press; pp. 261–275.
- Roca, J.; Hernández, M.; Carvajal, G.; Vázquez J.M.; Martínez, E.A. 2006b. *Factors influencing boar sperm cryosurvival*. *J Anim Sci* 84:2692-2699.
- Roca, J.; Parrilla, I.; Rodríguez-Martínez, H.; Gil, M.A.; Cuello, C.; Vazquez, J.M.; Martínez, E.A. 2011. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod Domest Anim*. En prensa.
- Rodríguez-Martínez, H.; Eriksson, B.; Lundeheim, N. 1996. *Freezing boar semen in flat plastic bags membrane integrity and fertility*. *Reprod Dom Anim* 31: 161-168.
- Rodríguez-Martínez, H.; Larsson, B.; Pertoft, H.; 1997. *Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up*. *Reprod Fertil Dev* 9: 297–308.
- Saleh, R.A.; Agarwal, A. 2002. *Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice*. *J Androl* 23:737 -752.
- Sanocka, D.; Kurpisz, M. 2004. *Reactive oxygen species and sperm cells*. *Reprod Biol Endocrin* 2: 1–7.
- Saravia, F.; Hernández, M.; Wallgren, M.; Johannisson, A.; 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: 458-499.
- Saravia, F.; Wallgren, M.; Johannisson, A.; Calvete, J.J.; Sanz, L.; Peña, F.J.; Roca, J.; Rodríguez-Martínez, H. 2009. *Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks*. *Theriogenology* 71 (4): 662-675.
- Saravia, F.; Wallgren.; Rodríguez-Martínez, H. 2010. *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* 117(3-4):279-87.
- Schmidt, H.; Kamp, G. 2004. *Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis*. *Reproduction* 128: 171-179.
- Schroeder, F. 1984. *Role of membrane lipid asymmetry in aging*. *Neurobiol Aging* 5(4): 323-333.
- Sellés, E.; Wallgren, M.; Gadea, J.; Rodríguez-Martínez, H. 2001. *Sperm viability and capacitation-like changes in fractions of boar semen after storage and freezing*. In: Proceedings of the VIth International Conference on Pig Reproduction. Columbia, MO, USA; 3–6 June p. 36.
- Shanis, BS.; Check, I.J.; Bolendorf, A. 1989. *Interpretation and misinterpretation of semen parameters*. *Arch Androl* 23: 213-227.
- Sharma, R.K.; Agarwal, A. 1996. *Role of reactive oxygen species in male infertility*. *Urology* 48 (1996), pp. 835–850.
- Sharma, R.K.; Tolentino, M.V.; Thomas, A.J.; Agarwal, A. 1996. *Optimal dose and duration of exposure to artificial stimulants in cryopreserved human spermatozoa*. *J Urol*. 155: 568-573.
- Shekarris, M.; DeWire, D.M.; Thomas, A.L.; Agarwal, A. 1995. *A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species*. *Eur Urol* 28:31–5.

- Sikka, S.C. 1996. *Oxidating stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function*. *Front Biosci* 1: 78-86.
- Singer, S.J.; Nicolson, G.L. 1972. *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. *Science* 175(23): 720-731.
- Sohal, R.S.; Weindruch, R. 1996. *Oxidative stress, caloric restriction, and aging*. *Science* 273(5271): 59-63.
- Somfai, T.; Bodo, S.; Nagy, S. 2002. *Effect of swim-up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa*. *Reprod Domest Anim* 37: 285-90.
- Storey, B.T. 1997. *Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa*. *Mol Hum Reprod* 3: 203-13.
- Stubbs, C.D.; Smith, A.D. 1984. *The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function*. *Biochim Biophys Acta* 779:89-137.
- Subramaniam, R.; Roediger, F.; Jordan, B.; Mattson, M.P.; Keller, J.N.; Waeg, G.; Butterfield, D.A. 1997. *The lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, alters the conformation of cortical synaptosomal membrane proteins*. *J Neurochem* 69(3): 1161- 1169.
- Svingen, B.A.; Buege, J.A.; O'neal, F.O.; Aust, S. 1979. *The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation*. *J Biol Chem* 254(13): 5892-5899.
- Tappel, A.L. 1973. *Lipid peroxidation damage to cell components*. *Fed Proc* 32(8): 1870-1874.
- Thomas, A.D.; Meyers, S.A.; Ball, B.A. 2006. *Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation*. *Theriogenology* 65, 1531-1550
- Thurston, L.M.; Watson, P.F.; Mileham, A.J.; Holt, W.V. 2001. *Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculate correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation*. *J Androl* 22:382-394.
- Thurston, L.M.; Siggins, K.; Mileham, A.J.; Watson, P.F.; Holt, W.V. 2002. *Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation*. *Biol Reprod* 66: 545-554.
- Thys, M.; Vandaele, L.; Morrell, J.M.; Mestach, J.; Van Soom, A.; Hoogewijs, M.; Van den Bergh, M.; Emiliani, S.; Biramane, J.; Vannin, A.S.; Englert, Y. 1998. *A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoa and its influence on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection*. *Hum Reprod* 13: 3103-3107.
- Thys, M.; Vandaele, L.; Morrell, J.; Mestach, J.; Van Soom, A.; Hoogewijs, M.; Rodriguez-Martinez, H. 2009. *In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (Glycidoxypropyltrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation*. *Reprod Domest Anim* 44: 390-394.
- Trzcinska M, Bryla M, Smorag Z, 2006. *Correlation between two apoptotic markers in fresh boar spermatozoa*. *Reprod Fertil Dev* 19: 280-281.
- Van Wienen, M.; Johannisson, A.; Wallgreen, M.; Parlevliet, J.; Morrell, J.M. 2011. *Single Layer Centrifugation with Androcoll-P can be scaled-up to process larger volumes of boar semen*. *ISRN Veterinary Science*.
- Vladimirov, Y.A.; Olenev, V.I.; Suslova, T.B.; Cheremisina, Z.P.; 1980. *Lipid peroxidation in mitochondrial membrane*. *Adv Lipid Res* 17: 173-249.

- Venero-Gutiérrez, J.R. 2002. *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. *Rev Cubana Med Milit* 31(2): 126-133.
- Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M.; Onklin, K. 2002. *Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice*. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Visconti, P.E.; Moore, G.D.; Bailey, J.L. 1995. *Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway*. *Development* 121: 1139-1150.
- Visconti, P.E.; Kopf, G.S. 1998. *Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation*. *Biol Reprod* 59: 1-6.
- Visconti, P.E.; Westbrook, V.A.; Chertihin, O.; Demarco, I.; Sleight, S.; Diekman, A.B. 2002. *Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity*. *J Reprod Immunol* 53: 133-150.
- Wabersky, D.; Weitze, K.F.; Gleumes, T.; Schwarz, M.; Wilmen, T.; Petzoldt, R.; 1994. *Effect of time of insemination relative to ovulation on the fertility with liquid and frozen boar semen*. *Theriogenology* 42: 831- 840.
- Wallgren, M.; Rodriguez-Martinez, H.; Morrell, J.M. 2010. *Single Layer Centrifugation with Androcoll™-P removes, or substantially reduces, bacterial contamination in boar sperm samples*. In *Proceedings of the 11th International Symposium on Spermatology*, Okinawa, Japan.
- Watson, P.F.; Morris, G. 1987. *Cold shock injury in animal cells*. In *Temperature and animal cells*. B. K. y F. B. (eds). The Company of Biologist Limited. pp 311-340.
- Watson, P.F. 1990. *Artificial insemination and the preservation of semen*. En: Lamming, G.E. (ed.). *Marshall's physiology of reproduction*. 4th edition. Vol. 2: Reproduction in the male. Churchill Livingstone, New York, USA; pp. 747-869.
- Watson, P.F. 1995. *Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function*. *Reprod Fertl Dev* 7: 871-891.
- Watson, P.F. 1996. *Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity*. *Reprod Dom Anim* 31 (Suppl. 1): 135–140.
- Watson, P.F.; Plummer, J.M. 1985. *The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling*. In: "Deep freezing of boar semen". Eds: Johnson, L.A.; Larsson, K. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia. Pp: 113-127.
- Watson, P.F. 2000. *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. *Anim Reprod Sci* 60 – 61: 481 – 492.
- Watson, P.F.; Green, C.E. 2000. *Cooling and capacitation of boar spermatozoa: What do they have in common?* En: *Boar Semen Preservation IV*. Johnson, L.A.; Guthrie, H.D. (eds.). Allen Press, Lawrence. pp. 53-60.
- Weitze, K.F.; 2000. *Update on the worldwide application of swine AI*. In: Johnson LA, Guthrie HD (eds), *Boar Semen Preservation IV*. Allen Press, Lawrence, KS, pp. 141–146.
- Westendorf, P.; Richter, L.; Treu, H. 1975. *Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor und besamungsergebnisse mit dem Hu" Isenberger Pailleten Verfahren*. *Dtch. Tiera´ rztl Wschr*. 82:261–267.
- White, I.G. 1993. *Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review*. *Reprod Fert Dev* 5: 639-658.

- Williamson, P.; Mattocks, K.; Schlegel, R.A. 1983. *Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing. Biochim Biophys Acta* 732: 387–393.
- Wishart, G.J. 1984. *The effect of anoxia on fowl spermatozoa: recovery of fertilizing ability, motility and cellular concentrations of potassium and ATP. Gamete Res* 10: 83-89
- Woelders, H.; Matthijs, A.; Den Besten, M. 1996. *Boar variation in “freezability” of the semen. Reprod Domest Anim* 31: 153–159.
- Wolf, D.E.; Hagopian, S.; Ishijima, S. 1986. *Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. J Cell Biol* 102: 1372-1377.
- Wolf, J.; Smital, J. 2009. *Quantification of factors affecting semen traits in AI boars from animal model analyses. J Anim Sci* 87:1620–1627.
- Wolff, H.; Anderson, D.J. 1988. *Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen. Fertil Steril* 49: 497–504.
- Wolf, J.; Smital, J. 2009. *Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. J Anim Sci* 87:1620-1627.
- Yanagimachi, R. 1981. *Mechanisms of fertilization in mammals. In: Fertilization and embryonic development in vitro. Mastroianni, L.; Biggers, J.D. (eds.) Plenum Press (New York, USA).*
- Yu, B.P. 1994. *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev* 74(1): 139-162.
- Zarkovic, K. 2003. *4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. Mol Aspects Med* 24(4-5): 293-303.
- Zeng, W.X.; Shimada, M.; Isobe, N.; Terada, T. 2001. *Survival of boar spermatozoa frozen in diluents of varying osmolality. Theriogenology* 56: 447-458.
- Zhang, H.; Zheng, R.L. 1996. *Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. Free Rad Res* 24: 261-268.
- Zimmer, G.; Freisleben, H.J.; 1988. *Membrane Fluidity determination form viscosity. In: Aloia, R.C., Curtain, C.C. and Gordon, L.M., Editors. Advances in membrane fluidity Vol. 1. Methods for studying membrane fluidity, Alan R Liss Inc, New York, pp. 297–318.*
- Zini, A.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. 1995. *Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. J Androl* 16, 424-431.

UAB



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA



UNIVERSIDAD DE MURCIA

IRTA



INIA
Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria

IVIA

INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

