

Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica

Boar Semen Cryopreservation: Results and Advances in the Technique

Williams S^{*1}, Fernández V¹, Gavazza M², Marmunti M², Zeinsteger P², Prenna G³

¹Laboratorio de Reproducción Animal, Departamento de Clínicas. ²Cátedra de Zootecnia especial I, Departamento de Producción Animal. ³Cátedra de Bioquímica, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ⁴Bioter, SA.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: swilliams@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El proceso de congelación de espermatozoides porcinos produce alteraciones de la integridad de sus membranas, que pueden variar según el perfil de ácidos grasos o la composición de los medios utilizados. El objetivo de este estudio fue determinar las posibles variaciones individuales en la calidad seminal durante el proceso de congelación de semen porcino y sus respuestas ante modificaciones del medio, como el uso de diferentes gradientes del crioprotector o la inclusión de un antioxidante *in vitro*. Al analizar el efecto del tratamiento (temperatura según etapa del proceso), se observaron descensos de la calidad seminal muy marcados en la mayoría de los parámetros (motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y de acrosomas normales, $P < 0,001$), a excepción de las anomalías espermáticas. Las variaciones individuales tendieron a asociarse con diferencias en la motilidad, si bien no fueron de significación estadística ($P < 0,2$). Los mejores valores de calidad seminal se obtuvieron con el uso de hasta un 4 % de glicerol y de 0,5 % de dodecil sulfato de sodio. El agregado de un antioxidante natural a base de licopeno *in vitro* a muestras obtenidas durante la criopreservación ejerció un efecto protector, ya que los principales ácidos grasos insaturados no fueron afectados por el proceso de lipoperoxidación.

Palabras clave: semen porcino, congelación, calidad seminal, crioprotectores, antioxidante

Abstract: The freezing process of boar semen produces changes in the integrity of the membranes, which may vary according to the profile of fatty acids to medium composition. The objective of this study was to determine possible individual variations in the seminal quality during the freezing process in boar semen and the responses to changes in the environment, such as the use of different gradients of the cryoprotectant or *in vitro* inclusion of antioxidants. When the effect of the treatment (temperature according to the freezing steps) was analysed, it was observed a marked decline in seminal quality for most parameters (motility, percentage of live spermatozoa and with normal acrosomes, $P < 0.001$). Individual variations showed a trend towards an effect on motility, even though it was not significant ($P < 0.2$). The best values of seminal quality were obtained with the use of 4 % of glycerol and 0.5 % of sodium dodecyl sulphate. The addition of a natural antioxidant based on lycopene *in vitro* in samples obtained during cryopreservation conferred a protective effect because major unsaturated fatty acids were not affected by the process of peroxidation.

Key words: boar semen, freezing, semen quality, cryoprotectans, antioxidant

Introducción

La congelación de espermatozoides se inicia de forma experimental con perspectiva de utilizarla en inseminación artificial (IA) en el año 1949.

En la década del setenta se lograron inseminaciones exitosas en cerdas con semen congelado (Graham *et al* 1971, Pursel y Johnson 1971, Crabo y Einarsson 1971) y, posteriormente, se publicaron dos métodos de congelación que han sido la base de los utilizados hasta el día de hoy: en Estados Unidos, Pursel y Johnson (1976) congelaron semen en píldoras y, en Alemania, Westendorf *et al* (1975) congelaron semen en pajuelas de 5 ml. Ambos métodos utilizan diluyentes que están basados en la utilización de yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente.

En los últimos tiempos, los estudios se han centrado en los tipos de envases para semen congelado (Eriksson y Rodríguez-Martínez 2000, Eriksson *et al* 2002), en las alteraciones que produce la congelación en la célula espermática y, especialmente, en la desestabilización que se produce en el sistema antioxidante del espermatozoide durante dicho proceso.

La mayoría de las dosis inseminantes utilizadas en la especie porcina están constituidas por semen conservado a 15-18 °C, lo que representa el 85 % del total de inseminaciones realizadas en el mundo (Johnson *et al* 2000). El uso de semen congelado se encuentra limitado a programas de selección, transporte de dosis a largas distancias, conservación de poblaciones de interés por su escasa cantidad y pruebas que realizan los grupos de investigación, debido principalmente a que los resultados de fertilidad y prolificidad están en un 10-20 % y 1-2 lechones, respectivamente, por debajo de los obtenidos con semen refrigerado, a pesar de la elevada cantidad de espermatozoides por dosis, siendo la tasa media de partos del 70 %, aproximadamente.

La actual tendencia en la inseminación artificial con semen congelado porcino es reducir la cantidad de espermatozoides por inseminación y, en esta línea, se están desarrollando nuevas técnicas para la aplicación del semen cerca del lugar de fecundación. Con el uso del método de inseminación intrauterina profunda, algunos de estos inconvenientes han logrado superarse (Martínez *et al* 2001, Martínez *et al* 2002, Vázquez *et al* 2008).

El espermatozoide del porcino es muy sensible al choque térmico por frío, que produce una alteración de la funcionalidad de la membrana espermática comprometiendo la viabilidad celular. En numerosos estudios se han descrito grandes diferencias en la capacidad de congelación que presentan los eyaculados de distintos machos, las que afectan tanto la viabilidad de

los espermatozoides tras la descongelación como la fertilidad *in vivo*.

La reducida fertilidad y prolificidad tras la IA con semen congelado se debe a los cambios estructurales y funcionales que sufren los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, la disminución de la funcionalidad que dichos espermatozoides tienen en el tracto genital de las cerdas, las peculiares características anatómicas del aparato genital de la hembra y la mala calidad de los embriones producidos que condicionan su posterior viabilidad.

Las membranas de los espermatozoides son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y son sensibles al daño oxidativo mediado por el proceso de peroxidación lipídica (PL) (Sheweita *et al.*, 2005); ésta es causa potencial de infertilidad en machos de numerosas especies. El semen del verraco es susceptible al daño peroxidativo inducido por el proceso de criopreservación (Hernández *et al* 2007b) debido a la alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados presentes en sus membranas (Cerolini *et al* 2000). El grado en que los espermatozoides pierden movilidad *in vitro* se correlacionan con la tasa de PL que sufren. Los antioxidantes son sustancias que, cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones respecto a los sustratos oxidables, retrasan o anulan la oxidación de dicho sustrato (Faudale *et al.*, 2008). Existen evidencias de que los carotenoides podrían actuar como antioxidantes, como el licopeno, que se halla casi exclusivamente en el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y sus productos.

El objetivo de este estudio fue determinar posibles variaciones individuales en la calidad seminal frente a modificaciones del medio, como el uso de diferentes gradientes del crioprotector o la adición *in vitro* del antioxidante vegetal obtenido del tomate, durante el proceso de congelación de semen porcino.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron eyaculados obtenidos de cerdos provenientes de distintas granjas comerciales o de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Todos los animales se encontraban alojados en sistemas confinados y recibían un alimento balanceado de formulación comercial, en algunos casos especial para verracos. Las muestras enviadas desde las granjas fueron recibidas refrigeradas a 15 °C al día siguiente de la extracción. En el caso de los padrillos de la Facultad, la congelación se realizó en el mismo día de la extracción.

Protocolo de congelación

Se utilizó la técnica de Westendorf (Westendorf *et al*, 1975) con modificaciones. Los medios utiliza-

dos para el enfriamiento a 5 °C fueron los medios comerciales Boarciphos A y B® (IMV-technologies) modificados de la siguiente manera: medio A + 20 % de yema de huevo y medio B, utilizado previamente al envasado y la congelación, con la adición de 20 % de yema de huevo y crioprotector.

Evaluación de la calidad seminal inicial

La motilidad individual y el vigor se evaluaron mediante la observación de una gota de la muestra (colocada entre porta y cubreobjetos) con aumentos de 100X y 400X del microscopio óptico.

Los resultados de motilidad se expresaron como porcentaje de espermatozoides móviles (0-100 %) y el vigor en una escala de 0-5.

La viabilidad se determinó por tinción vital con eosina-nigrosina, a partir de un extendido de una mezcla homogénea de semen y colorante, y se observó en un microscopio óptico a 1000X, contabilizando un mínimo de 100 células espermáticas.

Para el estudio de la integridad de la membrana acrosomal se hicieron lecturas a partir de extendidos de semen fijados en alcohol y teñidos con una solución de *Pisum sativum agglutinin* (PSA) al 5 % en PBS. Se observaron en microscopio de fluorescencia, se contabilizaron como mínimo 100 células y se calculó el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales.

Las variaciones en la calidad seminal se estudiaron en las siguientes etapas: 1) a 15 °C, 2) a 15 °C + A, luego de la centrifugación y previo al enfriamiento, una vez diluido en medio comercial A, 3) 5 °C + A, una vez finalizado el enfriamiento; 4) 5 °C + A + B, luego de la dilución con medio comercial B, previo a la colocación en pajuelas y congelación y 5) en la descongelación. En cada etapa se analizó: motilidad, vigor, porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de la membrana acrosomal.

Protocolo de descongelación

Las pajuelas se mantuvieron congeladas durante un mes, como mínimo. Se descongelaron sumergiéndolas en baño térmico a 37 °C durante 1 minuto y se realizó inmediatamente la dilución en un medio comercial de descongelación a 37 °C, procediéndose a su evaluación.

Evaluación de la calidad del semen porcino durante el proceso de congelación

1. Efecto de la variabilidad individual

Se utilizaron eyaculados de seis (6) padrillos de más de un año, de línea terminal, provenientes de un

establecimiento comercial. En el momento del arribo de las dosis se comprobaron los parámetros mínimos de calidad seminal: motilidad (> 70 %) y presencia de anomalías espermáticas (< 20 %) y, una vez contrastadas las dosis, se inició el proceso de criopreservación. Las variaciones en la calidad seminal se estudiaron en las distintas etapas del proceso.

Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (procedimiento MIXED de SAS®, 2004). Los datos obtenidos se utilizaron para confeccionar curvas y demostrar las variaciones de la calidad de semen durante el proceso de la criopreservación.

2. Efecto del uso de crioprotectores y del dodecil sulfato de sodio (SDS)

Para analizar el impacto en la calidad espermática durante el proceso de congelación-descongelación utilizando distintas concentraciones de glicerol y de dodecil sulfato de sodio (SDS, por su nombre en inglés), se utilizaron eyaculados provenientes de un verraco adulto, alojado en la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP), con el fin de evitar variaciones individuales durante el proceso de congelación. El semen se obtuvo por extracción manual y, una vez en el laboratorio, se comprobaron los parámetros mínimos de calidad seminal.

Un total de 7 eyaculados fueron congelados. Luego del enfriamiento a 5 °C, cada eyaculado fue dividido en 4 alícuotas (I a IV), las que fueron diluidas en medios con diferente concentración de glicerol y de SDS: (I) 4% de glicerol y 1% de SDS; (II) 4% de glicerol y 0,5 % de SDS; (III) 2% de glicerol y 1% de SDS y (IV) 2% de glicerol y 0,5% de SDS. Durante el proceso de congelación, se tomaron muestras para contrastar la calidad seminal. Se calcularon los índices de congelabilidad (coeficiente entre el valor de la muestra descongelada/valor en cada paso del proceso, para cada uno de los parámetros). El estudio comparativo entre los medios I, II, III y IV se realizó mediante análisis de varianza (procedimiento CAT-MOD de SAS®, 2002).

3. Efecto antioxidante *in vitro* de *Lycopersicon esculentum* en ensayos con semen porcino

Se estudió el efecto del agregado *in vitro* de un antioxidante natural al medio, como es el uso del licopeno, extraído del tomate. Se trabajó con muestras de semen porcino durante el proceso de criopreservación en 4 circunstancias: 1) a 15 °C, 2) 15 °C + medio A (previamente al enfriamiento), 3) a 5 °C + medio A y 4) a 5 °C + medio A + medio B. Los espermatozoides se obtuvieron por el método descrito por Dandekar *et al* (2002). Se determinaron proteínas por el método

de Lowry *et al* (1951). Los lípidos fueron extraídos por el método de Folch *et al* (1957). Los ácidos grasos fueron transmetilados con F₃B (trifluoruro de boro) a 60 °C durante 3 horas. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía gaseosa. El antioxidante utilizado se obtuvo de manera sencilla y abundante a partir del tomate, utilizando solventes como hexano y etanol. Se inició la peroxidación lipídica no enzimática mediante adición de ascorbato-Fe⁺⁺ (con una concentración final de 0,4 mM) (Wright *et al*, 1979). Se prepararon 3 grupos de muestras: 1) control: sin ascorbato, 1 mg de proteína; 2) sin antioxidante: 1 mg de proteína + ascorbato; 3) con antioxidante: 1 mg de proteína + ascorbato + 500 µg del antioxidante. La emisión lumínica se cuantificó en un contador de centelleo líquido, determinándose las cuentas por minuto (cpm) cada 10 minutos durante 120 minutos.

Para la obtención del extracto de tomate se cortaron frutos frescos en cubos de aproximadamente 1 g, los que luego fueron desecados en estufa a 40 °C hasta obtener peso constante. De esta manera el efecto del calor sobre los carotenoides es mínimo. Posteriormente se procesaron en molinillo hasta obtener un polvo fino, el que se reservó en recipientes de vidrio color caramelo al abrigo de la luz. Diez gramos de polvo de tomate se colocaron en recipiente de vidrio con 100 ml de butanol para la extracción de la fracción de carotenoides (EFSA, 2008) durante 60 min con agitación magnética y el extracto total se concentró con rotaevaporador a 40 °C hasta sequedad. Posteriormente el residuo se resuspendió con etanol, quedando la concentración final de extracto total en 123 mg en 10 ml del alcohol. Para corroborar la presencia de los carotenoides (representados prin-

cialmente por el licopeno) una alícuota del extracto fue sometido al reactivo de Shinoda, utilizado para la detección de flavonoides (Shinoda, 1928), dando resultado positivo.

Resultados

1. Efecto de la variabilidad individual

Los valores promedio de los parámetros analizados se presentan en la Tabla 1.

Al analizar el efecto del tratamiento (temperatura según etapa), se observaron descensos de la calidad seminal muy marcados para la mayoría de los parámetros, a excepción de las anomalías espermáticas. Estas variaciones mostraron diferencias estadísticamente significativas (P<0,001) para los valores correspondientes a motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y de acrosomas normales.

Las posibles variaciones individuales tendieron a mostrar un efecto sobre la motilidad, aunque sin diferencias significativas (P<0,2).

Cuando se analizó el efecto individual según las distintas temperaturas del tratamiento de congelación, se encontró que para la variable motilidad esta diferencia fue estadísticamente significativa (P<0,001), lo que explica los bajos valores promedio para motilidad, debidos al efecto individual (Figuras 1, 2 y 3).

2. Efecto del uso de crioprotectores y del dodecil sulfato de sodio (SDS)

Los parámetros de calidad seminal se mantuvieron hasta los 5 °C, los valores promedio de motilidad y vigor fueron de 73,57 % y 3,07, respectivamente,

Tabla 1. Valores promedio de parámetros de calidad seminal, según temperaturas durante el proceso de congelación.

Variable	Temperaturas durante el proceso de congelación				Descongelado
	15 °C	15 °C+A ¹	5 °C+A ¹	5 °C+B ²	
Motilidad (%)	66,6±3,0a	68,2±2,1a	66,6±1,9a	65,5±2,3a	22,6±4,0b
Vitalidad (%)	86,7±1,1a	86,6±1,1a	86,5±1,2a	88,6±1,0a	34,9±3,6b
Morfología (%)	12,7±2,5	11,2±2,3	12,3±2,9	12,4±2,5	14,5±2,6
Acrosomía (%)	85,5±2,4a	84,4±2,6a	83,6±1,9a	77,0±3,4a	35,8±3,0b

En la misma fila, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas P<0,001).

1: medio comercial para el enfriamiento, más el agregado de yema de huevo.

2: medio comercial para la congelación, más el agregado de yema de huevo y de glicerol.

Tabla 2. Promedio de porcentaje de motilidad, vitalidad y de acrosomas normales luego del enfriamiento (5 °C) diluido en los medios I, II, III y IV.

Medios	Motilidad	Vitalidad	Acrosomía
I	71,00	60,75	80,67
II	69,17	86,20	83,50
III	66,67	77,67	77,00
IV	71,00	87,20	76,50

Tabla 3. Promedio de porcentaje de motilidad, vitalidad y de acrosomas normales luego de la descongelación para los medios I, II, III y IV.

Medios	Motilidad	Vitalidad	Acrosomía
I	31,25	40,25	35,67
II	36,00	39,80	55,6
III	10,00	33,50	10,00
IV	45,00	40,67	44,00

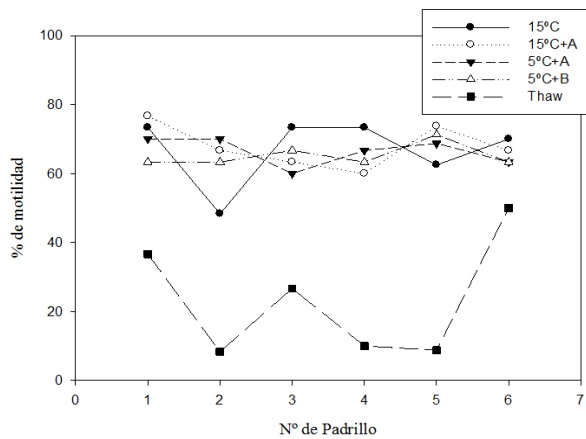


Figura 1. Motilidad según las etapas del proceso de congelación para los diferentes padrillos.

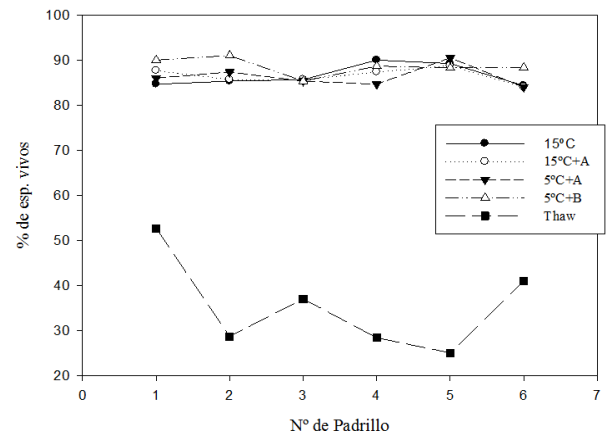


Figura 2. Vitalidad según las etapas del proceso de congelación para los diferentes padrillos.

la vitalidad fue de 82 % y la integridad acrosomal de 86,75 %.

En las Tablas 2 y 3 pueden observarse los valores promedio hallados luego de la dilución a 5 °C con los medios I, II, III y IV y de la descongelación. Observamos que la motilidad a 5 °C fue superior en el caso de los diluyentes I y IV en un 2,58 % y 6,1 % con respecto al medio II y III, respectivamente. A la descongelación estos parámetros fueron superiores en los medios IV y II en un 30,55 % y 13,19 % respecto al I. El vigor mostró similares variaciones. La vitalidad a 5 °C fue superior en el medio IV en un 1,14 % con respecto al II y a la descongelación I y IV obtuvieron similares resultados, superiores al II en un 2,13 %. La integridad acrosomal a 5°C fue mayor en el medio II en un 3,39 % respecto al medio I y a la descongelación se mantuvo superior la del medio II en un 20,86 % con respecto al IV.

Cuando se compararon los índices de congelabilidad de los 4 medios, se hallaron valores estadís-

ticamente significativos para el parámetro motilidad entre los medios III y IV ($P < 0,05$). Si bien los valores de acrosomas normales fueron similares, no se halló diferencia significativa, tal vez por haberse procesado menos muestras.

3. Efecto antioxidante *in vitro* de *Lycopersicum esculentum* en ensayos con semen porcino

Las muestras de semen porcino en las diferentes etapas del proceso de criopreservación fueron sensibles al proceso de lipoperoxidación. Los valores de quimioluminiscencia de las muestras peroxidadas sin antioxidante fueron aproximadamente 3 veces más elevados con respecto a las muestras control (Figura 4).

Comparando los valores de la emisión lumínica de las muestras con ascorbato- Fe^{++} , se observó que en presencia del antioxidante los valores fueron más bajos. Durante el proceso de PL, se observó que el

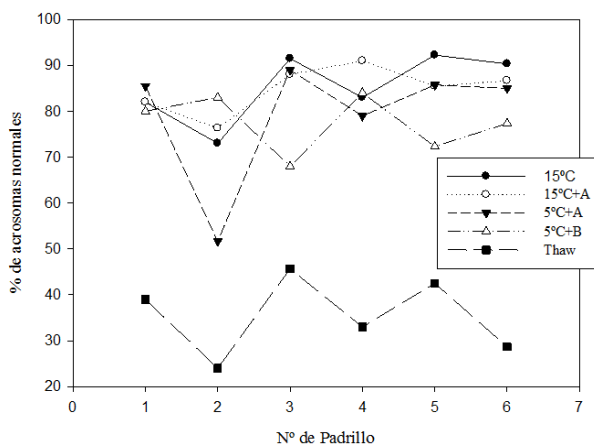


Figura 3. Acrosomas normales (%) según las etapas del proceso de congelación para los diferentes padrillos.

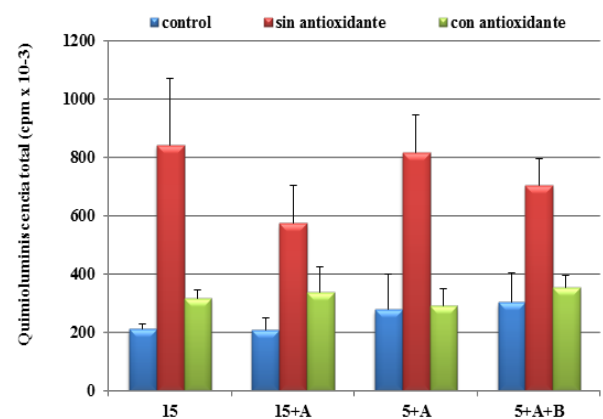


Figura 4. Valores de quimioluminiscencia de muestras peroxidadas con y sin antioxidante.

porcentaje de ácidos grasos insaturados de las muestras tratadas con ascorbato (31,3 %) disminuyó significativamente con respecto a los controles (53,73 %). El porcentaje de ácidos grasos insaturados de las muestras con el antioxidante fue de aproximadamente 62,03 %, siendo este valor similar al de las muestras controles (Figura 5).

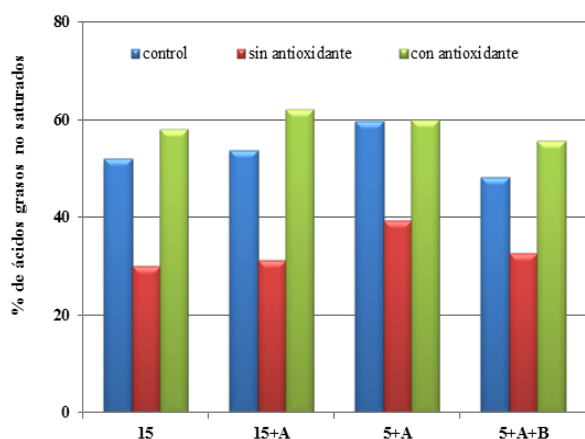


Figura 5. Porcentaje de ácidos grasos no saturados en muestras control, sin antioxidante y con antioxidante.

Discusión y conclusiones

Las diferencias en la composición química de la membrana espermática podrían explicar las variaciones individuales con respecto al congelado-descongelado y la pérdida de enzimas responsables de la metabolización de las especies reactivas del oxígeno (ROS, por su nombre en inglés) que produce la disminución de los compuestos antioxidantes en el medio extracelular tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación. En la especie porcina, las membranas poseen más moléculas de colesterol y una proporción de ácidos grasos saturados/insaturados diferente con respecto a otras especies, lo que predispone a mayores daños, por la alteración tanto química que producen los radicales libres, como física al bajar la temperatura, ya que la membrana se vuelve muy rígida y es más frágil.

Existen modificaciones del medio interno: alteraciones en el balance iónico de sodio, zinc y calcio, que se acumulan en el espacio intracelular, y de potasio y magnesio, que salen masivamente de la célula. Esto se debe a que las proteínas de la membrana que funcionan como bomba de iones disminuyen su actividad con el descenso de temperatura. Por otro lado, hay un efecto sobre el núcleo, debido a la supercondensación de la cromatina nuclear con incremento en la fragmentación del ADN del núcleo de los espermatozoides tras el proceso de congelación-descongelación.

Echegaray (2001) afirma que para congelar semen de verraco es absolutamente necesario realizar una selección previa de los animales que se van a utilizar: 1. Selección de los verracos por buena calidad seminal (motilidad superior al 80 %, vigor mayor a 4, y 80 % de acrosomas normales), 2. Selección de verracos por buena congelabilidad, considerándose, como un mínimo exigible, un 35 % de motilidad individual en las dosis descongeladas.

La membrana del espermatozoide se diferencia en regiones y muestra compartimientos diferentes, dependiendo de las regiones estructurales. El acrosoma (especialmente el segmento ecuatorial), el segmento posterior acrosómico, la pieza intermedia y la cola, con sus segmentos principal y final, son todos estructural y funcionalmente cruciales para la función espermática. Los protocolos de congelación/descongelación causan pérdidas de permeabilidad selectiva y de la integridad de estos compartimientos, sobre todo durante la descongelación (Medrano *et al.*, 2002a). La formación inadecuada de hielo y el subsiguiente estrés osmótico inducido durante la congelación y descongelación son los dos factores principales responsables de las alteraciones durante el proceso (Watson, 2000) y alteran las funciones del espermatozoide debido a modificaciones en los constituyentes de la membrana, particularmente los lípidos y las proteínas. Estos fenómenos podrían estar asociados con cambios proapoptóticos en espermatozoides causados por los ROS producidos bajo condiciones de estrés.

En este contexto, Waterhouse *et al* (2006) demostraron una relación entre los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la membrana plasmática de los espermatozoides descongelados y diferencias individuales entre verracos en la crio-sensibilidad a la congelación. Estas diferencias entre verracos pueden relacionarse con las variaciones en la composición del espermatozoide.

Como en el caso de otros mamíferos (Holt *et al.* 2005, Loomis y Graham, 2008), la variabilidad entre individuos está demostrada también en el cerdo (Thurston *et al.*, 2001, Medrano *et al.* 2002b, Saravia *et al.*, 2005, Roca *et al.*, 2006b). Las diferencias entre verracos son el principal factor que explica la variación individual en la supervivencia de espermatozoides luego de la congelación/descongelación (Roca *et al.*, 2006a). Sin embargo, considerando que los eyaculados de determinados padrillos presentan la misma respuesta reproductiva con un mismo protocolo de congelación, se podría hacer un agrupamiento de los verracos como “buenos”, “moderados” o “pobres” congeladores, basado en la calidad del espermatozoide a la descongelación. Entre 20 y 33 % de los padrillos de centros de inseminación se consideran como “pobres” congeladores, probablemente con una

tendencia genética (Thurston *et al.*, 2002, Roca *et al.*, 2006a, 2006b, Hernández *et al.*, 2007a).

Con el objetivo de minimizar los efectos negativos de la variabilidad entre verracos en la calidad del esperma posterior a la descongelación, la industria biotecnológica de la reproducción debe primero enfrentar la identificación potencialmente de “buenos” o “pobres” congeladores. Además, deberían adoptarse medidas para la mejora de la supervivencia de eyaculados obtenidos y clasificados como “pobres” congeladores. La posibilidad de congelar esos eyaculados sigue siendo importante en el contexto del recurso de bancos genéticos y el intercambio internacional de material genético (Holt *et al.*, 2005). Tal acción podría emprenderse individualizando el protocolo de congelación/descongelación. Un ejemplo es la confección de protocolos individuales de congelación-descongelación, un concepto sugerido por Watson (1995) y recientemente aplicado por Hernández *et al.* (2007b) utilizando un llamado test de identificación de eyaculados de acuerdo a su capacidad de congelabilidad (SFT, del inglés *Split Freezability Test*). Se encontró una interacción significativa entre los protocolos de congelación/descongelación y los eyaculados, con la influencia de la tasa de concentración de glicerol y la tasa de calentamiento en la descongelación. Este procedimiento permitió reducir el porcentaje de “pobres” congeladores de 26,4 a 7,5 %. Recientemente se ha presentado una alternativa consistente en la congelación de los primeros 10 ml de la fracción rica de cada eyaculado (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2008; Saravia *et al.*, 2009a; b).

En presencia de un agente crioprotector apropiado, aunque se produzcan alteraciones, muchas células sobreviven el proceso. El glicerol es el crioprotector más comúnmente utilizado, en concentraciones de entre 2 y 4 % para semen porcino, aunque debido a que puede llegar a tener efectos tóxicos se han utilizado sustancias alternativas como las amidas DMA (dimetilacetamida) y el DMSO (dimetilsulfóxido). Debido a su menor peso molecular y mayor solubilidad en agua, las amidas disminuyen la formación intracelular de cristales de hielo y provocan una mínima toxicidad y un menor daño osmótico. Sin embargo, con su uso, la motilidad y la integridad de membrana fueron menores que cuando se criopreservó con glicerol al 3 % (Suhee *et al.*, 2011).

En nuestro trabajo, comparando los distintos valores de calidad con los medios con glicerol al 4 % (I y II), se obtuvieron valores aceptables en todos los parámetros estudiados. Estos resultados son similares a los obtenidos por Corcuera *et al.* (2007), quienes compararon distintas concentraciones de glicerol en el medio de congelación. Con respecto a la concentración de SDS, los mejores resultados se obtuvieron con

la menor concentración, resultando la mejor combinación la de 4 % de glicerol y 0,5 % de SDS, coincidente con la utilizada por Córdoba-Izquierdo *et al.* (2005).

Ekwall (2009), utilizando un microscopio electrónico de crio-exploración (Cryo-SEM), observó que se forma una solución viscosa dentro y fuera del espermatozoide, conformando una matriz vítrea relativamente estable, que se mantiene cuando los espermatozoides se almacenan a -196 °C. La mayoría de las células se dañan durante la descongelación y exhibe membranas y axonemas alterados por el desequilibrio osmótico que ha sido creado durante la congelación (Morris 2006; Morris *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo durante los procesos de congelación-descongelación, debido a la excesiva generación de ROS o a deficiencias en el sistema de defensa antioxidante, puede inducir graves modificaciones a biomoléculas como proteínas, lípidos y ADN mitocondrial (ADNmt), así como al ADN nuclear (ADNn), que podrían llevar a alterar sus propiedades y, eventualmente, a la muerte celular (Aitken y Baker, 2004). Los cambios proapoptóticos en espermatozoides crio-preservados se caracterizan por mayor concentración de Ca⁺⁺, alteración en el potencial de membrana mitocondrial, reducción de los niveles de ATP y la cesión de factores proapoptóticos del citoplasma (Martin *et al.*, 2004; 2005; Peña *et al.*, 2009).

Los antioxidantes previenen la lipoperoxidación utilizando diferentes mecanismos. Por lo tanto, se ha probado el agregado de varios antioxidantes a diferentes fracciones del eyaculado del verraco para mejorar la supervivencia posterior a la descongelación (Peña *et al.*, 2003, Gadea *et al.*, 2005), incluyendo butilato de hidroxitolueno (BHT, Roca *et al.*, 2004), catalasa, superóxido dismutasa (SOD, Roca *et al.*, 2005), glutatión reductasa (GSH, Woelders *et al.*, 1996) y α -tocoferol (Breininger *et al.*, 2005). Este último reduce el daño oxidativo de las membranas del espermatozoide inducido por la congelación, la fosforilación de la proteína tirosina y los eventos semejantes a la capacitación espermática (Satorre *et al.*, 2007).

El semen porcino posee altos niveles de ácidos grasos no saturados. Estos ácidos grasos expuestos a un sistema *in vitro*, en presencia de ascorbato, fueron vulnerables a la peroxidación lipídica. El licopeno es un antioxidante natural que posee una elevada capacidad *in vitro* para ligarse al oxígeno singulete. Nuestros resultados indican que la lipoperoxidación podría ser uno de los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios fisiológicos durante la criopreservación y que el licopeno ejerce un efecto protector, ya que los principales ácidos grasos insaturados no fueron afectados por el proceso de lipoperoxidación. Ensayos futuros nos permitirán confirmar esta presunción.

Se concluye que, para la preservación de semen porcino mediante la congelación, se requiere identificar verracos “buenos” congeladores, así como optimizar el proceso de congelación según las características individuales, con el propósito de disminuir los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios fisiológicos que sufre el espermatozoide, con adecuadas concentraciones del crioprotector y el empleo de sustancias antioxidantes de efecto protector a la lipoperoxidación.

Referencias Bibliográficas

Aitken RI, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 2004; 16:581-8.

Breining E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology.* 2005; 63:2126-35.

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

Corcuera BD, Marigorta A, Sagües F, Saíz-Cidoncha JF, Pérez Gutiérrez JF. Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology.* 2007; 67: 1150-7.

Córdoba-Izquierdo A, Oliva JH, Lleó B, García Artiga C, Corcuera BD, Pérez Gutiérrez JF. Effect of different temperatures on the viability, *in vitro* fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 ml straws. *Anim Reprod Sci.* 2005; 92:145-54.

Crabo BG, Einarsson S. Fertility of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Vet Scand Suppl.* 1971; 12:125-27.

Dandekar SP, Nadkarni GD, Kulkarni VS, Puneekar S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J Postgrad Med.* 2002, 48:186-9.

Echegaray A. ¿Para cuándo el semen porcino congelado? *Venezuela Porcina.* 2001; 17(48):3-5.

EFSA (European Food Safety Authority). Use of lycopene as a food colour. *The EFSA Journal.* 2008; 674:1-66.

Ekwall H. Cryo-scanning electron microscopy discloses differences in dehydration of frozen boar semen stored in large containers. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44:62-68.

Eriksson BM, Petterson H, Rodríguez-Martínez H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology.* 2002; 58(6):1065-79.

Eriksson BM, Rodríguez Martínez H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flatpacks and Maxi-straws. *Anim Reprod Sci.* 2000; 63(3-4):205-20.

Faudale M, Viladomat F, Bastida J, Poli F, Codina C. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *J Agric Food Chem.* 2008; 26(6):1912-20.

Folch J, Less M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem.* 1957; 226:497-509.

Gadea J, García-Vázquez F, Matas C, Gardon IC, Canovas S, Gumbao D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl.* 2005; 26:396-404.

Graham EF, Rajamannan AHJ, Schmeihl MKL, Maki-Laurila M, Bowe RE. Preliminary report on procedure and rationales for freezing boar semen. Reprint for *AI Digest.* 1971; 19:12-4.

Hernández M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Muiño-Blanco T, Cebrian-Pérez JA. Cryosurvival and *in vitro* fertilizing capacity post thaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J Androl.* 2007a; 26:689-97.

Hernández M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. Oxidative stress during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev.* 2007b; 19:177.

Holt WV, Medrano A, Thurston I, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from cryomicroscope. *Theriogenology.* 2005; 63:370-82.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62:143-72.

Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci.* 2008; 105119-105128.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-75.

Martin G, Sabido, O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod.* 2004; 71:2B-37.

Martin G, Sabido, O, Durand P, Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. *Hum Reprod.* 2005; 20:3459-88.

Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction.* 2002; 123:163-70.

Martínez, EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small number of spermatozoa in sows. *Reproduction.* 2001; 122:289-96.

Medrano A, Anderson J, Millar JO, Holt WV, Watson PF. A custom-built controlled-rate freezer for small sample cryopreservation studies. *CryoLetters,* 2002a, 23397-404.

Medrano A, Watson PF, Holt WV. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction.* 2002b; 123:315-22.

Morris GJ, Faszer K, Green JE, Draper O, Grout BW, Fonseca F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology.* 2007; 68:804-12.

Morris GJ. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Hum Reprod.* 2006, 21:2075-83.

Peña FJ, Iohannisson A, Wallgren M, Rodríguez Martínez

- H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.* 2003; 78:85-98.
- Peña FJ, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, Gonzales Fernández L, Macías García B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44:345-9.
- Polge C, Salamon S, Wilmut I. Fertilizing capacity of frozen semen following surgical insemination. *Vet Rec.* 1970; 87:424-8.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and desiccation at low temperatures. *Nature.* 1949; 164:666.
- Pursel VG, Johnson LA. Frozen boar spermatozoa: methods of thawing pellets. *J Anim Sci.* 1976; 42:927-31.
- Pursel VG, Johnson LA. Procedure for the preservation of boar spermatozoa by freezing. *US Dept Agri ARS.* 1971; 44:227.
- Roca J, Gil MA, Hernández M, Parrilla I, Vázquez JM, Martínez EA. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *J Androl* 2004, 25: 389-96.
- Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci,* 2006a, 84 2692-99.
- Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, García EM, Cuello C, Vázquez JM, Martínez EA. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase or catalase or both. *J Androl.* 2005; 26:15-24.
- Roca J, Rodríguez-Martínez H, Vázquez JM, Bolarin A, Hernández M, Saravia F, Wallgren M, Martínez EA. Strategies to improve the fertility of frozen thawed boar semen for artificial insemination. En: Ashworth CJ and Kraeling RR (Eds), 2006b. *Control of Pig Reproduction VII.* Nottingham: Nottingham University Press, pp. 261-275.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Roca I, Peña FI. Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology.* 2008; 70:1242-50.
- Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, Peña FI, Roca J, Rodríguez-Martínez H. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology.* 2009b; 71:662-75.
- Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodríguez Martínez H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology.* 2005; 63:1320-33.
- Saravia F, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 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.* 2009a; 117(3-4):279-87.
- Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB. α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology.* 2007; 68:958-65.
- Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. 2005. Mechanism of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.* 2005; 6:495-501.
- Shinoda J. A new biologically active flavone glycoside from the roots of *Cassia fistula* Linn. *J Pharm Soc Jpn.* 1928; 48:214-20.
- Suhee Kim, Young-Jun Lee, Dong-Beom Ji, Yong-Jun Kim. Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *J Vet Med Sci.* 2011; 73 (7):961-3.
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF; Holt WV. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism makers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod.* 2002; 66: 545-54.
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. Morphological distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl.* 2001; 22: 382-94.
- Vázquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vázquez JL, Martínez EA. New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology.* 2008; 70(8): 1216-24.
- Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller Jr RR. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar semen. *Reproduction.* 2006; 131:887-94.
- Watson P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60-61:481-92.
- Westendorf P, Ritcher L, Tren H. Zur tiefgefrierung von ebesperma: labor und besamungsergebnissmint dem Hülsemberger pailleten verfarren. *Dtsch Tierärztl Wschr.* 1975; 82:261-7.
- Woelders H, Matthijs A, Den Beston M. Boar variation in "freezability" of the semen. *Reprod Domest Anim.* 1996; 31:153-9.
- Wright JR, Rumbaugh RC, Colby HD, Miles PR. The relationship between chemiluminescence and lipid peroxidation in rat hepatic microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1979; 192:344-51.

Conflictos de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.