

Títol del treball: Revisió de la tècnica de criopreservació espermàtica i estudi de la seva optimització en biotecnologia de la reproducció porcina

Estudiant: Marina Carrasco Vila

Grau en Biologia

Correu electrònic: u1915180@campus.udg.edu

Tutor: Sílvia Sancho Badell

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor:



Nom del tutor: Sílvia Sancho Badell

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): silvia.sancho@udg.edu

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: Divendres, 24 de juliol de 2015

RESUM

La criopreservació espermàtica és una tècnica integrada en la biotecnologia reproductiva animal que permet la conservació dels gàmetes masculins a baixes temperatures, concretament a -196°C , durant llargs períodes de temps a fi de mantenir-ne la seva capacitat fecundant. La tècnica és usada en diferents espècies animals amb diverses finalitats, entre elles les reproductives, les de preservació del material genètic, les de facilitar el comerç internacional, etc. La metodologia del treball ha consistit en una revisió bibliogràfica realitzada en diverses bases de dades mitjançant la introducció de paraules clau per tal de cercar diferents publicacions: tesis doctorals, articles científics, articles de revisió, tots ells relacionats amb la criopreservació espermàtica. En aquest treball s'ha utilitzat com a model l'espermatozoide porcí, el qual presenta una major susceptibilitat a la criopreservació degut a l'alt contingut d'àcids grassos poliinsaturats i a la baixa presència de colesterol en la seva membrana plasmàtica. Des del 2006 i fins a l'actualitat, en el sector porcí la utilització de semen criopreservat per a la pràctica de la inseminació artificial (IA) tant sols representa l'1% del total de les inseminacions realitzades, aquest fet es deu a que la taxa de fertilitat i de prolificitat utilitzant semen congelat és molt menor al que s'obté a l'utilitzar semen fresc refrigerat; amb diferències del 20-30% en la taxa de fertilitat i de 2-3 garrins menys per ventrada. En els últims anys, s'han realitzat diversos estudis per tal d'optimitzar el protocol de criopreservació del semen d'aquesta espècie amb la finalitat de millorar la supervivència espermàtica i la capacitat fecundant dels espermatozoides descongelats. En aquest treball s'han revisat algunes de les millores del protocol de la criopreservació fins al moment assajades com són: modificacions de la pròpia tècnica i l'addició de colesterol, antioxidants o plasma seminal als medis de congelació. Malgrat les millores aconseguides al llarg dels anys, cal continuar assajant amb noves substàncies i/o diferents concentracions de les substàncies estudiades fins al moment, per tal d'optimitzar i rendibilitzar la tècnica de criopreservació espermàtica en porcí perquè sigui d'interès dins del sector.

RESUMEN

La criopreservación espermática es una técnica integrada en la biotecnología reproductiva animal que permite la conservación de los gametos masculinos a bajas temperaturas, concretamente a -196°C , durante largos periodos de tiempo con el fin de mantener su capacidad fecundante. La técnica se usa en distintas especies animales con diversas finalidades, entre ellas las reproductivas, las de preservación del material genético, las de facilitar el comercio internacional, etc. La metodología del trabajo ha consistido en una revisión bibliográfica realizada en varias bases de datos mediante la introducción de palabras clave para buscar distintas publicaciones: tesis doctorales, artículos científicos, artículos de revisión, todos ellos relacionados con la criopreservación espermática. En este trabajo se ha utilizado como modelo el espermatozoide porcino, el cual presenta una mayor susceptibilidad a la criopreservación debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados y la baja presencia de colesterol en su membrana plasmática. Desde 2006 y hasta la actualidad, en el sector porcino la utilización de semen criopreservado para la práctica de la inseminación artificial (IA) tan solo representa el 1% del total de las inseminaciones realizadas, este hecho se debe a que la tasa de fertilidad y de prolificidad utilizando semen congelado es mucho menor al que se obtiene al usar semen fresco refrigerado; con diferencias del 20-30% en la tasa de fertilidad y de 2-3 lechones menos por camada. En los últimos años, se han realizado diversos estudios para optimizar el protocolo de criopreservación del semen de esta especie con el fin de mejorar la supervivencia espermática y la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados. En este trabajo se han revisado algunas de las mejoras del protocolo de la criopreservación hasta el momento ensayadas como son: modificaciones de la propia técnica y la adición de colesterol, antioxidantes o plasma seminal a los medios de congelación. A pesar de las mejoras conseguidas a lo largo de los años, hay que continuar ensayando con nuevas sustancias y/o diferentes concentraciones de las sustancias estudiadas hasta el momento, con el fin de optimizar y rentabilizar la técnica de criopreservación espermática en porcino para que sea de interés dentro del sector.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation is a technique integrated in the animal reproductive biotechnology that allows the preservation of male gametes at low temperatures, particularly at -196°C , for long periods of time in order to maintain their fertilizing capacity. The technique is used in different animal species for various purposes, including the reproductive, the preservation of genetic material, the easier international trade, etc. The work methodology has consisted of a literature review conducted in several databases by entering keywords to search for different publications such as theses, scientific articles, review articles, all related to sperm cryopreservation. In this work has been used as a model the boar sperm, which presents a greater susceptibility to cryopreservation due to the high content of polyunsaturated fatty acids and the low cholesterol presence in its membrane. From 2006 until today, the use of boar semen cryopreserved for the practice of artificial insemination (AI) represents only 1% of the inseminations carried out, this is due to the fertility rate and litter size using frozen semen is much lower than that obtained when using fresh cooled semen; with a 20-30% of difference in the fertility rate and 2-3 piglets less per litter. In recent years, several studies have been conducted to optimize the protocol for cryopreservation of semen of this species in order to improve sperm survival and the fertilizing capacity of sperm thawed. In this work has been reviewed some of the improvements to the cryopreservation protocol tested until now as: modifications of the technique itself and adding cholesterol, antioxidants or seminal plasma in freezing extenders. Despite the improvements achieved over the years, it is necessary to continue testing with new substances and different concentrations of the substances studied so far, in order to optimize and monetize the technique of cryopreservation of boar sperm to be of interest within in the sector.

INDEX

1. Introducció.....	2
1.1. Estratègies de preservació cel·lular.....	2
1.2. Criopreservació espermàtica.....	2
1.3. Alteracions de l'espermatozoide durant la criopreservació.....	2
1.4. L'espermatozoide porcí.....	4
1.4.1. Composició de la membrana plasmàtica.....	5
1.5. El plasma seminal.....	7
2. Objectives.....	8
3. Metodologia.....	9
4. Resultats i discussió.....	10
4.1. Usos del semen criopreservat.....	10
4.1.1. Antecedents històrics.....	11
4.1.2. Estat actual i perspectives de futur.....	12
4.2. Protocol de la tècnica de la criopreservació espermàtica.....	13
4.3. Millores en la criopreservació espermàtica.....	17
4.3.1. Modificacions de la tècnica.....	17
4.3.2. Addició de colesterol.....	19
4.3.3. Addició d'antioxidants.....	19
4.3.4. Addició de plasma seminal.....	21
5. Conclusions.....	24
Bibliografia.....	25

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Estratègies de preservació cel·lular

La preservació de les cèl·lules vives, i per tant dels espermatozoides, pot consistir en la refrigeració (emmagatzematge en fase líquida) o en la congelació (eliminació de l'aigua intracel·lular). La principal diferència en l'aplicabilitat d'entre els dos mètodes és la durada de la preservació; en el cas de la refrigeració pot arribar a ser de fins a 10-12 dies, mentre que en la congelació el període de temps és molt més llarg, en principi indefinit (Cerolini *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2006a; Casas, 2010). Existeixen dues tècniques de congelació: la criopreservació (congelació en equilibri amb el gel) o la vitrificació (congelació sense gel) (Solé *et al.*, 2008; Casas, 2010). La utilització d'una o d'una altra depèn fonamentalment del tipus de cèl·lula i de l'objectiu que es pretén assolir.

1.2. Criopreservació espermàtica

El terme criopreservació espermàtica fa referència al mètode de conservació o preservació, teòricament indefinida, de la funcionalitat dels gàmetes masculins mitjançant la disminució gradual de temperatura fins arribar a ser emmagatzemat a -196°C en nitrogen líquid (N_2L), impedit així, que les seves reaccions metabòliques es puguin dur a terme. Tot i aconseguir el manteniment de les cèl·lules espermàtiques per llargs períodes de temps, la viabilitat i la mobilitat dels espermatozoides es pot veure afectada negativament degut als canvis bioquímics i estructurals que tenen lloc durant el descens de la temperatura i també durant el retorn a la normotèrmia (Solé *et al.*, 2008).

1.3. Alteracions de l'espermatozoide durant la criopreservació

Durant els processos de congelació i descongelació es produeixen a les cèl·lules una sèrie d'alteracions fisicoquímiques que poden alterar, i de fet alteren, la seva viabilitat i per tant la seva funcionalitat.

Degut al descens dràstic de temperatura que té lloc durant la congelació, els espermatozoides experimenten un fenomen anomenat xoc tèrmic. Les membranes d'aquests estan formades per una bicapa de lípids juntament amb complexos proteics; a l'aplicar un descens de la temperatura, es produeix un canvi de fase en el qual els lípids que en condicions normals es troben en estat fluid, experimenten una transició cap a la fase líquida cristal·lina i, posteriorment, a la fase de gel (Parks i Lynch, 1992; Drobnis *et al.*, 1993; Palma, 2001). En aquesta fase gelificada els lípids de la mateixa família es van agrupant formant agregats lipídics que no s'integren adequadament amb les proteïnes associades, generant així, que els agregats lipídics es converteixin en àrees més vulnerables a la ruptura dels lípids i més permeables als ions (Palma, 2001; Tomás, 2007). A més a més, l'augment de la permeabilitat de l'entrada de ions, principalment de calci, i la pèrdua de funcionalitat de les proteïnes de membrana associades als lípids com les que formen els canals de calci, acaben generant una mala regulació del calci, i per tant, la mala funcionalitat cel·lular (Palma, 2001).

En el cas de l'espermatozoide de porcí, la baixa proporció de colesterol : fosfolípids que presenta la seva membrana juntament amb l'elevat contingut d'àcids grassos insaturats que hi són presents, faciliten la transició dels lípids a la fase gelificada contribuint a la desestabilització d'aquests (Casas, 2010). Per tal de contrarestar els efectes negatius provocats pel xoc tèrmic, s'addicionen crioprotectors als diluents de congelació que aporten fosfolípids mitjançant el rovell d'ou (Palma, 2001; Casas, 2010).

Els crioprotectors es poden classificar en penetrants i no penetrants segons si tenen o no capacitat de travessar la membrana cel·lular. Els penetrants són aquelles molècules de baix pes molecular que poden travessar la membrana i entrar dins les cèl·lules per tal de desplaçar l'aigua intracel·lular, evitant així, la formació de cristalls de gel intracel·lulars. Alguns dels crioprotectors que pertanyen a aquest grup són el glicerol (el més usat), metanol, dimetilsulfòxid (DMSO), l'etilenglicol, entre d'altres (Solé *et al.*, 2008). Els no penetrants són molècules d'alt pes molecular que actuen envoltant la membrana plasmàtica, de manera que augmenten la pressió osmòtica a l'espai extracel·lular induint la ràpida deshidratació dels espermatozoides i, per tant, la baixa formació de cristalls de gel intracel·lulars (Solé *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2012). En aquest grup s'inclouen els sucres com la lactosa de la llet descremada, les lipoproteïnes del rovell d'ou (el més usat) i proteïnes d'alt pes molecular (Campos *et al.*, 2012). Existeix una hipòtesi dels danys provocats per la congelació anomenada "la Hipòtesi dels dos Factors" postulada al 1972 (Mazur *et al.*, 1972). Aquesta hipòtesi exposa que en taxes de refredament massa elevades, l'aigua que forma part de la cèl·lula no té temps de sortir i acaba formant gel intracel·lular que provoca la degradació dels orgànuls cel·lulars. En taxes de refredament massa lentes, l'aigua de la cèl·lula surt sense generar gel intracel·lular però a vegades, la cèl·lula és deshidratada i exposada durant massa temps als canvis de pH i als efectes de toxicitat del crioprotector, alterant així, la integritat de la membrana i les funcions cel·lulars. Per tant, la taxa de refredament òptima és aquella que impedeix la formació de gel intracel·lular i que minimitza la deshidratació (Casas, 2010) (Figura 1).

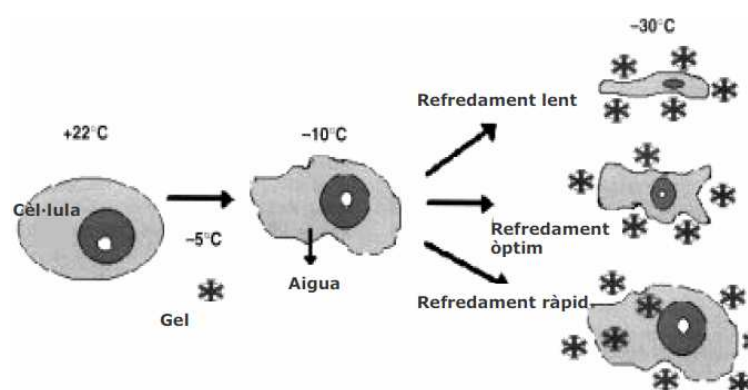


Figura 1. Esdeveniments que es poden produir durant la congelació de les cèl·lules (Dayong i Critser, 2000).

En condicions *in vivo*, els espermatozoides es troben en el plasma seminal protegits dels danys oxidatius (Estrada, 2014). Durant la criopreservació s'allibera una excessiva quantitat de ROS (espècies reactives d'oxigen) que provoca l'anomenat estrès oxidatiu, causant de la peroxidació lipídica (Bilodeau *et al.*, 2000). Aquesta peroxidació és una degradació oxidativa dels lípids que formen les membranes lipídiques i, conseqüentment, es produeix una

afectació de la viabilitat dels espermatozoides. La peroxidació lipídica es dóna sobretot a la peça intermèdia de l'espermatozoide, fet que explicaria la disminució de la mobilitat espermàtica post-descongelació (Brouwers *et al.*, 2005).

1.4. L'espermatozoide porcí

En el producte de l'ejaculació de *Sus domesticus* es pot trobar de mitjana entre el 80-95% d'espermatozoides madurs (morfològicament normals) i amb capacitat fecundant (Bonet *et al.*, 2000).

L'espermatozoide és la cèl·lula sexual masculina o gàmeta altament especialitzada en la funció de fecundar. Un espermatozoide madur de *Sus domesticus* presenta una longitud total d'uns 45.1 μm (Bonet *et al.*, 2000) i s'hi poden distingir tres parts: el cap (7 μm), la peça de connexió o coll (0.7 μm) i la cua (37.4 μm) on s'hi poden diferenciar tres regions: la peça intermèdia (9 μm), la peça principal (26.2 μm) i la peça terminal (2.2 μm) (Bonet *et al.*, 2000) (Figura 2a i 2b).



Figura 2a. Representació esquemàtica de l'espermatozoide porcí (modificat de Gadella *et al.*, 2008).



Figura 2b. Imatge d'un espermatozoide porcí obtinguda a partir de microscòpia de contrast de fases a 1000X (de Mercado, 2011)

1.4.1. Composició de la membrana plasmàtica

Les tres parts que formen l'espermatozoide, anteriorment esmentades, es troben limitades per una estructura lipoproteica en forma de bicapa anomenada plasmalemma o membrana plasmàtica (Bachmann, 1978; Bonet *et al.*, 2000; Estrada, 2014).

La composició de la membrana plasmàtica està formada per una gran varietat de lípids, formant així, una heterogeneïtat lipídica que participa en el manteniment de l'estructura de la bicapa (Estrada, 2014). A més a més, també formen part de la composició de la membrana les proteïnes unides no covalentment i els glúcids units covalentment als lípids o proteïnes, formant així, una estructura dinàmica per la qual s'hi poden desplaçar la majoria dels components que formen part de la membrana (de Mercado, 2011; Estrada, 2014) (Figura 3).

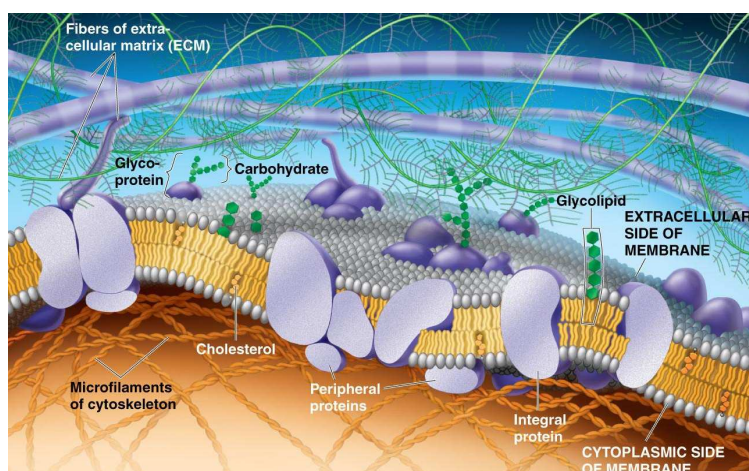


Figura 3. Composició de la membrana plasmàtica o plasmalemma (Anatomy & Physiology, 2015).

Els lípids són el principal component de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide de totes les espècies animals. Existeixen diferències en quant a la proporció i la tipologia dels lípids del plasmalemma espermàtic entre espècies domèstiques (de Mercado, 2011). Tot i això, de manera general, els lípids més abundants de la membrana plasmàtica espermàtica són els fosfolípids, el colesterol i els glicolípid, sent aquests últims, els que s'hi troben en una menor proporció (Gadella i Harrison, 2000).

Un fosfolípid està format per una molècula de glicerol unida a dues d'àcid gras i a un grup fosfat. Els fosfolípids són una varietat de lípids que juguen un paper clau en el funcionament de les membranes cel·lulars. Els fosfolípids majoritaris en la membrana plasmàtica espermàtica porcina són els àcids grassos poliinsaturats, que actuen com a substrat per a les ROS (Estrada, 2014). La membrana presenta moltes tipologies diferents de fosfolípids per això s'usa el concepte d'heterogeneïtat de fosfolípids (de Mercado, 2011; Estrada, 2014). Cada varietat de fosfolípid presenta un punt de fusió característic, per tant, és lògic afirmar que com més varietat de fosfolípids presenti la membrana més varietat de punts de fusió hi haurà (Estrada, 2014).

La composició dels diversos lípids de les membranes plasmàtiques difereix no només entre espècies sinó que també entre els individus de la mateixa espècie (de Mercado, 2011). Un dels lípids de major importància en la membrana plasmàtica és el colesterol, ja que la relació quantitativa entre aquest i els fosfolípids és imprescindible per a l'estabilitat i la fluïdesa del plasmalemma (Parks i Hammerstedt, 1985). A major quantitat de fosfolípids, més fluïdesa presenta la membrana, mentre que el colesterol juntament amb les proteïnes tenen funció estabilitzadora de la membrana (Palma, 2001). La relació colesterol : fosfolípids és característica per a cada espècie i s'ha comprovat que aquesta és major en aquelles espècies en les quals la resistència a la congelació és més elevada, com en el cas dels bovins i dels humans, que presenten respectivament uns valors de 0.4 i 0.99 (Darin-Bennett i White, 1977) (Taula 1). En canvi, les espècies que presenten una menor resistència a la congelació dels seus espermatozoides també presenten un valor menor de la relació colesterol : fosfolípids, com en el cas de l'espècie porcina que presenta un valor de 0.26, en el gall és de 0.30, en el cavall semental 0.36 i en el toro 0.45 (Parks i Lynch, 1992) (Taula 1).

Taula 1. Composició de la membrana plasmàtica dels espermatozoides de diferents espècies animals (White i Darin-Bennett, 1977; Parks i Lynch, 1992).

Espècie	Ratio colesterol:fosfolípids	Ratio poliinsaturats/saturats
Porc	0.26	2.5
Cavall	0.36	-
Marrà	0.38	2.5
Toro	0.45	3.5
Caprí	0.59	-
Conill	0.88	0.8
Humà	0.99	1

La susceptibilitat al xoc tèrmic és específica per a cada espècie ja que el que determina aquesta susceptibilitat és la composició lipídica de les membranes plasmàtiques. Aquesta composició depèn de les ratios colesterol : fosfolípid i de les cadenes d'àcids grassos poliinsaturats : saturats unides als fosfolípids (Darin-Bennett i White, 1977). La situació òptima seria una ratio colesterol : fosfolípids elevada i una ratio poliinsaturats : saturats baixa, ja que la membrana plasmàtica presentaria una elevada estabilitat i fluïdesa, disminuint així, la temperatura a la qual es produeix el canvi de fases dels lípids, i perquè a menor quantitat d'àcids grassos poliinsaturats la susceptibilitat a la peroxidació lipídica també disminueix (Tomás, 2007). La baixa relació colesterol : fosfolípid de la membrana espermàtica de porcins fa que els espermatozoides d'aquesta espècie presentin una major susceptibilitat al xoc tèrmic (Parks i Lynch, 1992). A més a més, el fet de presentar poca quantitat de colesterol a la membrana plasmàtica espermàtica en porcí està estretament lligat amb una disminució en la fluïdesa i estabilitat de la membrana i conseqüentment, amb una menor viabilitat de l'espermatozoide un cop descongelat (Cerolini *et al.*, 2001). Els espermatozoides de conill i els d'humà són els que presenten una ratio colesterol : fosfolípids més elevat i una ratio poliinsaturat : saturat menor i, per tant, seran els que presentin una major resistència al xoc tèrmic en comparació als espermatozoides de caprí, oví, boví, equí i porcí.

1.5. El plasma seminal

El semen està format pels espermatozoides i pel plasma seminal, essent aquest últim, la barreja de les secrecions de les diferents glàndules accessòries del tracte urogenital masculí.

El plasma seminal de l'espècie porcina conté principalment les proteïnes procedents de les secrecions de les glàndules accessòries, àcids grassos, ions inorgànics, àcid cítric, carbohidrats, sals orgàniques i prostaglandines (Casas, 2010; de Mercado, 2011). L'elevada presència de proteïnes proporciona protecció als espermatozoides, impedeix la seva aglutinació i també té una funció clau en el procés de fertilització ja que moltes d'elles estan implicades en el procés de capacitació espermàtica. Tots aquests compostos, tant inorgànics com orgànics, confereixen un medi tamponat que permet mantenir una osmolaritat de 290-330 mOsm i un pH al voltant de 7.4 unitats adient pel manteniment de la viabilitat espermàtica (Casas, 2010).

A la tècnica de criopreservació que actualment s'utilitza el plasma seminal és eliminat de manera que es modifiquen i es reestructuren alguns dels components de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide, generant així, una pèrdua de la seva mobilitat i capacitat fecundant (Maxwell i Johnson, 1997).

2. OBJECTIVES

The main goal of this work is to make a careful review of the technique of sperm cryopreservation in animals of productive interest, taking as a model the boar sperm cell.

The specific objectives are:

- Assess the current state of the use of the technique of cryopreservation as a system of boar sperm preservation.
- Compare the degree of use of cryopreserved boar sperm in front of other species.
- Conduct a literature review of the tested improvements in optimizing the technique of boar sperm cryopreservation.
- Propose alternatives to improve the technique of sperm cryopreservation in boars based on the literature review conducted.

3. METODOLOGIA

La metodologia d'aquest treball ha consistit en una revisió bibliogràfica a diferents nivells; inicialment s'han realitzat cerques més generals sobre el tema tractat, i posteriorment, s'han fet cerques més específiques i selectives.

Primerament, per tal de conèixer la metodologia de la tècnica de criopreservació espermàtica així com la fisiologia del mascle porcí i la composició del semen, es va usar la web de la biblioteca de la Universitat de Girona fent les cerques "criopreservació espermàtica" i "biotecnologia de la reproducció porcina". A més a més, també es va consultar el servidor TDX per tal de seleccionar tesis doctorals relacionades amb la criopreservació, en aquest cas, utilitzant novament les mateixes cerques. La redacció de l'apartat d'introducció es va realitzar majoritàriament a partir de les tesis doctorals, articles de revisió i els llibres consultats.

Per tal de desenvolupar l'apartat de resultats i discussió es va fer ús de les bases de dades bibliogràfiques PubMed, Sciencedirect, Google Académico i SciELO. En aquest cas, la cerca es va focalitzar en aquells articles d'impacte científic rellevant, i que en la major part dels casos, estaven referenciats en les tesis com articles relacionats i que assajaven millores en els protocols de la tècnica de la criopreservació espermàtica. Es van fer també cerques utilitzant les composicions: "cryopreservation boar sperm", "effects of cryopreservation sperm", "sperm plasma membrane", "sperm membrane and ROS", "antioxidants cryopreservation" i "sperm freezability". Paral·lelament, es van consultar algunes revistes electròniques internacionals de caire científic i de gran repercussió com Cryobiology i Theriogenology. En tots els casos es van seleccionar articles de diferents anys per tal d'observar l'evolució i la innovació assolida en el protocol de criopreservació al llarg dels darrers anys. Utilitzant aquest criteri s'ha comprovat que en els primers anys el nombre d'articles era baix, en canvi, en les últimes dècades el nombre d'articles ha anat augmentant progressivament.

Finalment, s'ha utilitzat el gestor bibliogràfic Mendeley per tal de recopilar, organitzar i realitzar la relació de la bibliografia dels documents d'interès seleccionats que han estat utilitzats en aquest treball.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Usos del semen criopreservat

La criopreservació espermàtica és una tècnica que es pot utilitzar en les espècies d'interès productiu amb diferents finalitats entre elles les reproductives, les de preservació del material genètic, les de facilitació del comerç internacional, etc. Mentre que en el cas del porcí aquesta tècnica encara té una aplicació complementària, altres espècies com l'equina, al tenir els sementals un valor econòmic més elevat, esdevé d'alt interès aplicat. En l'espècie humana la criopreservació va associada a les tècniques de reproducció assistida.

En el sector porcí i en la majoria dels animals d'interès productiu, la inseminació artificial (IA) utilitzant semen fresc o refrigerat és el mètode més àmpliament implantat per a la seva reproducció; alternatives com la utilització del semen criopreservat poden representar un avantatge a l'hora d'optimitzar el seu rendiment reproductiu, és per això que és important aconseguir una millora de les taxes de recuperació del semen descongelat.

A continuació es fa una revisió dels avantatges i inconvenients més representatius que pot oferir el semen criopreservat en porcí, en altres espècies productives i en l'espècie humana.

Com a avantatges (Roca *et al.*, 2006a; Hernández *et al.*, 2006a; TechnoSperm, 2015):

- Afavoreix el comerç internacional de dosis seminals, facilitant així, la seva importació i/o exportació arreu del món i introduint noves línies genètiques d'alt valor genètic i, per tant, econòmic als diferents països.
- Permet la creació de bancs de semen de dosis seminals porcines on es conserven determinades línies genètiques d'alt valor genètic i econòmic (banc de germoplasma).
- Facilita l'emmagatzematge de semen de bona qualitat en períodes d'alta producció, permetent així, disposar de les dosis seminals en els períodes de baixa producció o en els quals la qualitat espermàtica disminueix.
- Contribueix a minimitzar el problema de l'estacionalitat reproductiva en porcí; d'aquesta manera, es criopreserva el producte de l'ejaculació en els mesos en que aquest presenta major qualitat espermàtica per tal d'obtenir dosis seminals de més bona qualitat, i que puguin ser emprades durant els mesos de calor intensa quan l'ejaculació de porcí presenta una menor qualitat espermàtica.
- Facilita la gestió, planificació i operativitat dels centres de IA porcins; el fet de tenir semen criopreservat afavoreix la gestió i organització dels propis centres així com la distribució de les dosis a totes les granges que ho sol·liciten.

Com a inconvenients:

- Els bons resultats que proporcionen els diluents de refrigeració actuals que permeten mantenir en bones condicions el semen fins a 7-9 dies.
- Els escassos rendiments reproductius que actualment encara proporciona el semen criopreservat i descongelat i, l'elevada variabilitat entre mascles en la resposta a la congelació.

En el cas especial de l'espècie humana, la criopreservació espermàtica té un objectiu òbviament diferent i, per tant, la seva utilització es troba àmpliament acceptada en els programes de reproducció assistida (RA). En aquest cas, és útil utilitzar-la en homes en edat fèrtil que volen preservar la seva fertilitat futura, i més concretament, també està indicada en els següents casos (Solé *et al.*, 2008; Pacheco i San Celestino, 2012; Garrido *et al.*, 2012):

- Pacients que necessiten realitzar tractaments de radioteràpia o quimioteràpia, ja que aquests tractaments poden causar lesions testiculars afectant així a la qualitat espermàtica.
- Quan es busca la sincronització en l'obtenció del semen i el dia de la punció fol·licular.
- Homes que presenten algun tipus de patologia que afecti la seva qualitat espermàtica, com en el cas d'azoospermia.
- Homes que s'han de sotmetre a una vasectomia o que no presenten ejaculació normal, essent aquesta última una conseqüència d'una possible disfunció erèctil, ejaculació retrògrada, entre d'altres causes.

Per a tots aquests casos exposats anteriorment, s'aconsella la criopreservació d'esperma en bancs de semen en els quals es congelen i s'emmagatzemen les mostres, permetent així, la seva conservació per una futura utilització. Existeixen dos tipus de bancs de semen: els bancs de semen que preserven les mostres d'esperma de pacients que estan inclosos dins els programes de RA, i els bancs de semen on es conserven les mostres de semen de donants anònims (Solé *et al.*, 2008; Garrido *et al.*, 2012; González-Ravina *et al.*, 2012).

Cal tenir en compte que existeixen molts casos en els quals és aconsellable la utilització d'esperma criopreservada o fins i tot que és imprescindible per a poder aconseguir descendència i, per tant, l'optimització d'aquesta tècnica té un interès aplicat importantíssim a tenir en compte. És per aquesta raó que actualment hi ha molts grups de recerca que hi treballen.

4.1.1. Antecedents històrics

Al segle XVIII el naturalista italià Spallanzani fou el primer en observar la recuperació dels espermatozoides prèviament congelats en neu, i en demostrar també, la funcionalitat d'aquestes cèl·lules en el procés de la fecundació (Spallanzani, 1776). Al 1938 s'establí per primera vegada el nitrogen líquid com a element utilitzat per a la criopreservació espermàtica (Jahnel, 1938). Posteriorment a aquest fet, el danès Sørensen (1940) fou qui ideà la palleta com a sistema d'envasat de les dosis seminals, les quals presenten una elevada superfície que permet una nucleació uniforme, reduint així, el súper-refredament.

L'any 1949 el grup d'investigació anglès de Polge i col·laboradors fou el responsable del descobriment de les propietats crioprotectors que confereix el glicerol (Polge *et al.*, 1949). Aquest fet va significar un punt d'inflexió en el camp de la preservació del semen marcant l'origen de la criopreservació espermàtica aplicada a la majoria de les espècies domèstiques d'interès productiu (de Mercado, 2011). Sherman i Bunge (1953) foren els responsables d'aconseguir el primer embaràs en humans utilitzant semen criopreservat i posteriorment descongelat. No fou fins a la dècada dels 70 quan naixeren els primers garrins fruit de la

utilització d'espermatozoides criopreservats mitjançant una IA laparoscòpica (Polge *et al.*, 1970). L'any 1975 es varen proposar els dos primers protocols específics per a la criopreservació espermàtica per porcí: el mètode alemany o de Hülsenberger (Westendorf *et al.*, 1975) i el mètode americà o de Beltsville (Pursel i Johnson, 1975). Ambdós mètodes es caracteritzen per la utilització de diluents de congelació que inclouen crioprotectors (CPAs) però difereixen en el tipus de sucre que duen i en el mètode de criopreservar. En el mètode de Hülsenberger s'addiciona com a font de carboni la lactosa i els espermatozoides són envasats en palletes de 5-6 mL de volum i immediatament congelades amb vapors de nitrogen líquid, mentre que en el mètode de Beltsville s'utilitza glucosa com a sucre principal i els espermatozoides es congelen en neu carbònica (Hernández *et al.*, 2006a; Casas, 2010).

Uns anys més tard, concretament al 1985, es celebrà a Suècia el primer Congrés Internacional sobre la criopreservació espermàtica en porcí. Arribat a aquest punt, els protocols de criopreservació d'esperma s'han anat modificant per tal de millorar-los. Una de les millores més importants fou la incorporació al 1989 dels biocongeladors programables als protocols de la tècnica de criopreservació, que proporcionen un control més exhaustiu de les taxes de refredament (Hernández *et al.*, 2006a; Casas, 2010).

4.1.2. Estat actual i perspectives de futur

Actualment es preserven espermatozoides de moltes espècies d'interès productiu i també d'humans, òbviament amb objectius totalment diferents. En aquest darrer cas, la tècnica està estandarditzada i s'utilitza associada a les tècniques de RA. D'entre les espècies d'interès productiu, la criopreservació està força optimitzada tot i que cal considerar que depèn molt de l'espècie. En especial, els espermatozoides de porcí degut a la composició de la seva membrana són especialment sensibles al xoc tèrmic que es produeix durant la criopreservació i, per tant, és una de les espècies en què el protocol no està del tot estandarditzat i cal optimitzar-lo per tal que la seva aplicació esdevingui rendible.

Tot i els avenços aconseguits al llarg dels darrers anys en la tècnica de la criopreservació espermàtica, al 2006 la utilització de semen criopreservat per a la pràctica de la IA tant sols representava l'1% del total de les inseminacions realitzades en el sector porcí (Roca *et al.*, 2006b) i no ha augmentat des de llavors. Aquest fet es deu a que la taxa de fertilitat i la prolificitat utilitzant semen congelat és molt menor al que s'obté a l'utilitzar semen fresc; amb diferències del 20-30% en la taxa de fertilitat i de 2-3 garrins menys per ventrada (de Mercado, 2011). Aquestes baixes taxes de fertilitat i de prolificitat del semen criopreservat han dut als investigadors a estudiar les característiques del semen de porcí, i assajar noves modificacions de la tècnica de criopreservació per tal de millorar els resultats obtinguts i que la tècnica arribi a ser una alternativa eficient dins el sector porcí. Actualment s'està treballant amb compostos antioxidants com el glutatió (Gadea *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012; Estrada, 2014), precursors del glutatió com la L-cisteïna (Funahashi i Sano, 2005) i la L-glutamina (Khelifaoui *et al.*, 2005; de Mercado *et al.*, 2009), enzims com la superòxid dismutasa i la catalasa (Roca *et al.*, 2005), vitamines com la C (Peña *et al.*, 2003, 2004; Yoshimoto *et al.*, 2008) i l'E (Peña *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2009) i algunes plantes com el *Rosmarinus officinalis* (Malo *et al.*, 2010) i *Rhodiola rosea* (Zhao *et al.*, 2009), per tal d'intentar revertir-ne

els efectes negatius. També s'està assajant els beneficis que pot oferir l'addició d'alguns dels components del plasma seminal o del propi plasma en els diluents de congelació per tal d'estabilitzar la membrana plasmàtica (Pursel *et al.*, 1973; Aurich *et al.*, 1996; Centurió *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004; Kawano *et al.*, 2004; Barrios *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007b; Vilagran *et al.*, 2015).

En els darrers anys i gràcies a les millora en els protocols de la tècnica de criopreservació, s'ha aconseguit obtenir dosis seminals porcines amb una qualitat post-descongelació de fins al 50% tant d'espermatozoides mòbils com de viables (Roca *et al.*, 2006a). Aquests valors no són encara prou satisfactoris com per aconseguir desbancar la utilització del semen fresc o refrigerat. De totes maneres, el desenvolupament de tècniques com la inseminació intrauterina profunda (IIP) conjuntament amb les millores que es poden anar aconseguint en la tècnica de la criopreservació pot col·laborar en l'ús del semen criopreservat en IA.

4.2. Protocol de la tècnica de la criopreservació espermàtica

El protocol que es detalla a continuació correspon al que s'aplica de forma rutinària al semen de porcí i que es proposa com a model d'estudi del procés de criopreservació (Westendorf, 1975 i modificat per Martín, 1996; Hernández *et al.*, 2006a):

✓ Recollida i manipulació del semen

Recollida de la fracció rica en espermatozoides de l'ejaculació, mitjançant una gassa estèril, en un recipient temperat a 35-37°C per tal d'evitar qualsevol xoc tèrmic que podria afectar negativament a la qualitat espermàtica. Immediatament després de la recollida, cal diluir la fracció rica recollida en un diluent salí com el Belstville Thawing Solution (BTS) (Taula 2), el qual també ha d'estar a la mateixa temperatura que el producte de l'ejaculació (37°C). Una vegada diluïda la fracció rica en BTS es pot mantenir a 17°C fins al moment de la criopreservació que no ha de ser superior a 12h.

Taula 2. Composició del diluent Belstville Thawing Solution (BTS) (Hernández *et al.*, 2006a).

Component	mM
Glucosa	205
Citrat sòdic	20.4
Clorur potàssic	10
Bicarbonat sòdic	15
EDTA	3.6
Kanamicina (g/L)	0.07
pH	7.2-7.4
Osmolaritat (mOsm/L)	295-330

La fracció rica diluïda es distribueix en tubs de 50 mL i es centrifuga a $300 \times g$ durant 1 min a $16-17^{\circ}\text{C}$ (Figura 4), per tal d'obtenir exclusivament la fracció espermàtica; aquesta haurà de ser rediluïda amb el primer diluent de congelació (Lactose Egg Yolk, LEY; Kikuchi *et al.*, 1997) (Figura 5) fins a una concentració de 1.5×10^9 espermatozoides (spz) per mL i portar-lo a un descens gradual i homogeni de la temperatura des dels 17°C fins als 5°C . Durant les 3h que tarda aproximadament a baixar la temperatura, s'aprofita per avaluar la qualitat dels espermatozoides presents a la fracció rica (concentració, motilitat, viabilitat i morfologia espermàtiques).

Una vegada assolits els 5°C s'addiciona el segon diluent de congelació (Lactose Egg Yolk Glicerol i Orvus Es Paste, LEYGO; Kikuchi *et al.*, 1997), fins a una concentració final de 1×10^9 spz/mL.



Figura 4. Centrifugació de la fracció rica a $300 \times g$ durant 1 minut a $16-17^{\circ}\text{C}$ (TechnoSperm, 2015)

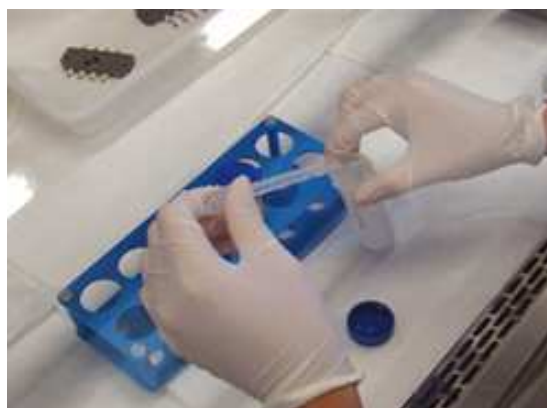


Figura 5. Addició del primer diluent de congelació (LEY) (TechnoSperm, 2015)

✓ Preparació dels diluents de congelació

Els diluents de criopreservació difereixen dels de refrigeració perquè aporten nutrients i preserven la membrana dels espermatozoides durant el xoc tèrmic de la criopreservació mitjançant l'addició de crioprotectors i lípids. Els diluents de criopreservació per als espermatozoides de l'espècie porcina no existeixen comercialment, per aquesta raó s'han de preparar al propi laboratori. Els espermatozoides porcs presenten una alta sensibilitat a temperatures per sota dels $12-15^{\circ}\text{C}$, és per aquest fet que com a component habitual dels diluents de criopreservació s'usa el rovell d'ou fresc, normalment de gallina, ja que presenta propietats protectores davant el refredament, aportant lípids a la membrana per tal que aquesta esdevingui més resistent. Normalment s'usa un primer diluent anomenat LEY que conté rovell d'ou i lactosa i un segon diluent anomenat LEYGO que es prepara a partir del LEY i que conté glicerol com a crioprotector i un detergent sintètic com a emulsionador (Orvus Es Paste o Equex STM) (Taula 3).

Taula 3. Composició dels diluents de congelació més àmpliament utilitzats: Lactosa-Egg-Yolk (LEY) i LEY-Glicerol-Orvus Es Paste “Equex STM” (LEYGO) (Hernández *et al.*, 2006a).

Composició	LEY	LEYGO
Rovell d'ou (%)	20	-
β -lactosa (mM)	248	-
Kanamicina (g/L)	0.1	-
LEY (%)	-	89,5-92,5
Glicerol (%)	-	6-9
Equex STM (%)	-	1.5
pH	6-6.3	6-6.3
Osmolaritat (mOsm/Kg)	330-390	1650-1750

Un cop elaborat el diluent cal mantenir-lo refrigerat a 4-5°C fins a la seva utilització.

✓ Envasat del semen en palletes de 0.5 mL

L'envasat del semen diluït amb el segon medi de congelació fins a una concentració de 1×10^9 spz/mL (LEYGO) es realitza sempre a 5°C i en condicions òptimes de manipulació. Existeixen envasadores semi-automàtiques (Figura 6a) o automàtiques (Figura 6b) d'envasat i també diferents tipus de sistemes d'empaquetatge del semen, entre els més usats hi ha les palletes de 0.5 mL (Figura 7) les de 5 mL i els Flat-Pack de 5 mL. La utilització d'un sistema o d'un altre dependrà del volum de l'ejaculació i conseqüentment de l'espècie de què es tracti.

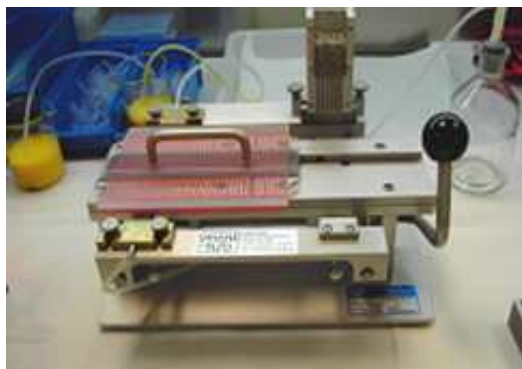


Figura 6a. Envasadora de palletes semi-automàtica (TechnoSperm, 2015)

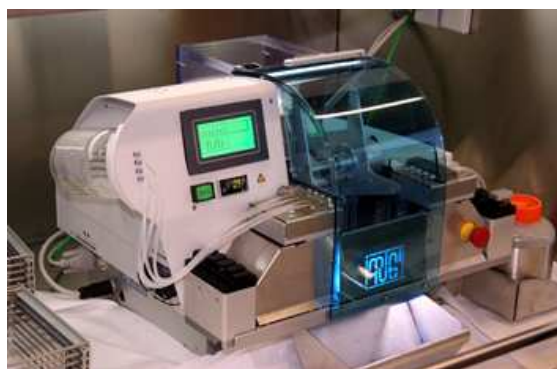


Figura 6b. Envasadora de palletes automàtica (TechnoSperm, 2015)

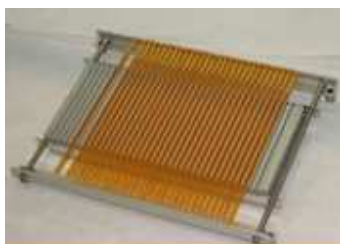


Figura 7. Palletes d'envasat de 0.5 mL (TechnoSperm, 2015)

✓ Congelació de les dosis seminals

La congelació de les dosis seminals es realitza amb vapors de N_2L de manera manual mitjançant envasos criogènics de boca ampla o caixes de porexpan, o de manera automàtica utilitzant biocongeladors. Els biocongeladors tenen com a avantatge que el descens de la temperatura és més controlat ja que permeten programar corbes de refredament preestablertes (Figura 8). Un cop les mostres seminals han estat congelades, s'emmagatzemen momentàniament en un bany de nitrogen líquid fins a ser dipositades en els tancs de N_2L on seran emmagatzemades a $-196^{\circ}C$ fins al moment de la seva utilització.

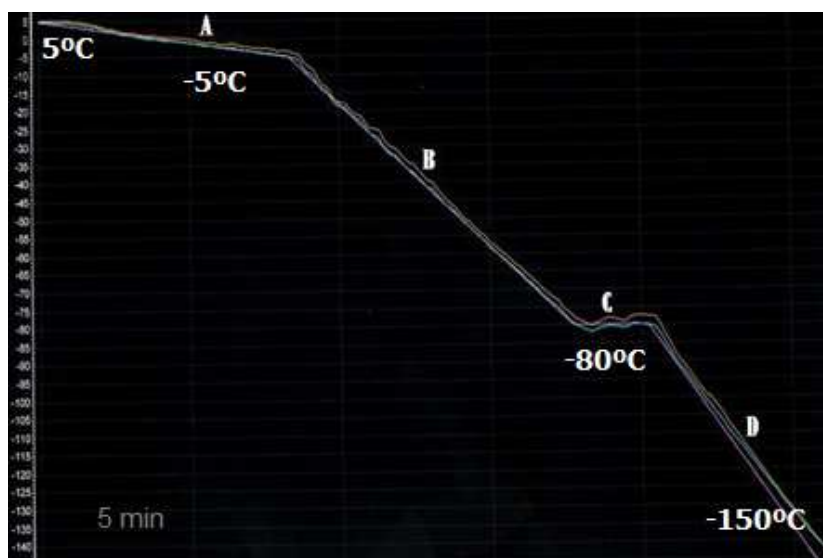


Figura 8. Corba de refredament (TechnoSperm, 2015)

✓ Descongelació

Per tal de descongelar les palletes criopreservades és necessari disposar d'un bany d'aigua a $37^{\circ}C$ on es dipositen les palletes per immersió durant 20 segons en agitació (Figura 9). Tot seguit es traspassa el contingut de les palletes a un tub on prèviament s'hi ha dipositat diluent de descongelació o BTS temperat a $37^{\circ}C$ en proporció (1:3; volum semen : volum BTS). És en aquest moment quan es fa una anàlisi de la qualitat espermàtica que consisteix en l'avaluació de la motilitat, viabilitat i morfologia espermàtiques per tal de fer una valoració de l'estat del semen criopreservat i descongelat.



Figura 9. Descongelació dels espermatozoides criopreservats en un bany d'aigua amb diluent de descongelació a $37^{\circ}C$ (TechnoSperm, 2015)

4.3. Millores en la criopreservació espermàtica

El procés de criopreservació es basa en la manipulació de l'ejaculació des de la seva recollida fins a la congelació i posterior descongelació. L'èxit d'aquest procés depèn de diversos factors interns (característiques fisicoquímiques del propi espermatozoide i de les diferències entre els mascles i entre el propi producte de l'ejaculació) i de factors externs (composició dels diluents, tipus i concentració dels agents crioprotectors, taxes de congelació i descongelació, entre d'altres) (Estrada, 2014). Aquests factors són els responsables de que l'esperma tingui la capacitat per poder sobreviure i mantenir les seves qualitats fecundants durant el procés de criopreservació.

Òbviament, la recerca en aquest àmbit dependrà dels objectius a assolir en cada una de les espècies d'interès, així com, del grau d'eficiència que ofereix la criopreservació per a cada una d'elles. És per això, que la recerca dels últims anys s'ha centrat majoritàriament, en l'optimització de la tècnica en aquelles espècies en què encara no s'ha aconseguit una taxa d'èxit suficientment acceptable com per a garantir la seva aplicabilitat. Concretament, una d'elles és l'espècie porcina i, per tant, la recerca en aquest camp està en continu desenvolupament. L'addició de colesterol, l'addició d'antioxidants i fins i tot de proteïnes seminals de baix pes molecular, entre d'altres, poden ser alternatives reals a la millorar de l'eficiència del procés de criopreservació.

4.3.1. Modificacions de la tècnica

Els protocols de criopreservació sorgiren a la dècada dels 70 i fins a la dècada dels 90 quasi no foren modificats (Juárez, 2009). En els últims anys però, s'han realitzat diversos estudis per tal d'optimitzar el protocol de criopreservació amb la finalitat de millorar la supervivència espermàtica i la capacitat fecundant dels espermatozoides descongelats.

En el mètode Beltsville els espermatozoides s'envasaven en píldores de 0.2 mL mentre que el mètode Hülsenberger ho feia en palletes d'uns 5-6 mL (Juárez, 2009). Diversos estudis han demostrat que l'ús d'envasos de menor capacitat (1.3, 0.5 i 0.25 mL) proporciona una major homogeneïtzació al congelar les mostres i, per tant, una millora en els resultats post-descongelació dels espermatozoides (Almlid i Johnson, 1988; Bwanga *et al.*, 1990; Berger i Fischerleitner, 1992).

Una de les etapes dels protocols de criopreservació és la centrifugació que facilita l'eliminació del plasma seminal i concentra la fracció espermàtica. En els mètodes Beltsville (Pursel i Johnson, 1975) i Hülsenberger (Westendorf *et al.*, 1975) el règim de centrifugació és de 300 x *g* i 800 x *g* durant 10 minuts, respectivament. S'avaluà experimentalment la influència de diversos règims de centrifugació (2400 x *g* durant 3 minuts, 1600 x *g* durant 5 minuts i 80 x *g* durant 10 minuts) mitjançant la recuperació i el percentatge d'espermatozoides de porcí viables post-centrifugació (Carvajal *et al.*, 2004). Els resultats demostraren que usant la força centrífuga més elevada (2400 x *g*) i el temps de centrifuga menor (3 minuts), s'aconseguien els millors resultats de recuperació i del percentatge d'espermatozoides viables. Així doncs, segons l'estudi de Carvajal i col·laboradors, el règim de centrifugació òptim seria 2400 x *g* durant 3 minuts per tal de minimitzar els danys dels

espermatozoides porcins produïts pel procés de la centrifugació i per tal d'augmentar la qualitat espermàtica post-descongelació. Tot i així, segueixen havent-hi controvèrsies al respecte per la qual cosa no tots els laboratoris accepten un règim de centrifugació de 2400 x g durant 3 minuts.

Els protocols de la criopreservació espermàtica consten de tres etapes (refredament, congelació i descongelació) en les quals els espermatozoides s'exposen a importants canvis de temperatura, i en les que és imprescindible la utilització de velocitats de refredament òptimes per tal de causar el menor dany possible a la qualitat espermàtica (Juárez, 2009). Tots els mamífers, i especialment l'espècie porcina, són sensibles al rang de temperatura de refredament de 15°C a 5°C, per la qual cosa es recomana usar velocitats de refredament relativament baixes per tal d'evitar o prevenir els efectes causats pel xoc fred (Watson, 2000). És per aquesta raó per la qual s'han usat velocitats de refredament lentes: 0.06°C/min (Fraser i Strzezek, 2005), 0.08°C/min (Hernández *et al.*, 2007b), 0.1°C/min, 0.18°C/min (Saravia *et al.*, 2009) o 0.2°C/min (Thurston *et al.*, 2002). S'ha comprovat però, que la utilització de velocitats de refredament més ràpides, de fins a 1.5°C/min, en la criopreservació d'espermatozoides porcins no perjudiquen la qualitat ni la funcionalitat espermàtica (Juárez, 2009). D'aquesta manera, utilitzar velocitats de refredament de 1.5°C/min representaria reduir la durada de l'etapa de refredament, dels 90-210 minuts que dura actualment, a tan sols uns 8-10 minuts, de tal manera que la durada total del procés de criopreservació es veuria reduïda de 150-250 minuts a 35-40 minuts (Juárez, 2009). S'ha estudiat també la velocitat de congelació en el descens de temperatura de -5°C als -40°C, ja que en aquest rang de temperatura hi té lloc la cristallització del medi i els canvis produïts per la pressió osmòtica (Woelders *et al.*, 2005). S'ha demostrat experimentalment que velocitats de congelació relativament altes, -30°C/min i -40°C/min, són més beneficioses que velocitats baixes ja que permeten un equilibri entre l'efecte solut i la formació de cristalls de gel (Devireddy *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007c). En l'etapa de descongelació s'ha corroborat que velocitats de descongelació elevades, d'uns 1800°C/min, proporcionen majors resultats en comparació a les velocitats de 1200°C/min usades habitualment (Hernández *et al.*, 2006b, 2007b). En l'espècie bovina, s'ha demostrat que la utilització de velocitats de refredament elevades, de 4-5°C/min, aporta una bona qualitat espermàtica post-descongelació (Janaskaukas *et al.*, 1999).

El coneixement de les propietats biofísiques dels espermatozoides ha permès desenvolupar algunes millores en els protocols de criopreservació com: el disseny d'envasos per a l'emmagatzematge dels espermatozoides que permeten una major homogeneïtzació a la deshidratació, la utilització de noves pautes de centrifugació menys perjudicials pels espermatozoides, les variacions de les velocitats de les corbes de congelació i descongelació, entre d'altres.

4.3.2. Addició de colesterol

Com s'ha comentat anteriorment, el colesterol és el segon component majoritari de les membranes plasmàtiques que actua conferint estabilitat i disminuint la temperatura en la qual es produeix el canvi de fase dels lípids de líquida a gel (Brouwers *et al.*, 2005; Tomás, 2007). Durant la criopreservació es produeixen danys que recorden els que tenen lloc durant la capacitació (adquisició de la capacitat per a fecundar l'òocit) (White, 1993). Un d'aquest dany és la pèrdua de colesterol de les membranes, generant així, la pèrdua de viabilitat i de la capacitat per a resistir baixes temperatures (Tomás, 2007; Roca *et al.*, 2011). Aquest fet va dur a estudiar l'efecte de la incorporació de colesterol a les membranes plasmàtiques mitjançant oligosacàrids cíclics anomenats ciclodextrines. Les ciclodextrines es saturen de molècules de colesterol obtenint així, un medi portador per incorporar el colesterol a les membranes plasmàtiques espermatiques (Tomás, 2007). La saturació de les ciclodextrines amb colesterol és completament necessària ja que si s'addicionen no saturades, aquestes capten el colesterol de les membranes plasmàtiques desestabilitzant-les (Tomás, 2007).

En porcí s'ha pogut comprovar que l'addició de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (Zeng i Terada, 2000 i 2001a) i de metil- β -ciclodextrina saturades de colesterol, (Zeng i Terada, 2001b) proporciona un major percentatge de mobilitat i de la integritat de la membrana plasmàtica dels espermatozoides. A més a més, l'addició de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina saturada de colesterol 3-sulfat millora la viabilitat dels espermatozoides porcíns i inhibeix la capacitació durant la criopreservació (Galantino-Homer *et al.*, 2006). En equins es va observar que l'addició de metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol prèvia al procés de criopreservació, proporcionava una millora post-descongelació ja que s'obtingué un major percentatge d'espermatozoides mòbils i amb la membrana plasmàtica íntegra (Combes *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2005). Per contra, en altres estudis tan sols s'obtingueren millores en la integritat de la membrana plasmàtica però no en quant a motilitat (Zahn *et al.*, 2002). A més a més, aquest últim estudi demostrà que la utilització del semen equí tractat amb metil- β -ciclodextrina saturada de colesterol per realitzar inseminacions, proporcionava un menor percentatge de femelles prenyades en relació a les femelles inseminades amb el semen no tractat (Zahn *et al.*, 2002). Els estudis en boví (Purdy i Graham, 2004) i en caprí (Tomás, 2007) demostren que el tractament de ciclodextrines saturada de colesterol millora la motilitat i la viabilitat dels espermatozoides pre-tractats.

Observant els estudis anteriors, es pot afirmar que el tractament amb ciclodextrines saturades de colesterol proporciona millores en la viabilitat i la motilitat dels espermatozoides de diverses espècies d'interès productiu com porcí, equí, boví i caprí.

4.3.3. Addició d'antioxidants

Un dels principals problemes de la criopreservació és l'elevada generació de ROS com a conseqüència de l'estrès oxidatiu produït per la peroxidació lipídica dels àcids grassos poliinsaturats de la membrana. És per aquesta raó que les investigacions dels últims anys han anat dirigides a la millora de la tècnica i de la qualitat del semen post-descongelació, mitjançant l'aplicació de diversos antioxidants en els medis de congelació durant la criopreservació. Existeixen dos grups d'antioxidants: els enzimàtics com per exemple la

superòxid dismutasa i la catalasa i, els no enzimàtics com vitamines C i E, però tots ells tenen la capacitat de neutralitzar els ROS, evitant així, el dany estructural de la cèl·lula (Kefer *et al.*, 2009).

La utilització del glutatió (GSH) com a antioxidant ha demostrat que redueix significativament el contingut de H_2O_2 (ROS) (Estrada, 2014). També s'ha comprovat que els espermatozoides porcins criopreservats amb l'addició de GSH exogen milloren la seva capacitat fecundant quan els nivells de GSH endògens són inferiors als nivells seminals normals de GSH (Zhang *et al.*, 2012; Estrada, 2014). L'addició de GSH al medi de congelació augmenta significativament la taxa de part (Estrada, 2014) i la penetració de l'espermatozoide porcí a l'oòcit (Gadea *et al.*, 2004).

En el plasma seminal s'hi troben antioxidants enzimàtics com l'enzim superòxid dismutasa (SOD) i catalasa (CAT) per tal de contrarestar l'efecte perjudicial de ROS (Weir i Robaire, 2007; Hammadeh *et al.*, 2009). El SOD transforma l' O_2^- en H_2O_2 i el CAT converteix el H_2O_2 en H_2O , eliminant així, la toxicitat dels ROS del producte de l'ejaculació (Zhang *et al.*, 2012). L'addició de SOD i CAT en el diluent de congelació redueix la generació de ROS i millora la mobilitat, la viabilitat i la capacitat fertilitzant in vitro dels espermatozoides porcins descongelats (Roca *et al.*, 2005). Maxwell i Stohanov (1996) trobaren els mateixos resultats en espermatozoides d'oví.

L'àcid ascòrbic (o vitamina C) és un antioxidant que redueix el dany de l'ADN induït per H_2O_2 i redueix la peroxidació lipídica (Sierens *et al.*, 2002). S'ha pogut determinar que l'àcid ascòrbic proporciona una major viabilitat dels espermatozoides criopreservats de porcí (Peña *et al.*, 2003, 2004). L'addició d'àcid ascòrbic en espermatozoides de boví proporciona una major motilitat d'aquests (Hu *et al.*, 2010). L'addició de la vitamina sintètica derivada de l'àcid ascòrbic, AA-2G, protegeix als espermatozoides porcins de la peroxidació lipídica i del dany cel·lular causat per l'estrès oxidatiu com a conseqüència de la generació de ROS durant la criopreservació (Yoshimoto *et al.*, 2008).

L' α -Tocoferol (o vitamina E) actua com antioxidant trencant els enllaços covalents que formen les formes ROS amb els àcids grassos de la membrana lipídica (Dad *et al.*, 2006). Els estudis de Peña i col·laboradors (2003) demostraren efectes positius en la motilitat, en la integritat de la membrana dels espermatozoides porcins criopreservats i, per tant, en la supervivència dels espermatozoides post-descongelació prèvia addició de α -Tocoferol. D'altra banda, tal com demostrà Jeong i col·laboradors (2009), l'addició d' α -Tocoferol pot protegir als espermatozoides de l'excessiva producció de ROS durant la criopreservació mitjançant la reducció de la peroxidació lipídica.

L'addició de L-glutamina (L-Glu) i de L-cisteïna (L-Cys), precursors de GSH intracel·lular, són de gran importància en la criopreservació espermàtica. L'addició de L-Glu pot actuar com a crioprotector en el procés de criopreservació i com a substitutiu del glicerol, millorant així, la motilitat de l'esperma post-descongelada (Khelifaoui *et al.*, 2005; de Mercado *et al.*, 2009). S'ha pogut corroborar que l'addició de L-Cys millora la viabilitat i la motilitat progressiva del semen de porcí fresc (Funahashi i Sano, 2005) i de les mostres refrigerades a 15°C (Szczeniak-Fabianczyk *et al.*, 2003).

Un altre dels estudis actuals és la suplementació de plantes naturals que contenen compostos amb capacitat antioxidant (Zhang *et al.*, 2012). Una de les plantes és el romaní (*Rosmarinus officinalis*) que conté substàncies biològicament actives com àcids, flavonoides i polifenols (Zhang *et al.*, 2012). S'ha comprovat que l'addició d'extracte de romaní al diluent de congelació de semen de porcí proporciona una major viabilitat dels espermatozoides post-descongelats i una millora en la taxa de fertilització dels espermatozoides (Malo *et al.*, 2010). Una altra estratègia usada és l'extracte de l'arrel de la planta *Rhodiola rosea* (Zhang *et al.*, 2012) que presenta una forta activitat de neutralització del radical O_2^- i conseqüentment, una inhibició de la peroxidació lipídica (Zhang i Liu, 2005). Zhao i col·laboradors (2009) van observar que l'addició de *Rhodiola rosea* al diluent de congelació en criopreservació de semen de porcí proporcionava una millora significativa dels nivells de GSH i de la qualitat espermàtica.

Per tots aquest resultats que s'han anat constatant, l'addició d'antioxidants en el diluent de congelació disminueix els danys causats per l'estrès oxidatiu i proporciona una millora en la viabilitat i en la motilitat dels espermatozoides post-descongelació. Actualment però, es continua estudiant la relació existent entre els antioxidants i els mecanismes de protecció contra l'estrès oxidatiu intracel·lular, per cercar noves substàncies que puguin actuar com a antioxidants i poder millorar els protocols de criopreservació.

4.3.4. Addició de plasma seminal

En el procés de criopreservació el plasma seminal és eliminat per tal de congelar únicament els espermatozoides, provocant així, una eliminació, modificació i reestructuració dels components de la membrana plasmàtica, alterant-ne la motilitat i la capacitat fecundant de l'espermatozoide (Maxwell i Johnson, 1999). Diversos estudis corroboren la presència de factors descapacitants en el plasma seminal que protegeixen els espermatozoides d'una criopreservació prematura (Davis i Niwa, 1974; Kanwar *et al.*, 1979). Aquest fet provoca que la incubació dels espermatozoides en plasma seminal els protegeixi dels fenòmens de capacitació espermàtica deguda a la criopreservació (Davis i Niwa, 1974; Kanwar *et al.*, 1979). La capacitació espermàtica provoca un seguit de reaccions com l'alliberament del colesterol de les membranes, la fosforilació de proteïnes i l'increment intracel·lular de ions calci que causen la desestabilització i reorganització dels lípids i proteïnes de les membranes plasmàtiques, per tal que es produeixi l'exocitosi de l'acrosoma quan l'espermatozoide entre en contacte amb la zona pel·lúcida de l'oòcit. Aquest fet ha dut a valorar la utilització del plasma seminal o d'alguns dels seus components, principalment proteïnes, com additiu en els diluents de congelació durant la criopreservació (Caballero *et al.*, 2004; Barrios *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2007a).

Existeix una gran controvèrsia sobre l'efecte que provoca la incubació dels espermatozoides en plasma seminal; alguns autors demostren els beneficis que comporta la incubació dels espermatozoides amb el plasma seminal durant un període de temps (2-7h) previ a la congelació, així com l'addició d'una proporció del 10-40% de plasma seminal en els diluents de congelació per tal d'augmentar la resistència dels espermatozoides al xoc tèrmic i, d'aquesta manera, reduir l'estat de capacitació espermàtica (Pursel *et al.*, 1973; Vadnais *et al.*, 2005). Altres autors demostren que l'addició del plasma seminal comporta un efecte

perjudicial en la qualitat espermàtica (Kawano *et al.*, 2004; Okazaki *et al.*, 2009) com efectes perjudicials per una elevada osmolaritat del medi deguts a l'excessiva addició de plasma seminal (de Mercado, 2011). Aquesta controvèrsia sobre el benefici o perjudici de l'addició de plasma seminal podria ser deguda a la gran variació existent en la composició del plasma seminal entre mascles i entre les pròpies ejaculacions del mateix mascle, classificant-se així com a mascles “bons o mals congeladors” depenent de la capacitat dels espermatozoides a resistir el procés de criopreservació (Casas, 2010; de Mercado, 2011). Diversos estudis demostren que l'addició de plasma seminal procedent de mascles “bons congeladors” presenten millors valors de viabilitat i de mobilitat post-descongelació (Aurich *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 2007a). La durada del període d'incubació dels espermatozoides porcs en el plasma seminal també presenta controvèrsia ja que no existeix un temps estandarditzat ni consensuat en els protocols (Eriksson *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2007a; Vadnais *et al.*, 2011; Tomás *et al.*, 2014).

Diversos autors classifiquen els mascles porcs en “bons i mals congeladors” en funció de la resposta de les seves ejaculacions a la seva criopreservació. Tot i així, s'observen també diferències en les diverses ejaculacions del mateix mascle (Vilagran *et al.*, 2013). Diversos estudis demostren que els productes de les ejaculacions dels mascles “bons i mals congeladors” difereixen segons la proporció de dos proteïnes; una proteïna d'uns 15kDa present en major proporció en els mascles “bons congeladors”, mentre que en els “mals congeladors” es troba una major proporció d'una proteïna d'uns 25kDa (Jobim *et al.*, 2004; de Mercado, 2011). La banda proteica de 15kDa és semblant al pes molecular de les espermadhesines (12-16kDa) (Centurió *et al.*, 2003; Caballero *et al.*, 2004), família de proteïnes majoritàries en el plasma seminal que s'adhereixen a la membrana plasmàtica durant l'ejaculació (Sanz *et al.*, 1992). Les espermadhesines tenen funció protectora dels espermatozoides porcs ja que proporcionen estabilitat a la membrana plasmàtica davant del danys causats pel xoc tèrmic (Caballero *et al.*, 2004; Barrios *et al.*, 2005; García *et al.*, 2006) i eviten la capacitació espermàtica prematura (Calvete *et al.*, 1996). Aquests beneficis dugueren a realitzar diversos estudis addicionant una de les espermadhesines més abundants en el plasma seminal, l'heterodímer PSP-I/PSP-II, en els quals s'ha determinat que l'addició de l'heterodímer en el semen fresc o congelat-descongelat durant períodes de temps curts preserva i/o millora la viabilitat, la motilitat espermàtica (Caballero *et al.*, 2004) i l'activitat mitocondrial (Centurió *et al.*, 2003).

Vilagran i col·laboradors (2015) han comparat el proteoma seminal dels porcs “mals congeladors” amb el dels “bons congeladors” per tal de cercar marcadors de la congelabilitat de l'esperma. L'estudi ha demostrat diferències significatives en la quantitat de fibronectina-1 (FN1) present en les ejaculacions dels dos grups, ja que les ejaculacions procedents de mascles “bons congeladors” presentaren una major quantitat de FN1 en comparació amb les dels “mals congeladors”. Per tant, la quantitat de FN1 present en el semen fresc de porcí podria ser usat com a marcador proteic de la congelabilitat espermàtica (Vilagran *et al.*, 2015).

L'addició de proteïnes seminals en els diluents de congelació en semen de boví proporciona un augment del percentatge d'espermatozoides viables post-descongelació (Rueda *et al.*, 2013).

Els estudis realitzats determinarien que l'addició de quantitats adequades de plasma seminal procedent de mascles "bons congeladors" o l'addició d'algun component seminal com les espermadhesines, podrien protegir els espermatozoides del procés de la criopreservació afavorint-ne la viabilitat i la mobilitat espermàtica. Actualment, diversos centres de recerca en biotecnologia de la reproducció estan investigant per tal de cercar nous marcadors moleculars, com la fibronectina-1, que actuïn com a indicadors de la congelabilitat espermàtica.

5. CONCLUSIONS

- The frozen-thawed boar semen is underused in AI programs, only 1% of the females are inseminated with this semen. The rate of fertility and litter using frozen semen is much lower than that obtained when using fresh cooled semen; with a 20-30% of difference in the fertility rate and 2-3 piglets less per litter.
- The sperm of boars, horses, oxen and goats are more sensitive to the cryopreservation than the human sperm, being the boar the most vulnerable due to the high content of polyunsaturated fatty acids and the low cholesterol presence in its plasma membrane. Boar sperm have a high susceptibility to the various manipulations of the cryopreservation technique.
- The use of cooling speeds faster than usual, up to 1.5°C / min, do not seem to harm the functionality or quality post-thawing boar sperm, allowing a reduction in the time devoted to the process of cryopreservation. The short-term centrifugation at a relatively high g-force minimize damage to boar spermatozoa and improve the post-thawing sperm quality
- The quality post-thaw of the sperm of boars, horses, oxen and goats is favored by adding saturated cholesterol cyclodextrins prior to cryopreservation. The addition of antioxidants in the freezing extenders diminishes the harmful effects of ROS in boars, goats and oxen sperm during cryopreservation. Supplementation with seminal plasma from good freezers boar males provides improved mobility and sperm viability post-thaw.
- The optimization degree of the technique in those animal species of productive interest different from boars is further achieved due to the lower susceptibility of the sperm cell. In humans, sperm cryopreservation is part of the process of assisted reproduction techniques with satisfactory results.
- It is necessary to continue studying improvements to optimize cryopreservation technique in boars in order to get good results and be able to reduce the cost of its implementation. It is necessary to continue assaying new substances and/or different concentrations of the substances studied so far, in order to optimize and monetize the technique of cryopreservation of boar sperm to be of interest within in the sector.
- It is very difficult to standardize a protocol of sperm cryopreservation for all species because there are differences between species, between males from the same species and even between ejaculations of the same male as there is enormous variability.

BIBLIOGRAFIA

Almlid, 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. *Journal of Animal Science*, 66, 2899-2905.

Anatomy & Physiology. (2015). *Anatomy & Physiology*. Recuperat 1 de juliol de 2015 des de <http://www.anatomyandphysiology.com/the-plasma-membrane-structure/>

Aurich, J.E., Kühne, A., Hoppe, H., Aurich, C. (1996). Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, 46, 791–797.

Bachmann, K. (1978). *Biología para médicos*. Recuperat 15 juliol de 2015 a https://books.google.es/books/about/Biolog%C3%ADa_para_m%C3%A9dicos.html?id=dwPg88Wq2xYC

Barrios, B., Fernández, M., Muiño, T., Cebrián, J.A. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. *Journal of Andrology*, 26, 539-549.

Berger, B., Fischerleitner, F. (1992). On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 27, 266–270.

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. *Molecular Reproduction and Development*, 55, 282-288.

Bonet, S., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E. (2000). *Morphology of boar spermatozoa*. Barcelona: Institut d'Estudis Catalans.

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.

Bwanga, C.O., de Braganca, M.M., Einarsson, S., Rodriguez- Martinez, H. (1990). Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *Journal of Veterinary Medicine*, 37, 651-658.

Caballero, I., Vázquez, J.M., Centurió, F., Rodríguez-Martínez, H., Parrilla, I., Cuello, C., Martínez, E.A. (2004). Comparative effects of autologous and homologous seminal plasma on the viability of largely extended boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 39, 370-375.

Calvete, J.J., Dostálová, Z., Sanz, L., Adermann, K., Thole, H.H., Töpfer-Petersen, E. (1996). Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins. *FEBS Letters*, 379, 207-211.

Campos, I., Magán, R.M., Ruzafa, C., Fortes, C. (2012). Congelación de semen en píldoras. En J.A. Remohí, A.C. Cobo, N. Prados, J.L. Romero, A. Pellicer (eds.), *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: Laboratorio de reproducción asistida* (4a ed., p. 27-32). Madrid: Médica Panamericana.

Carvajal, G., Cuello, C., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Roca, J. (2004). Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryopreservation. *Journal of Andrology*, 25, 389–396.

Casas Roqueta, Isabel. *A practical approach on boar sperm cryodamage. Morphofunctional and immunocytochemical study of cryopreserved boar sperm intended for use in artificial insemination* [en línia]. Girona: Universitat de Girona. Departament de Biologia, 2010. <<http://hdl.handle.net/10803/7642>> [Consulta: 10 gener 2015].

Centurió, F., Vázquez, J.M., Calvete, J.J., Roca, J., Sanz, L., Parrilla, I., García, E., Martínez, E.A. (2003). Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biology of Reproduction*, 69, 640-646.

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

Combes, G.B., Varner, D.D., Schroeder, F., Burghardt, R.C., Blanchard, T.L. (2000). Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 56, 127-132.

Dad, S., Bisby, R.H., Clark, I.P., Parker, A.W. (2006). Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. *Free Radical Research*, 40, 333-338.

Darin-Bennett, A., White, I.G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14, 466-70.

Davis, B.K., Niwa, K. (1974). Decapacitation and recapacitation of rabbit spermatozoa treated with membrane vesicles from seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41, 241-244.

Dayong, G., Critser, J.K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal*, 41, 187-196.

de Mercado, E., Hernández, M., Sanz, E., Rodríguez, A., Gómez, E., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Roca, J. (2009). Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 115, 149-157.

de Mercado de la Peña, Eduardo de. *Caracterización de la congelabilidad y mejora de los diluyentes de crioconservación espermática en porcino ibérico* [en línea]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Medicina y Cirugía Animal, 2011. <<http://eprints.ucm.es/14442>> [Consulta: 13 gener 2015].

Devireddy, R.V., Fahrig, B., Godke, R.A., Leibo, S.P. (2004). Subzero water transport characteristics of boar spermatozoa confirm observed optimal cooling rates. *Molecular Reproduction and Development*, 67, 446-457.

Drobnis, E.Z., Crowe, L.M., Berger, T., Anchordoguy, T.J., Overstreet, J.W., Crowe, J.H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*, 265, 432-437.

Eriksson, B.M., Petersson, H., Rodríguez, H. (2002). Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*, 58, 1065-1079.

Estrada Paqui, Efrén. *Efectos del glutatión reducido y la procaína en la resistencia a la crioconservación de semen porcino. Acciones a nivel de la estabilidad nuclear y su efecto en la fertilidad "in vivo"* [en línea]. Bellaterra: Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina i Cirurgia Animals, 2014. <<http://hdl.handle.net/10803/145392>> [Consulta: 12 gener 2015].

Fraser, L., Strzezek, J. (2005). Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reproduction in Domestic Animals*, 40, 530-536.

Funahashi, H., Sano, T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. *Theriogenology*, 63, 1605-1616.

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

Gadella, B.M., Harrison, R.A. (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. *Development*, 127, 2407-2420.

Gadella, B.M., Tsai, P.S., Boerke, A., Brewis, I.A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, 52, 473-480.

Galantino-Homer, H.L., Zeng, W.X., Megee, S.O., Dallmeyer, M., Voelkl, D., Dobrinski, I. (2006). Effects of 2-hidroxiopropil- β -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 638-650.

García, E.M., Vázquez, J.M., Calvete, J.J., Sanz, L., Caballero, I., Parrilla, I., Gil, M.A., Roca, J., Martínez, E.A. (2006). Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *Journal of Andrology*, 27, 434-443.

- Garrido, N., Márquez, Y., Rico, C., Rodríguez, P., Mencías, A., Zurilla, A., Serrano, J., Meseguer, M. (2012). Banco de semen de muestras propias. En J.A. Remohí, A.C. Cobo, N. Prados, J.L. Romero, A. Pellicer (eds.), *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: Laboratorio de reproducción asistida* (4a ed., p. 39-46). Madrid: Médica Panamericana.
- González-Ravina, C., Tirado, M^a M., Ramos, R., Herrera, R., de Ruz, T., Rodríguez, M., Laynez, M^a M., Campos, P. (2012). Banco de semen de donantes: gestión y criterios de selección. En J.A. Remohí, A.C. Cobo, N. Prados, J.L. Romero, A. Pellicer (eds.), *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: Laboratorio de reproducción asistida* (4a ed., p. 47-54). Madrid: Médica Panamericana.
- Hammadeh, M.E., Fillippos, A., Hanad, M.F. (2009). Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *International Journal of Fertility and Sterility*, 3, 87-110.
- Hernández, M., Bolarín, A., Gil, M., Almiñana, A.C., Cuello, C., Parrilla, I., ... Roca, J. (2006a). Criopreservación espermática. Dins S. Bonet, E. Martínez, J.E. Rodríguez, X. Barrera (eds.), *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino: Biotecnología de la Reproducción Porcina* (1a ed., p. 185-200). Girona: Universitat de Girona - Red Temática Nacional de Reproducción Porcina.
- Hernández, M., Roca, J., Ballester, J., Vázquez, J.M., Martínez, E.A., Johannisson, A., Saravia, F., Rodríguez-Martínez, H. (2006b). Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability. *Journal of Andrology*, 29, 583-591.
- Hernández, M., Roca, J., Calvete, J.J., Sanz, L., Muiño, T., Cebrián, J.A., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. (2007a). Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *Journal of Andrology*, 28, 689-697.
- Hernández, M., Roca, J., Gil, M.A., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. (2007b). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology*, 67, 1436-1445.
- Hernández, M., Ekwall, H., Roca, J., Vázquez, J.M., Martínez, E., Rodríguez-Martínez, H. (2007c). Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars. *Cryobiology*, 54, 63-70.
- Holt, W.V., Medrano, A., Thurston, L.M., Watson, P.F. (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, 63, 370-382.
- Hu, J.H., Tian, W.Q., Zhao, X.L., Zan, L.S., Wang, H., Li, Q.W., Xin, Y.P. (2010). The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal Reproduction Science*, 121, 72-77.
- Jahnel, F. (1938). Über die Widerstandsfähigkeit von menschlichen spermatozoonen gegenüber starker kälte. *Klinische Wochenschrift*, 17, 1273-1274.
- Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Håård, M.G., Håård, M.Ch., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. *Theriogenology*, 52, 641-656.
- Jeong, Y.J., Kin, M.K., Song, H.J., Kang, E.J., Ock, S.A., Kumar, B.M., Balasubramanian, S., Rho, G.J. (2009). Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, 58, 181-189.
- Jobim, M.I., Oberst, E.R., Salbego, C.G., Souza, D.O., Wald, V.B., Tramontina, F., Mattos, R.C. (2004). Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 61, 255-266.
- Juárez, J.D. (2009). *Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de los espermatozoides de porcino* (Treball de màster no publicat). Universidad Politécnica de Valencia: Valencia.
- Kanwar, K.C., Yanagimachi, R., Lopata, A. (1979). Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 31, 321-327.
- Kawano, N., Shimada, M., Terada, T. (2004). Motility and penetration competence of frozen-thawed miniature pig spermatozoa are substantially altered by exposure to seminal plasma before freezing. *Theriogenology*, 61, 351-364.

- Kefer, J.C., Agarwal, A., Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, 16, 449-457.
- Khlifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J.F., Chatagnon, G., Trimeche, A., Tainturier, D. (2005). Effects of glutamine on the post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. *Theriogenology*, 63, 138-149.
- Kikuchi, K., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Noguchi, J., Shimada, A., Soloy, E., Kaneko, H. (1997). Cryopreservation and in vitro fertilization of pig sperm collected from refrigerated epididymides. *Theriogenology*, 47, 258.
- Malo, C., Gil, L., González, N., Martínez, F., Cano, R., de Blas, I., Espinosa, E. (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*, 61, 142-147.
- Martín, S. (1996). Avances en el control de la reproducción en ganado porcino. Dins *Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal* (1a ed., p. 31-52). Cuenca: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla-La Mancha.
- Maxwell, W.M.C, Stohanov, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development*, 8, 1013-1020.
- Maxwell, W.M.C, Johnson, L.A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48, 209-219.
- Maxwell, W.M.C, Johnson, L.A. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52, 1353-1362.
- Mazur, P., Leibo, S.P., Chu, E.H. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, 71, 345-355.
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K. (2005). Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Criobiology*, 51, 241-249.
- Okazaki, T., Abe, S., Yoshida, S., Shimada, M. (2009). Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology*, 71, 491-498.
- Pacheco, A., San Celestino, M. (2012). Seguridad en la gestión del banco de gametos y embriones. En J.A. Remohí, A.C. Cobo, N. Prados, J.L. Romero, A. Pellicer (eds.), *Manual práctico de Esterilidad y Reproducción Humana: Laboratorio de reproducción asistida* (4a ed.,p. 369-376). Madrid: Médica Panamericana.
- Palma, G.A. (2001). *Biotechnología de la Reproducción*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Parks, J.E., Hammerstedt, R.H. (1985). Developmental changes occurring in the lipid of ram epididymal sperm plasma membranes. *Biology of Reproduction*, 32, 653-68.
- Parks, J.E., Lynch, D.V. (1992). Lipid composition and the thermotropic phase behaviour of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29, 255-266.
- Peña, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane peteital after cryopreservation of diferent fractions the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 78, 85-98.
- Peña, F.J., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H. (2004). Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, 12, 117-124.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666.
- Polge, C., Salamon, S., Wilmut, I. (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Veterinary Record*, 87, 424-429.
- Purdy, P.H., Graham, J.K. (2004). Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*, 48, 36-45.

- 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. *Journal of Animal Science*, 37, 528-531.
- Pursel, V.G., Johnson, L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*, 40, 99-102.
- 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. *Journal of Andrology*, 26, 15-24.
- Roca, J., Hernández, M., Bolarín, A., Vázquez, J.M., Martínez, E. (2006a). Semen criopreservado en los programas de inseminación en la especie porcina, ¿alternativa o complemento al semen refrigerado?. *Avances en tecnología porcina*, 3, 21-31.
- Roca, J., Vázquez, J.M., Gil, M.A., Cuello, C., Parrilla, I., Martínez, E.A. (2006b). Challenges in pig artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 43-53.
- Roca, J., Parrilla, I., Rodríguez-Martínez, H., Gil, M.A., Cuello, C., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. (2011). Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 79-83.
- Rueda, F., Garcés, T., Herrera, R., Ramírez, Arbeláez, L., Peña, M., Velásquez, H., Hernández, A., Cardozo, J. (2013). Las proteínas del plasma seminal incrementan la viabilidad espermática post-descongelación del semen de toros Sanmartinero. *Revista MVZ Córdoba*, 18, 3327-3335.
- Sanz, L., Calvete, J.J., Mann, K., Schafer, W., Schmid, E.R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Ehrhard, M., Topfer-Petersen, E. (1992). The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa. *FEBS Letters*, 300, 213-218.
- Saravia, F., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H. (2009). Freezing of boar semen can be simplified by handling a specific portion of the ejaculate with a shorter procedure and MiniFlatPack packaging. *Animal Reproduction Science*, 117, 279-287.
- Sherman, J.K., Bunge, R.G. (1953). Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 172, 767-768.
- Sierens, J., Hartley, J.A., Campbell, M.J., Leatham, A.J., Woodside, J.V. (2002). In vitro isoflavone supplementation reduces hydrogen peroxide-induced DNA damage in sperm. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 22, 227-234.
- Solé, M., Boada, M., Veiga, A. (2008). Criopreservació i tècniques de reproducció assistida. Dins M. Durfort i F. Vidal (eds.), *Biologia de la Reproducció* (1a ed., p.233-248). Barcelona: Treballs de la Societat Catalana de Biologia. Institut d'Estudis Catalans.
- Sörensen, E. (1940). Insemination with gelatinized semen in paraffined cellophane tubes. *Medlærnsbl Danske Dyrægeforen*, 23, 166-169.
- Spallanzani, L. (1776). Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell' uomo e degli animali. Opusculi di Fisica Animale e Vegetabile, Moderna.
- Szczesniak-Fabianczyk, B., Bochenek, M., Smorag, Z., Silvestre, M.A. (2003). Effects of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival and sperm chromatin structure. *Reproductive Biology*, 3, 81-87.
- TechnoSperm. (2015). *TechnoSperm*. Recuperat 14 de maig de 2015 des de <http://www.technosperm.com>
- Thurston, L.M., Siggins, K., Mileham, A.J., Watson, P.F., Holt, W.V. (2002). Identification of amplified restriction fragment length polymorphism (AFLP) markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 66, 545-554.
- Tomás, C. (2007). *Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío* (Treball de màster no publicat). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Tomás, C., Gómez, J., Gómez, E., de Mercado, E. (2014). Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 144, 115-121.

- Vadnais, M.L., Kirkwood, R.N., Specher, D.J., Chou, K. (2005). Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Animal Reproduction Science*, 90, 347-354.
- Vadnais, M.L., Althouse, G.C. (2011). Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*, 76, 1508-1516.
- Vilagran, I., Castillo, J., Bonet, S., Sancho, S., Yeste, M., Estanyol, J.M., Oliva, R. (2013). Acrosin-binding protein (ACRBP) and triosephosphate isomerase (TPI) are good markers to predict boar sperm freezing capacity. *Theriogenology*, 80, 443-450.
- Vilagran, I., Yeste, M., Sancho, S., Castillo, J., Oliva, R., Bonet, S. (2015). Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*, 3, 345-356.
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481-492.
- Weir, C.P., Robaire, B. (2007). Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat. *Journal of Andrology*, 28, 229–240.
- Westendorf, P., Richter, L., Treu, H. (1975). Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hülseberger Palletten-Verfahren. [Deep freezing of boar sperma. Laboratory and insemination results using the Hülseberger paillete method]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 82, 261-267.
- White, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5, 639-658.
- Woelders, H., Matthijs, A., Zuidberg, C.A., Chaveiro, A.E. (2005). Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. *Theriogenology*, 63, 383-395.
- Yoshimoto, T., Nakamura, S., Yamauchi, S., Muto, N., Nakada, T., Ashizawa, K., Tatemoto, H. (2008). Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic 2-O-alpha-glucoside. *Cryobiology*, 57, 30-36.
- Zahn, F.S., Papa, F.O., Dell'Aqua, J.A. (2002). Cholesterol incorporation on equine sperm membrana: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*, 58, 237-240.
- Zeng, W.X., Terada, T. (2000). Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reproduction, Fertility and Development*, 12, 223-228.
- Zeng, W.X., Terada T. (2001a). Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology*, 55, 615-627.
- Zeng W.X., Terada T. (2001b). Effect of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. *Journal of Andrology*, 22, 111-118.
- Zhang, Y., Liu, Y. (2005). Study on effects of salidroside on lipid peroxidation on oxidative stress in rat hepatic stellate cells. *Zhong Yao Cai*, 28, 794-796.
- Zhang, W., Yi, K., Chen, C., Hou, X., Zhou, X. (2012). Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 132, 123-128.
- Zhao, H.W., Li, Q.W., Ning, G.Z., Han, Z.A., Jiang, Z.L., Duan, Y.F. (2009). *Rhodiola sacra* aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 5, 849-857.