



Universitat de Girona

A PRACTICAL APPROACH ON BOAR SPERM CRYODAMAGE. MORPHOFUNCTIONAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF CRYOPRESERVED BOAR SPERM INTENDED FOR USE IN ARTIFICIAL INSEMINATION

Isabel CASAS ROQUETA

ISBN: 978-84-693-6116-0

Dipòsit legal: GI-1035-2010

<http://www.tesisenxarxa.net/TDX-0817110-121611/>

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

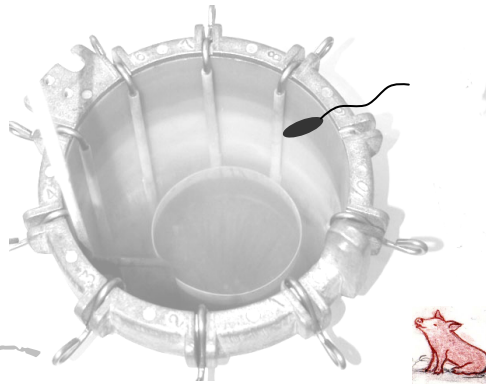
ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

A PRACTICAL APPROACH ON
BOAR SPERM CRYODAMAGE

Morphofunctional and immunocytochemical study of
cryopreserved boar sperm intended for use in artificial
insemination

Estudi morfofuncional i immunocitoquímic de l'espermatozoide porcí
criopreservat i destinat a inseminació artificial



Cryopreserved
Criopreservació
BOAR SPERM



Universitat de Girona

DOCTORAL THESIS / TESI DOCTORAL

A PRACTICAL APPROACH ON BOAR SPERM CRYODAMAGE

**MORPHOFUNCTIONAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF
CRYOPRESERVED BOAR SPERM INTENDED FOR USE IN ARTIFICIAL
INSEMINATION**

**ENFOCAMENT PRÀCTIC DELS DANYS PER CRIOPRESERVACIÓ EN L'ESPERMATOZOIDE
PORCÍ**

**ESTUDI MORFOFUNCIONAL I IMMUNOCITOQUÍMIC DE L'ESPERMATOZOIDE PORCÍ
CRIOPRESERVAT I DESTINAT A INSEMINACIÓ ARTIFICIAL**

ISABEL CASAS ROQUETA

2010



Universitat de Girona

DOCTORAL THESIS / TESI DOCTORAL

A PRACTICAL APPROACH ON BOAR SPERM CRYODAMAGE

**MORPHOFUNCTIONAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY OF
CRYOPRESERVED BOAR SPERM INTENDED FOR USE IN ARTIFICIAL
INSEMINATION**

**ENFOCAMENT PRÀCTIC DELS DANYS PER CRIOPRESERVACIÓ EN L'ESPERMATOZOIDE
PORCÍ**

**ESTUDI MORFOFUNCIONAL I IMMUNOCITOQUÍMIC DE L'ESPERMATOZOIDE PORCÍ
CRIOPRESERVAT I DESTINAT A INSEMINACIÓ ARTIFICIAL**

ISABEL CASAS ROQUETA

2010

**Programa de Doctorat en Tecnologia Agroalimentària
(Biotecnologia de la Reproducció)**

Direcció:

**Dr SERGI BONET MARULL
Dra Ma DOLORS BRIZ GONZÁLEZ
Dra SÍLVIA SANCHO BADELL**

Memòria presentada per optar al títol de Doctora per la Universitat de Girona

**La realització d'aquest treball ha estat possible gràcies al Suport del Departament d'Innovació,
Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu**



Universitat de Girona

Sergi Bonet Marull, Catedràtic del Departament de Biologia de la Facultat de Ciències de la Universitat de Girona.

Maria Dolors Briz González, Professora Titular del Departament de Biologia de la Facultat de Ciències de la Universitat de Girona

Sílvia Sancho Badell, Professora Lectora del Departament de Biologia de la Facultat de Ciències de la Universitat de Girona

CERTIFIQUEM

Que la tesi titulada **A practical approach on boar sperm cryodamage**, presentada per Isabel Casas Roqueta per optar al grau de Doctora per la Universitat de Girona, s'ha realitzat sota la nostra direcció i, considerant aquesta acabada, autoritzem la seva presentació perquè sigui jutjada per la Comissió corresponent.

I per tal que així consti als efectes que correspongui, firmem la present a Girona el 10 de maig del 2010.

Dr Sergi Bonet Marull

Dra Maria Dolors Briz González

Dra Sílvia Sancho Badell

La doctorand



Per a vosaltres, que m'acompanyeu en el camí.

Un camí!

Quina cosa més curta de dir!
Quina cosa més llarga de seguir!
Quin so vulgar i estrany!!
Un camí!...
Quina sentida de pena y patir,
quina promesa de calma i de guany!
Un camí!...

Els camins són l'angúnia primera
del rústec cor llunyà,
que ni ell sabia el que era
o per saber es posava a caminar...
Camins, serps d'encantària,
que feu amable el feix
del qui es vol lliurar d'ell mateix,
de la pròpia tristesa solitària,
i vol cercar un altre somriure,
una altra sang o un altre crit,
i fins un altre món més ennegrit
per poder viure!

[...] Tu no saps el camí què significa?
El camí significa humilitat,
vol dir un renunciament a fi de bé,
vol dir passar pel mateix recer
que els altres han passat.
Camí de la glòria, camí de la Creu,
camí que puja i baixa i cansa,
on ens portes, camí? La teva fi no es veu!
Si ens han posat l'esquella mansa,
tu limites l'audàcia del peu
amb l'espígol novell de l'esperança!...
Camí pelat i esqueixat,
ple de vent dalt de la coma,
camí de la soledat,
tots els camins van a Roma,
tots els camins, ja ho sabem!,
tots els camins van a Roma,
però no van a Betlem!

[...] Pots triar-te tu el camí!
Pots triar-te el vent que eslloma,
l'arada, la forca, el rem!
Tots els camins van a Roma,
però no van a Betlem!

[...] El camí de Betlem! L'únic, el vostre,
aquell que cadascú porta a les venes,
encara que no vulgui, no seria
igual que aquell camí dalt la muntanya,
ensopegat només, perquè el silenci,
perquè els ocells, perquè les herbes
castes,
van agafar tots els colors d'un somni?

Si ets net de cor, pastor mesquí,
no t'has de perdre pel camí
que et va guiant l'estrella cauta;
no t'has de perdre, pastoret,
anant seguint el camí dret,
amb el sac de gemecs i la flauta!
Pastor dels meus somnis d'infant,
de les meves tristesses de gran,
pastor menut del meu pessebre,
tant és que fem com que no fem,
sempre es troba el camí de Betlem,
encara que ens escanyi la tenebra!"

Poema de Nadal, Cant III (fragment)

Josep Maria de Sagarra, 1894-1961

Noia pasturant porcs (Paul Gauguin, 1889)



Agraïments

Una tesi és teixida de moments invisibles als ulls del lector i plens de bones companyies.

Un agraïment especial al meu director principal, en Sergi, per l'oportunitat i la confiança rebudes. A la Mailo i a la Sílvia, perquè heu estat les meves codirectores més enllà de la tesi amb la vostra gran complicitat i suport, i a la Beth, pels bons consells que sempre m'has donat.

Un agraïment també a les que em vau ensenyar els primers passets: Anna P (amiga en l'aventura del primer congrés i més enllà), Elena (carinyosa com poques), Judit (idees que sempre arriben al punt), Mònica S (gran ajuda en el tràngol de les primeres pràctiques) i Núria (et recorda la teva companya “alta i espigada”).

De la colla TS, què n'he de dir... sou la llum del far! Eva B (treballadora, activa i no menys increïble persona), Marc (el nostre suport imprescindible en tot moment), Anna F (totalment entregada als amics. La “jefa petita” aprèn molt més de tu del que t'imagines!), Estela (fins i tot inseminant truges ets una rialla ☺ amb la qual comptar!), Marta P (en Sergi no només escull bons científics sinó també grans persones), Eva T (la teva simpatia ha calat molt i molt ràpid), Míriam (atenta, responsable,...què més es pot voler?). Si Déu vol encara queda molt camí per compartir, ànims i endavant!!

Gràcies també a les persones que amb puntades de suport heu ajudat a teixir el treball: companys de la UdG (una llista tan llarga que no cabria en tres pàgines....cadascú fa el seu camí però compartim l'experiència. I als que comenceu...ànims!), laborants (sense vosaltres encara seria a mig camí!), personal del Parc Científic i del Servei Tècnic de Recerca, PAS de la Facultat de Ciències i de l'INTEA (en especial a la Yolanda D i l'Anna C, per agilitzar-nos els tràmits burocràtics), als becaris i estudiants en pràctiques al grup (Alba C, Albert, Aïda, Jessica, Lilian, Marta B, Meritxell, Mireia, Olímpia, Romina, Telma...”Ensenyant s'aprèn dues vegades”), companys de BioGirona (Carol, Caty, Dolors, Esteve, Eva, Ignasi, Jaume, Jenny, Josep, Juanjo, Marta D, Marta G, Montse,... ser amb vosaltres a Riudarenes va ser la millor estada que podia fer. Gràcies per ajudar-me en tot moment a aconseguir la “matèria prima”, per ser com sou i per tots els bons moments compartits!), companys de Semen Cardona (Susanna, Xavier,... per subministrar-me també la “matèria prima” i per la vostra professionalitat), equip de la UAB (em feu sentir com a casa: Àlex, Diego, Esther, Eva, Joan Enric, Joan, Jordi, Laura, Roser, Sílvia, Tereses, Xus,...),

companys de Múrcia (especialment a la Marta H, que ens vas introduir en les tècniques de criopreservació), Sam i Rafel (per les xerrades compartides tot carregant nitrogen), companys dels cursos de doctorat (Facultat de Medicina de Barcelona), companys de les jornades doctorials del 2007 i a tantes altres persones que heu compartit amb mi els vostres coneixements i agradable tarannà (companys de Magapor, família Fochs, Javier Gil, personal de l'IRTA,...).

Als professors, que m'heu ensenyat el sentit de la voluntat.

A les meves amistats de tota la vida, per carregar-me d'energia positiva: Glòria (gràcies també per revisar-me el redactat), Montse, M^a José, Núria,... I tants companys que feu camí amb mi i i que em preguntàveu quan acabaria la tesi. Aquí la teniu per fi, és ben vostra!

Un agraïment a una persona molt especial, en Xavi "funny", que ha compartit amb mi la seva alegria i entrega infinites, i també a tota la seva família i amics.

I com que els últims seran els primers dedico la tesi als pares, als avis, a en Jordi i a la tia Mercè, que em suporten incondicionalment i per això els estimo tant! i a la resta de la família (i a l'Anna, que espero que aviat ho sigui), perquè sempre puc comptar-hi.

L'última gran contribució a la tesi serà la teva lectura.

Desitjo que t'agradi!

"No perdis el teu camí a cada dia que passa,
has arribat tant lluny! [...].
Si ens mantenim junts
els nostres somnis seguiran vius [...]."

If we hold on together, fragment (Diana Ross)





List of Papers

This thesis is presented as a compendium of three papers:

PAPER I

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. *Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability*. *Animal Reproduction Science* 2010 Mar; 118(1): 69-76.

Animal Reproduction Science has an impact factor of **1.890** and it is situated in the first quartile in the Agriculture, Dairy and Animal Sciences category (© 2008 Journal Citation Reports, published by Thomson Reuters).

PAPER II

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. *Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins*. *Theriogenology* 2009 Oct 15; 72(7): 930-48.

Theriogenology has an impact factor of **2.041** and it is situated in the first quartile in Veterinary Sciences category (© 2008 Journal Citation Reports, published by Thomson Reuters).



PAPER III

Casas I, Sancho S, Ballester J, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. *The HSP90AA1 content of boar sperm and the prediction of the ejaculate freezability*. *Theriogenology* 2010 (in press).

Theriogenology has an impact factor of **2.041** and it is situated in the first quartile in Veterinary Sciences category (© 2008 Journal Citation Reports, published by Thomson Reuters).

Image: Pigs in a Wood, Cornwall (Sir Alfred J. Munnings, 1878-1959. Private collection)



Abbreviations & Symbols

AI	Artificial insemination	x g	Centrifuge force (g-force units)
AKAP	A-kinase anchoring protein	GDP	Guanidin diphosphate
ALH	Amplitude of lateral head displacement	GFES	Good freezability ejaculates
AMP	Adenosin monophosphate	GGP	Grand grand parental
As-A	Arylsufatase A	GLUT	Glucose transporter protein
Atm	Atmospheres	GMP	Guanidin monophosphate
ATP	Adenosin triphosphate	GnRH	Gonadotrophin-releasing hormone
ATPase	Adenosin triphosphate cinase	GP	Grandparental
Bax	Bcl-2-associated X protein	GTP	Guanidin triphosphate
BC	Before Christ	h	Hours
Bcl-2	B-cell/lymphoma 2	H₂O₂	Peroxide hydrogen
BCF	Beating frequency	hCG	Human chorionic gonadotrophin
BLUP	Best Linear Unbiased Predictor	HCl	Hydrogen chloride
BSA	Bovine Serum Albumin	HDL	High density lipoproteins
BTS	Beltsville Thawing Solution	HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Ca(+2)	Calcium ion	HOST	Hypoosmotic swelling test
CALPAIN	Calcium-dependent cysteine proteases	HRP	Horseradish peroxidase
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis	HSP90AA1	Heat-shock protein 90 KDa alpha (cytosolic), class A member 1
cm	Centimeters	Hz	Hertz
CPAs	Cryoprotectants	i.e.	<i>id est</i> (that is)
Cu/ZnSOD	Copper/zinc containing SOD	intra-CAI	Cervical artificial insemination
DAG	Diacylglycerol	IP₃	Inositol triphosphate
DMSO	Dimethyl sulfoxide	J	Joules
DNA	Deoxyribonucleic acid	K	Kelvin degrees
DTT	Dithiothreitol	KCl	Potassium chloride
DUI	Deep intrauterine artificial insemination	KDa	Kilodalton
eCG	Equine chorionic gonadotrophin	KF	Potassium fluoride
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Kg	Kilogram
EFABAR	European Code of Good Practice for Farm Animal Breeding and Reproduction	l	Liter
e.g.	<i>exempli gratia</i> (examples)	LDL	Low density lipoproteins
EQUEX STM[®]	Commercial name of a synthetic detergent	LEY	Lactose egg-yolk
et al.	<i>et alii</i> (and others)	LEYGO	Lactose egg-yolk, glycerol and Orvus-Es [®] /EQUEX STM [®] Paste
etc.	<i>et cetera</i> (and other things)	LIN	Linearity index (VSL/VCL)
EU	European Union	LH	Luteinizing hormone
F1	Hybrid pigs obtained from crossing two purebreds of GPs	Lp	Coefficient/rate of water permeation
F2	Hybrid pigs obtained from crossing F1 pigs	M	Molar (mol/liter)
FBS	Foetal Bovine Serum	mg	Milligram
FS	Refrigerated/Fresh semen	mM	Millimolar (mmol/liter)
FSH	Follicular stimulating hormone	mm	Millimeter
FT	Frozen-thawed	min	Minutes
g	Gram	ml	Milliliter
		MOPS	4-Morpholinepropanesulfonic Acid
		mOsm	Milliosmoles
		MW	Molecular weight
		N	Normal (equivalents of solute/liters of solution)
		N₂	Nitrogen
		NaCl	Sodium chloride



Abbreviations & Symbols

NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	post-CAI	Post-cervical artificial insemination
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	PVA	Polyvinyl alcohol
NaOH	Hydroxide sodium	PVDF	Polyvinylidene fluoride
NGS	Normal goat serum	PVP	Polyvinyl pyrrolidone
nm	Nanometers	QTL	Quantitative Trait Loci
NO	Nitric oxide	RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay buffer
O²⁻	Superoxide radical	ROS	Reactive oxygen Species
ORT	Osmotic resistance test	s or sec	Seconds
Orvus-Es[®]	Commercial name of a synthetic detergent	SDS	Sodium dodecyl sulphate
PAF	Platelet Activating Factor; 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine	SEM	Standard error of the mean
PAGE	Poliacrylamide gel electrophoresis	Ser	Serine amino acid
PBS	Phosphate buffered saline	SOD	Superoxide dismutase
PCA	Principal component analysis	spz	Spermatozoa
PCR	Polymerase chain reaction	STR	Straightness index (VSL/VAP)
PFEs	Poor freezability ejaculates	SYBR[®]	Commercial name of nucleic acids synthetic dyes
PGF	Prostaglandin	TEMED	Tetramethylethylenediamine
PI	Propidium iodide	Thr	Threonine amino acid
PLSCR	Phospholipid scramblase	TRIS	Hydroxymethyl aminomethane
PMNs	Polymorphonuclear neutrophils	Tyr	Tyrosine amino acid
PMSG	Pregnant mare serum gonadotrophin	UTJ	Uterotubal junction
proSAP	pro Sphingolipid Activator Proteins	V	Volts
PSP	Seminal plasma spermadhesins	v	Volume
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride	VAP	Average velocity
PIP₂	Phosphoinositol biphosphate	VCL	Curvilinear velocity
PK	Protein kinase	VSL	Straightlinear velocity
		w	Weight
		WEI	Weaning-to-oestrus interval
		WOB	Oscillation index (VAP/VCL)
		μl	Microliter (10 ⁻³ ml)
		μm	Micrometer (10 ⁻³ mm)



Contents

Acknowledgements.....	xii, xiii
List of Papers.....	xvii, xviii
Abbreviations & Symbols.....	xix, xx
Figures & Tables.....	xxv, xxvi
Abstract/Resum/Resumen/Résumé.....	1/197/199/201
Bibliographic Revision.....	3-43

Generalities on pig breeding, reproduction and sperm cryopreservation

1. Generalities on pig breeding	
1.1. The domestic pig.....	3
1.2. Pig breeding in Spain as member of the EU (2000-2008).....	4
1.3. Commercial pig breeding.....	6
1.4. Piétrain: an excellent breed for terminal boars.....	10
2. Porcine reproduction	
2.1. Boar sperm generalities.....	12
2.2. Reproductive physiology of the boar.....	14
2.3. Reproductive physiology of the gilt/sow.....	17
2.4. Artificial insemination (AI) in swine: background and state-of-the-art methods.....	19



3. Cryopreservation of porcine sperm	
3.1. Physics of freezing in living cells.....	31
3.2. Cryopreservation of boar spermatozoa (I): milestones, freezing extenders and applications of the process.....	36
3.3. Cryopreservation of boar spermatozoa (II): challenges.....	38
Objectives.....	45
Paper I.....	47-57
Paper II.....	58-79
Paper III.....	80-112
General Discussion.....	113-122
General Conclusions.....	123-124
References.....	125-148
Appendix.....	149-186

Techniques, material and future perspectives of boar sperm cryopreservation

1. Techniques and material	
1.1. Analysis of the boar sperm quality (I): morphology.....	149
1.2. Analysis of the boar sperm quality (II): motility.....	150
1.3. Analysis of the boar sperm quality (III): concentration.....	153
1.4. Analysis of the boar sperm quality (IV): membrane integrity.....	154
1.5. Analysis of the boar sperm quality (V): osmotic resistance test (ORT)..	155
1.6. Immunolabelling of boar sperm.....	156
Immunolabelling for fluorescence microscopy: sperm membrane antigens.....	157
Immunolabelling for fluorescence microscopy: sperm cytosolic antigens.....	158
One-dimensional western blotting for sperm samples.....	159
1.7. Boar sperm cryopreservation.....	161

1.8. Thawing cryopreserved boar sperm.....	162
1.9. Preparation of boar sperm cryopreservation media	
LEY (NSF-I).....	164
LEYGO (NSF-II).....	165
BTS.....	165
2. Future perspectives.....	166
Cold-shock in boar sperm. Epilogue.....	173
References in appendix.....	174
Thesis in Catalan	187-265



Figures & Tables

IN BIBLIOGRAPHIC REVISION

Figure 1	Pig livestock in the EU on December 2007.....	5
Figure 2	Pig livestock in Spain on December 2007.....	5
Figure 3	Pig commercial production pyramid with two breeding nuclei.....	7
Figure 4	The pig breeding system of Selecció Batallé®, with four breeding nuclei.....	9
Figure 5	Pig production cycle in production herds.....	10
Figure 6	Some Piétrain boars selected for this thesis.....	11
Figure 7	Structure of the boar spermatozoon.....	13
Figure 8	Reproductive anatomy of boars.....	15
Figure 9	Spermatogenesis and the vesicularization of the acrosome after contact with the oocyte (acrosomal reaction).....	16
Figure 10	Reproductive anatomy of gilts and sows.....	17
Figure 11	Oogenesis.....	19
Figure 12	Instruments for animal AI imported from Russia by Dr. Ing. Luis Thomasset in 1935.....	20
Figure 13	A Piétrain boar mounting a dummy sow and collection of the spermatric rich fraction using the gloved-hand method.....	22
Figure 14	Timing of AI by detecting oestrus in gilts and sows.....	24
Figure 15	Factors mediating mammalian sperm selection in the female reproductive system....	25
Figure 16	Pig embryo and foetal death.....	26
Figure 17	Aborted pig foetuses aged around 40 days.....	26
Figure 18	A piglet on cranial presentation during parturition and a model showing different foetuses in the uterine horns of a sow.....	27
Figure 19	Schematic draw of the three main AI techniques in swine.....	28
Figure 20	Cervical and intrauterine inseminations with refrigerated semen doses.....	29
Figure 21	Plot representing solidification of undercooled and non-undercooled solutions.....	33
Figure 22	Possible events in cells during freezing.....	34
Figure 23	Survival of different cell types depending on the cooling rate.....	35
Figure 24	Electronic microscopy capture of a cross fracture on a 0.25 ml straw and a frozen human sperm cell entrapped in frozen concentrated freezing medium.....	39
Figure 25	Hypothetical signalling pathways during the phosphorylation of protein residuals that activate proteins involved in capacitating and apoptotic events.....	43
Table 1	Composition (g/l) of most common boar AI extenders.....	21
Table 2	Main quality parameters assessed on refrigerated, raw boar semen for AI.....	22
Table 3	Reproductive indices used in swine herds.....	27



IN APPENDIX

Figure 1A	Boar sperm (phase contrast x200).....	150
Figure 2A	Boar sperm morphology visualized through a computerized-assisted sperm analysis system.....	150
Figure 3A	Representation of some motility parameters assessed by a computerized system over the displacement trajectory of a boar spermatozoon.....	152
Figure 4A	Boar sperm motility visualized through a computerized-assisted sperm analysis system.....	152
Figure 5A	Makler counting chamber.....	154
Figure 6A	Representative images on the two methods employed in the present thesis to assess the membrane integrity of boar spermatozoa.....	155
Figure 7A	Representative image of two boar spermatozoa showing intact and altered acrosomes after the ORT test (phase contrast x400).....	156
Figure 8A	Equipment in a cryopreservation laboratory, minimal sperm quality values, and the curve displayed by the programmable freezer when freezing boar sperm from 5 to -150°C.....	163
Figure 9A	Sperm straw of 0.5 ml (0.5 cm ³) containing 0.5 x 10 ⁹ spermatozoa in LEYGO.....	164
Table 1A	Default parameters used in the present thesis for computerized assessment of the boar sperm motility with SCA2002®	153



Abstract

The use of frozen-thawed (FT) sperm in artificial insemination (AI) of species with productive interest allows higher sanitary control and the creation of high genetic value sperm banks, among other advantages. In the swine market most inseminations are still performed with refrigerated semen (FS) because of the successful application of long-term extenders and the sensitivity of boar sperm to cryopreservation. Although this sensitivity is provided by particular features of the sperm physiology in boars, some boar ejaculates maintain the sperm quality parameters after freezing (good freezability ejaculates, GFEs) in front of others that do not survive the process (poor freezability ejaculates, PFEs). The first objective of the study was to compare both groups in terms of field fertility. The second objective was to test the efficiency of the post-cervical AI (post-CAI) with FT sperm. The third objective was to search for predictors of the ejaculate freezability by assessing, both in GFEs and in PFEs and in three steps during the cryopreservation procedure (17°C, 5°C and 240 min post-thaw), conventional sperm quality parameters and the location and reactivity under the microscope of three proteins related to the sperm physiology with potential roles in freezability (GLUT3, HSP90AA1 and Cu/ZnSOD). The fourth objective was to quantify through western blot the expression of the three proteins, both in GFEs and in PFEs and in the three steps mentioned, to determine their potential as freezability predictors. For the first and second objectives, 86 sows were inseminated by post-CAI with 26 ejaculates from Piétrain boars divided into a 17°C FS portion (control treatment) and a cryopreserved (FT) sperm portion, the two portions in turn classified into GFEs and PFEs. The most relevant outcomes were that the probabilities of pregnancy resulted two times lower after inseminations with FT-PFEs ($P < 0.05$) compared to FT-GFEs, which indicates that ejaculates with high post-thaw sperm progressive motility and membrane integrity (over 40% in GFEs) are more likely to result in pregnancies than those with poor in vitro

sperm function (PFEs). Neither the number of farrowing sows and the litter size nor the risk of sperm backflow was significantly different in FT-GFEs from that achieved in FS control treatments, which showed the good applicability of post-CAI to boar FT sperm. For the third and fourth objectives, 29 and 11 Piétrain boar ejaculates, respectively, were cryopreserved. Two kinematic parameters, the sperm linearity (LIN) and the sperm straightness (STR), revealed higher hyperactivated motility in PFEs than in GFEs when assessed after 30 min at 5°C during cryopreservation, the combination of the two motility parameters showing around 72% confidence in the freezability prediction of ejaculates. Whereas it was not possible to predict the freezability of the boar ejaculates by assessing the three proteins under microscope, results from western blot showed differences in the HSP90AA1 expression in sperm at 17°C that are most possibly related to the best cryosurvival of GFEs. This finding aims to promote the cryopreservation of boar sperm intended for use in AI through the development of tests for freezability prediction in FS.

Bibliographic Revision



Generalities on pig breeding, reproduction and sperm cryopreservation

1. GENERALITIES ON PIG BREEDING

1.1. The domestic pig

The domestic pig (*Sus scrofa scrofa* or *Sus scrofa domestica*; Linnaeus, 1758) belongs to *Suidae* family of the order *artiodactyla*. This mammal follows an omnivorous diet, its weight ranges from 50 to 350 Kg, and it develops social structures called herds. Pigs do not have sweat glands for what the accumulated heat is eliminated during respiration and, together with the scarce growing of bristles, it explains its sensitivity in front of temperature changes and that they often get wet or roll in the mud to keep cool [1, 2]. Although it is considered a non-seasonal breeder, seminal quality and libido are lower in summer (july-october) due to the extreme photoperiod [3, 4]. High temperatures affect the functionality of testis since they are directly exposed to environmental conditions, altering the production of spermatozoa and libido [5-7]. The first oestrus signs or puberty occurs in females at the age of 6 months whereas it is more progressive on males, from 5 to 18 months of age [8]. The period that follows is the post-puberty that lasts until reaching the sexual maturity at around the age of 12 months both in males (boars) and females (gilts/sows) [9]. Those females that have farrowed once and twice or more are called primiparous and multiparous sows, respectively, while those females with still no parity are called nulliparous or gilts. The mean breeding life of pigs is 3-4 years whereas their real lifespan is 6-15 years [1, 10].

Pigs have been independently domesticated in several regions of the world from *Sus scrofa* populations (wild boars), the first domestications occurring in Thailand and China around



10000 BC. There was a later hypothetical introgression of Asian domestic breeds into the Euro-American breeds, possibly between 7000 and 3000 BC [9, 11, 12]. Pig breeding favoured the establishment of human communities, raising a livestock for pork (meat) and for leather [1, 9]. Until the XXth century, pig breeding was destined to familiar consumption. Farming for commercial purposes went on increasing and large livestock breeding, pork industries and slaughterhouses were settled. Importation of pig breeds adapted to intensive farming raised the pork industry but determined the extinction of several autochthonous breeds [13].

It is generally accepted that current breeds evolved from three primitive species [12]: asian (*Sus vittatus*), celtic (*Sus scrofa*), and iberian with african origins (*Sus mediterraneus*), the latest thought to be a subspecies of the celtic [14, 15]. In Spain, Vitoriana, Baztan and Large-White breeds derived from celtic pigs established in the north whereas breeds from the iberian line, possibly introduced by Phoenicians from northern Africa, extended along the spanish coast [15]. It has been recently found that pig populations are highly polymorphic, even in case of inbreeding, which indicates their complex phylogeny [16].

There are more than 200 breeds of pigs worldwide [11], which could be classified in basis of morphologic characters [17], country of origin [18], or reproductive and productive performance [19]. Attending this last system, purebreds with both productive (paternal aptitudes) and reproductive (maternal aptitudes) performance are Large-White, Landrace, Yorkshire, Duroc and Spotted (general lines). Piétrain, Belgium Landrace and Hampshire are breeds basically having productive performance (paternal lines) and Meishan and Poland-Chinese are sexually precocious breeds with good prolificacy and adaptability (maternal lines) [19]. General lines are so versatile that they are intensively selected for farmers towards good productivity indexes or good prolificacy indexes, these lasts called hyper prolific selection lines. Intensive selection results in individuals from a same breed that belong to different lines, having different alleles fixed for a character depending on its selection history, and each pork producer develops its particular line. Although crossbreeding is frequently the cause of extinction of the autochthonous breeds, this system holds the modern pork industry since hybrids are more versatile and resistant than purebred pigs [20].

1.2. Pig breeding in Spain as member of the EU (2000-2008)


 Farming in Spain represents the 40% of total production in agronomy, arising as the second European Union (EU) country in meat stock (Figure 1). Pork industry in Spain is the highest livestock sector (more than 25 million censused animals in 2007) followed by sheep, cattle and goat [21]. Catalonia is the first autonomous community in number of pig livestock, with above 6 million censused animals in 2007 [21] (Figure 2). Since the year 2000 Spain has been the

Fig. 1 Pig livestock in the EU on December 2007 (thousands of animals)

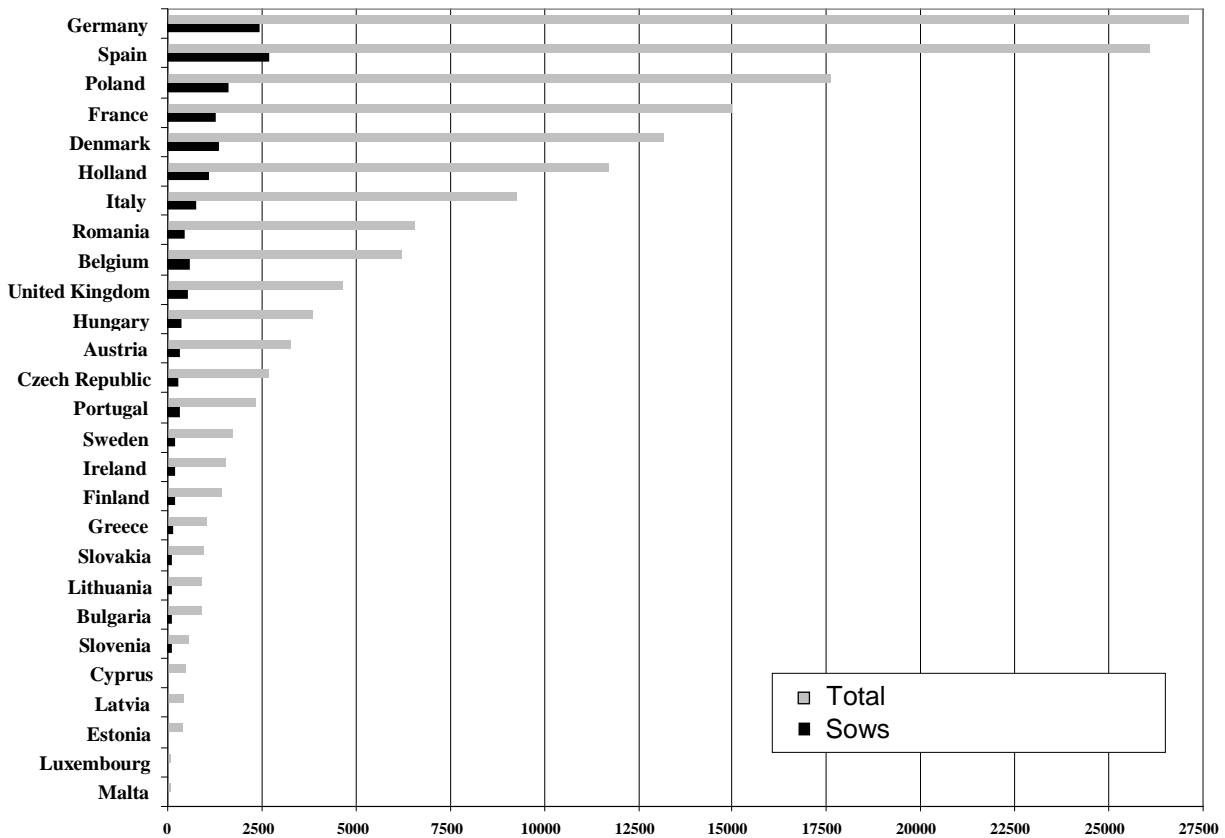
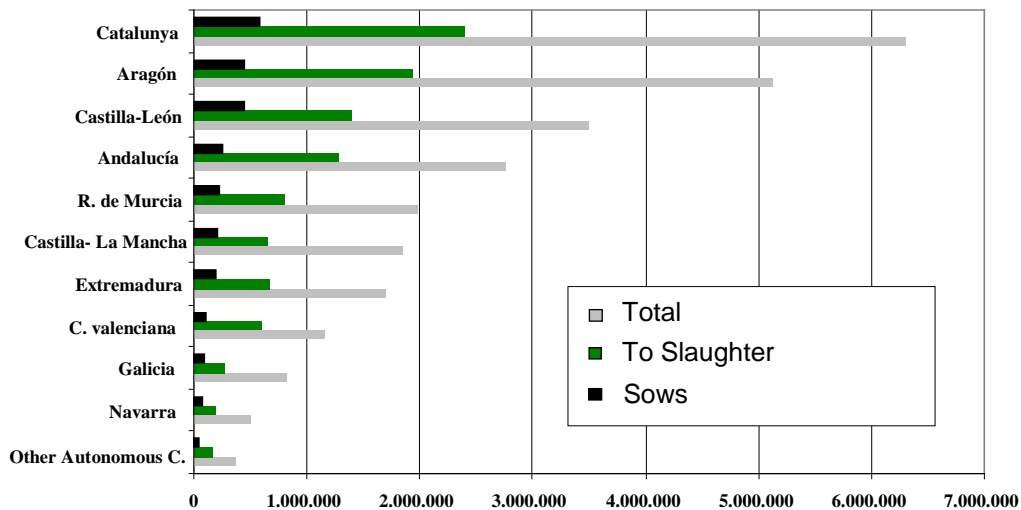


Fig. 2 Pig livestock in Spain on December 2007 (thousands of animals)



Figures 1, 2 Modified from *Ministerio Español de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Subdirección General de Estadísticas Agroalimentarias (MAPA). Encuestas Ganaderas; Ganado porcino, resultados 2007 [21].*



fourth worldwide pig producer beneath China, the United States and Germany [22]. With around 600 commercial herds in 2008, over 200 in Catalonia [23], Spain has produced more than 3 million tonnes of pork and has undergone an increase in the number of exportations [24]. These good results have given a boost to pig production research with the main purpose of improving pork quality for its consumption.

1.3. Commercial pig breeding

There are generally two options when establishing a swine breed: on-farm (breeding concentrated in a particular farm) and commercial herding (different pig herds cooperating owned by a producer). Due to increasing market demand and the introduction of ultimate technologies the organization of farms has been growing in complexity and commercial boar herding is the most extended nowadays.

One example of commercial herding is the case of Selecció Batallé® [25]. This company has developed a genetic improvement program with the objective of selecting and producing individuals following commercial demand. Such program consists of a pork production chain constituted by three main types of herds: selection or breeding nuclei, multiplication herds and production herds or commercial farms. These herds are established in basis a pyramidal hierarchy in which the breeding nuclei locate at the top of the pyramid (Figure 3). The objective of the production chain is to disseminate the characteristics of elite animals from the top to the basis of the pyramid where individuals are grown for slaughterhouses (market swine) [26, 27]. The final aim is to obtain commercial swine with minimum costs and maximum pork quality, so strict controls must also be implemented to avoid propagation of diseases between herds. Selecció Batallé® complies with the recently established Code of Good Practice for Farm Animal Breeding and Reproduction (code EFABAR) in the EU [28].

A **breeding nucleus** is a herd performing genetic improvement. Individuals from a breed having some traits of interests are included in the genetic program to improve the characteristics of the breed by developing new experimental lines. There could be as many breeding nuclei as breeds of interest, with a minimum of two breeds that will be later crossed in multiplication herds. Four breeds are currently included in Selecció Batallé®: Landrace, Duroc, Piétrain and Yorkshire. All of them are mainly constituted by sows since the sow-to-boar ratio in breeding nuclei, considering modern artificial insemination (AI) techniques, ranges around 7:1-80:1. Individuals in a nucleus are the grand grandparental (GGP) and belong either to maternal or paternal lines. The best individuals are selected and they are later inbred to obtain grandparental (GP). Approximately the 6% of GP females born are retained in the nucleus (those with best performance) whereas over the 70% are culled; only the 3% are destined to

multiplication herds, and the rest is sold. In contrast, almost all GP males are culled, a little percentage is either sold or sent to multiplication herds, and less of 1% is retained in the nucleus. Those percentages can vary considering fluctuations in pork market [25].

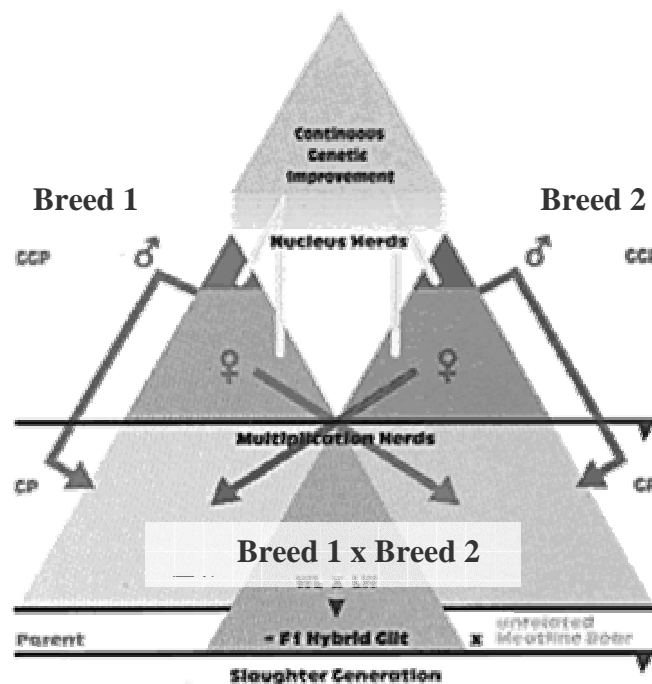


Figure 3 Pig commercial production pyramid with two breeding nuclei (modified from *Breeding programs*, JJGenetics, 2008 [27]).

Yield controls (on-farm or station testing) are the basis for choosing genetically superior animals. Calculation of genetic values on GGP comprises the analysis of genealogy and testing those traits included in the breeding goals of the genetic program, i.e. percentage of backfat thickness, intramuscular fat, piglets born alive, daily growth rate from birth, conversion index (food needed per kg of pork produced) or number of teats [25]. During many years one of the most performed yield control have been detecting the gene causing the porcine stress syndrome (called the halothane gene because of the negative effects of the halothane anaesthetic on pigs suffering from this recessive disease). Individuals having nn alleles codifying for the halothane gene present bad pork quality as result of their extreme sensitivity to stress. It is known a large percentage of Piétrain individuals express the two recessive alleles, what explains its sensitivity to the environmental conditions. Conversely, Yorkshire does not carry the allele and Duroc and Landrace can carry one allele, although in last years the selection has been directed against Nn individuals and most of them are currently tested to be homozygote (NN). Since the year 2000, the identification of individual genes having effects on traits with economical interests (Quantitative trait Loci, QTL) is being developed [29], but characters like the prolificacy or the daily growth, having low heritability, cannot be evaluated by



genotyping and demand statistical models like BLUP (Best Linear Unbiased Predictor) that is based on observations of factors interfering in our pig population [30].

After yield controls, GGP individuals with low genetic value are destined to slaughterhouses or to AI centres for providing semen to production herds, whereas those individuals selected for paternal or maternal traits are inbred. A percentage of the female progeny (GP) from maternal lines is destined to different multiplication herds whereas the male progeny from paternal lines is directly destined to production herds (terminal boars) [31]. In the case of Selecció Batallé®, the paternal line is composed by GGP of Piétrain and Yorkshire breeds. The resultant GP males of each breed are directly sent to production herds. The maternal line is composed by GGP of Landrace and Duroc breeds. The GP Landrace males and Duroc females are destined to multiplication herds (Figure 4).

In **multiplication herds**, GP from maternal lines in the breeding nuclei are crossbred. In Selecció Batallé®, GP Duroc sows are inseminated with semen from GP Landrace males to obtain F1 hybrids in which the best genetics of each breed confluence. It is called heterosis or “hybrid vigour”, the phenomenon by which the performance of the progeny exceeds the average performance of the parents. Hybrid females obtained are sold to production herds because of the sow-to-boar ratio increase in those herds [32]. Costs derived from selection in the breeding nuclei are distributed to a number of individuals along the pyramid (approximated current ratio of sows in breeding nuclei, multiplication and production herds is 1:4:70) [25].

Individuals born in **production herds** are destined to market (slaughterhouses). The sow-to-boar ratio in these herds could be over 150:1 [33] and F1 females from multiplication herds are cyclically inseminated with seminal doses from GP terminal boars, which genetically provide high productive output. Thus, paternal or productive characteristics are disseminated through seminal doses. The terminal boars influence the farrowing rate and the litter size and contribute 50% to genetics of their progeny (F2), whereas GP individuals crossbred in multiplication herds contribute 25% each to the genetics of F2 [32].

Up to 10×10^6 F2 individuals can be slaughtered in Selecció Batallé® in one year [25]. This kind of pork production chain is called terminal crossbreeding system. In rotaterminal systems, the 85% of F1 females follows the terminal crossbreeding system whereas the 15% is cyclically inseminated with semen from breeds in the maternal line. This last system produces females that replace the F1 stock as they have the same characteristics. It reduces the investment on individuals for the breeding nuclei and minimizes the health risk associated with new animals purchased to these nuclei [34]. Production herds form a closed system in which F1 females are cyclically inseminated during their life for a top productive efficiency [35] (Figure 5). To maximize the herd profitability, a maximum of 7-parity is recommended for sows in this cycle before culling them [36].

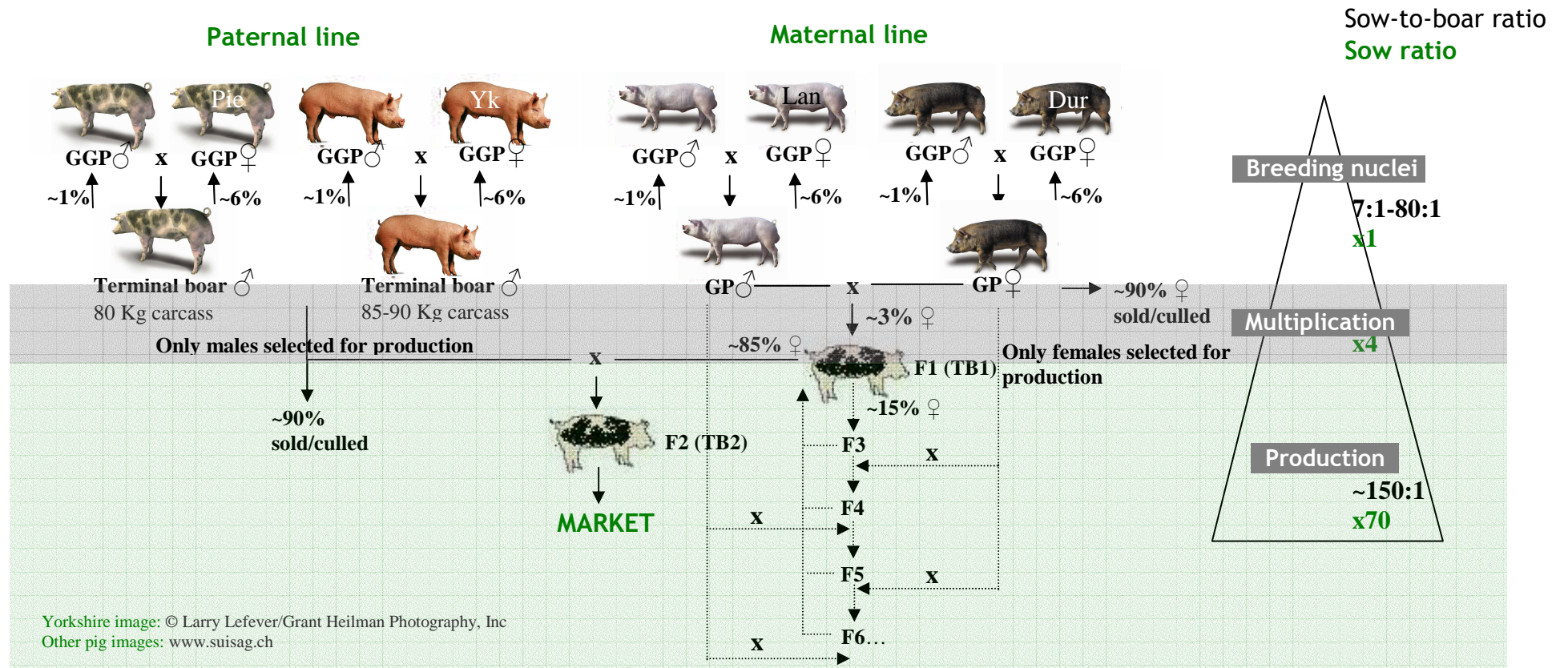


Figure 4 The pig breeding system of Selecció Batallé®, with four breeding nuclei (Data is courtesy of Selecció Batallé®. Pig drawings are from Thompson LH. [32]).

Lan= Landrace; Yk= Yorkshire; Pie= Piétrain; Dur= Duroc. Dashed lines represent a rotaterminal system. Percentages vary depending on market demand.

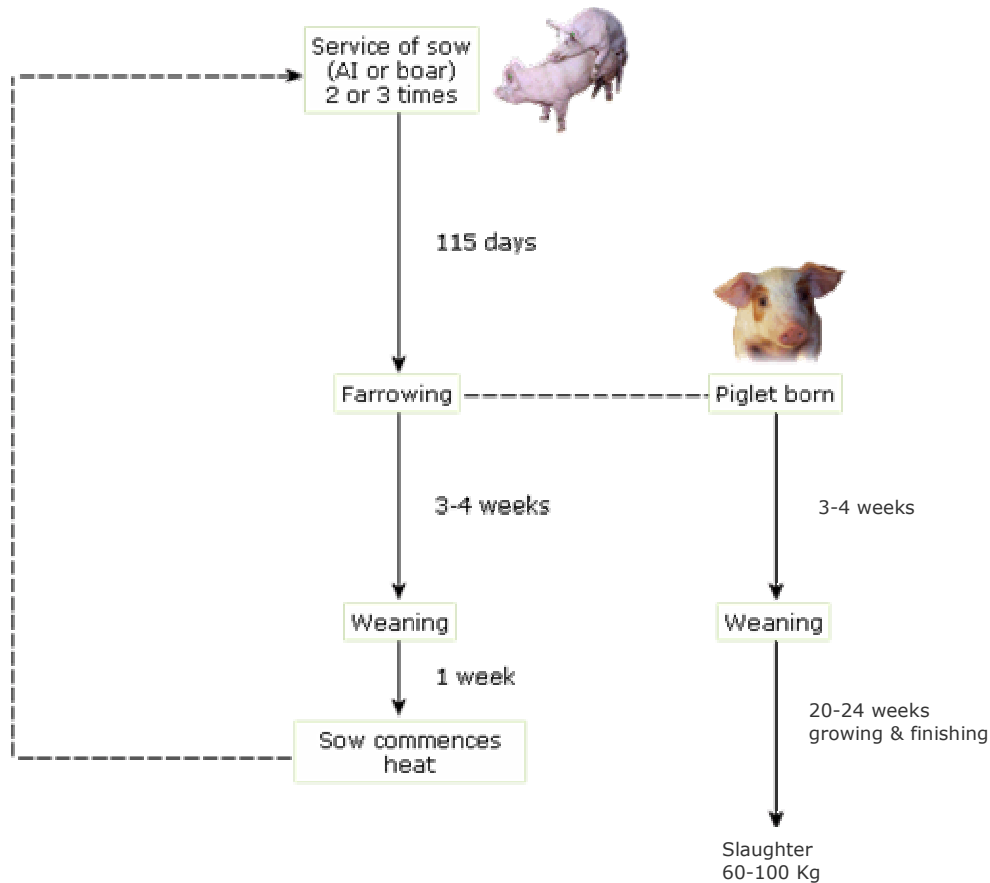


Figure 5 Pig production cycle in production herds (from *Living Countryside* ©, UK agriculture [35]).

1.4. Piétrain: an excellent breed for terminal boars

Piétrain is a preferential purebred for successful production in terminal crossbreeding system (Figure 6). This pig of pied skin comes from the village Piétrain, 53 Km east from Brussels (Belgium). It is an animal having few hairs, with robust and long body and erected ears. The extremities are shorter than in most breeds. Piétrain is prolific but it has a low reproductive index (few piglets per sow and year), bad nursery performance and poor milk production. It presents low daily growth and conversion index, although they both have been improved in some lines. Conversely, it is a very muscular animal, with a low fat index (it carries a high proportion of lean to fat, up to 9:1) [25, 37]. For that reason Piétrain boars are frequently used as a terminal boar to improve carcass quality (up to 83% meaty carcass), independently of the sow inseminated. However, its unique muscularity derives from a mutation in the halothane gene that also provokes a high sensitivity to stress and bad pork quality. The gene is still tested

in yield controls since the 80% of the total Piétrain population is homozygous recessive (nn) for it. The low meat quality of the breed determines the conversion of Piétrain individuals into fresh meat like ham, sausages or mortadella instead of products like cured ham, bacon or pork loin. Prototype parameters of the breed are the following [37, 38]:

- 🐷 Final weight (Kg): 230-300
- 🐷 Daily growth at 20-90 Kg (g/day): 575
- 🐷 Conversion index at 20-90 Kg (Kg/Kg): 3.25
- 🐷 Age of gilts at first farrow (days): 342
- 🐷 Live piglets/farrow: 9-9.5
- 🐷 Weaned piglets/farrow: 7-8
- 🐷 Length of carcass (cm): 92
- 🐷 Lean in carcass (%): 60



Figure 6 Some Piétrain boars selected for this thesis (courtesy of *Selecció Batallé*®, November 2006).



2. PORCINE REPRODUCTION

The reproductive performance of pigs is basic in the economy of herds, which is the reason individuals from maternal lines are carefully selected for the best farrowing and prolificacy indexes. Many factors are implied in the reproductive output of an individual, either intrinsic (i.e. breed, age, physiology) or extrinsic (i.e. temperature, humidity, photoperiod, rhythm of collection, feeding) [39-41].

2.1. Boar sperm generalities

The boar spermatozoon is a highly specialized cell of around 45 μm total length divided in three main sections: head (7 μm), connecting piece or neck (0.7 μm) and tail (37 μm). These sections are surrounded by a continuous bilayer called plasmalemma or plasmatic membrane [42, 43] (Figure 7).

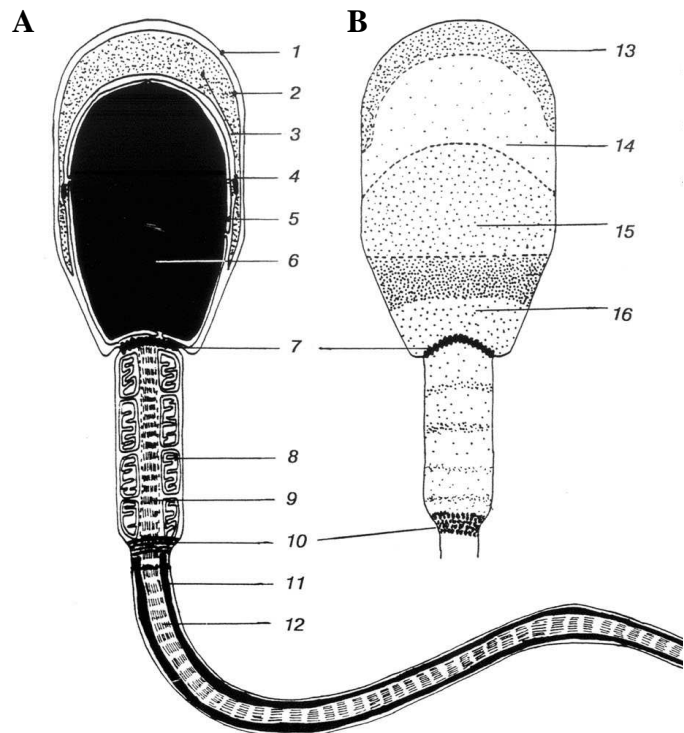
The **head** is oval and flat and contains a bilayer vesicle called the acrosome, which covers half of the nucleus like a cap, extending from the top of the head until the equatorial region. Such zone is called the acrosomal region. The acrosome contains mucopolisaccharides, proteins, lipids and hydrolytic enzymes to digest the oocyte covers during fecundation. Although the acrosomal membrane is a continuous vesicle, the surface facing the plasmatic membrane is called the outer acrosomal membrane and the surface facing the nucleus is called the inner

acrosomal membrane. In the apical ridge of one of the head faces there is a horseshoe shape protuberance of about 0.4 μm width caused by a dilatation of the acrosome. Below the equatorial region, the post-acrosomal region contains dense fibrous material between the plasmalemma and the nuclear envelope.

Figure 7 Structure of the boar spermatozoon (modified from *Gadella et al.*, 2008 [44]).

(A) Sectional view of a boar sperm cell. Solid lines represent membrane bilayers. 1, plasmatic membrane or plasmalemma; 2, outer acrosomal membrane; 3, acrosomal enzyme matrix; 4, inner acrosomal membrane; 5, nuclear envelope; 6, nucleus; 7, connecting piece (neck); 8, midpiece; 9, axoneme and mitochondria; 10, Jensen's ring; 11, fibrous sheath; 12, axoneme + outer dense fibres.

(B) Surface view of the boar sperm head and midpiece with the subdomains: 13, apical ridge; 14, acrosomal region; 15, equatorial region; 16, post-acrosomal region.



The **connecting piece** is the most sensitive region to fracture because of its thinness. It keeps in contact the head with the tail.

The **tail** impulses the spermatozoon with an helicoidal forward movement and it is composed by three pieces: the midpiece, presenting an axonematic structure covered with a mitochondrial sheath (diverse mitochondria helicoidally disposed around the axoneme); the principal piece, presenting an axonematic structure covered with a fibrous sheath; the terminal piece, having simple axonematic structure [42, 43]. The midpiece is connected with the principal piece by the Jensen's ring, a circumference of packed filamentous subunits attaching the two structures that avoids displacements of the mitochondrial sheath [45].

Quality and volume of boar semen, like fertility, are influenced by many factors [6, 46, 47] classified as intrinsic (e.g. genetics, age, breed [48-50]) or extrinsic (e.g. rhythm of collection, environment [3, 51-53]). The influence of such factors in the sperm quality is contrasted by several functional parameters [54, 55]: morphology, motility, membrane integrity



[41], DNA integrity, percentage of altered acrosomes (osmotic resistance test, ORT), acrosomal swelling (hypoosmotic resistance test, HOST), functional status [56], etc.

The morphology is one of the indicators of the ability of sperm to fecundate since the presence of folded or coiled tails refrains sperm from swimming correctly and the anomalies on head frequently point to aberrations in the genetic material. Moreover, several subproducts from the maturation of sperm are released in the form of cytoplasmic droplets, which is a spherical protuberance attached to the connecting piece of sperm (proximal droplet) that migrates along the midpiece during the way of the spermatozoon along the epididymis until it is released at the Jensen's ring (distal droplet) at the moment of ejaculation. The presence of proximal droplets in the ejaculate is considered a morphologic anomaly since it indicates the process of sperm maturation could not have been developed correctly [48, 57-59]. It is still controversial whether distal droplets should be considered or not a morphological anomaly in doses collected for AI. Anyway, the retention of cytoplasmic droplets when sperm is entering the female tract is associated to infertility in mammals, whether the droplet is proximal or distal [57, 60].

2.2. Reproductive physiology of the boar

The reproductive system of a boar is constituted of six coordinated units: the brain, the hypothalamus with the pituitary gland, the testis with the epididymis and the urogenital tract with its accessory glands (the prostate, two seminal vesicles and two bulbourethral or Cowper's glands) (Figure 8). A healthy boar reaches the post-puberty at 7-9 months of age and the production of spermatozoa (spermatogenesis) starts in the testis, where temperature is decreased from $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ to $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ since normal body temperature inhibits the process [5, 61, 62].

Spermatogenesis (Figure 9) takes place in the seminiferous tubules of testis and comprises the pass of primary diploid spermatogonial cell to haploid spermatid (meiosis) and further modifications to spermatozoon (differentiation or compartmentalization). The spermatids become embedded into the cytoplasm of Sertoli cells where they get glycogen to nourish them during the different structural changes they bypass. The Golgi apparatus transforms into the acrosome and a centriole organizes the axoneme of the tail. Histones are replaced by protamines for higher compaction of DNA. Mitochondria fuse and migrate to the tail to provide energetics for displacement and the cytoplasmic cell content reduces. The residual cytoplasm in the spermatozoon is expelled taking the shape of cytoplasmic droplets during the process

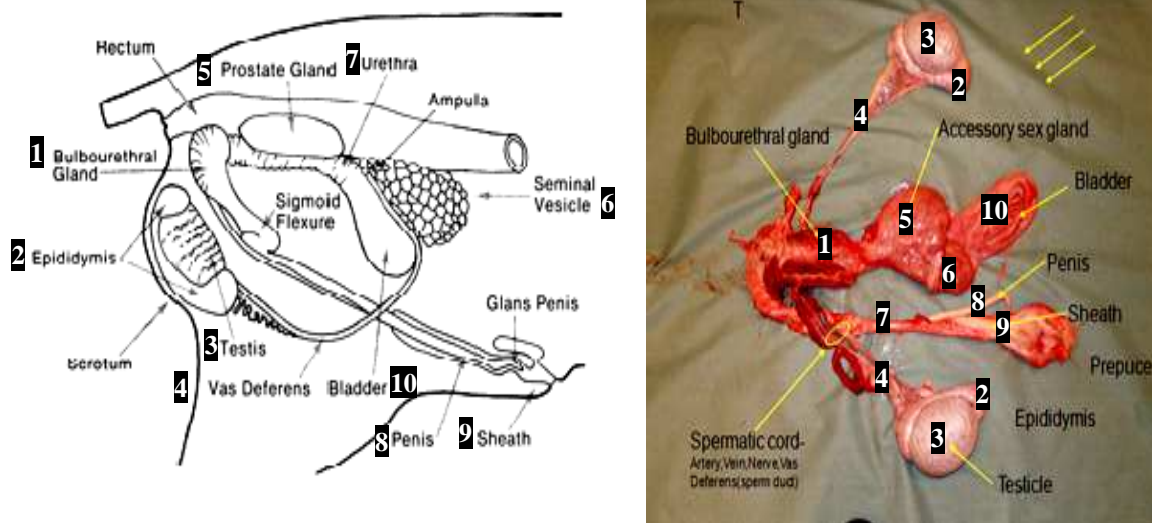


Figure 8 Reproductive anatomy of boars (on the left, drawing from Thomson LH., 2008 [32]; on the right, image modified from shpswine [69]).

following spermatogenesis, the **maturation** into the epididymis during 14-18 days [63]. During maturation there is acquisition of motility and fertility functions through changes in the pattern of proteins of the sperm surface [64-66], for what morphologic anomalies can appear at this step [67], and sperm is later stored into caudal epididymis until ejaculation. Ultimate changes in sperm are promoted in the reproductive tract of the sow with the processes of **capacitation** and acrosomal reaction, this last consisting of fusion of the acrosomal and plasmatic membranes of sperm after contact with the oocyte (Figure 9).

Events in the boar reproductive tract are regulated with hormones secreted by the pituitary gland, which is in turn stimulated with signals from the brain. Those signals produce secretion of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus to stimulate the pituitary gland secreting two gonadotrophins: the follicular stimulating hormone (FSH) and the luteinizing hormone (LH). The FSH regulates the production of estrogens in Sertoli cells to conduct spermatogenesis, whereas the LH upregulates the production of testosterone in the interstitial (or Leydig) cells from the testis to stimulate sperm production and libido [68]. The entire process of spermatogenesis and maturation is cyclical and lasts around 7 weeks [62].

During ejaculation the spermatozoa are released from the epididymis and mixed with secretions from the accessory glands of the urogenital tract, which will constitute the seminal plasma. The final ejaculated secretion or semen is the sum of sperm and seminal plasma. Seminal plasma of boars contains many proteins secreted by the accessory glands [70-73]. These proteins protect sperm [74], avoid its agglutination and mediate the fertilization process



for their importance in the capacitation process [75, 76]. Moreover, seminal plasma contains carbohydrates like glucose, sorbitol and fructose to provide energy for the sperm metabolism [70]. The pH of the ejaculate is about 7.4 units and its osmolality ranges 290-300 mOsm, the spermatozoon having its threshold of osmotic tolerance at 240-380 mOsm. The ejaculate is divided into three main fractions: pre-spermatic, spermatic and post-spermatic [39, 77].

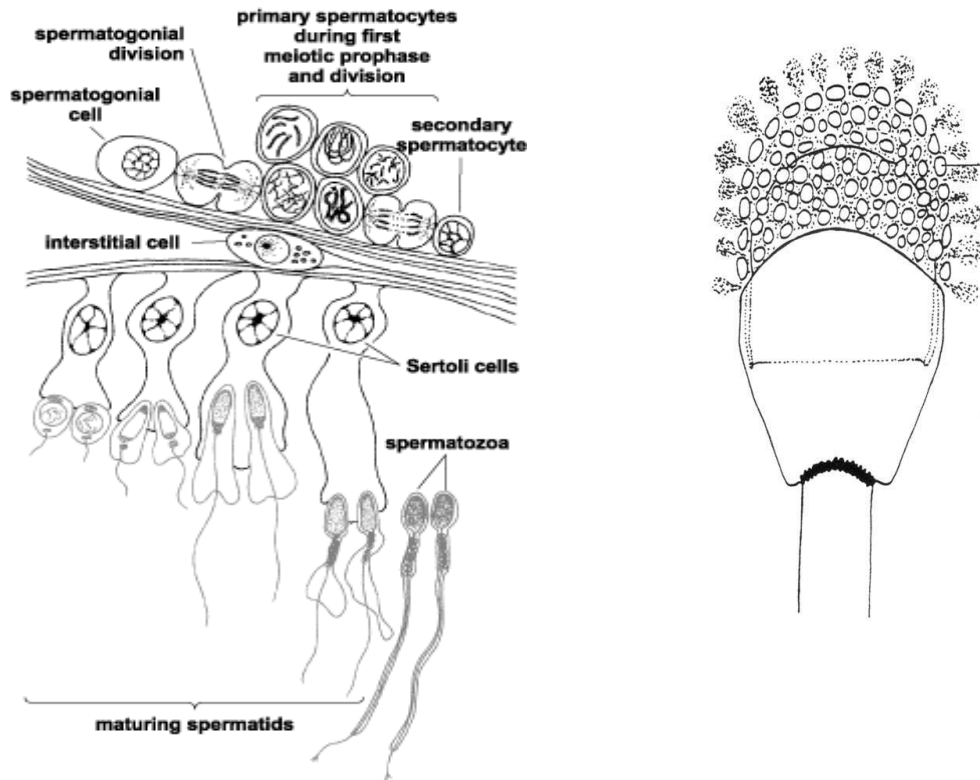


Figure 9 On the left, spermatogenesis (from Answer.com [68]). On the right, vesicularization of the acrosome after contact with the oocyte (acrosomal reaction). Fusion of the outer acrosomal membrane with the plasmalemma results in expulsion of the vesicular enzymes (from Gadella et al., 2008 [44]).

In the **pre-spermatic** fraction the tapioca is dislodged. It is a gelatinous substance from the bulbourethral glands that lubricates and isolates the urogenital tract from the pollution outside. This fraction also includes a prostatic secretion that provides for semen liquefaction.

The **spermatic** fraction is rich in spermatozoa for what it looks milky (oscillating from 0.4 to 1.8 x 10⁹ spz/ml [77, 78]) and has a volume of 40-100 ml depending on many factors like photoperiod, individuals, rhythm of collection, breed, age, etc. [78]. It is principally composed by secretions from epididymal cauda, seminal vesicles and the prostate. Fluid from epididymal cauda and seminal vesicles provide proteins that protect sperm, participate in fertilization and facilitate the sperm transport and, the secretion of the prostate is known to neutralise urine and

protect against sperm agglutination and against the acidity of the female tract [79-82]. These secretions also provide sugars (i.e. glucose, fructose and sorbitol) that are essential for the endogenous metabolism of the boar spermatozoon [83].

The **post-spermatric** fraction gathers residual liquid from the seminal vesicles and the last lumps of tapioca, which seals the genital tract of the sow after natural mating.

2.3. Reproductive physiology of the gilt/sow

The reproductive system of pig females is constituted of seven coordinated units: the brain, the hypothalamus, the pituitary gland, the ovaries, the oviducts (4-8 cm long, also called fallopian tubes and divided into uterotubal junction -UTJ-, isthmus, ampulla and infundibulum with fimbria), the uterus (divided into a body and two horns) and the genital tract (cervix and vagina) [61, 80] (Figure 10).

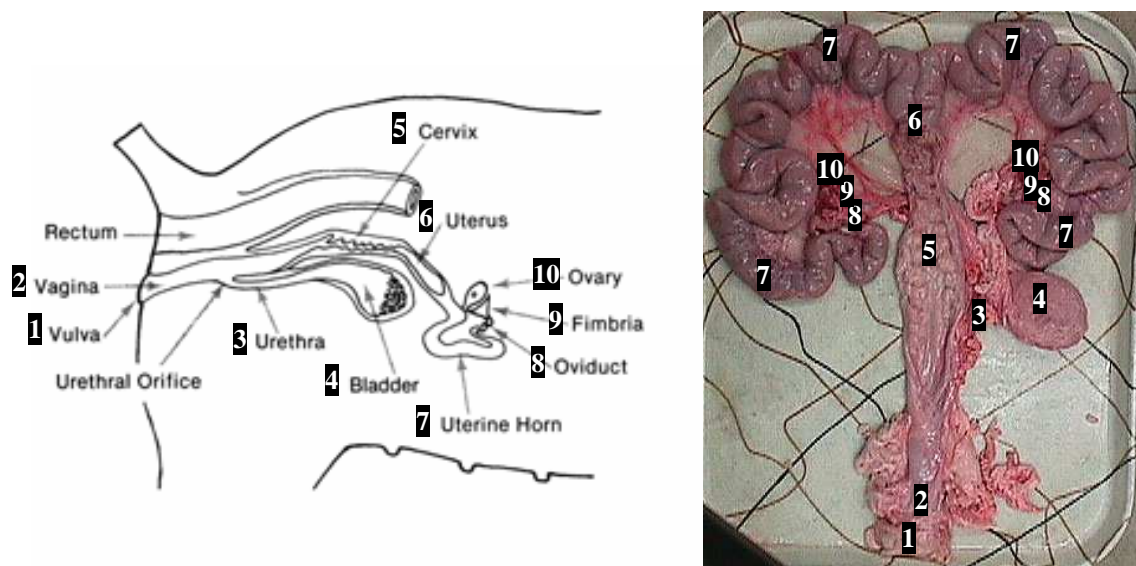


Figure 10 Reproductive anatomy of gilts and sows (on the left, drawing from Thomson LH., 2008 [32]; on the right, image modified from the University of Wisconsin [87]).

The reproductive cycle of a gilt or a sow ranges 21 days and could be divided into oestrus (days 0-2, receptive to males), diestrus (days 3-15, luteal phase) and proestrus (days 16-21, follicular phase) [62].



Oestrus, also called “heat period”, lasts 36-72 h depending on the parity of the female and it is characterized by behavioural changes (e.g. seeking contact with a boar, standing reflex in front of a boar and when back pressure is applied, smelling the flanks of other individuals) and by physiological changes (e.g. reddening and swelling of the vulva, changes in vocal sounds), these changes being more pronounced when a boar is present [84]. Oestrus is onset by estrogens secreted from mature follicles in the ovaries, which produce in turn the secretion of LH. This hormone produces the ovulation of dominant follicles around 40 h after the onset of oestrus, and the involution of the others. Once the ovulation is produced, expelling an average of 17 oocytes (also called ova) [85], each oocyte is fertile for about 8 hours before starting to degenerate. Polyovulation in swine probably comes as response to the intense artificial selection [86].

Diestrus is characterized by the degeneration of each of the follicles that have not been fertilized into a corpus luteum that starts producing progesterone. The function of this hormone is to maintain pregnancy in case of fertilization and to impede ovulation. If conception does not occur, cortisol from the suprarenal cortex stimulates prostaglandin (PGF) to be secreted by the uterus, causing corpora lutea to degenerate and cease in producing progesterone on about day 16 [33, 85].

Pregnancy interrupts the reproductive cycle but corpora lutea remain functional and continue secreting progesterone. Gilts and sows have gestational periods of 3 months, 3 weeks and 3 days (114 ± 2 days) that precede lactation periods of 3-4 weeks. At the end of pregnancy, the production of PGF in the uterus and of oestrogen in placenta promotes farrowing, which normally lasts 2-3 h, while oxytocin from the pituitary gland stimulates uterine contractions and also the milk letdown reflex. Removal of the suckling stimulus when piglets are weaned produces the recovery of the normal physiology of the uterus and the exhibition of oestrus in 3-7 days (weaning-to-oestrus interval, WEI) [33, 85].

Proestrus starts when there is secretion of PGF from the uterus. It produces the release of FSH from the pituitary gland to activate a new pool of follicles and to initiate oogenesis (Figure 11). Six to 10 follicles grow in each ovary and oestrogen levels go increasing to onset oestrus. First signs of libido can appear in this period [33, 85].

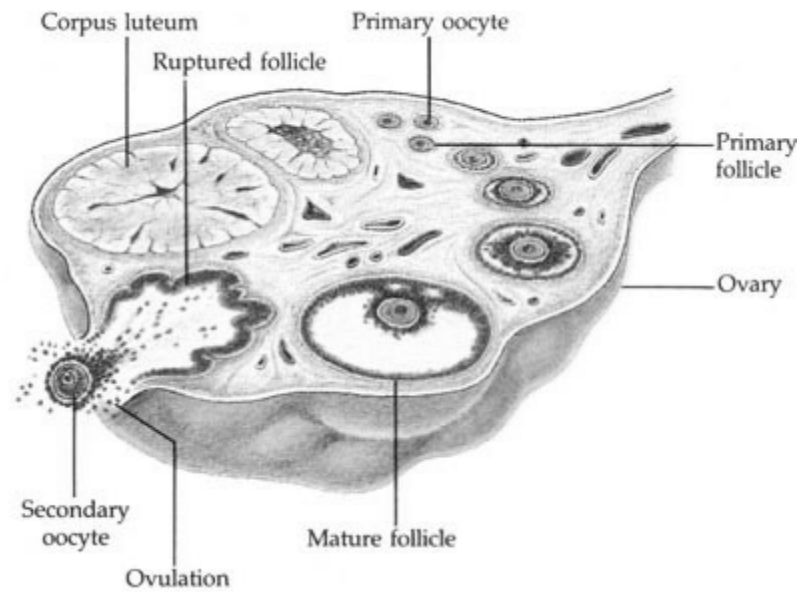


Figure 11 Oogenesis

(from *Biology 102* [88]).

2.4. Artificial insemination (AI) in swine: background and state-of-the-art methods

One boar ejaculate usually contains about 10000 to 100000 million sperm cells [89]. In commercial herding, natural mating is economically and time cost expensive because one male can copulate with a maximum of two females in a 24 h period. On the contrary, AI permits greater diffusion of boar genetics and makes each semen collection much more profitable as it is packed in 10 to 40 AI doses of 80-90 ml (3×10^9 spz/dose [89]), which allows serving 5 to 20 females with one ejaculate [90].

From data in 2007, AI accounts for over the 90% of pig matings in many European countries, the 75% in North America and Brazil and over the 50% worldwide [91]. The Italian priest and physiologist Lazzaro Spallanzani was the first in 1779 in testing AI using fishes and amphibians and later with dogs [92]. Full development of the zootechnical AI procedure was started in 1899 by the russian Ivanow [93] (Figure 12). It was not until the second half of the XXth century that AI was adapted to porcine coinciding with the rise of the swine industry [94, 95]. The performance of AI on swine was accompanied by the study of methods for semen collection [96] and its storage [97-99], which are still being improved [89, 100]. In Spain, pig AI was introduced in the 1980s by Santiago Martín Rillo [101, 102].

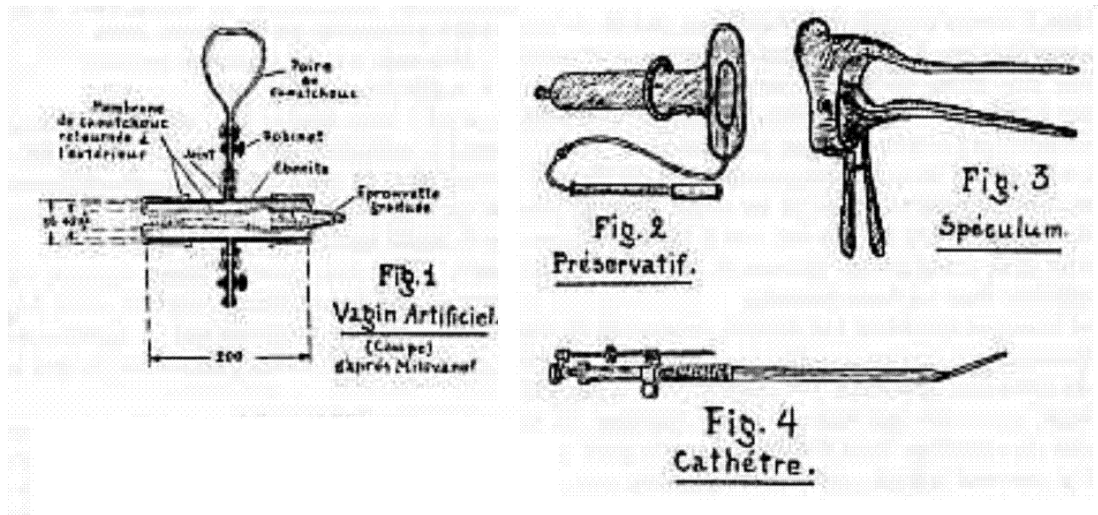


Figure 12 Instruments for animal AI imported from Russia by Dr. Ing. Luis Thomasset in 1935 (from [wikipedia.org](https://www.wikipedia.org) [103]).

The methodology of pig AI is based on the use of **extenders** to dilute semen after collection, thus allowing better conservation of sperm. Although sperm cells in raw semen resist a broad range of osmotic pressures (from 240 to 380 mOsm) they are not as tolerant to pH changes. Moreover, if nutrients are not available glycolysis in sperm retrieves lactic acid and the pH of the ejaculate diminishes. Similarly, changes in temperature may affect the sperm motility and viability for what sperm must be preserved at 15-17°C, thus lowering the metabolism and avoiding the growth of bacteria [104]. Raw semen is diluted in extenders that provide energy for sperm cells (e.g. glucose, fructose), protection against thermal stress (e.g. bovine serum albumin -BSA-) and oxidation, control of acidity (zwitterionic buffers like bicarbonate, sodium citrate, TRIS, MOPS, HEPES [98]), control of electrolytes for isotonic conditions (e.g. NaCl, KCl), EDTA to block calcium activity and antibiotics for the inhibition of microorganisms [100].

The first extenders for boar semen appeared in the 1970s through modification of buffers that had been used with success for bull AI in the 1950s [98]. Those buffers maintained fertility during not more than four days for what they were called short-term extenders. The Beltsville Thawing Solution (BTS), first conceived for frozen-thawed (FT) sperm by Pursel and Johnson in 1975 [105] and later adapted to refrigerated semen (FS) [99], is the most frequently used short-term extender in pig AI. It was not until the 1980s that Gottardi and collaborators formulated the first long-term extender, called Zorlesco, which maintained the fertilizing capacity for as long as seven days thanks to the inclusion of BSA and cysteine for the stabilization of the boar sperm membrane [106]. It was later improved with the apparition of new commercial long-term diluents like the MR-A®, developed in 1984 by Martín Rillo and Eulogio Alias [100, 101] (Table 1).

BOAR SEMEN EXTENDERS

	Short-term (1-3 days)			Long-term (4 -7 days)					
	IVT 1959	Kiev 1965	BTS 1975	Zorlesco 1980	Modena 1981	MR- A® 1984	ZORPVA 1985	Reading 1989	Androhep® 1990
Glucose	3	60	37	11.5	25	√	11.5	11.5	26
Sodium citrate	24.3	3.7	6.0	11.7	6.90	√	11.65	11.65	8.0
EDTA		3.7	1.25	2.3	2.25	√	2.35	2.35	2.4
Sodium bicarbonate	2.4	1.2	1.25	1.25	1.00	√	1.75	1.75	1.2
Potassium chloride	0.4		0.75						
Acetilcysteine	0.05								
HEPES									9.0
BSA				5.0	3.00	√			2.5
TRIS				6.5	5.65		5.5	5.5	
Citric acid				4.1	2.00		4.1	4.1	
Cysteine				0.1	0.05	√	0.7	0.7	
Trehalose								1	
PVA							1	1	
Potassium acetate						√			
MOPS						√			
mOsm	290	380	330	240	282	290	275	300	309
pH		7.2	7.2		6.9	6.9			6.8

Table 1 Composition (g/l) of most common boar AI extenders (modified from Gadea J., 2003 [100]).

Semen extenders are added to the spermatic rich fraction of the boar ejaculate. Dilutions must be under 10 folds because high dilution rates reduce motility and viability [107], and ejaculates must be collected not more than twice per week. These prerequisites were established in 1984 by Martin Rillo [101, 102], who also suggested the insemination of females twice per oestrus to assure covering the ovulation period. Modern practice of pig AI does not manifest relevance in the use of pre-heated semen, for what the seminal dose can be introduced in gilts/sows at the temperature of refrigeration (15-17°C). In oestrus, the female can itself absorb the dose thanks to peristaltism of the uterine walls (autoinsemination) [111]. Doses contain sometimes semen of two or more boars without displaying negative interferences in sperm quality (heterospermic or pooled insemination) or are added additives to compensate the effect of dilution on seminal plasma. Nevertheless, semen destined to AI must be assessed for minimal values in **quality parameters** before doses be packed. Even when using commercial doses whose quality had been approved it is recommended to check the motility on-farm. The most important boar seminal quality parameters are shown in Table 2.



Quality parameters of boar semen	Optimal ejaculate value
Consistency	Milky to creamy
Color	Gray-white to white
Volume	50-500 ml
Sperm concentration	10-100 x 10 ⁹ spz/ejaculate (mean 0.25 x 10 ⁹ spz/ml)
Total motility	> 70% (> 62% progressives)
Abnormal Morphology (including cytoplasmic droplets)	< 20-30%
Cytoplasmic droplets (proximal and distal)	< 15%

Table 2 Main parameters assessed on refrigerated, raw boar semen for AI (from González-Urdiales et al., 2006 [78], Althouse GC., 1997 [108], Flowers WL., 1998 [109] and Crabo BG., 1997 [110]).

Boars are trained to mount on dummies for semen collection. During training of young boars the dummy is impregnated of boar semen, saliva or urine from a sow, although in the first months of training an oestrus female could be needed to encourage the boar [112]. The most frequent method for semen collection is the **gloved-hand method** (Figure 13).



Figure 13 On the left, a Piétrain boar mounting a dummy sow. On the right, collection of the spermatic rich fraction using the gloved-hand method (courtesy of Selecció Batallé®, November 2006).

In the gloved-hand method, 50 ml of semen extender at 35-38°C are introduced inside a sterile plastic bag, which is in turn placed into a tempered vessel. The collecting bag contains a filter to discard pre- and post-spermiatic fractions. In front of the dummy, the trained boar will start a sexual behaviour before mounting it. Zones around the penis should be cleaned to avoid urine contamination before grasping the penis outside the sheath to simulate penetration of the sow. Slight pressure on the prepuce will empty it from urine before ejaculation. The penis is quite long and spiralled at its end, and the boar could take 7 to 15 min to ejaculate 50-500 ml of semen. Only the spermiatic rich fraction is collected. A raw semen sample of 2 ml is stored whereas the rest of the spermiatic rich fraction is diluted in BTS at approximately 2:1; v:v. The raw semen sample is necessary to measure the concentration of the spermiatic rich fraction with the purpose of further diluting and packing it into doses of 3×10^9 spz and 80-90 ml, which will be delivered to the corresponding farms. Once collected, semen must be shipped and stored at 17°C (courtesy of *Semen Cardona SL*).

Sows naturally enter proestrus after weaning but it can be induced with external gonadotrophins to synchronize a large number of sows (equine chorionic gonadotrophin -eCG- or pregnant mare serum gonadotrophin -PMSG- to promote follicular development and human chorionic gonadotrophin -hCG- or GnRH to induce ovulation). **Time of ovulation** is calculated after detection of oestrus so that AI could be performed before degeneration of oocytes and within the lifespan of the extended semen. Sows are inspected once or twice per day after weaning and they are generally inseminated 24 h after detection of oestrus, some hours before ovulation takes place [113]. As assurance, they can be inseminated again 18-24 h later (around ovulation) even though if sows are inspected once per day it is better this period be shortened to avoid delays with respect to ovulation [112] (Figure 14). In cytometrically sorted sperm or in FT sperm it is recommended the first insemination be held 4 h prior to ovulation because of the lower sperm viability [114, 115].

Spermatozoa in the uterine horns reach each oviduct within 30 min after conventional AI [33], and within 1 to 2 hours from mating there is a sperm population large enough to fertilize [116]. In each oviduct there are reported two **sperm reservoirs**, the UTJ and the isthmus, where spermatozoa bind to oviductal epithelial cells and maintain their fertilizing capacity while waiting for ovulation. Those spermatozoa that cannot attach to these cells lose their membrane integrity before ovulation and are no further viable [116, 117]. There are many factors that determine whether a spermatozoon would bind or not to oviductal epithelial cells [117, 118] (Figure 15).

High numbers of spermatozoa are lost during the way to the oviducts due to vaginal reflux of semen (backflow [119, 120]) or phagocytosis in the uterus [121]. It is suggested spermatozoa must enter the oviductal sperm reservoirs before signalling components in seminal



plasma arrive to the uterus, which cause a massive recruitment of endometrial polymorphonuclear neutrophils (PMNs) to cleanse from pathogens and redundant spermatozoa [122]. It seems that spermatozoa that can bind to oviductal epithelial cells have certain factors from seminal plasma attached on their surface, which prevent from capacitation before reaching the sperm reservoirs and also interfere in the immunity of the female genital tract to tolerate these spermatozoa [122]. Their interaction with oviductal epithelial cells maintains them viable and uncapacitated for 24-42 h [123, 124].

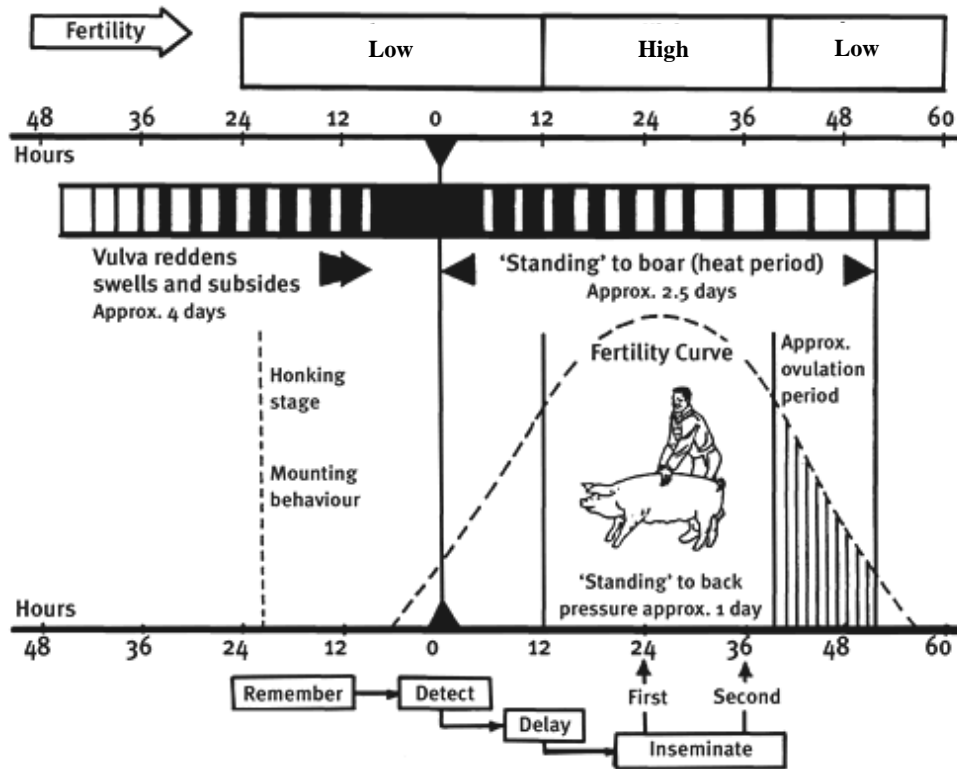


Figure 14 Timing of AI by detecting oestrus in gilts and sows (from *Queensland Primary Industries and Fisheries, 2009* [112]).

Fertilization occurs in the ampulla of each fallopian tube. Only sperm that has been capacitated after leaving the sperm reservoirs has the ability to recognize the oocyte and penetrate its zona pellucida [115]. Sperm capacitation is onset by the loss of seminal plasma and by the environmental conditions in the ampulla after ovulation. It consists of signalling events that promote the redistribution of lipids and proteins in the plasmatic membrane of sperm and the increase of the aerobic metabolism (oxidative phosphorylation) to obtain more energetic resources [125]. It later facilitates the acrosomal reaction to free the hydrolytic enzymes in the acrosome that digest the zona pellucida and let the spermatozoon penetrates the oocyte, helped by the hyperactivation of motility [126, 127]. Capacitation is a reversible process whereas the acrosomal reaction is not [125].

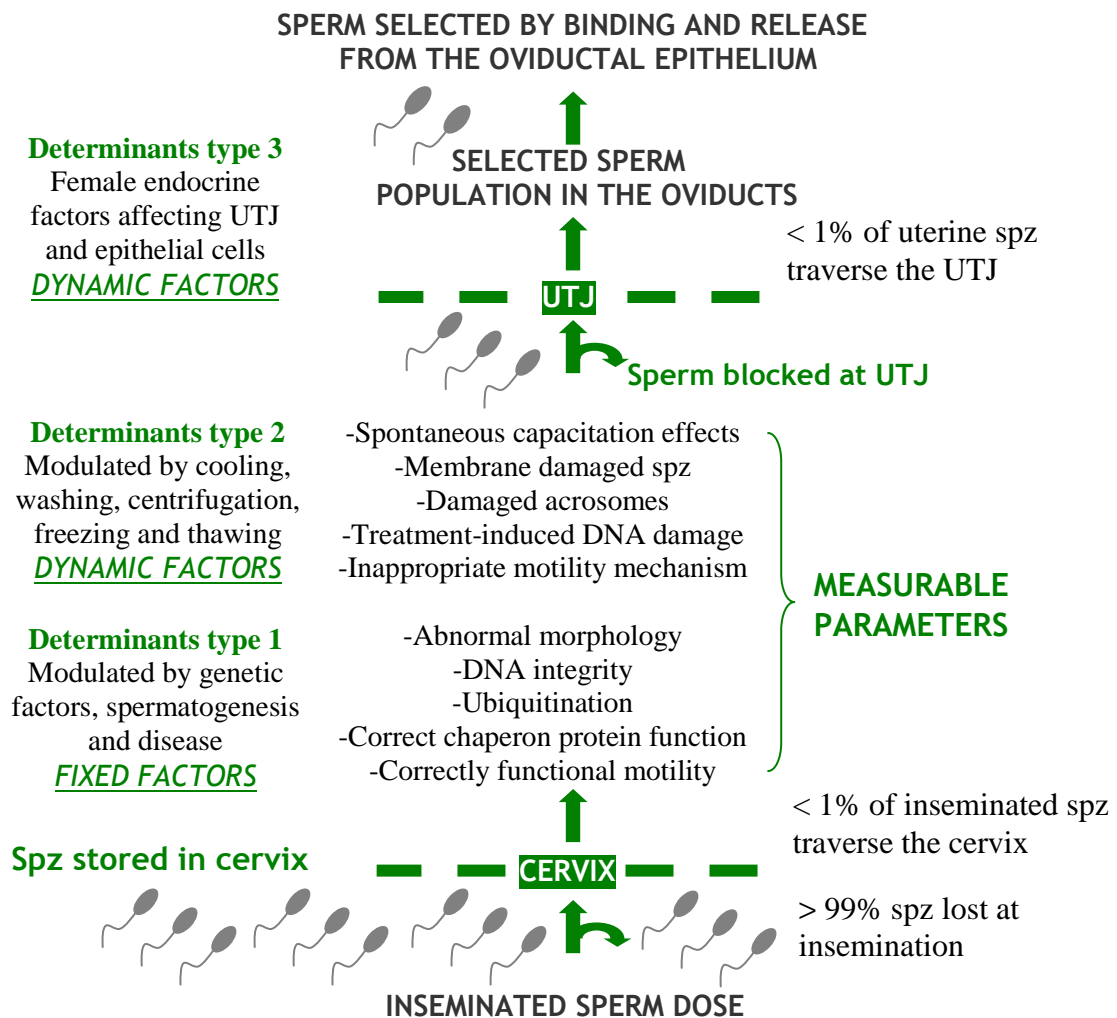


Figure 15 Factors mediating mammalian sperm selection in the female reproductive system

(modified from *Holt WV., 2009 [118]*).

If **pregnancy** occurs, approximately 12 from the average of 17 oocytes released from the ovary in the sow are attached to the uterine wall in form of blastocysts (days 11-16 from fertilization). Attachment failure is one of the reasons for litter size reduction. Before attachment the blastocysts can migrate from one horn to another [85].

A minimal of 4-5 embryos must be successfully implanted at day 40 to continue with pregnancy (starting of foetal period), and foetal death after this time results in expulsion or retention of the foetus. The skeleton of piglets retained starts a process of calcification called mummification (Figure 16). Each embryo implanted is surrounded by fluid-filled membranes that form the placenta [85] (Figure 17).



EMBRYO AND FOETAL DEATH AND THE CONSEQUENCES

Age and position of embryos	Failure	Result
Day 0 - Ovulation	No Ovulation	Anoestrus
Day 0 - Fertilisation	No Fertilisation	Normal 21 day return
Day 2 - Fertilised ova descend	Total embryo mortality prior to day 10	Normal 21 day return
Day 3 - Embryo size :0.2mm - 0.5mm	Only 5 or less embryos present at day 10	Delayed return to oestrus at 24 - 38 days.
Day 4 to 12 - Embryos move between horns	Implantation occurs but all embryos die before day 35 and are absorbed	Sow not in pig, pseudo pregnancy. Return between 40 - 70 days
Day 12 to 14 - Implantation (pregnancy) 5mm - 10mm	1 - 2 embryos survive after day 35	Litter size 1 - 2 pigs born Delayed farrowing
	All embryos die after day 35 Mummified A foetus dies after day 35	Sow pregnant but does not farrow Mummified



Figure 16 Pig embryo and foetal death (from *The Pig Site.com* [84]).

Pregnancy is diagnosed when females do not return to oestrus from the 18th day after AI (non-returning rate) and its verification is performed either by ultrasounds (from the 22th day) or rectal palpation (from the 30th day). Farrowing can be externally induced by PGF and will occur 18-36 h later. During parturition, piglets are released at intervals either in cranial (facing the vagina) or caudal (backwards the vagina) presentation (Figure 18). External oxytocin or manual removal of piglets also helps in delivering [33].

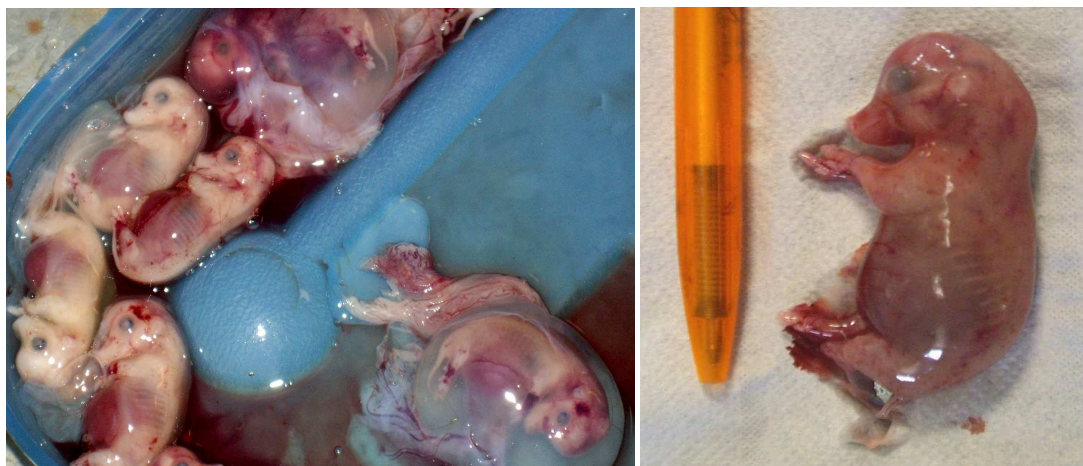


Figure 17 Aborted pig foetuses aged around 40 days. On the left, it can be observed two foetuses still surrounded by the placenta (courtesy of *Magapor® SL, July 2008*).

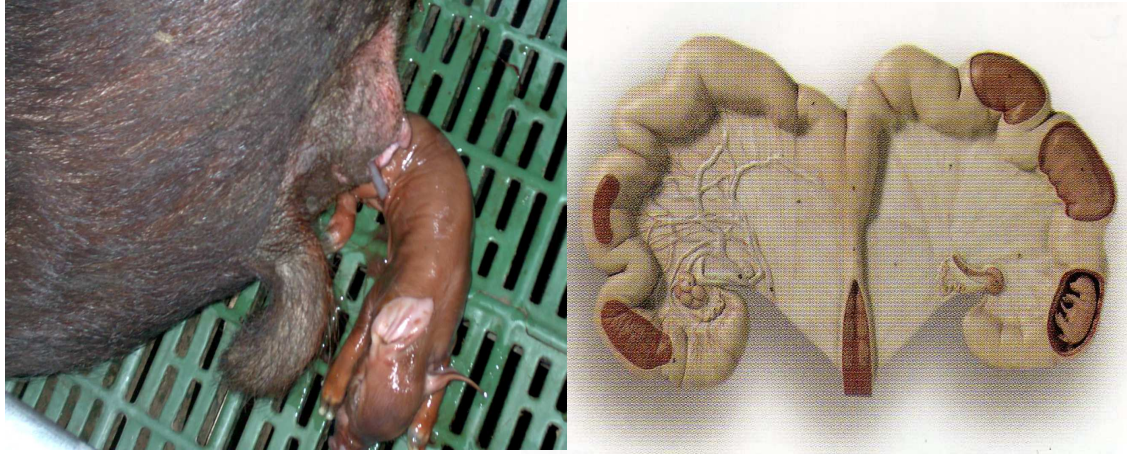


Figure 18 On the left, a piglet on cranial presentation during parturition (courtesy of *Selecció Batallé*®, February 2007). On the right, a model showing different foetuses in the uterine horns of a sow (courtesy of *Minitube*®, Germany).

Results of **fertility** after AI are frequently presented as non-returning rate (females inseminated that do not return to oestrus), pregnancy rate (females pregnant from the total inseminated), farrowing rate (females delivering from the total inseminated), and prolificacy (litter size in either born dead or born alive piglets). There are also other parameters to evaluate the reproductive performance (**Table 3**).

Reproductive Indices	Target	Interference Level
Wean-to-oestrus interval	< 7 days	> 10 days
Repeat services at 21 days	< 10%	> 15%
Abnormal returns to service (25-37 days)	< 3%	> 5%
Abortions	< 2%	> 2%
Farrowing rate	> 85%	< 80%
Live births/litter	10-12	< 10
Foetal death	< 5%	> 10%
Mummies	< 1%	> 2%
Weaned/litter	9.5	9
Prewaning mortality	< 10%	> 15%
Litters/mated sow/year	2.5	< 2
Pigs weaned/mated sow/year	≥ 23	< 20
Culling rate	30-50%	> 50%

Table 3 Reproductive indices used in swine herds (from *The Merck Veterinary Manual, 2008 [33]*).



Currently, three main pig **AI methods** can be performed depending on the site of sperm deposition: conventional or cervical AI (intra-CAI), intrauterine or post-cervical AI (post-CAI) and, deep intrauterine AI (DUI) [128] (Figures 19 and 20). Any AI device must guarantee a minimum concentration of 0.05×10^9 spz in the UTJ to maintain fertilization rates and normal litter sizes [131]. The device must be inserted upwards to avoid pressing the bladder of the female and its tip must anchor in the cervix folds to prevent backflow by stimulating, through contact, the peristalsis of the cervical walls during penetration [132]. The AI devices must fit the anatomical characteristics of the boar penis and the female reproductive tract. The vagina of the pig female is about 25-30 cm long depending on parity [133] whereas the cervix is longer than other species (15-25 cm) and full of twisted folds. The uterine body is short (5-15 cm) but prolonged into two large horns (50-120 cm) that end with the oviducts (4-8 cm) and the ovaries (1-2 cm) [77, 84, 128, 134]. Such anatomical structure allows storing both great volumes of semen and litters from 9 to 14 piglets, but it is in turn a selective barrier for spermatozoa, particularly in front of low-concentrated or low-viability sperm samples (e.g. cytometrically-sorted and/or FT sperm).

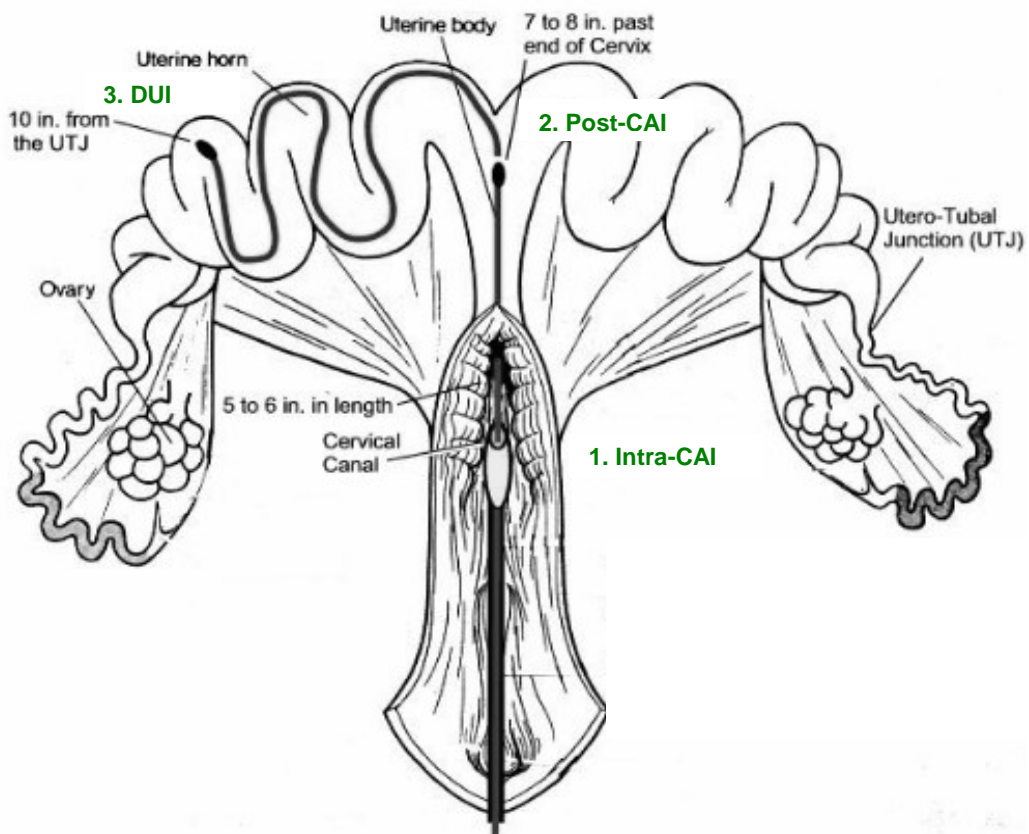


Figure 19 Schematic draw of the three main AI techniques in swine (from *Department of Animal Science, NCSU, 2002* [129]).

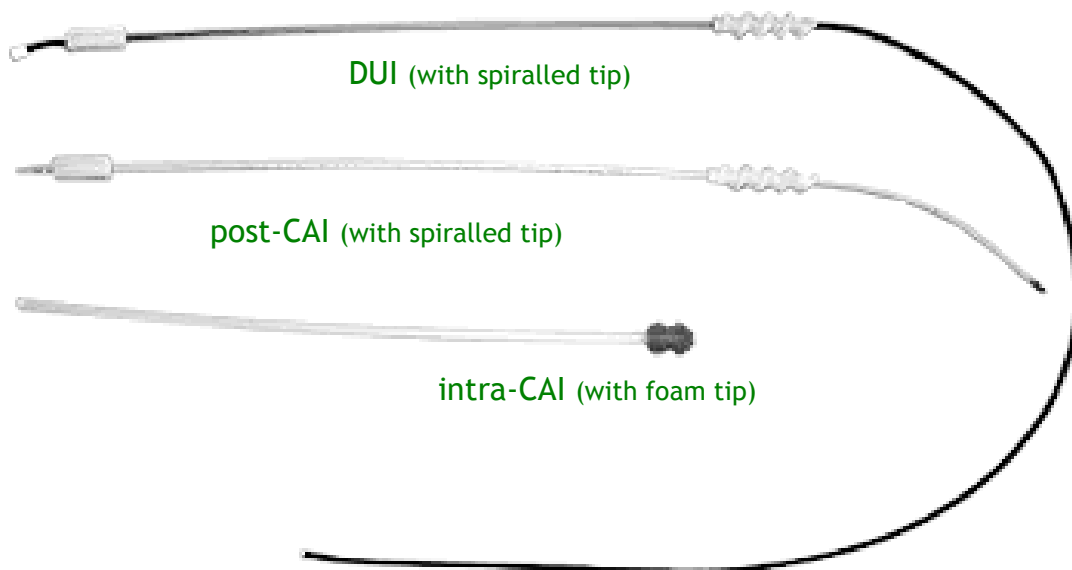


Figure 20 On the left, cervical insemination with a refrigerated semen dose (courtesy of *Selecció Batallé*®, February 2007). On the right, intrauterine insemination with a refrigerated semen dose (courtesy of *Magapor*® SL, June 2008). The last picture shows the devices used in the three swine AI techniques (picture modified from *Gil J.*, 2007 [130]).

In **intra-CAI** a cannula is inserted to deposit semen at the end of the cervix or at the entrance of the uterus, depending on the width of the cervical channel, like in natural mating.

- ⚡ Year introduction in swine: 1950s [94, 95], adapted from cattle.
- ⚡ Concentration of FS doses: 3×10^9 spz (lower threshold at 1.5×10^9 spz).
- ⚡ Volume of FS doses: 80-90 ml.
- ⚡ AI device characteristics: ~50 cm plastic rigid cannula ending with a plastic spiralled tip or with a foam tip to fit cervical folds. Approximated external/internal diameter: 7/4 mm.



- Best results achieved with FS: 80-90% fertility, pregnancy and farrowing rates; 10-14 piglets/litter.
- References: [62, 89, 90, 94, 95, 101, 102, 120, 121, 128, 130, 134].

In **post-CAI** semen is introduced directly in the uterine body so that the long way to the oocyte is shortened by placing the spermatozoa deeper than in intra-CAI. This fact provides advantages: less semen backflow, fewer sperm cells per dose and smaller dose volume [134]. These are interesting characteristics in order to optimize doses and particularly when working with cytometrically-sorted or with FT sperm, this last application exposed on **PAPER I**.

- Year introduction in swine: 2000 [135].
- Concentration of FS doses: $1-1.5 \times 10^9$ spz (lower threshold at 0.5×10^9 spz).
- Volume of FS doses: 30-50 ml (lower threshold at 15 ml).
- AI device characteristics: ~70 cm flexible fiberscope inserted in an intra-CAI cannula.
- Best results achieved with FS: 80-90% fertility, pregnancy and farrowing rates; 10-14 piglets/litter.
- References: [128, 130, 134-139, 140, 142, 143].

In **DUI** semen is deposited at the proximal segment (2/3 way up) of one uterine horn, about 25 cm from the uterotubal junction. This technique shares the advantages of post-CAI adding lower loss of sperm, for what it requires even less semen volume and concentration than post-CAI [144]. These characteristics make it, nowadays, the method of choice to inseminate with FT and/or cytometrically-sorted sperm. However, lower concentrations than 0.6×10^9 spz per dose compromise the litter size due to the occurrence of unilateral or partial bilateral fertilizations, that is, foetuses located in only one uterine horn or with less representation in one horn than in the other.

- Year introduction in swine: 2000 [145, 146].
- Concentration of FS doses: 0.6×10^9 spz (lower threshold at 0.15×10^9 spz)
- Volume of FS doses: 20 ml (lower threshold at 7.5 ml).
- AI device characteristics: ~180 cm flexible fiberscope inserted in an intra-CAI cannula.
- Best results achieved with FS doses: 80-90% fertility, pregnancy and farrowing rates; 9-12 piglets/litter.
- References: [128, 130, 134, 144-152].



3. CRYOPRESERVATION OF PORCINE SPERM

3.1. Physics of freezing in living cells

Taking apart technologies that are emerging, living cells can currently be preserved up to 15 days in refrigeration (liquid storage) or for longer by freezing water inside them [128]. There are two ways for freezing cells: **cryopreservation** (ice-equilibrium freezing) or **vitrification** (ice-free freezing). This section approaches to the physics of ice-equilibrium freezing, which is the technique employed in the present thesis.

In ice-equilibrium freezing the freezing or nucleation point of solutions is the temperature at which the first crystals of ice appear. The term “nucleation” refers to the spontaneously growth of a water ice crystal from a “seed” particle or from a cold surface, a frozen point that provides for the configuration of the ice structure around it, which is called “seeding”. Two events can take place during cryopreservation mainly depending on the nature of the solution and the characteristics of freezing: typical freezing or undercooling.

In **typical freezing** (Figure 21, blue line) the temperature of a solution rapidly decreases but after nucleation it reaches a plateau, establishing a temporary equilibrium between cooling (freezing) and warming (latent heat of ice fusion) since ice formation is an exothermic process. This plateau is a bit inclined in solutions, where particles are found between water molecules, since the more ice crystals are formed the more concentrated the solution becomes and thus it is more difficult to attach water molecules to form ice (the freezing point progressively decreases). Contrarily, the plateau is horizontal in the case of pure water where no particles are



found and thus it is easy to grow an ice crystal once nucleation is onset. When all water in the solution has solidified and the latent heat of ice fusion has dissipated the equilibrium breaks and the temperature decreases again.

In **supercooling or undercooling** (Figure 21, red line) solutions cool far below their freezing point without nucleation because of different factors (e.g. rate of cooling, molecules of solute, liquid volume) [153]. Undercooling occurs when there is no seeding surface to impose the crystalline ordering of ice on the atoms of water. Without this point, nucleation does not occur and the solution undercools until solidifying at a given temperature (glass transition temperature) as an amorphous structure (glassification to metastable glass). As it is a metastable structure, nucleation has increasing probabilities to occur spontaneously as the solution is cooled. Once nucleation takes place the ice crystalline structure is propagated like a wave from the nucleation point [154]. Although nucleation in undercooled solutions is onset at lower temperatures than in typical freezing, the equilibrium plateau during ice formation localizes, as in typical freezing, at the freezing point of the solution. Because of the difference between the temperature of the undercooled solution and its freezing point, the solution warms to its freezing point at a faster rate than if not undercooled to abruptly return, after the latent heat of ice fusion has dissipated, to the temperature of undercooling.

Such high warming/cooling rates are not desirable in living cells, as it will be explained later. In those cases induced nucleation can be eventually performed at the start of cryopreservation, thus avoiding abrupt changes in temperature [153]. Some animals that survive freezing include proteins in blood that act as nucleation points [155]. Undercooling can additionally be minimized by freezing cells into containers with high surface/volume ratio, like the 0.5 ml straws in which FT sperm is packed. The wall of the container acts as a nucleation point so that there is uniform expansion of the ice wave and progressive dissipation of the latent heat of ice fusion [156].

Avoiding undercooling is one point to pay attention with for a successful freezing of living cells in ice-equilibrium freezing, but survival of cells being frozen is attached to many other parameters that cannot always be controlled. The ice-equilibrium freezing is characterized by the coexistence of two phases or fractions in the solution: an unfrozen fraction and a crystal fraction. Cells are excluded from the ice crystals of the solution and migrate to the unfrozen fraction where they are exposed to a number of stress factors: reduction of temperature, increase in solute and ionic concentration, dehydration, gas bubble formation, viscosity, changes in pH, etc. These events determine a cellular response based in membrane lipid phase changes, depolymerisation of the cytoskeleton, osmotic shrinkage, solubilisation of membrane proteins, uncontrolled diffusion processes, mechanical damage to membranes and cytoskeleton, denaturising of proteins, etc. [153, 157].

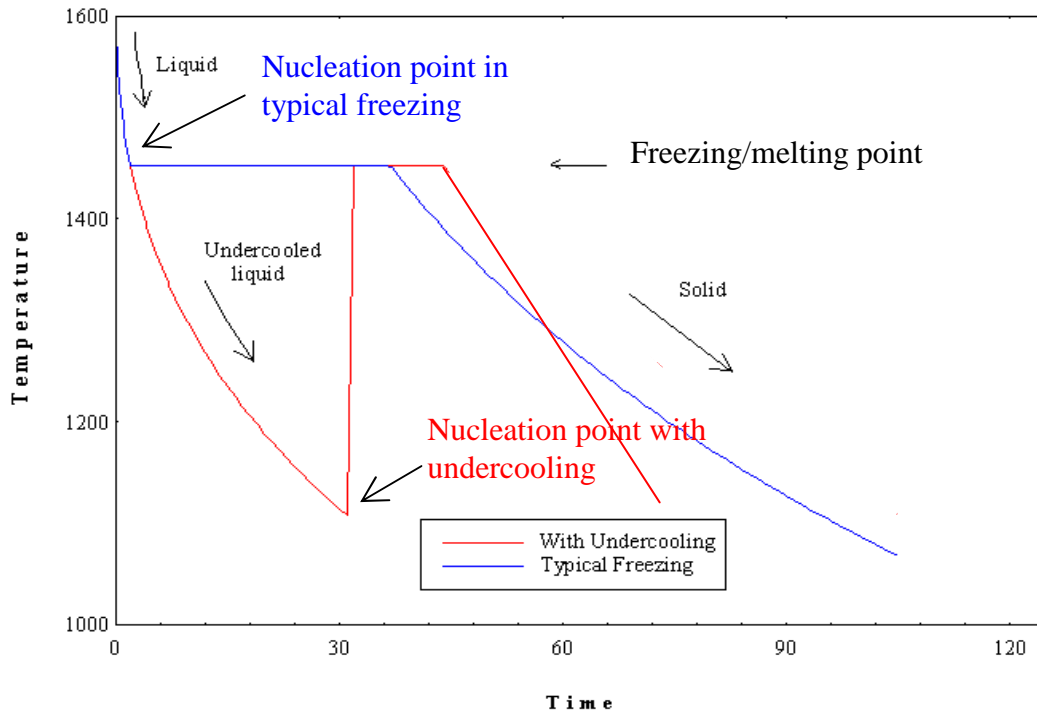


Figure 2.1 Plot representing solidification of undercooled and non-undercooled solutions

(modified from *National Aeronautics and Space Administration (NASA)* [154]).

The **osmotic response** of cells is considered the first determinant of cell resistance in front of ice formation in the solution [153]. The osmotic pressure is given by the temperature and the number of particles of the solution, according to the formula:

$$P = R \times T \times \sum C,$$

where P is the osmotic pressure, R the constant of gases (8.314472 J/K mol), T the temperature and C the concentration. As the extracellular medium is frozen after nucleation, it becomes more concentrated and water tends to flow out of the cell because of the increase in the osmotic pressure, so the cell is progressively dehydrated [158, 159]. The amount of water loss depends on two kinds of factors that affect the cell water permeability: intrinsic (i.e. osmolality of the intracellular solution, ratio cell surface/volume, water permeation coefficient of the membrane -Lp-, cytoplasm water content) and extrinsic (i.e. osmolality of the extracellular solution and rate of cooling). The intrinsic factors are given by the cell type. In 1971, Meryman proposes cells can be dehydrated to a minimal volume, the osmotically inactive volume, which is determined by the cytoskeleton [160]. A cell cannot respond to the osmotic pressure beyond this volume and this provokes the rupture of the plasmatic membrane. It has been determined the 67% of the total cell volume (both liquids and solids) and the 23% of water in boar sperm



are osmotically inactive, the L_p being 0.84-1.03 $\mu\text{m}/\text{min atm}$, which is consistent with the impairment of the boar spermatozoon under 210 mOsm/Kg [161, 162]. To avoid major damage to cells the extrinsic factors can be controlled and adapted to their osmotic response. On one hand, the osmolality of the extracellular solution can be modified by the addition of colligative cryoprotectants [158] (see section 3.2). On the other hand, the cooling rate can be adapted to the characteristics of cells, taking into account the **Two-Factor Hypothesis** of freezing injury postulated in 1972 [163]. This hypothesis exposes that under too fast cooling rates, as it occurs in undercooling, water in the cell have no time to flow out and intracellular ice is formed, which damages the organelles, particularly in cells with low surface area to volume ratio (low permeability). Under too slow cooling rates water can flow out of the cell so that ice crystal formation inside is prevented, but in turn the cell is dehydrated to the minimal volume and exposed too much time to pH changes and to the cryoprotectant toxicity ("solution effects"), what breaks its membrane and alters its functions. At this respect, the optimal cooling rate is the one adapted to the osmotic response of the cell to minimize dehydration and to avoid intracellular ice (Figure 22).

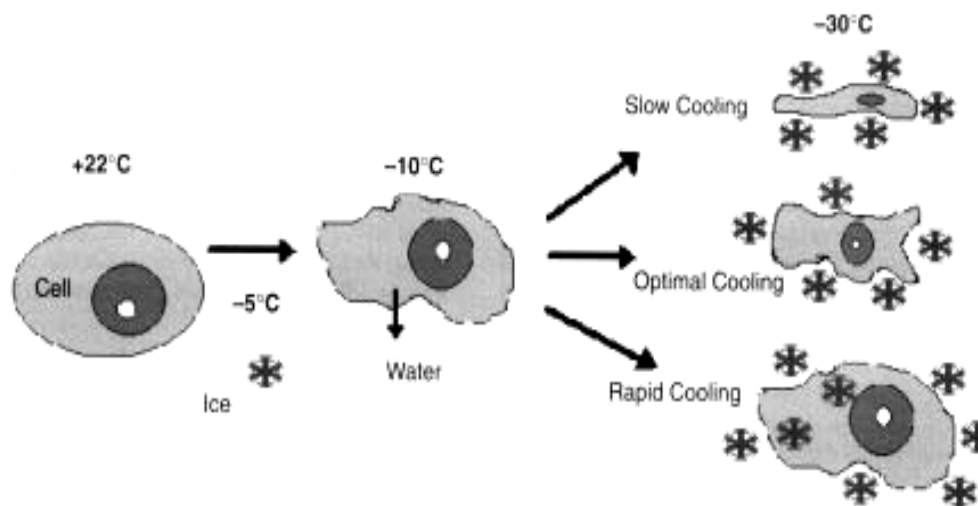


Figure 22 Possible events in cells during freezing (from *National Academy of Sciences*, 2000 [159]).

An **optimal cooling rate** must fit the complex osmotic properties of the living cell that is being frozen, for what it does not consist of a linear decrease in temperature but rather in different cooling rates that form a curve following the non-linear physical changes in the extracellular solute concentration and in the permeability of the cell membrane through decreasing temperatures [164, 165]. The optimal cooling curves of different cell types and species are exposed in Figure 23. Bull, ram, boar and stallion sperm are sensitizer to cryopreservation than dog, cat, rabbit or human sperm [166]. Most cells can only diffuse water through the phospholipid bilayer but the red blood cells particularly tolerate high cooling rates because they can rapidly expel the intracellular water through water channel proteins (aquaporins) [167].

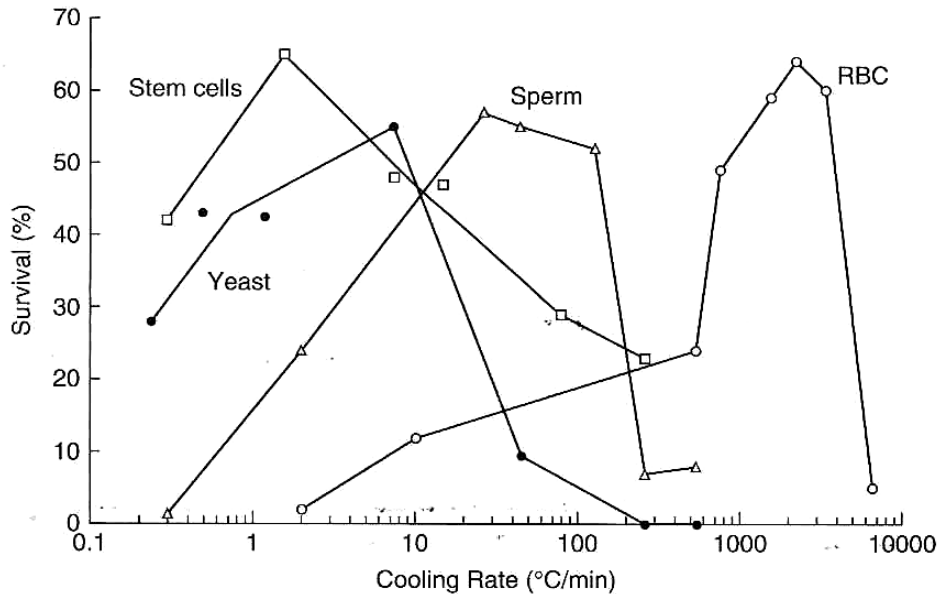



Figure 23 Survival of different cell types depending on the cooling rate. RBC= red blood cells (from *Physical parameters of cooling in cryonics, review 1990-2005 [167]*).

It is no lesser important that even an optimal cooling rate has been applied an **optimal thawing rate** be achieved [158]. During thawing, cells are rehydrated because there is an abrupt decrease in the extracellular concentration due to ice melting. Cell survival during thawing basically depends on the tolerance of the cell to the cryoprotectant toxicity and on the mechanical response of its membrane when returning to physiological conditions [170]. The toxicity of the cryoprotectant is not a common problem during thawing since it is further diluted in the thawing media. When thawing, rapid warming rates are applied to prevent recrystallization (conversion of little ice crystals into large ones that will shrink the cell) but even so it does not guarantee the recovery of the cell if irreversible damage has occurred during freezing.

Finally, one may wonder why not storing living cells at -80°C instead of cryopreserving them at -196°C . This preference is due to the higher stability of ice below -100°C , which avoids any possible recrystallization [171]. Moreover, storage of frozen samples in liquid nitrogen (-196°C) prevents from thermal reactions and only the slow ionization from radiations would probably become damaging after centuries [158, 172]. Cryopreservation, however, does not kill microorganisms with high cryotolerance and with resistance to antibiotics in the cryopreservation medium, so there is literature that recommends performing bacteriological controls on samples before freezing [173].



3.2. Cryopreservation of boar spermatozoa (I): milestones, freezing extenders and applications of the process

 Spallanzani was in the XVIIIth century the first to freeze spermatozoa and to perform AI [174]. He made observations on the recovery of sperm cells frozen in the snow and proved the role of spermatozoa in fecundation. The interest on FT sperm destined to AI increased in 1932, particularly in cattle, when Milovanov and Selivanova [175] and Bernstein and Petropavlovsky [176] discovered the use of egg yolk and glycerol, respectively, as cryoprotectants. Jahnel implemented the liquid nitrogen in 1938 for sperm cryoreservation [177, 178] and the Danish Sorensen engineered in 1940 a straw for packaging sperm, with a high surface that allowed a uniform nucleation to reduce undercooling [179]. Polge and collaborators pioneered the science of AI with boar sperm [95] and were also the firsts in 1970 to achieve farrowing with boar FT sperm after AI through laparotomy [180], seventeen years later than in human [181]. In 1971, different scientists (Crabo and Einarsson [182], Graham et al., [183] and Pursel and Johnson [184]) performed AI in swine using the first cervical catheters and in 1975 two different boar sperm cryopreservation methods were developed: the American or **Beltsville method** (Pursel and Johnson [105]) and the German or **Hülsenberger method** (Westendorf et al., [185]). Both are based on the use of freezing extenders containing the following substances as cryoprotectants (CPAs): egg yolk, glycerol, and Orvus-ES[®] or Equex STM[®] Paste (commercial concentrated synthetic soap detergents in paste form to emulsionate lipids in the egg yolk. They contain sodium dodecyl sulphate). However, the two methods differ in the type of sugars in the freezing extender and in the mode of cryopreservation [186]. The Beltsville method is based in the addition of glucose and freezes sperm in the shape of round pellets inside holes made on carbonic ice. The Hülsenberger method uses lactose and packs semen into straws that are frozen over vapours of liquid nitrogen. This last is the most extended method nowadays.

For better control of the cooling rate **programmable freezers** were first used with boar semen in 1989 [187]. Modern cryopreservation protocols for boar sperm involve a slow descend from 17°C to 5°C in the freezing medium during which the egg yolk interacts with sperm. This period, lasting 3 h, could be actually reduced [188]. It follows a slope from 5°C to -150°C, after including glycerol and Orvus-ES[®]/Equex STM[®] Paste in the freezing medium, that can be performed using different cooling rates [189]. It usually includes few seconds standing at -80°C, which is near the glass transition temperature of glycerol to allow its correct glassification [167, 190]. Johnson et al., [191] proved in the year 2000 that the boar semen retained for a minimum of 2-7 h at 17°C in its seminal plasma before cryopreservation, commonly called "holding time", acquired more resistance to **cold-shock**, a property that had already been described many years before [192, 193]. The benefits of seminal plasma on sperm fertility are also reported when it is added to the thawing solution that recovers sperm after cryopreservation, as first

reported Larsson and Einarsson in 1975 [194]. It is thought some effects of cold-shock are reversed by certain factors in seminal plasma [195, 196].

The **freezing extenders** are based on those used in FS with the inclusion of the so-called CPAs, which are substances that minimize the effects of cold-shock. CPAs can be classified as colligative (osmotic protection. They increase the number of solute particles) or non-permeable (membrane stabilizers). The CPAs had been discovered in fluids of ectothermic animals living in cold environments [155, 197].

Colligative CPAs prevent the expansion of ice by diffculting the addition of water molecules to the ice crystals growing, so they avoid the increase in the concentration of the extracellular solution and the cellular dehydration: glycerol (also called glycerine or glycerin), lactose, sorbitol, glucose, ficoll (polymer of sucrose), etc. They are permeable to cells and relatively non-toxic at concentrations around 1M [163]. Polge, Smith and Parkes were the first in 1949 to test the benefits of glycerol in the cryopreservation of sperm [198].

Non-permeating CPAs stabilize proteins and lipids in the plasmatic membrane to prevent the entrance of ice: egg yolk, dimethyl sulfoxide (DMSO), bovine serum albumin (BSA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), etc. The introduction of egg yolk and DMSO in FT sperm was not until 1964 [199-202]. These CPAs will not protect in the absence of colligative CPAs but increase their effectivity and avoid its use at toxic concentrations [163]. Low density lipoproteins (LDL) in the egg yolk are supposed to increase the ratio cholesterol:unsaturated phospholipids in the sperm membrane and thus they help in preserving its integrity [203-206].


In veterinary medicine, cryopreservation is strongly linked to the development of AI [207]. Pregnancy rates and litter sizes are reduced when using cryopreserved boar sperm so its use is limited to special breeding programs [89]. Despite the first farrowing with FT boar sperm was achieved in 1970 [180], in the year 2000 the 99% of inseminations in swine were still performed with FS, whereas in cattle almost the 100% of inseminations were performed with FT sperm [191]. Still today, the sensitivity of boar sperm to cold-shock and the cost of FT sperm doses, due both to the technology required and to the maintenance of nitrogen containers [186], have restrained the expansion of cryopreservation in the swine market. However, the cryopreservation of sperm has different points of interest even in swine [206]:

- ☞ Indefinite storage of sperm.
- ☞ Safety exchange of genetic material across long distances.
- ☞ Higher sanitary control.
- ☞ Sperm banking: preservation of endangered species and high-value genetics.
- ☞ Stock of semen available for periods of low production.



Latest works on the improvement of boar sperm cryopreservation in the last decade are being led by a large number of groups worldwide.

3.3. Cryopreservation of boar spermatozoa (II): challenges

 Boar sperm presents particular features that characterize it as the mammalian spermatozoon with the lowest ability to survive cryopreservation (poor **freezability**).

During cryopreservation sperm migrates to the unfrozen fraction of the solution (see section 3.1.) ([Figure 24](#)). Despite the freezing medium prevents from ice formation there are many other factors during cold-shock that affect the integrity of sperm, the most important related to membrane lipid phase changes and osmotic shrinkage, which induce the main posterior sperm injuries [[153](#), [209-213](#)]. The morphology of sperm is one of the parameters in boars that influence in the sperm resistance to cold-shock, since abnormalities on head shape and volume are attached to a poorer tolerance in front of osmotic changes [[214-217](#)]. The ability of boar sperm to regulate its volume during exposure to hypertonic conditions, as occurs during ice-formation, is important for the correct sperm functionality and has serious implications in cryopreservation [[218](#)].

The capacity of the spermatozoon to regulate its volume is compromised during cold-shock because freezing produces a phase transition in plasmatic membrane lipids, from liquid-crystalline to jellified, at a given temperature depending on the lipid, so that the selective permeability of sperm is interfered [[219](#)]. Certain lipids that are still in liquid phase become entrapped between jellified lipid phases, these lasts having such condensation of lipids that exclude the transmembrane proteins from their structure. The permeability of sperm to water and ions becomes dramatically increased at the unsealed junctions between different lipid phases, especially in the sperm head [[220](#)]. It is reported that cholesterol interferes in the condensation of the jellified phases and hence it helps in decreasing the permeability at the junctions between phases [[221](#), [222](#)]. Contrarily, the permeability is enhanced by unsaturated phospholipids, which contain double bonds that increase the lipid fluidity and facilitate the apparition of membrane pores [[223](#)]. Such lipid clustering into jellified phases is observed in mammalian sperm plasmatic membrane from the 5°C during cryopreservation. It is only partially reversed after thawing because the original distribution of molecules is not restored even in the presence of egg yolk and glycerol [[224](#)].

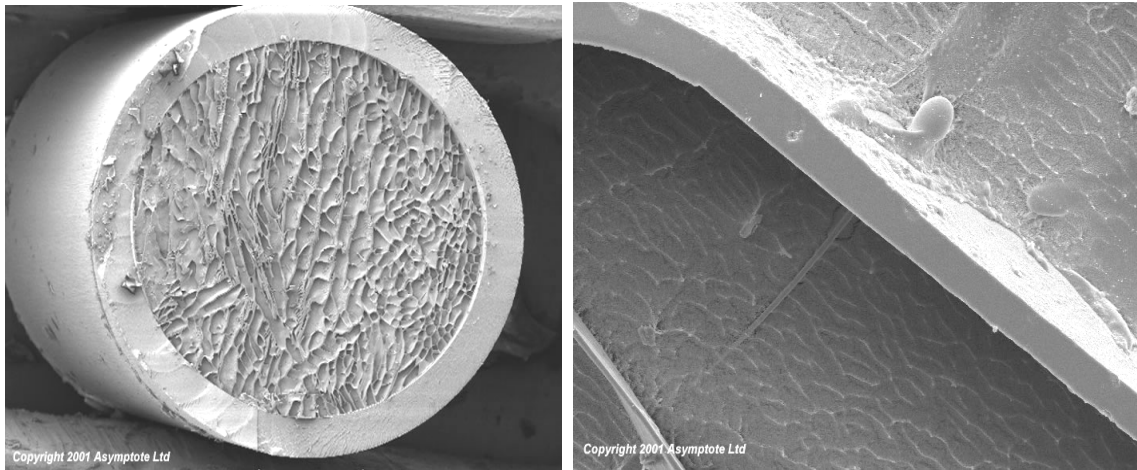


Figure 24 On the left, electronic microscopy capture of a cross fracture on a 0.25 ml straw, revealing the structure of the matrix of frozen concentrated freezing medium (glycerol/egg yolk). The spaces were previously occupied by ice. On the right, a frozen human sperm cell entrapped in frozen concentrated freezing medium with the tail and head into the spaces previously occupied by ice (Copyright©2008 Asymptote Ltd. [208]).

The boar sperm plasmatic membrane is particularly prone to form jellified phases since it has one of the lowest cholesterol to phospholipid molar ratio among species (0.26) [225, 226] and it also has a high content of unsaturated phospholipids [227-230]. Lipoproteins in the egg yolk supply this shortage to a certain extent and protect some functions of the spermatozoon [231]. The particular composition of the boar sperm plasmatic membrane is probably derived from its maturation in the epididymis, which is known to decrease the content of cholesterol in membranes [232]. At this respect, it is demonstrated the boar sperm becomes more sensitive to cold-shock as it matures in the epididymis [233].

The increase in permeability of the boar sperm plasmatic membrane during cryopreservation together with the rise in the concentration of the freezing medium contribute to uncontrolled flux of water across the spermatozoon that decreases even more the membrane stability. Altogether triggers the influx of ions in boar sperm whose effects resemble the events of capacitation [234]. This “premature” capacitation during cold-shock, called **cryocapacitation**, interferes in the response of sperm to the signalling events required for fertilization and its survival in the oviducts [234-236]. Similitudes of cryocapacitation with true capacitation in boar and other mammalian sperm are reviewed by Bailey et al., 2000 [237] and Green and Watson, 2001 [234], and include:



➤ Increased sperm plasmatic membrane permeability to ions

Calcium and bicarbonate influx increase during true capacitation [238-240], the influx of calcium being mediated by a calcium-ATPase [241-243]. Freezing sperm also increases calcium uptake [231].

➤ Reorganization of the sperm plasmatic membrane and cholesterol release

The calcium and bicarbonate influx during true capacitation onsets signalling pathways that promote lipid reordering of the sperm plasmatic membrane and cholesterol efflux, especially in the sperm head [244, 245]. This reorganization resembles the lipid phase packaging produced during cold-shock. In true capacitation, the lipid reordering form microdomains (lipid rafts) enriched in cholesterol [44, 246]. The formation of these lipid rafts may facilitate cholesterol efflux mediated by albumin and seems stimulated by bicarbonate-mediated exposure of phosphatidilserine and phosphatidiletanolamine from the inner to the outer sperm plasmatic membrane [247-251]. Cholesterol releasing increases the fluidity of the sperm plasmatic membrane to ions and mediate posterior events in capacitation to facilitate the fusion of the outer acrosomal membrane with the plasmatic membrane during the acrosomal reaction preceding fertilization [126, 252]. The exposure of phosphatidilserine and phosphatidiletanolamine [253] and the cholesterol content decrease [228] is also observed after cold-shock in boar sperm, what explains the acrosomal sensitivity during this process [254]. It seems this lipid reordering in cryocapacitation is reversible and could be partially restored or prevented by seminal plasma [195, 196]. In some cases it has been observed that the true capacitation in boar sperm is achieved in the absence of bicarbonate [255]. This fact might be due to the poor cholesterol content of the boar sperm plasmatic membrane, which accounts for a greater fluidity compared to other mammalian sperm that might facilitate the consecution of true capacitation even in the absence of cholesterol efflux. It would also simplify the achievement of cryocapacitation.

➤ Signalling cascade for protein phosphorylation

The influx of ions also stimulates a cascade of signalling events leading to the activation of protein kinases (PKs) that in turn activate, by phosphorylating Tyr/Ser/Thr residuals, proteins involved in capacitating events like the hyperactivated motility [255-257]. The hyperactivated motility has been also observed in cold-shocked sperm, as reviewed in **PAPER II**.

➤ Release of reactive oxygen species (ROS)

During true capacitation there is an increase in the oxidative phosphorylation in the midpiece to produce the ATP required for the hyperactivated motility, with a boost in ROS production [258]. The rise in ROS is also observed during cryocapacitation. In this case it is suggested ROS derived from the oxidative phosphorylation are reduced during cryopreservation due to impairment of the mechanism whereas, paradoxically, the decrease in the mitochondrial

potential that provokes this impairment opens mitochondrial pores through which ROS are released together with other factors [258].

Apoptotic-like features

Death of cells through accidental injuries is called necrosis whereas apoptosis involves signalling pathways for a programmed cell death. The apoptosis is characterized by a decrease in mitochondrial potential, release of pro-apoptotic factors from mitochondria, caspase activation, increase of plasmatic membrane permeability, DNA fragmentation and, phosphatidilserine exposure. Some of these processes occur in true capacitation. Recently, markers of apoptosis have been also related to freezability in canine sperm [259] and in equine sperm [260]. These features have been reported in cryopreserved sperm in other mammals, except the DNA fragmentation [258, 261-269]. Despite it has not been found DNA fragmentation certain damage occurs on the nuclear structure of cryopreserved boar sperm [270]. It has been proposed in bulls the cryopreserved sperm displays an “apoptosis-like” mechanism since only the earlier degradation phases of apoptosis are observed, determining a sublethal sperm state [264]. In fact, there are evidences indicating that apoptosis only operates during spermatogenesis and not in ejaculated sperm, in which the high compaction of DNA difficults its fragmentation [271]. Moreover, some studies have reported the phosphatidilserine externalization in sperm is caspase-independent [247, 249] and more related to capacitation than to apoptosis [265]. However, it is confirmed that true capacitation and apoptosis share some processes and molecules [272, 273], and evidences in cryopreserved sperm suggest it also occurs in cryocapacitation.

In [Figure 25](#) are showed hypothetical signalling pathways of true capacitation that may be also triggered by cold-shock. A study on FT sperm of the molecules participating in this cascade of events would serve to disclose if they are also involved in cold-shock.

Apart from lipid phase changes and osmotic shrinkage, collateral damages produced on sperm during cold-shock should not be forgotten and some of them have been mentioned yet, e.g. decrease in mitochondrial membrane potential [301], membrane lipid peroxidation [231], chromatin unstability [302] and motility and viability impairment [212, 303, 304]. Frequently, it results in half of the boar spermatozoa be dead after cryopreservation [234]. Altogether alters the fertility of sperm, with a reduction in farrowings of about the 20% [305].

The reproductive performance of sperm is sometimes secondary in front of the genetic excellence of individuals when investing in the creation of a frozen sperm bank. Because of it, it is of no lesser importance, compared with the optimization of the cryopreservation protocol, to consider the optimization of the AI technique to overcome the weakness of FT sperm, particularly by [186]:



- 🔧 Synchronizing the ovulation of sows and setting proper insemination timing.
- 🔧 Using intrauterine insemination techniques to optimize doses.

This question is discussed in **PAPER I**. Most assays with boar FT sperm in the last decade report farrowing rates over the 70%, which is near those obtained in bovine **[186]**. To achieve such successful farrowing rates selection of the freezability of ejaculates is also of utmost importance, as it has happened in bovine **[186]**.

Despite boar sperm is the most sensitive to cold-shock among mammalian sperm, there are also differences among breeds, individuals and ejaculates **[306-308]**. That is, some boar ejaculates can freeze without considerably losing its sperm quality. In general terms, there are **good freezability** boars and **poor freezability** boars **[309]**, a terminology currently applied to the level of ejaculates. Differences in field fertility between good and poor freezability boar ejaculates are reviewed in **PAPER I**.

Although the improvement of the cryopreservation protocol is a major factor in the gain of freezability in the last decades **[192, 310]**, it is generally accepted the existence of a genetic basis for boar sperm cryosurvival **[311-313]**. At this concern, it is proposed that differences in the resistance to freezing could be subjected, for example, to the morphology of the sperm head **[214]** or to the amount of long-chain polyunsaturated fatty acids in the sperm plasma membrane **[314]**. These findings remind of characteristics of the boar spermatozoon that account in the acquisition of the cryocapacitated status. Developing new tests to detect variations at a molecular level between ejaculates with different freezability has the purpose to determine the freezability of an ejaculate before the cryopreservation process takes place. These tests should be set on the molecular bases of cold-shock, which probably lay on similitudes between cryocapacitation and true capacitation and even with respect to apoptosis. This point is developed in **PAPERS II** and **III**, which describe studies on the location and expression of three molecules: the glucose transporter protein GLUT3 **[294, 315, 316]**, the heat shock protein HSP90AA1 **[297, 298, 317]** and, the antioxidant enzyme Cu/ZnSOD **[272, 318]** (**Figure 25**).

Image: Particular source

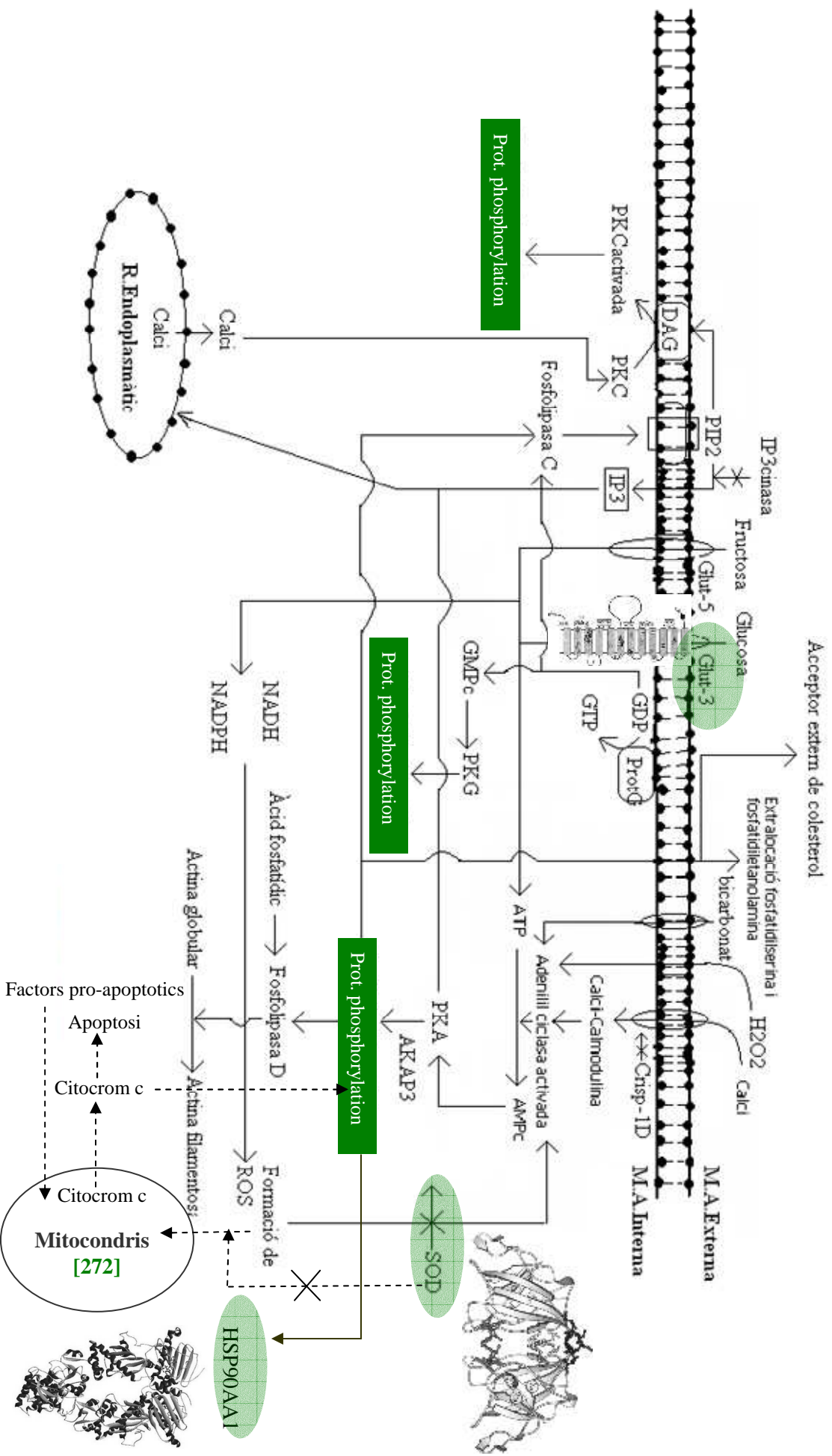


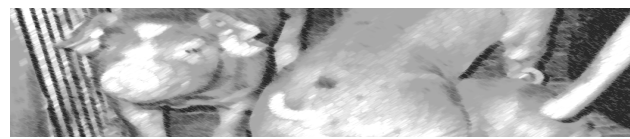
Figure 25 Hypothetical signalling pathways during the phosphorylation of protein residuals (highlighted) that activate proteins involved in capacitating and apoptotic events. Alterations occurred during cryocapacitation may also concern such metabolic cascade. The three molecules shadowed are object of study in this thesis. (Sources: [255, 272-300]).



Objectives

This thesis proposes four main objectives according to challenges that currently concern boar sperm cryopreservation, as exposed in the bibliographic revision. Three papers have been published in response to these four objectives, which are named at the end of each point.

1. Comparing good freezability ejaculates (GFEs) and poor freezability ejaculates (PFEs) in terms of field fertility using fresh semen (FS) controls and frozen-thawed (FT) sperm.
PAPER I
2. Testing the efficiency of the post-cervical artificial insemination (post-CAI) with FS controls and FT sperm. **PAPER I**
3. Searching for predictors of the ejaculate freezability by assessing, both in GFEs and in PFEs and in three steps during the cryopreservation procedure (17°C, 5°C and at 240 min post-thaw), conventional sperm quality parameters and the location and reactivity under the microscope of three proteins in sperm: the facilitated glucose transporter 3 (SLC2A3, alias GLUT3), the heat shock protein 90-KDa alpha A1 (HSP90AA1) and the copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD). These proteins are related to the sperm physiology and have potential roles in cryopacitacion. **PAPER II**
4. Quantifying through the western blot technique the expression of the three proteins, both in GFEs and in PFEs and in the three steps mentioned in objective 3, to determine their potential as freezability predictors.
PAPER III



Paper |

Animal Reproduction Science 2010 Mar;118(1):69-76

Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability

Image: Duroc piglets (own work)

I. Casas, S. Sancho, M. Briz, E. Pinart, E. Bussalleu, M. Yeste and S. Bonet. "Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability". *Animal Reproduction Science*. Volume 118, issue 1 (March 2010) : p. 69-76.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.003>

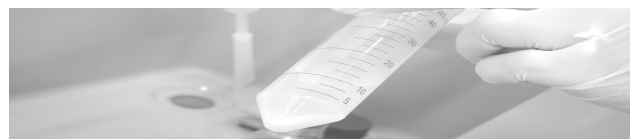
Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm),
Department of Biology, Institute of Food and Agricultural Technology,
University of Girona, Campus Montilivi, Girona, Spain

Received 4 December 2008; revised 3 June 2009; accepted 8 June 2009. Available online 17 June 2009.

Abstract

This study compared the field fertility outcomes in frozen–thawed (FT) sperm from boar ejaculates with different freezability (good, GFE/poor, PFE) while testing the reliability of the post-cervical artificial insemination (post-CAI) in FT sperm. The assay was conducted over eight months with 86 weaned sows being inseminated by post-CAI. Every ejaculate in a total of 26 from 15 Piétrain boars was divided into a refrigerated semen portion (FS; control treatment) and a cryopreserved portion (FT sperm), and the ejaculates were in turn classified as GFE or PFE in function of the sperm progressive motility and viability at 240 min post-thaw. As result, one of four possible treatments was randomly given to each sow: FS-GFE, FS-PFE, FT-GFE and FT-PFE. The number of pregnant and farrowing sows in FT-GFE did not significantly differ from those of FS control treatments. Contrarily, the probabilities of pregnancy were two times lower after inseminations with FT-PFE ($P < 0.05$) compared to FT-GFE, which indicates that ejaculates with high post-thaw sperm progressive motility and viability are more likely to result in pregnancies than those with poor in vitro sperm function. There were no differences in litter size or the risk of backflow among treatments. Further trials are required to determine the optimal volume and concentration of FT sperm in post-CAI to obtain a more reliable method for farmers interested in cryopreserved sperm.

Keywords: Artificial insemination; Boar sperm; Cryopreservation; Fertility; Freezability; Sperm quality



Paper II

Theriogenology 2009 Oct 15; 72(7): 930-48

Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins

Image: Sperm pellet recovering (own work)

I. Casas, S. Sancho, M. Briz, E. Pinart, E. Bussalleu, M. Yeste and S. Bonet. "Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins". *Theriogenology*. Vol. 72, issue 7 (15 October 2009) : p. 930-948.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.07.001>

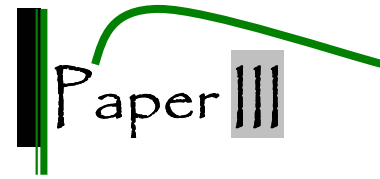
Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm), Department of Biology, Institute of Food and Agricultural Technology, University of Girona, Campus Montilivi, Girona, Spain

Received 15 April 2009; revised 1 July 2009; accepted 1 July 2009. Available online 3 August 2009.

Abstract

The objective of this work was to look for useful predictive indicators of the potentially "good" or "poor" ability of a boar ejaculate to sustain cryopreservation by assessing both the conventional sperm quality parameters (Study 1) and the immunolabeling of three proteins involved in the physiology of the sperm cell: GLUT3, HSP90AA1 and Cu/ZnSOD (Study 2). Study 1 was carried out in three different steps during the cryopreservation process of the sperm-rich fraction of 29 Piétrain boar ejaculates (17 °C, 5 °C, and 240 min postthaw). These ejaculates were clustered based on sperm quality parameters analyzed at 240 min postthaw, obtaining 16 good freezability ejaculates (GFEs) and 13 poor freezability ejaculates (PFEs). The sperm linearity (LIN) and the straightforward (STR) indexes at 5 °C showed higher hyperactivated movement in the PFEs than in the GFEs, which suggests that analyzing these sperm kinematic parameters could be a useful tool for predicting the potential freezability of an ejaculate. This statement was demonstrated by grouping the 29 ejaculates into two clusters (A and B) based on LIN and STR values assessed after 30 min at 5 °C, which resulted in around 72% of coincidence with the GFE and PFE groups. Study 2, performed at 17 °C and 240 min postthaw, revealed no differences between GFEs and PFEs in the immunolabeling of the three proteins within a same step, in terms of location and reactivity, although reactivity was generally weaker at 240 min postthaw in both groups. Additional studies on Western blot are currently being carried out with the objective to quantify the expression of the three proteins in GFEs and PFEs in the three steps of the cryopreservation process.

Keywords: Boar; Cryopreservation; Freezability; Immunolabeling; Sperm



Theriogenology 2010(in press)

The HSP90AA1 content of boar sperm and the prediction of the ejaculate freezability

Image: Microscopical analysis (own work)

I. Casas, S. Sancho, J. Ballester, M. Briz, E. Pinart, E. Bussalleu, M. Yeste, A. Fàbrega, J.E. Rodríguez-Gil and S. Bonet. "The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability". *Theriogenology*. Article in Press, Corrected Proof.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.021>

Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm), Department of Biology, Institute of Food and Agricultural Technology (INTEA), University of Girona, Girona, Spain

Center for Animal Biotechnology and Gene Therapy (CBATEG), Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain

Department of Animal Medicine and Surgery, School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain

Received 12 March 2010; revised 12 April 2010; accepted 18 April 2010. Available online 30 June 2010.

Abstract

In a previous study we reported that the immunolabelling of GLUT3, HSP90AA1, and Cu/ZnSOD proteins on boar sperm did not show differences between good and poor freezability ejaculates, in terms of a qualitative analysis based on location and reactivity of these proteins at 17 °C and at 240 min post-thaw. Since predicting the ejaculate freezability is considerably important in sperm cryopreservation procedures, the objective of the present study was to quantify the expression of these three proteins in good and poor freezability ejaculates. For this purpose, 10 ejaculates from 9 Piétrain boars were cryopreserved and their sperm quality assessed in the three main steps of the freezing process (17 °C, 5 °C, and 240 min post-thaw). After this assessment, the 10 ejaculates were clustered for freezability on the basis of their sperm progressive motility and membrane integrity at 240 min post-thaw. From the whole ejaculates, only four good and four poor freezability ejaculates displaying the most divergent values were selected for a western blot assay using sperm samples coming from the three mentioned freezing steps. Protein levels through densitometry were significantly different between good and poor freezability ejaculates for Cu/ZnSOD at 240 min post-thaw ($P \leq 0.01$) and for HSP90AA1 at 17 °C and 5 °C ($P \leq 0.05$). This last finding claims the introduction of tests based on molecular markers in spermatozoa to accurately predict the freezability of ejaculates in order to promote the use of frozen semen on artificial insemination programmes.

Keywords: Cryopreservation; Freezability; Sperm; GLUT3; HSP90AA1; Cu/ZnSOD

General Discussion



Despite the advantages and advances described in the bibliographic revision concerning the practice of AI with boar FT sperm, in 2006 it represented only the 1% of the total inseminations performed in swine [128], and the percentage remains low to the date. The restraint in the expansion of AI with boar FT sperm is mainly explained by the poor reproductive output obtained as opposed to the success with FS, since the weaker physiology of FT sperm restricts its lifespan and its arrival to the oocytes [319]. A large dataset in 2009 comparing the farrowing rates and litter sizes between FS and FT sperm reports 23% less sows farrowing and 1.4 piglets less when inseminating with FT sperm [320]. Additionally, there are insemination strategies at a standstill waiting to be standardized for routine use with FT sperm [319].

Although conventional or cervical AI (intra-CAI) has been reported in 1995 similar fertility rates with FT sperm than with FS [321], at least $5-6 \times 10^9$ FT spz (10-12 straws of 0.5 ml) per 80-90 ml doses are necessary for intra-CAI to match the results obtained with only 3×10^9 spz per 80-90 ml doses of FS, which is not profitable due to the increased cost of sperm after cryopreservation [128]. A deeper introduction of sperm by DUI allows, with little volumes of FT sperm, reaching farrowing rates not so far from the 90% obtained with FS in intra-CAI (Watson and Behan, 2002 [142]). Roca et al. hold since 2003 the best farrowing rate published with FT sperm and using DUI (77.55%), with only 1×10^9 spz (2 straws of 0.5 ml) per 7.5 ml dose after inseminating 49 hormonally treated sows [144]. However, DUI often provokes a decrease in the litter size associated to unilateral fertilizations or partial bilateral fertilizations given the reduction in the number of spermatozoa inseminated (Martínez et al., 2006 [150]).



Dimitrov et al. compared in 2007 the three current insemination methods (intra-CAI, post-CAI and DUI) in trials with FS and found no significant differences on farrowing rates but a lower litter size in DUI in comparison to intra-CAI [143]. On assays in the last decade, the litter size after DUI is commonly not superior to 10 piglets neither with FT sperm nor with FS [144, 151], whereas intra-CAI and post-CAI normally reach 12 piglets with FS [135, 136, 140, 142]. The problem of DUI has been solved in the case of FS by increasing the dose concentration and volume from 0.15×10^9 spz in 7.5 ml to 0.6×10^9 spz in 20 ml (Martínez et al., 2006 [150]). The solution has still not been applied to FT sperm, which needs higher concentration doses, because it represents an increase in the number of straws used to inseminate with DUI. The method of choice to inseminate with FT sperm must contribute to cost savings without sacrificing the fertility outcomes. Because DUI is, to the date, the only method tested for efficient inseminations with FT sperm, in PAPER I it is presented a field assay to test the adequacy of post-CAI as an alternative method to inseminate with FT sperm. Post-CAI is a technique that maintains, in FS, the farrowing rate and the litter size of intra-CAI while reducing doses to $1-1.5 \times 10^9$ spz and 30-50 ml [135, 137]. In literature, the only assay of post-CAI that compares the efficiency of the technique in FT sperm is a field trial of 2001 from Gil J et al. with a low number of sows [322]. Other trials that report the use of post-CAI and FT sperm compare different parameters than freezability and use a variety of volumes and concentrations (3×10^9 spz and 80 ml [323]; 2.5×10^9 spz and 50 ml [324]), or compare the effect of extenders [324, 325], or are trials on other species like goats [326]. This variety of trials show there is still no standardized protocol of post-CAI for FT sperm.

In the trial described in PAPER I in swine the main objectives are to compare post-CAI with FT sperm against the post-CAI with FS routinely practiced, and to compare the post-CAI results between ejaculates with different freezability, at the same time that effects of freezability on outcomes are evaluated. The trial seeks as well to draw a novel protocol for performing post-CAI with FT sperm. For these purposes, 45 multiparous sows have been inseminated with FT sperm (control inseminations with FS will be detailed later). Observations on the post-CAI performance suggest that post-CAI is a non-aggressive technique to the sow because bleeding has only been detected once (2.22% of sows) and that it is a technique having a low backflow, as it is also reported in 2005 in a comparison with intra-CAI using FS [327]. In the trial in PAPER I, backflow has been observed in the 26.67% of sows inseminated with FT sperm, a similar percentage than the published with FS (2005) [327]. Moreover, the sperm dose has flown easily into the uterus and the catheter has been inserted without any resistance from the 95.56% of sows, an advantage that had also been reported by Gil J. in 2006 [137] and by Levis et al. in 2002 [134]. The purpose of post-CAI is not to replace DUI but to provide an alternative technique that does not require particular skills of the inseminator to avoid the resistance from sows often observed in DUI [141, 146, 151].

A good litter size has been obtained in the trial described in **PAPER I** but the farrowing rate achieved has been unexpectedly lower than, for example, that obtained in 2007 by Fraser et al. with 8 multiparous sows inseminated [325]. They obtained the 75% of farrowing when infusing 2×10^9 FT spz (4 straws of 0.5 ml) in 100 ml. In **PAPER I** the farrowing rate of 75% is only equalled with FS, whereas the highest farrowing rate obtained with FT sperm is the 50% when infusing 7.5×10^9 FT spz (15 straws of 0.5 ml) in 30 ml. A 50% is also obtained by Abad et al. in 2007 performing post-CAI with 3×10^9 FT spz (6 straws of 0.5 ml) in 80 ml [323]. It is difficult to consider all the possible sources of variation among the different trials from semen collection to insemination [328]. The sperm quality and all laboratory variables are thought to determine only 6-7% of variation in fertility results (Broekhuijse et al., 2009 [329]). Most variability among trials is believed to be due to factors like the seasonal variation in the sow fertility, particularly critical for FT sperm [330], the breeding conditions of animals or the sperm selection within the oviducts, this last reviewed by Holt WV. in 2009 [118]. Skills of the inseminator also contribute to good fertility results, so that inexperienced technicians can decline fertility if AI is not adequately performed. Some of the possible management problems during AI in the trial described in **PAPER I** are discussed in the next paragraph. Before, it is also important to mention that splitting results, both from FT sperm and FS control, into two freezability groups (GFEs and PFEs) has increased the number of treatments to compare and has diminished the individuals allocated into each treatment resulting in a major relevance of individuals on farrowing rates, for what one pregnant sow slaughtered could dramatically have decreased the farrowing rate in the treatment it belonged.

Certain managing factors during inseminations with FT sperm in **PAPER I** need to be revised, like the maintenance of the 37°C of sperm during dose injection or the insemination-to-ovulation interval, this last point previously discussed by Martínez et al., 2002 [331], Bolarín et al., 2006 [152], Abad et al., 2007 [323] and, Großfeld et al., 2008 [332]. In addition to the two managing factors mentioned above, it must be included losses of sperm when injected into the reproductive tract of the female, which could also have contributed to decrease the farrowing rate. Such losses would come from a defective coupling between the device and the syringe used to introduce the FT sperm since, given the experimental nature of the assay, the tip of the plastic syringe have not sealed correctly when attached to the device.

The use of FT sperm doses at the same volume and concentration of FS conventional doses in intra-CAI seems not a guarantee to compensate the managing inconveniences of post-CAI with this kind of sperm, since in 2007 Abad et al., with 3×10^9 FT spz (6 straws of 0.5 ml) in 80 ml, reported similar farrowing rates and lower litter size than in **PAPER I** [323]. On the contrary, an important reduction must be achieved in the number of straws for each post-CAI practiced in **PAPER I** (currently, 15 straws of 0.5 ml); otherwise it would be expensive for farmers considering that less than 300 straws are usually packed from each ejaculate (not more than 20 inseminations with the method described). In fact, it is suggested that FT sperm doses



having lower volume and concentration than those in **PAPER I** may be used without compromising fertility. In this sense, Gil J et al. demonstrate in 2004 that it is possible to maintain the farrowing rate and the litter size of FS intra-CAI by using post-CAI and FS doses with 0.5 or 1×10^9 spz in 15 or 30 ml, respectively [136]. In terms of FT sperm it would represent a maximal of 2 straws of 0.5 ml. However, reducing volume and concentration of FT doses in post-CAI demands attending some considerations, as concluded from results of an assay in our laboratories in 2008 [333]. The three considerations that follow have been taken into account in the trial described in **PAPER I**. Firstly, there is a high variability in quality parameters among sperm straws and it is considered that at least four straws should be used in post-CAI inseminations to be representative of the whole ejaculate. Secondly, the progressive motility of sperm after thawing is lower as the rate of dilution in BTS increase, as also observed in bovine in 1998 [334]. It is proposed a dilution in BTS not higher than 1:4; v:v, recommending a dilution of 1:3; v:v. Thirdly, the freezability of ejaculates is a key point to consider for increasing fertility after post-CAI.

The impact of the boar ejaculate freezability on fertility results is generally accepted: the FT sperm has poor fertility results compared to FS. However, **PAPER I** is the only trial published that seeks to quantify real differences between FT sperm from good (GFEs) and poor (PFEs) freezability ejaculates in relation to FS and in terms of field fertility. From data in the last five years, the best freezability ejaculates generally display around 50% of both sperm with membrane integrity and total sperm motility between 30 and 150 min after thawing [128, 296, 310, 335]. Although motility assessment in FS explains only about 9-15% of variance in fertility [118, 329], the motility and other quality sperm parameters are still the most used to measure the boar ejaculate fertility in FS and in FT sperm and to measure the freezability in ejaculates [310, 336-339]. In **PAPER I**, two freezability diverging groups of ejaculates (GFEs and PFEs) have been obtained after a cluster analysis based on the sperm membrane integrity and the progressive motility at 4 h post-thaw. This time point has been selected to assure that the FT sperm will survive the insemination-to-ovulation interval of 4 h recommended on inseminations with FT sperm [114, 148]. At this time point, GFEs in **PAPER I** are characterized to display progressive motility and membrane integrity over 40%, whereas the values for the PFEs are under this percentage.

To compare the influence of freezability on fertility results in post-CAI, FS controls have been also included in **PAPER I**. Thus, in addition to the 45 multiparous sows inseminated with FT sperm in the trial, 41 more sows have been inseminated with FS doses from the same ejaculates from which the FT sperm doses came. The FS doses have been also divided in two groups depending on the freezability of its corresponding ejaculate. This has allowed comparing four treatments in the trial: FS-GFEs, FS-PFEs, FT-GFEs and FT-PFEs. Sperm doses of 30 ml have been used both in the FS and in the FT treatments to avoid the volume infused could interfere in results. Despite so, the concentration of FS doses has been 1×10^9 spz per dose

whereas the FT doses have been concentrated to 7.5×10^9 spz (15 straws of 0.5 ml). The concentration of FS doses follows data in literature when 30 ml are inseminated by post-CAI [138-140, 325, 326], whereas it was impossible to achieve the same low concentration in FT sperm doses. This last statement obeys to the consideration mentioned before about not diluting FT sperm at higher rates than 1:4; v:v.

Fertility results in **PAPER I** are in concordance with those of Gil MA et al. in 2005 when assaying the in vitro fertility of bad freezers, in reference to the freezability of boars, in which lower rates of in vitro oocyte penetrability were obtained compared to good freezer boars [337]. In accordance, pregnancy and farrowing rates in **PAPER I** have been lower in FT-PFEs than in FT-GFEs and the two FS controls, whereas in FT-GFEs the two parameters have not differed from that of FS controls. Although it has not been observed any variation in the farrowing rate of FT-GFEs compared to FS controls, the farrowing rate has also been equal to the one of FT-PFEs, which suggests a certain effect of cold-shock has affected the farrowing rate of GFEs too. Contrarily to pregnancy and farrowing rates, the litter size has not been influenced by the freezability of ejaculates because no-significant differences have been found among treatments. Feitsma and Leenhouders also observed, in 2009, no effect of the freezing protocol on the litter size in pigs [320]. It means there are other factors than freezability that have higher relevance over this parameter.

The effects of classical seminal parameters (i.e. motility, morphology, membrane integrity) on the litter size are also poor [340]. Tsakmakidis et al. did not report in 2009 any correlation of the litter size with the sperm membrane integrity, motility, morphology or chromatin stability in FS [341]. As discussed for DUI at the beginning of this section, the volume and concentration of semen infused seem to be the main restrictors of the litter size. They explain a high percentage of variance in litter size together with the fertilizing capacity of sperm, this last measured in vitro as the sperm penetration rate [340, 342]. The sperm volume and concentration would not be associated with the litter size only from its implication in PMNs recruitment in the uterus, as exemplify Yamaguchi et al. in 2009 [324], but also from supplying the percentage of functional sperm in the oviducts that would guarantee the best rate sperm:oocytes. From results in **PAPER I**, a volume of 30 ml at a concentration of 1×10^9 spz in FS doses and 7.5×10^9 spz in FT sperm doses (15 straws of 0.5 ml) seems to assure the maintenance in the total number of piglets born and in the number of piglets born alive in post-CAI whatever the treatment. Because the litter size also depends on other parameters like the pig breed [343] and the characteristics of the sow and its management, which regulate the number of ova and the embryo development [340, 344-347], the sows inseminated in **PAPER I** have been bred under equal conditions and have been randomly allocated within the four different treatments.



In conclusion, the AI technique used and its management do not guarantee alone successful fertility results in swine, and **PAPER I** manifests the importance of selecting in favour of GFEs too. What determines the belonging of ejaculates to GFEs or to PFEs? Although under optimal cryopreservation conditions the survival of boar sperm is improved [310], the freezability of ejaculates is more dependant on the boar individual features than on the cryopreservation process itself [313, 348], besides ambiental factors that produce variations in freezability among collections [3, 4, 47, 49]. The selection of ejaculates destined to cryopreservation is currently based on the outcomes of conventional quality parameters in FS, which do not inform of their freezability in the way they are being assessed in the last years [348]. The inclusion of new tests to predict the resistance of sperm to cold-shock is presented as an interesting possibility that would help in improving fertility results. Since there is a strong genetic background explaining variations among boars in the ejaculate freezing resistance [311, 312], a previous selection for freezability could be feasible and would permit to discard the PFEs from cryopreservation, saving the money and time that are associated unless there was special interest on boar individual genetics.

In **PAPER II** it is discussed the role of conventional sperm quality parameters and some proteins in the prediction of the boar ejaculate freezability. It has been observed that the conventional sperm quality parameters (kinematic parameters, the sperm membrane integrity and the percentage of non-reacted acrosomes after the ORT test) are informative for freezability from the 5°C and not from the 17°C, the combination of LIN and STR indexes being the most useful for prediction.

Values of LIN and STR are inversely related with levels of cold-shock at 5°C and the combination of both can predict around the 70% in post-thaw sperm survival chances. The relation of these parameters with freezability can be found in the enhancement of cold-shock at the 5°C during cryopreservation that is helped by the removal of seminal plasma, which contains decapacitant factors, through centrifugation of ejaculates before the process. Cold-shock provokes influx of Ca(+2) due to the increase in permeability of the sperm plasmatic membrane and mediates the hyperactivation of motility, the so-called cryocapacitation [212, 234, 237, 303]. Cryocapacitation disappears in FT sperm, as observed in **PAPER II**, probably because of motility impairment. The hyperactivated motility pattern results in a decrease in the sperm LIN and STR indexes similar to that observed during real capacitation [349]. In **PAPER II**, the PFEs have shown significantly lower LIN and STR indexes than the GFEs for what it is suggested the PFEs achieve higher levels of hyperactivation than the GFEs. In accordance, the hyperactivated status during cryocapacitation in dog sperm is demonstrated to be related with cryosensitivity (Núñez-Martínez et al., 2006 [350]). Such motility differences between the two boar ejaculate categories are given by variations in the amount of spermatozoa with better ability to be cryopreserved, whose presence in the ejaculate is revealed under the form of a subpopulation depicting a particular motion pattern (Rodríguez-Martínez et al., 2008 [296]).

Apart from LIN, STR and motile subpopulations in the ejaculate, the morphometry of the sperm head in FS is reported, in a study from 2005, to account for up to 36% of the percentage of intact sperm membranes post-thaw [216]. This finding is possibly linked to the relation of the sperm head morphology with the resistance of sperm in front of the osmotic changes occurred during freezing, as it has been explained in the bibliographic revision of this thesis. As it has been exposed above, however, LIN and STR indexes, motile subpopulations, and the morphometry of the sperm head are not the 100% reliable for freezability prediction, for what it is necessary to look for other predictive parameters.

The estimation of the boar fertility is improved when combining the assessment of sperm conventional quality parameters and the analysis of proteins in semen [351]. Likewise, the sperm movement patterns linked to freezability seem associated with proteins present in different fractions of seminal plasma [296]. Thus, the estimation of the boar ejaculate freezability could be optimized by linking assays on sperm conventional quality parameters with the study of sperm molecules implicated in the cryocapacitation process.

The existence of a high cross-talk among capacitation, apoptosis and cryocapacitation suggests us studying cryocapacitation from the molecules known to participate in the other two processes, either in seminal plasma or in sperm. In **PAPER II**, three candidate proteins in sperm (GLUT3, HSP90AA1 and Cu/ZnSOD) have been immunolabelled for its assessment under the microscope, both in FS and in FT sperm from GFEs and PFEs. The objective has been to find out if there are changes in these proteins that could determine the boar sperm resistance to cold-shock.

The immunolabelling of the three proteins have showed no differences between GFEs and PFEs in terms of location and reactivity, neither in FS semen nor in FT sperm. Thus, a microscopic analysis of the three proteins is not enough informative to be developed as a test for freezability prediction. Despite there have been no changes that could be associated with freezability the reactivity of the protein labelling in FT sperm has decreased compared to FS, which indicates the cryopreservation process affects the integrity of sperm and especially that of the acrosome both in GFEs and in PFEs. It means cryoinjuries comprise irreversible damage on the sperm structure. At this respect, although the sperm fertility is favoured by the addition of seminal plasma after thawing, as first observed in 1975 [194], the reversion of cryocapacitation mediated by seminal plasma does not always improve fertility as desired [323]. A discussion on the results of the three proteins in **PAPER II** is exposed in the next paragraphs.

The GLUT3 protein is present on the plasmatic membrane at the acrosomal region and along the principal and distal pieces of the tail. Such distribution has been described in previous literature since 1998, remarking the fine modulation of GLUT3 expression for an efficient glucose intake [293, 352]. The location of the protein responds to the presence of glycolytic



enzymes in these structures to provide fast energy for sperm motility and for signalling processes (head receptors) [353, 354]. The products of glycolysis are later metabolized by oxidative phosphorylation (respiration) in the sperm midpiece to produce additional ATP [353], being much more operative during hyperactivation [255]. Because GLUT3 is expressed on the plasmatic membrane, its poor reactivity after freezing was attached in 2007 to the loss of membrane fragments during cryopreservation [294]. On the other side, since an accumulation of lactate occurs after membrane disruption that downregulates the intake of glucose [258, 355], it is suggested it may also affect the reactivity of GLUT3. It must be also said that, in spite of restrictions in glucose uptake, the metabolism of FT sperm is not totally arrested, as retrieved from the motility outcomes recorded after freezing in **PAPER II**. It is reported sperm can as well obtain energetic resources from mobilization of endogenous substrates [356, 357].

The HSP90AA1 cytosolic protein is phosphorylated during capacitation [284, 297] and inhibited in apoptosis [358] and, it is located at the acrosomal region, along the tail and in cytoplasmic droplets, as it was reported in 2008 [298]. In **PAPER II** it has also been observed reactivity to HSP90AA1 in tail foldings and coilings, revealing a possible role in the regulation of motility in mature sperm as it is reported to do in immature sperm [298, 359]. On the other side, some amount of HSP90AA1 may escape from the sperm cytosol to the extracellular medium due to membrane damage during cryopreservation, as suggested by Huang et al. in 1999 [317].

The Cu/ZnSOD cytosolic enzyme is located at the acrosomal region and along the tail, as described in 2008 [272], but its reactivity is particularly strong in the midpiece, as discussed in **PAPER II**. Such distribution agrees with its hypothetical function in the regulation of ROS release from the oxidative phosphorylation in mitochondria, since equilibrium in ROS levels is suggested to collaborate in motility activation during capacitation [279, 280]. Similarly, during cryocapacitation the Cu/ZnSOD could participate in scavenging those ROS pathologically released due to the opening of mitochondrial pores [258]. In capacitated boar sperm cells, Cu/ZnSOD decreases in expression and disappears from the acrosome compared to non-capacitated boar sperm cells [272], which may be most likely linked to the acrosomal reaction. In a similar way, certain loss of Cu/ZnSOD from the cytosol to the extracellular medium occurs during cryopreservation in human sperm due to membrane impairment [360], like it has been discussed for GLUT3 and HSP90AA1.

Finally, results in **PAPER II** suggest damage on the sperm surface, due both to freezing and to the immunolabelling protocol, could have masked differences in the reactivity of the three proteins between GFEs and PFEs during microscopic analysis. Other authors discuss about this matter too [237, 361]. For that reason, additional analyses on the expression of the proteins have been considered necessary to disclose this question. Whereas immunolabelling for microscopy is a qualitative analysis, immunolabelling by western blot is a quantitative analysis with higher resolution to detect differences in protein expression. To avoid confusions,

the term “reactivity” has been used to refer to microscopical assessments on the proteins whereas the term “expression” will be used to define results from western blot.

The assay in **PAPER III** aims to quantify through western blot the expression of the three proteins in FS, at 5°C and in FT sperm (at 240 min post-thawing), both in GFEs and in PFEs, with freezability prediction purposes. Motility analyses on sperm have been also performed. In spite LIN and STR indexes at 5°C have been reported in **PAPER II** to predict around the 70% in survival post-thaw, there have not been differences in the two indexes between GFEs and PFEs under this temperature, verifying the reliability of both indexes in freezability prediction is not the 100%. Such finding remarks the necessity of developing tests in FS for the selection of GFEs in parallel with the assessment of conventional sperm quality parameters. Significant results have been found at this respect in **PAPER III**.

In **PAPER III** it is proposed the PFEs may be less resistant to cold-shock in part because they contain less HSP90AA1 in FS and at 5°C than the GFEs, a protein having the ability to counteract a broad spectrum of stresses in mammalian sperm (e.g. the *HSP90AA1* gene is upregulated in pig oviductal cells to maintain the survival of sperm after mating [362] and the expression of the protein is known to increase in oligozoospermic men [363]). The higher amount of HSP90AA1 in boar GFEs compared to PFEs in FS and at 5°C may have the functional role of interfering in the cold-shock induced stress. The acute stress onset on PFEs during cryopreservation is confirmed by the significantly elevated Cu/ZnSOD expression in their FT sperm compared to GFEs, as exposed in **PAPER III**. This observation is in accordance with the cryocapacitation levels of PFEs described in **PAPER II** and may be presumably linked to a higher phosphorylation of Cu/ZnSOD, in PFEs, onset during cryocapacitation, likewise it has been recently observed the intensity of phosphorylations increases during boar sperm capacitation [255]. However, Cu/ZnSOD is not present among the proteins that are target of phosphorylations during true capacitation because its expression decreases after the process [272], which suggests that stress levels and their regulation in cryocapacitation and in true capacitation are not identical.

In contrast with HSP90AA1, no-significant differences between GFEs and PFEs have been obtained in **PAPER III** regarding the expression of GLUT3 and Cu/ZnSOD in FS. However, there have not been ruled out their roles in cold-shock because both proteins show a tendency, as seen on graphics, to an increase in PFEs in FS. The lack of statistical significance of this tendency is further discussed in the paper, as well as whether their expression would respond to higher sensitivity of PFEs to liquid storage and to the composition of the seminal plasma in those ejaculates. The hypothesis is supported by the differences existing in the composition of seminal plasma in ejaculates with different freezability, confirmed in 2007 [310], even though to the date it is unknown which components mediate the cryoprotective effects.



Thus, the HSP90AA1 can be developed as a molecular marker of cold-shock in boar sperm whereas the subtle differences obtained in FS between GFEs and PFEs for GLUT3 and Cu/ZnSOD compromise its development as freezability predictors. Research in the line of **PAPER III** promises to find new freezability predictors in boar sperm like the HSP90AA1. Suggestions about possible candidates are exposed in the appendix.

The purpose of **PAPER III** is to compare protein expression levels between GFEs and PFEs but not among cryopreservation steps. However, the expression levels of the internal standard alpha-tubulin seemed to have increased after thawing, which was unexpected, and suggests the possibility that the intensification of tubulin blots could be linked to changes in the alpha-tubulin expression and not only to the amount of protein loaded in wells. Regulation of tubulin expression by cells is illustrated in much literature. In cytosol of mouse fibroblasts and in intact marsupial kidney epithelial cells a significant portion of HSP90AA1, regulator of cell stress, is associated with a tubulin-containing complex (Sánchez et al., 1988 [364]). It is also proposed that tubulin epitopes could be useful biomarkers of the pathological sperm state in human (Peknicova et al., 2007 [365]). Moreover, tubulin decreases after capacitation in human sperm (Secciani et al., 2009 [366]). Thus, tubulin is said to be related to cell stress (Choi et al., 2008 [272]) and for that reason its expression may be associated to cold-shock. The increase in tubulin might be also associated to residuals of egg yolk in the cryopreservation medium, although washings of sperm before electrophoresis make it a remote possibility. Although the question of tubulin expression has not been discussed in the paper since it does not interfere in results, next studies comparing cryopreservation steps through western blot should further consider it. These experiments should also take into account that the degradation of some proteins in cryopreserved sperm samples affects their expression, and that the intensity of blots also depends on an efficient extraction of proteins (e.g. optimal sonication conditions [367]) that must be homogeneous among samples so that it does not invalidate comparisons.

This thesis shows that a general knowledge of the spermatozoon physiology through multiparametric studies (i.e. conventional sperm quality parameters and molecular assessments) aids in the purpose of predicting the freezing outcomes of a given ejaculate, finally avoiding the detrimental effects of PFEs on fertility irrespective of the freezing protocol used. Simultaneously, better understanding of the differences determining the resistance of ejaculates to cold-shock would help in designing new extenders to counteract the factors responsible for their poor freezability.

Image: Suckling pigs (Wikimedia Commons, Courtesy of Greg Mannin)



General Conclusions

From objective 1

1. The belonging of boar ejaculates to GFEs or PFEs does not interfere on fertility parameters on inseminations performed with post-CAI and FS, but it does on inseminations performed with post-CAI and FT sperm.
2. The FT boar sperm with post-thaw in vitro progressive motility and membrane integrity equal or over 40% (GFEs) is two times more likely to result in pregnancies than FT sperm having both parameters under this percentage (PFEs), despite the number of farrowings is not affected. However, FT sperm from PFEs results in three times less farrowings than those from FS. The freezability of boar sperm does not have influence on the litter size, either given in number of piglets born alive or in total number of piglets born.

From objective 2

3. The efficiency of post-CAI in swine includes the FT sperm, either coming from GFEs or from PFEs, because the risk of backflow does not vary from that observed in FS and, because when inserting the catheter the probabilities of bleeding and resistance from the sow are low (less than 1% and 3%, respectively) from whatever source sperm comes.
4. The fertility outcomes obtained by post-CAI with FT boar sperm from GFEs (61.54% of pregnancy rate and 53.85% of farrowing rate) need to be optimized in following assays. These assays must be particularly directed towards a reduction in the volume and concentration of the



FT sperm doses tested in this thesis (30 ml doses at 7.5×10^9 spz -15 straws of 0.5 ml- applied twice).

From objective 3

5. The sperm linearity (LIN) and the straightforward (STR) sperm motility indexes, assessed together after 30 min at 5°C during the cryopreservation protocol of boar sperm, predict the freezability status of boar ejaculates with around 72% confidence. Percentages of LIN and STR at this time point must be over 40% and 60%, respectively, in GFEs, which also indicates that PFEs display higher hyperactivated movement during cold-shock (according to the definition of hyperactivated movement on in vitro capacitated boar sperm).

6. Immunolabelling of the sperm facilitated glucose transporter 3 (SLC2A3, alias GLUT3), the heat shock protein 90-KDa alpha A1 (HSP90AA1) and the copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD), in terms of location and reactivity under the microscope, is not useful to predict the freezability of boar ejaculates since there are no differences between GFEs and PFEs in any of the three proteins, neither at 17°C nor at 240 min post-thawing.

7. Lower reactivity of the three proteins in FT boar sperm compared to FS shows damage concomitant with the freezing process and the immunolabelling protocol, which affects the boar sperm structure and the proteins it contains, being especially severe on the acrosome, with swelling of the apical ridge in some sperm heads. In contrast, the location of these proteins does not change after freezing and regards their corresponding functions in the boar sperm metabolism. Additional reactivity to HSP90AA1 in tail foldings and coilings and a particular reactivity of Cu/ZnSOD in the midpiece have also been found, revealing possible roles in sperm motility and ROS regulation, respectively.

From objective 4

8. The expression of GLUT3, HSP90AA1 and Cu/ZnSOD through western blotting in boar sperm is more resolute than the observations on protein reactivity under the microscope. The subtle differences between GFEs and PFEs concerning GLUT3 and Cu/ZnSOD expression in FS compromise the future development of both proteins as freezability predictors, although the expression of Cu/ZnSOD at 240 min post-thawing agrees with a higher cryocapacitation in PFEs than in GFEs. The HSP90AA1 can be developed as a molecular marker in sperm for the freezability prediction of boar ejaculates since it is more expressed in GFEs than in PFEs, both at 17°C and at 5°C during cryopreservation.

References



-
- [1] McGlone JJ. *Managing heat stress in the outdoor pig breeding herd*. [on-line]
<<http://www.pii.ttu.edu>>
[Accessed: December 15, 2008]
- [2] *Domestic pig*. The free encyclopaedia [on-line]
<http://en.wikipedia.org/wiki/Domestic_pig>
[Accessed: December 15, 2008]
- [3] Sancho S, Rodríguez-Gil JE, Pinart E, Briz M, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Casas I, Palomo MJ, Ramió L, Bonet S. 2006. *Effects of exposing boars to different artificial light regimens on semen plasma markers and "in vivo" fertilizing capacity*. *Theriogenology* 65(2): 317-31.
- [4] Sancho S, Pinart E, Briz M, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, Kádár E, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Coll MG, Bonet S. 2004. *Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods*. *Theriogenology* 62(7): 1271-82.
- [5] Stone BA. 1981. *Thermal characteristics of the testis and epididymis of the boar*. *J Reprod Fertil*. 63(2): 551-7.
- [6] Ciereszko A, Ottobre JS, Glogowski J. 2000. *Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars*. *Anim Reprod Sci*. 64(1-2): 89-96.
- [7] Pallás RT & de Alba. 2006. *Condiciones ambientales e instalaciones: influencia sobre la salud del verraco y la calidad seminal*. *Av Tecn Porc*. 3(9): 64-75.
- [8] *Swine production glossary*. The University of Pennsylvania School of Veterinary Medicine (1997) [on-line]
<<http://cal.vet.upenn.edu/projects/swine/abc.html>>
[Accessed: July 9, 2009]
- [9] Dewey T & Hruby J. 2002. *Sus scrofa* (Animal Diversity Web) [on-line]
<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Sus_scrofa.html>
[Accessed: December 15, 2008]



References

- [10] *Pigs, goats & sheeps*. The University of Tennessee Health Science Center. Department of Comparative Medicine Home [on-line]
<<http://www.utmem.edu/compmmed/Pigs.html>>
[Accessed: July 9, 2009]
- [11] Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E, Watanobe T, Ishiguro N, Yasue H, Mitsuhashi T. 2001. *Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs*. Anim Genet. 32(3): 139-47.
- [12] Adametz L. 1943. *Zootecnia general*. Ed. Labor. Barcelona.
- [13] AAVV. 2004. *Història agrària dels Països Catalans*. Volum 4. S.XIX-XX. Ed. Universitat de Barcelona. Barcelona.
- [14] Aparicio MJB. 1988. *El cerdo Ibérico*. Premio de Investigación Sánchez Romero Carvajal, Jabugo S.A. Huelva (España).
- [15] *Jamón Ibérico- Historia de la raza ibérica*. [on-line]
<http://www.publispain.com/jamon-iberico/historia_raza_iberica.html>
[Accessed: December 15, 2008]
- [16] Ojeda A, Rozas J, Folch JM, Pérez-Enciso M. 2006. *Unexpected high polymorphism at the FABP4 gene unveils a complex history for pig populations*. Genetics 174(4): 2119-27.
- [17] Dechambre P. 1924. *Le porc*. Ed. Charles Amat / Asselin & Houzeau. Paris.
- [18] Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS) [on-line]
<<http://www.fao.org/dad-is>>
[Accessed: December 16, 2008]
- [19] Institut Technique du Porc (ITP) [on-line]
<<http://www.itp.asso.fr>>
[Accessed: December 16, 2008]
- [20] *The Free Dictionary*. Farlex [on-line]
<<http://www.thefreedictionary.com/Hybrid+vigour>>
[Accessed: December 16, 2008]
- [21] *Encuestas Ganaderas; Ganado porcino, resultados 2007*. Ministerio español de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Subdirección General de Estadísticas Agroalimentarias (MAPA) [on-line]
<<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/encuestaganadera/encuesta.htm#art5>>
[Accessed: December 16, 2008]
- [22] *World Market Data* in Pig-International.com [on-line]
<<http://www.pig-international.com/uploadedFiles/Site1/Articles/0707PIGmarketsforweb.pdf>>
[Accessed: December 16, 2008]
- [23] Boletín e-BDPorc, Noviembre 2008 (Sistema electrónico de acceso al Banco de Datos de Referencia del Porcino Espanyol) [on-line]
<<http://bdporc.irta.es/butlleti.jsp>>
[Accessed: December 16, 2008]
- [24] Resa S. *El sector porcino prevé crecer menos por la subida de precios (8/2/08)*. La Gaceta de los Negocios [on-line]
<http://www.negocios.com/noticia_1img.php?s=28&sm=28&posEnc=¬i=11915>
[Accessed: December 16, 2008]

- [25] *Selecció Batallé*[®] [on-line]
 <<http://www.batalle.com/en/node/96>>
 [Accessed: February 27, 2010]
- [26] *Sustainable farm animal breeding and reproduction, a vision for 2025*. Fabre Technology Platform, February 2006 [on-line]
 <<http://www.inra.fr/content/download/6638/73070/version/1/file/visionFABRETPdef.pdf>>
 [Accessed: December 16, 2008]
- [27] *Breeding programs*. JJGenetics [on-line]
 <<http://www.pig-genetics.co.uk/breeding.htm>>
 [Accessed: December 18, 2008]
- [28] *Code-EFABAR*. The European Forum of farm Animal Breeders (EFFAB) [on-line]
 <<http://www.sefabar.org/publications/code-efabar-publications>>
 [Accessed: December 16, 2008]
- [29] Rotschild MF. 2000. *Advances in pig molecular genetics, gene mapping and genomics*. Revista ITEA - Revista de Producción Animal 96 A(3): 349-61.
- [30] Estany J, Ramis R, Noguera JL. 1997. *Estratègies de mejora de la prolificidad em porcino*. Mundo Ganadero 92. Suplemento especial genética porcina: 28-34.
- [31] Harris DL. 2001. *Producción porcina multi-sitio*. Ed. Acribia SA. Zaragoza.
- [32] Thompson LH. *Managing swine reproduction*. [on-line]
 <http://www.aces.uiuc.edu/vista/html_pubs/pigs/pigs.htm>
 [Accessed: December 18, 2008]
- [33] *Management of reproduction:Pigs*. In: The Merck Veterinary Manual. 2008. 9th edition. Ed. Merck & Co. [on-line]
 <<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/181704.htm>>
 [Accessed: July 9, 2009]
- [34] Bates RO. 1993. *Terminal and Rotaterminal Crossbreeding Systems for Pork Producers*. [on-line]
 <<http://extension.missouri.edu/explore/agguides/ansci/g02311.htm>>
 [Accessed: December 18, 2008]
- [35] *Pig production cycle, 1999-2008*. Living Countryside. UK agriculture [on-line]
 <http://www.ukagriculture.com/production_cycles/pigs_production_cycle.cfm>
 [Accessed: December 18, 2008]
- [36] Carroll C. *Sow culling and parity profiles*. Teagasc, Agriculture and Food Development Authority, Ireland [on-line]
 <<http://www.teagasc.ie/publications/pig1999/paper04.asp>>
 [Accessed: December 18, 2008]
- [37] Briggs HM. 1983. *International Pig Breed Encyclopedia*. Ed. Elanco Animal Health. Indianapolis.
- [38] *Raza nostra*. Madrid, 2003 [on-line]
 <<http://www.razanostra.com/pietrain.asp>>
 [Accessed: February 2, 2010]
- [39] Sancho S. 2002. *Efectes del fotoperíode sobre la qualitat espermàtica de mascles porcins Sus domesticus*. Doctoral thesis. University of Girona.



- [40] Wolf J & Smital J. 2009. *Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses*. J Anim Sci. 87(5): 1620-7.
- [41] Sutkeviciene N, Riskeviciene V, Januskauskas A, Zilinskas H, Andersson M. 2009. *Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen*. Acta Vet Scand. 51: 53.
- [42] Briz MD. 1994. *Anàlisi microscòpica de l'esperma ejaculada i de la maduració epididimària dels espermatozoides de Sus domesticus*. Doctoral thesis. University of Girona.
- [43] Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, Garcia -Gil N, Badia E. 2000. *Morfologia espermàtica en porcí*. Ed. Institut d'Estudis Catalans. Barcelona.
- [44] Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. 2008. *Sperm head membrane reorganisation during capacitation*. Int J Dev Biol. 52(5-6): 473-80.
- [45] Guan J, Kinoshita M, Yuan L. 2009. *Spatiotemporal association of DNAJB13 with the annulus during mouse sperm flagellum development*. BMC Dev. Biol. 9: 23.
- [46] Cameron RDA. 1985. *Factors influencing semen characteristics in boars*. Aust Vet J. 62 (9): 293-297.
- [47] Smital J. 2009. *Effects influencing boar semen*. Anim Reprod Sci. 110(3-4): 335-46.
- [48] Briz MD, Bonet S, Pinart E, Camps R. 1996. *Sperm malformations throughout the boar epididymal duct*. Anim. Reprod. Sci. 43(4): 221-239.
- [49] Flowers WL. 2008. *Genetic and phenotypic variation in reproductive traits of AI boars*. Theriogenology 70(8): 1297-303.
- [50] Sonderman JP & Luebke JJ. 2007. *Semen production and fertility issues related to differences in genetic lines of boars*. Proceed. 6th International Conference on Boar Semen Preservation, Alliston, ON, Canadá.
- [51] Koh TJ, Crabo BG, Tsou HL, Graham EF. 1976. *Fertility of liquid boar semen as influenced by breed and season*. J Anim Sci. 42(1): 138-44.
- [52] Pruneda A, Pinart E, Dolores Briz M, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E, Kádár E, Bassols J, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. 2005. *Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars*. Theriogenology 63(8): 2219-32.
- [53] Sancho S, Pinart E, Briz M, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, Kádár E, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Coll MG, Bonet S. 2004. *Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods*. Theriogenology 62(7): 1271-82.
- [54] Tardif S, Laforest JP, Cormier N, Bailey JL. 1999. *The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo*. Theriogenology 52(3): 447-59.
- [55] Gadea J, Sellés E, Marco MA. 2004. *The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions*. Reprod. Domest. Anim. 39(5): 303-8.
- [56] Bussalleu E, Pinart E, Yeste M, Briz M, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E, Bassols J, Pruneda A, Casas I, Bonet S. 2005. *Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa*. Microsc Res Tech. 68(5): 277-83.
- [57] Cooper TG. 2004. *Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing?* Hum Reprod 20(1): 9-11. Review.

- [58] de Vries AC, Colenbrander B. 1990. *Isolation and characterization of boar spermatozoa with and without a cytoplasmic droplet*. Int J Biochem. 22(5): 519-24.
- [59] Kaplan M, Russell LD, Peterson RN, Martan J. 1984. *Boar sperm cytoplasmic droplets: their ultrastructure, their numbers in the epididymis and at ejaculation and their removal during isolation of sperm plasma membranes*. Tissue Cell. 16(3): 455-68.
- [60] Kuster CE, Hess RA, Althouse GC. 2004. *Immunofluorescence reveals ubiquitination of retained distal cytoplasmic droplets on ejaculated porcine spermatozoa*. J Androl. 25(3): 340-7.
- [61] AA.VV. 1994. *El libro de IA en el cerdo*. Ed. Minitube of America. 1ª Ed. USA.
- [62] Almond G, Britt J, Carr J, Flowers W, Glossop C, Morow M, Todd S. 1994. *The Swine AI Book: A field and laboratory technicians' guide to artificial insemination in swine*. Ed. Cronje, Ruth (North Carolina State University). USA.
- [63] Séculi J & Perelló B. 1980. *Patología y clínica del ganado porcino*. Ed. Productos Neosan SA. 1ª Ed. Barcelona.
- [64] Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken RJ. 2005. *Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics 5 (4): 1003-12.
- [65] Briz MD, Bonet S, Pinart B, Egozcue J, Camps R. 1995. *Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus, and cauda regions of the epididymis*. J Androl. 16(2): 175-88.
- [66] Bassols J, Kádár E, Briz M, Pinart E, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Casas I, Dacheux JL, Bonet S. 2005. *Evaluation of boar sperm maturation after co-incubation with caput, corpus and cauda epididymal cultures [corrected]*. Theriogenology 2005 64(9): 1995-2009. Erratum in: Theriogenology 2006, 66(2): 495.
- [67] Bonet S, Briz M, Fradera A, Egozcue J. 1992. *Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails*. Hum Reprod. 7(4): 523-8.
- [68] *Answers.com*. Online dictionary, Encyclopedia and much more [on-line]
<http://www.answers.com/topic/spermatogenesis>
 [Accessed: December 30, 2008]
- [69] *Boar reproductive tract* from Sheridan Heuser Provis Swine Health Services [on-line]
 <https://www.shpswine.com/admin/documents/reproduction_male.jpg>
 [Accessed: July 13, 2009]
- [70] Garner DL & Hafez ESE. 1996. *Espermatozoides y plasma seminal*. In: Hafez ESE. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Ed. Interamericana McGraw-Hill, pp. 158-79.
- [71] Strzezek J. 2005. *Proteomics of boar seminal plasma-current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction*. Reprod. Biol. 5(3): 331-9.
- [72] Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Tsoleva M, Leeb T, Kirchhoff C, Müller P. 2005. *Structure and function of secretory proteins of the male genital tract*. Andrologia 37(6): 202-4.
- [73] Jonáková V, Manásková P, Tichá M. 2007. *Separation, characterization and identification of boar seminal plasma proteins*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 849(1-2): 307-14.
- [74] Kowalowka M, Wysocki P, Fraser L, Strzezek J. 2008. *Extracellular Superoxide Dismutase of Boar Seminal Plasma*. Reprod. Domest. Anim. 43: 490-6.

- [75] Caballero I, Vazquez JM, Mayor GM, Almiñana C, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martínez EA. 2009. *PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa*. *Int J Androl.* 32(5): 505-13.
- [76] Fournier-Delpech S & Thibault C. 1993. *Acquisition of sperm fertilization*. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF. *Reproduction in Mammals and Man*. Ed. Ellipses, pp. 257-80.
- [77] Knox RV. *Anatomy and Physiology of Sperm Production in Boars* [on-line] <<http://www.livestocktrail.uiuc.edu/swinerepronet/publications/extension/BoarA&P.pdf>> [Accessed: July 10, 2009]
- [78] González-Urdiales R, Tejerina F, Domínguez JC, Alegre B, Ferreras A, Peláez J, Bernal S, Cárdenas S. 2006. *Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática*. In: Bonet S, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera X. *Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. Ed. Universitat de Girona and Red Temática Nacional de Reproducción Porcina, pp. 19-38.
- [79] García EM, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM. 2009. *Distinct Effects of Boar Seminal Plasma Fractions Exhibiting Different Protein Profiles on the Functionality of Highly Diluted Boar Spermatozoa*. *Reprod. Dom. Anim.* 44(2): 200-5.
- [80] *Reproductive System* in The pig Site.com [on-line] <<http://www.thepigsite.com/pighealth/>> [Accessed: July 13, 2009]
- [81] Bournsnell JC, Johnson P, Zamora J. 1962. *An electrophoretic and ultracentrifugal study of boar seminal plasma*. *Biochim Biophys Acta.* 63: 374-81.
- [82] Dostál J & Veselský L. 1972. *Proteins in the seminal plasma and the accessory sexual gland fluids of the boar*. *J Reprod Fertil.* 30(2): 255-67.
- [83] Jones AR & Bubb WA. 2000. *Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa*. *J Reprod Fertil* 119(1): 129-35.
- [84] *The signs of oestrus* in The Pig Site.com [on-line] <<http://www.thepigsite.com/stockstds/39/the-signs-of-oestrus>> [Accessed: December 31, 2008]
- [85] Singleton W & Diekman M. *Reproductive Physiology and Anatomy of the Sow*. Department of Animal Sciences, Purdue University [on-line] <<http://www.ansc.purdue.edu/swine/porkpage/repro/physiol/reppaper.htm>> [Accessed: July 13, 2009]
- [86] Birney EC & Baird DD. 1985. *Why do some mammals polyovulate to produce a litter of two?* *Am Nat.* 126: 136-40.
- [87] *Female anatomy and histology*. University of Wisconsin, Dept. of Animal Sciences [on-line] <http://www.ansci.wisc.edu/jjp1/ansci_repro/lec/lec1/female_images/images_nolabel/sow_tract_color.jpg> [Accessed: January 28, 2010]
- [88] Adase TJ. *Oogenesis* in Biology 102 [on-line] <<http://faculty.sunydutchess.edu/Scala/Bio102/PDF/Oogenesis.jpg>> [Accessed: December 31, 2008]
- [89] Foote RH. 2002. *The history of artificial insemination: Selected notes and notables*. *J Anim Sci.* 80(2): 1-10.

- [90] *Advantages of AI in Alberta Pork* [on-line]
<<http://www.albertapork.com/news.aspx?NavigationID=1447>>
[Accessed: December 31, 2008]
- [91] Lumb S. 2007. *Artificial insemination: a European review* [on-line]
<http://www.porkmag.com/news_editorial.asp?pgID=770&ed_id=5539>
[Accessed: December 31, 2008]
- [92] Spallanzani L. 1799. *Fecondazione artificiale*. Podromo della nuova enciclopedia Italiana. Siena, pp 129-34.
- [93] Ivanow EI. 1922. *On the use of Artificial Insemination for Zootechnical purposes in Russia*. J Agric Sci. 12: 244-56.
- [94] Ito T, Niwa T, Kudo A. 1948. *Studies on artificial insemination in swine*. Zootech Exp Sta Res Bull. 55: 1-74.
- [95] Polge C. 1956. *Artificial insemination in pigs*. Vet Rec. 68: 62-76.
- [96] Mc Kenzie F. 1931. *A method for collection of boar semen*. J Am Vet Me. Asso. 78: 244-46.
- [97] Lewis LL. 1911. *The viability of reproductive cells*. Agri Exp Sta Bull. 96. Oklahoma Agriculture and Mechanical College, Stillwater. USA.
- [98] Crabo BG, Brown KI, Graham EF. 1972. *Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa*. J Anim Sci. 35: 377-82.
- [99] Johnson LA, Aalbers JG, Grooten HJG. 1988. *Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection*. Zuchthyg 23: 49-55.
- [100] Gadea J. 2003. *Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Revisión*. Spanish Journal of Agricultural Research 1(2): 17-27.
- [101] Martin S. 1984. *How AI is progressing in Spain*. Pig Int.: 24-28.
- [102] Martínez E, Andugar J, Martin S. 1984. *Puesta en marcha de la I.A. en una granja con 3.000 reproductoras. Estudio comparativo con la monta natural*. Anaporc 20: 17-24.
- [103] *Instruments for animal AI imported from Russia* by Dr. Ing. Luis Thomasset (1935) from the free encyclopedia (*Wikipedia*) [on-line]
<<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/33/Instrumentos de IA en 1936.GIF>>
[Accessed: January 1, 2009]
- [104] Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. 1973. *Fertilizing capacity of boar semen stored at 15°C*. J. Anim. Sci. 37: 532-5.
- [105] Pursel VG & Johnson LA. 1975. *Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure*. J Anim Sci. 40(1): 99-102.
- [106] Gottardi L, Brunel L, Zanelli L. 1980. *New dilution media for artificial insemination in the pig*. 9th International Conference on Animal Reproduction (ICAR). Madrid. Abstract book, pp. 49-53.
- [107] Maxwell WM & Johnson LA. 1999. *Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma*. Theriogenology 52(8): 1353-62. Review
- [108] Althouse GC. 1997. *Optimizing productivity of the AI boar*. Compend Contin Educ Pract Vet. 19(3): 400-4.



- [109] Flowers WL. 1998. *Management of Reproduction*. In: Progress in Pig Science 18, pp. 383-405.
- [110] Crabo BG. 1997. *Reproductive examination and evaluation of the boar*. In: R. S. Youngquist. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. 2nd ed. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. p. 972.
- [111] Domínguez JC, Alegre B, González R, Tejerina F, Peláez J, Ferreras A, Bernal S, Cárdenas S. 2006. *Desarrollo histórico de la inseminación artificial porcina*. In: Bonet S, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera X. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino. Ed. Universitat de Girona and Red Temática Nacional de Reproducción Porcina, pp 11-7.
- [112] *Pig production* from Queensland Primary Industries and Fisheries [on-line] <http://www.dpi.qld.gov.au/cps/rde/xchg/dpi/hs.xsl/27_122_ENA_HTML.htm> [Accessed: July 10, 2009]
- [113] Soede NM, Wetzels CCH, Zondage W, deKonig MAI, Kemp B. 1995. *Effect of time of insemination relative to ovulation as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows*. J Reprod Fert. 105: 135-40.
- [114] Waberski D, Weitze KF, Gleumes T, Schwarz M, Willmen T, Petzoldt R. 1994. *Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen*. Theriogenology 42(5): 831-40.
- [115] Wilson ME & Ward TL. *Artificial insemination* [on-line] <<http://gov.mb.ca/agriculture/livestock/pork/2008swineseminarpdf/bab22s00f.pdf>> [Accessed: January 12, 2009]
- [116] Mburu JN, Rodriguez-Martinez H, Einarsson S. 1997. *Changes in sperm ultrastructure and localisation in the porcine oviduct around ovulation*. Anim Reprod Sci. 47(1-2): 137-48.
- [117] Coy P, Lloyd R, Romar R, Satake N, Matás C, Gadea J, Holt WV. 2010. *Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function*. Theriogenology. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.03.005.
- [118] Holt WV. 2009. *Is semen analysis useful to predict the odds that the sperm will meet the egg?* Reprod Dom Anim. 44(3): 31-8.
- [119] Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. 1978. *Distribution and Morphology of Fresh and Frozen-Thawed Sperm in the Reproductive Tract of Gilts after Artificial Insemination*. Biol Reprod. 19(1): 69-76.
- [120] Steverink DWB, Soede NM, Bowman EG, Kemp B. 1998. *Semen backflow alter insemination and its effects on fertilization results in sows*. Anim Reprod Sci. 54: 109-19.
- [121] Matthijs A, Engel B, Woelders H. 2003. *Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender*. Reproduction 125(3): 357-67.
- [122] Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Peña FJ, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Calvete JJ. 2009. *The physiological roles of the boar ejaculate*. Soc Reprod Fertil Suppl. 66: 1-21.
- [123] Fazeli A, Duncan AE, Watson PF, Holt WV. 1999. *Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species*. Biol Reprod. 60(4): 879-86.

- [124] Yeste M, Lloyd RE, Badia E, Briz M, Bonet S, Holt WV. 2009. *Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro*. Anim Reprod Sci. 113(1-4): 263-78.
- [125] Vadnais ML, Galantino-Homer HL, Althouse GC. 2007. *Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation*. Arch Androl. 53(3): 109-23. Review.
- [126] Cánovas S & Coy P. 2008. *Molecular features of fertilization: gamete binding and fusion*. Rev Invest Clin 60(5): 403-13. Review. [Article in Spanish].
- [127] Wassarman PM. 1999. *Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis and fusion*. Cell 96: 175-83.
- [128] Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martínez EA. 2006. *Challenges in pig artificial insemination*. Reprod Domest Anim. 41(2): 43-53. Review.
- [129] *Swine reports*. Making Available Research-based Knowledge (Mark), from Department of Animal Science, NC State University [on-line]
<<http://mark.asci.ncsu.edu/SWINEREPORTS/2002/images/belsfig1.jpg>>
[Accessed: January 3, 2009]
- [130] Gil J. 2007. *Inseminación artificial en porcino según el punto de deposición de la dosis seminal*. From 3tres3.com [on-line]
<<http://www.3tres3.com/opinion/ficha.php?id=1973>>
[Accessed: July 14, 2009]
- [131] Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Welch GR, Schreier LL, Johnson LA. 1999. *In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer*. J Anim Sci. 77 (12): 3346-52.
- [132] Sánchez-Sánchez R. 2006. *Técnicas de inseminación artificial*. In: Bonet, S., Martínez, E., Rodríguez, J.E., Barrera, X. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino. Ed. Universitat de Girona and Red Temática Nacional de Reproducción Porcina, pp. 165-74.
- [133] Domínguez A, Rosales TAM, Lemus C. 2007. *An approach to relationships between vagina length and prolificity of sows*. J Anim Vet Adv. 6(10): 1152-54.
- [134] Levis DG, Burroughs S, Williams S. 2002. *Use of intra-uterine insemination of pigs: Pros, cons & economics*. In: Proceed. American Assoc. of Swine Vet 2002. Kansas City, MO, pp. 39-62.
- [135] Gil J, Tortades JM, Alevia A. 2000. *Post-cervical insemination*. In: Proceed. of the 16th IPVS Congress, Melbourne, Australia, p. 399.
- [136] Gil J, Tortades JM, Alevia A. 2004. *Post-cervical insemination use of small volumes and sperm number*. In: Proceed. of the XVIIIth International Pig Veterinary Society Congress. Ames, USA, p.456.
- [137] Gil J. 2006. *Inseminación post-cervical. Utilización en rutina de trabajo*. Av Tecnol Porc. 3(3): 66-76.
- [138] Williams S. 2002. *Inseminación post-cervical*. Working paper from Agrupación de Consultores en Tecnología del Cerdo. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. La Plata, Argentina [on-line]
<<http://www.vetefarm.com/nota.asp?not=767&sec=8&i=es>>
[Accessed: August 13, 2009].



References

- [139] Echegaray A, Arauzo F, Úbeda JL, Adamou A, Cabrejas S, Rueda S. 2003. *Estudio sobre los sistemas de inseminación post-cervical en porcino*. Anaporc. Revista de Porcinocultura 236: 172.
- [140] Roberts PK & Bilkei G. 2005. *Field experiences on post-cervical insemination in the sow*. Reprod Domest Anim. 40(5): 489-91.
- [141] Rozeboom KJ, Reicks DL, Wilson ME. 2004. *The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows*. J Anim Sci. 82(7): 2164-8.
- [142] Watson PF & Behan JR. 2002. *Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial*. Theriogenology 57(6): 1683-93.
- [143] Dimitrov F, Dimitrov M, Dimitrov S, Hernandez-Gil R, García Ruvalcaba JA. 2007. *Inseminación Post-Cervical en hembras multíparas con concentración reducida de espermatozoides por dosis: Resultados de campo en Bulgaria*. Av Tecnol Porc. 4(1): 36-44.
- [144] Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vázquez JM, Martínez EA. 2003. *Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa*. Theriogenology 60(1): 77-87.
- [145] Krueger C & Rath D. 2000. *Intrauterine insemination in sows with reduced sperm number*. Reprod Fertil Dev. 12(1-2): 113-7.
- [146] Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. 2001. *Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows*. Reproduction 122(2): 289-96.
- [147] Garcia-Casado P, Sala-Echave R, Reguera G, Pérez-Llano B. 2007. *Nuevas tecnologías en inseminación artificial profunda*. Av Tecnol Porc. 4(3): 118-26.
- [148] Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vázquez JL. 2005. *Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination*. Theriogenology 63(2): 536-47.
- [149] Wongtawan T, Saravia F, Wallgren M, Caballero I, Rodríguez-Martínez H. 2006. *Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses*. Theriogenology 65(4): 773-87.
- [150] Martínez EA, Vázquez JM, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Rodríguez-Martínez H, Roca J & Vázquez JL. 2006. *Incidence of unilateral fertilizations after low dose deep intrauterine insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions*. Reprod Domest Anim. 41(1): 41-7.
- [151] Bathgate R. 2008. *Functional integrity of sex-sorted, frozen-thawed boar sperm and its potential for artificial insemination*. Theriogenology 70(8): 1234-41.
- [152] Bolarín A, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Hernández M, Vázquez JM, Martínez EA. 2006. *Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used*. Theriogenology 65(3): 669-80.
- [153] Morris J. 2007. *Asymptote guide to cryopreservation*. 2nd ed. Cambridge: Asymptote Ltd. St. Johns Innovation Centre. [on-line]
<<http://www.asymptote.co.uk/cryo/Asymptote%20Guide%20to%20Cryopreservation.pdf>>
[Accessed: January 3, 2009]
- [154] Rathz T. *Undercooling of a liquid from NASA* [on-line].
<<http://science.nasa.gov/ssl/msad/df/under1.htm>>
[Accessed: January 3, 2009]

- [155] Storey KB & Storey JM. 1991. *Congelados y vivos*. Investigación y Ciencia nº 173: 58-64.
- [156] Berger B & Fischerleitner F. 1992. *On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straw volume, methods of freezing and thawing extenders*. *Reprod Dom Anim*. 27: 266-70.
- [157] Watson PF, Morris GJ, Clarke A. 1981. *Effect of low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, London.
- [158] Mazur P. 1963. *Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing*. *J Gen Physiol*. 47: 347-69.
- [159] Dayong G & Critser JK. 2000. *Mechanisms of cryoinjury in living cells*. *Journal* 41(4) from ILAR: Institute for Laboratory Animal Research, National Academy of Sciences, Washington [on-line].
<http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/41_4/Mechanisms.shtml>
[Accessed: January 4, 2009]
- [160] Meryman HT. 1971. *Osmotic stress as a mechanism of freezing injury*. *Cryobiology* 8(5): 489-500.
- [161] Gilmore JA, Du J, Tao J, Peter AT, Critser JK. 1996. *Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation*. *J Reprod Fertil*. 107(1): 87-95.
- [162] Curry MR, Kleinhans FW, Watson PF. 2000 *Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram, and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore*. *Cryobiology* 41(2): 167-73.
- [163] Mazur P, Leibo SP, Chu EH. 1972. *A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells*. *Exp Cell Res* 71(2): 345-55.
- [164] Morris GJ, Acton E, Avery S. 1999. *A novel approach to sperm cryopreservation*. *Hum Reprod*. 14(4): 1013-21.
- [165] Leibo SP & Mazur P. 1971. *The role of cooling rates in low-temperature preservation*. *Cryobiology* 8(5): 447-52.
- [166] Watson PF. 1979. *The preservation of semen in mammals*. In: Finn CA, ed. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Oxford University Press, London, pp 283-350.
- [167] Best, Ben. *Physical parameters of cooling in cryonics (review, 1990-2005)* [on-line].
<<http://www.benbest.com/cryonics/cooling.html>>
[Accessed: July 28, 2009]
- [168] Ito J, Kawabe M, Ochiai H, Suzukamo C, Harada M, Mitsugi Y, Seita Y, Kashiwazaki N. 2008. *Expression and immunodetection of aquaporin 1 (AQP1) in canine spermatozoa*. *Cryobiology* 57(3): 312-4.
- [169] Zilli L, Schiavone R, Chauvigné F, Cerdà J, Storelli C, Vilella S. 2009. *Evidence for the Involvement of Aquaporins in Sperm Motility Activation of the Teleost Gilthead Sea Bream (Sparus aurata)*. *Biol Reprod*. 81(5): 880-8.
- [170] Rodríguez Gómez L. 2005. *Reconstitución de productos hematopoyéticos criopreservados: control de calidad, estabilidad osmótica y lavado de DMSO*. Doctoral thesis. Facultat de medicina, Universitat Autònoma de Barcelona.



References

- [171] Rapatz G & Luyet B. 1959. *Recrystallization at high sub-zero temperatures in gelatin gels subjecte to various cooling treatments*. *Biodynamica* 8: 85-105.
- [172] Mazur P. 1984. *Freezing of living cells: Mechanisms and implications*. *Am J Physiol M7(Cell Physiol 16)*: C125-C142.
- [173] Corona A & Cherchi R. 2009. *Microbial quality of equine frozen semen*. *Anim Reprod Sci.* 115(1-4): 103-9.
- [174] Spallanzani L. 1776. *Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell' uomo e degli animali*. *Opusculi di Fisica Animale e Vegetabile*, Modena.
- [175] Milovanov VK & Selivanova O. 1932. *Dilutors for sperm of livestock*. *Probl zhiwotn.* 2: 75-86.
- [176] Bernstein AD & Petropavlovsky VV. 1937. *Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa*. *Bjull Eksp Biol Med* 3: 41-3.
- [177] Jahnel F. 1938. *Über die Widerslendifähigkeit von menschlichen spermatozoen gegenüber starker kälte*. *Klinische Wochenschrift* 17: 1273-4.
- [178] Fuller BJ, Benson EE, Lane N. 2004. *Life in the Frozen State*. CRC Press, USA, p 354.
- [179] Sørensen E. 1940. *Insemination with gelatinized semen in paraffined cellophane tubes* [Danish]. *Medlernsbl Danske Dyrlaegeforen.* 23: 166-9.
- [180] Polge C, Salamon S, Wilmut I. 1970. *Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination*. *Vet Rec.* 87(15): 424-9.
- [181] Bunge RG & Sherman JK. 1953. *Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa*. *Nature* 172: 767-768.
- [182] Crabo B & Einarsson S. 1971. *Fertility of deep frozen boar spermatozoa*. *Acta Vet Scand.* 12(1): 125-7.
- [183] Graham EF, Rajamannan AHJ, Schmehl MKL, Maki-Laurila M, Bower RE. 1971. *Fertility studies with frozen boar spermatozoa*. *A I Dig.* 19(6): 6.
- [184] Pursel VG & Johnson LA. 1971. *Fertility with frozen boar spermatozoa*. *J Anim Sci.* 33: 265. Abstract.
- [185] Westendorf P, Richter L, Treu H. 1975. *Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren*. [Deep freezing of boar sperma. Laboratory and insemination results using the Hülsenberger paillete method] *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 82(7): 261-7.
- [186] Gadea J. 2004. *El uso de semen porcino congelado*. *Mundo ganadero* 169: 60-62.
- [187] Hammit DG & Martin PA. 1989. *Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled-rate freezing in straws*. *Theriogenology* 32: 359-68.
- [188] Juarez JD, Hernández M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J. 2009. *Fast cooling rates from 17 to 5°C do not impair frozen-thawed boar sperm quality*. *Reprod. Dom. Anim.* 44(3): 86. Abstract.
- [189] Thurston LM, Holt WV, Watson PF. 2003. *Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison*. *Theriogenology* 60(1): 101-13.

- [190] Zondervan R, Kulzer F, Berkhout GCG, Orrit M. 2007. *Local viscosity of supercooled glycerol near T_g probed by rotational diffusion of ensembles and single dye molecules*. In: *Proceeds. of the national academy of sciences of the USA (PNAS)*, 104 (31): 12628-33.
- [191] Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. 2000. *Storage of boar semen*. *Anim Reprod Sci.* 62(1-3): 143-72. Review.
- [192] Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. 1973. *Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa*. *J Anim Sci.* 37(2): 528-31.
- [193] Tamuli MK & Watson PF. 1994. *Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation*. *Vet Rec.* 135(7): 160-2.
- [194] Larsson K & Einarsson S. 1975. *Fertility and post-thawing characteristics of deep frozen boar spermatozoa*. *Andrologia* 7(1): 25-30.
- [195] Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. 2008. *Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress*. *Reprod Domest Anim.* 43(4): 18-31. Review.
- [196] 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(3): 491-8.
- [197] Eastman JT & DeVries AL. 1987. *Peces antárticos*. *Investigación y ciencia* nº 124.
- [198] Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*. *Nature* 164(4172): 666.
- [199] Martin IC. 1963. *Effects of lecithin, egg-yolk, fructose and period of storage at 5 degrees C on bull spermatozoa deep-frozen to 79 degrees C*. *J. Reprod Fertil.* 6: 441-9.
- [200] Foote RH. 1964. *Extenders for freezing dog semen*. *Am J Vet Res.* 25: 37-40.
- [201] Sawada Y & Chang MC. 1964. *Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide*. *Fertil Steril.* 15: 222-9.
- [202] Sherman JK. 1964. *Dimethyl sulfoxide as a protective agent during freezing and thawing of human spermatozoa*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 117: 261-4.
- [203] Watson PF. 1975. *The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with fluorescent probe*. *J Reprod Fertil.* 42: 105-11.
- [204] Foulkes JA. 1977. *The separation of lipoproteins from egg yolk and their effects on the motility and integrity of bovine spermatozoa*. *J Reprod Fertil.* 49: 277-84.
- [205] Purdy PH & Graham JK. 2004. *Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility*. *Biol Reprod.* 71(2): 522-7.
- [206] Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Brèque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL. 2008. *Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry*. *Theriogenology* 70(8): 1251-9.
- [207] Pesch S & Hoffmann B. 2007. *Cryopreservation of Spermatozoa in Veterinary Medicine*. *J Reproduktionsmed Endokrinol.* 4(2): 101-5.



References

- [208] Asymptote Ltd., Specialist in controlling solidification research and product development [on-line]
<<http://www.asymptote.co.uk/gallery.html>>
[Accessed: August 2, 2009]
- [209] Watson PF & Plummer JM. 1985. *The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling*. In: Johnson LA & Larsson K. Deep freezing of boar semen. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, pp. 113-27.
- [210] Watson PF. 1995. *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. *Reprod Fertil Dev.* 7: 871-91.
- [211] Parks JE. 1997. *Hypothermia and mammalian gametes*. In: Karow AM & Critser JK. Reproductive tissue banking: scientific principles. Academic Press, San Diego, pp. 229-61.
- [212] Watson PF. 2000. *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 481-92.
- [213] Guthrie HD & Welch GR. 2005. *Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa*. *Reprod Fertil Dev.* 17(4): 467-77.
- [214] Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. 2001. *Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation*. *J Androl.* 22(3): 382-94.
- [215] García-Herreros M, Barón FJ, Aparicio IM, Santos AJ, García-Marín LJ, Gil MC. 2008. *Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation*. *Int J Androl* 31(5): 490-8.
- [216] Peña FJ, Saravia F, García-Herreros M, Núñez-Martínez I, Tapia JA, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 2005. *Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality*. *J Androl.* 26(6): 716-23.
- [217] Pesch S & Bergmann M. 2006. *Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation*. *Micron.* 37(7): 597-612.
- [218] Petrunkina AM, Jebe E, Töpfer-Petersen E. 2005. *Regulatory and necrotic volume increase in boar spermatozoa*. *J Cell Physiol.* 204(2): 508-21.
- [219] Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchoroguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. 1993. *Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model*. *J Exp Zool.* 265(4): 432-7.
- [220] Courtens JL, Ekwall H, Paquignon M, Plöen L. 1989. *Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during and after freezing*. *J Reprod Fertil.* 87(2): 613-26.
- [221] Quinn PJ. 1985. *A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes*. *Cryobiology* 22(2): 128-46.
- [222] Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F. 2005. *Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation*. *Reproduction* 129(3): 371-8.
- [223] Alberts A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. 4a ed. Ediciones Omega. Barcelona.

- [224] Holt WV & North RD. 1984. *Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study*. J Exp Zool. 230(3): 473-83.
- [225] Parks JE & Lynch DV. 1992. *Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes*. Cryobiology 29(2): 255-66.
- [226] Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM. 2001. *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen*. Reproduction 121(3): 395-401.
- [227] Maxwell WMC & Johnson LA. 1997. *Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation*. Theriogenology 48(2): 209-19.
- [228] Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. 2004. *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen*. Theriogenology 63(2): 411-21.
- [229] De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1990. *Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes*. Criobiology 27(2): 171-83.
- [230] Chen Y & Liu RZ. 2007. [Cryopreservation of spermatozoa] [Chinese]. Zhonghua Nan Ke Xue. 13(8): 734-8. Review.
- [231] White IG. 1993. *Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review*. Reprod Fertil Dev. 5(6): 639-58.
- [232] Nikolopoulou M, Soucek DA, Vary JC. 1985. *Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation*. Biochim Biophys Acta. 815(3): 486-98.
- [233] Simpson AM, Swan MA, White IG. 1987. *Susceptibility of epididymal boar sperm to cold shock and protective action of phosphatidylcholine*. Gamete Res. 17(4): 355-73.
- [234] Green CE & Watson PF. 2001. *Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation*. Reproduction 122(6): 889-98.
- [235] Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS. 1994. *Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm*. Cryobiology 31(3): 224-38.
- [236] Petrunkina AM, Volker G, Weitze KF, Beyerbach M, Töpfer-Petersen E, Waberski D. 2005. *Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions*. Theriogenology 63(8): 2278-99.
- [237] Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. *Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon*. J Androl. 21(1): 1-7. Review.
- [238] Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. 1996. *Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways*. Frontiers in Bioscience 1: d189-205.
- [239] Breitbar H. 2002. *Role and Regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis*. J Reprod Immunol. 53(1-2): 151-9.
- [240] Breitbar H. 2002. *Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction*. Mol Cell Endocrinol. 187(1-2): 139-44.
- [241] Harrison RA & Miller NG. 1994. *A possible role for Ca(2+)-ATPase in human sperm capacitation*. J Reprod Fertil. 102(1): 107-16.
- [242] DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. 1992. *Ca(2+)-related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca(2+)-ATPase*. J Reprod Fertil. 96(1): 363-77.



References

- [243] Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. 1995. *Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis*. Mol Reprod Dev. 40(2): 233-41.
- [244] Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. 1996. *Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes*. Mol Reprod Dev. 45(3): 378-91.
- [245] Harrison RA & Miller NG. 2000. *cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm*. Mol Reprod Dev. 55(2): 220-8.
- [246] van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. 2005. *Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells*. Mol Hum Reprod. 11(8): 583-90.
- [247] Gadella BM & Harrison RA. 2002. *Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells*. Biol Reprod. 67(1): 340-50.
- [248] Gadella BM & Harrison RA. 2000. *The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane*. Development 127(11): 2407-20.
- [249] de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. 2003. *Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells*. Biol Reprod. 68(6): 2122-34.
- [250] Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, Gadella BM. 2001. *Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane*. J Cell Sci. 114(19): 3543-55.
- [251] Kurz A, Viertel D, Herrmann A, Müller K. 2005. *Localization of phosphatidylserine in boar sperm cell membranes during capacitation and acrosome reaction*. Reproduction 130(5): 615-26.
- [252] Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. 1999. *Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation*. J. Biol. Chem. 274(5): 3235-42.
- [253] Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 2003. *Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity*. Theriogenology 60(4): 677-89.
- [254] Galantino-Homer HL, Zeng WX, Megee SO, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski I. 2006. *Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation*. Mol Reprod Dev. 73(5): 638-50.
- [255] Ramió L. 2009. *Dinàmica de la motilitat, fosforil·lació de proteïnes i l'activitat mitocondrial de l'espermatozoide porcí durant la capacitació i reacció acrosòmica "in vitro"*. Doctoral thesis. Autonomous University of Barcelona, Barcelona.
- [256] Tardif S, Dubé C, Chevalier S, Bailey JL. 2001. *Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins*. Biol Reprod. 65(3): 784-92.
- [257] Holt WV & Harrison RA. 2002. *Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation*. J Androl. 23(4): 557-65.

- [258] Peña FJ, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Ortega-Ferrusola C, González Fernández L, Macías García B. 2009. *Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review*. *Reprod Domest Anim*. 44(2): 345-9.
- [259] Sokolowska A, García BM, Fernández LG, Ortega-Ferrusola C, Tapia JA, Peña FJ. 2009. *Activated caspases are present in frozen-thawed canine sperm and may be related to post thaw sperm quality*. *Zygote* 17(4): 297-305.
- [260] Ortega-Ferrusola C, García BM, Gallardo-Bolaños JM, González-Fernández L, Rodríguez-Martinez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009. *Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa*. *Anim Reprod Sci*. 114(4): 393-403.
- [261] Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. 2001. *Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation*. *J Androl*. 22(4): 646-51.
- [262] Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A. 2004. *Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa*. *Biol Reprod*. 71(6): 1828-37.
- [263] Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ. 2004. *Activation pattern of caspases in human spermatozoa*. *Fertil Steril*. 81(1): 802-9.
- [264] Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. 2004. *Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm*. *Biol Reprod*. 71(1): 28-37.
- [265] Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. 2005. *Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction*. *Hum Reprod*. 20(12): 3459-68.
- [266] Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, Grizard G, Durand P, Levy R. 2007. *Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa*. *Hum Reprod*. 22(2): 380-8.
- [267] Brum AM, Sabeur K, Ball BA. 2008. *Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation*. *Theriogenology* 69(9): 1041-55.
- [268] Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galán Y, Varela-Fernández E, Gallardo-Bolaños JM, Muriel A, González-Fernández L, Tapia JA, Peña FJ. 2008. *Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm*. *J Androl*. 29(2): 213-21.
- [269] AAVV. 2002. *Phospholipid metabolism in apoptosis*. *Subcell. Biochem.*, Volume 36. Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- [270] Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell JM, Medrano A, Bonet S, Briz MD, Pinart E, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2008. *Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm*. *Theriogenology* 69(9): 1083-94.
- [271] Guthrie HD, Welch GR. 2005. *Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm*. *Theriogenology* 63(2): 396-410. Review.
- [272] Choi YJ, Uhm SJ, Song SJ, Song H, Park JK, Kim T, Park C, Kim JH. 2008. *Cytochrome c upregulation during capacitation and spontaneous acrosome reaction determines the fate of pig sperm cells: linking proteome analysis*. *J Reprod Dev*. 54(1): 68-83.



References

- [273] Grunewald S, Kriegel C, Baumann T, Glander HJ, Paasch U. 2009. *Interactions between apoptotic signal transduction and capacitation in human spermatozoa*. Hum Reprod. 24(9): 2071-8.
- [274] Peterson RN, Russell L, Hook L, Bundman D, Freund M. 1980. *Characterization and location of adenylyl cyclase in membrane vesicles and intact boar and human spermatozoa*. J Cell Sci. 43: 93-102.
- [275] Breitbart H, Cohen G, Rubinstein S. 2005. *Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction*. Reproduction 129(3): 263-8.
- [276] Breitbart. 2003. *Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction*. Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand) 49(3): 321-7.
- [277] Kruger H, Schroder W, Buchner K, Hucho F. 1990. *Protein kinase C inhibition by calmodulin and its fragments*. J Protein Chem. 9(4): 467-73.
- [278] Burant CF & Bell GI. 1992. *Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins*. Biochemistry 31(42): 10414-20.
- [279] Aitken RJ. 1995. *Free radicals, lipid peroxidation and sperm function*. Reprod Fertil Dev. 7(4): 659-68.
- [280] Aitken RJ. 2000. *Possible redox regulation of sperm motility activation*. J Androl. 21(4): 491-96.
- [281] Garbi M, Rubinstein S, Lax Y, Breitbart H. 2000. *Activation of protein kinase Calpha in the lysophosphatidic acid-induced bovine sperm acrosome reaction and phospholipase D1 regulation*. Biol Reprod. 63(5): 1271-7.
- [282] Budnick LT & Mukhopadhyay AK. 2002. *Lysophosphatidic acid and its role in reproduction*. Biol Reprod. 66(4): 859-65. Review.
- [283] Villalonga P, López-Alcalá C, Chiloeches A, Gil J, Marais R, Bachs O, Agell N. 2002. *Calmodulin prevents activation of Ras by PKC in 3T3 fibroblasts*. J Biol Chem. 277(40): 37929-35.
- [284] Ecroyd H, Jones RC, Aitken RJ. 2003. *Tyrosine phosphorylation of Hsp-90 during mammalian sperm capacitation*. Biol Reprod. 69(6): 1801-7.
- [285] Harayama H, Okada K, Miyake M. 2003. *Involvement of cytoplasmic free calcium in boar sperm: head-to-head agglutination induced by a cell permeable cyclic adenosine monophosphate analog*. J Androl. 24(1): 91-9.
- [286] Roberts K, Wamstad J, Ensrud K, Hamilton D. 2003. *Inhibition of Capacitation-Associated Tyrosine Phosphorylation Signaling in Rat Sperm by Epididymal protein Crisp-1*. Biol Reprod. 69(2): 572-81.
- [287] Cohen G, Rubinstein S, Gur Y, Breitbart H. 2004. *Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation*. Dev Biol. 267(1): 230-41.
- [288] Márquez B & Suárez S. 2004. *Different signalling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation*. Biol Reprod. 70(6): 1626-33.
- [289] Bravo MM, Aparicio IM, Garcia-Herreros M, Gil MC, Peña FJ, Garcia-Marín LJ. 2005. *Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa*. Mol Reprod Dev. 71(1): 88-96.

- [290] Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. 2005. *The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signalling events required for fertilization*. Dev Cell. 9(2): 249-59.
- [291] Luconi M, Porazzi I, Ferruzzi P, Marchiani S, Forti G, Baldi E. 2005. *Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylyl cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate*. Biol Reprod. 72(1): 22-32.
- [292] Agell N, Jaumot M, Rodriguez-Vilarrupla A, Brun S, Abella N, Canela N, Estanyol JM, Bachs O. 2006. *The diverging roles of calmodulin and PKC in the regulation of p21 intracellular localization*. Cell cycle 5(1): 3-6.
- [293] Rodriguez-Gil J. 2006. *Mammalian Sperm Energy Resources Management and Survival during Conservation in Refrigeration*. Reprod Domest Anim. 41(2): 11-20.
- [294] Sancho S, Casas I, Rodríguez-Gil JE, Ekwall H, Saravia F, Rodríguez-Martínez H, Flores E, Pinart E, Briz M, Garcia-Gil N, Bassols J, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. 2007. *Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs*. Reproduction 134(1): 111-21.
- [295] Adachi J, Tate S, Miyake M, Harayama H. 2008. *Effects of Protein Phosphatase Inhibitor Calyculin A on the Postacrosomal Protein Serine/Threonine Phosphorylation State and Acrosome Reaction in Boar Spermatozoa Incubated with a cAMP Analog*. J Reprod Dev. 54(3): 171-6.
- [296] Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Peña FJ. 2008. *Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing*. Theriogenology 70(8): 1242-50.
- [297] Naz RK & Rajesh PB. 2004. *Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction*. Reprod Biol Endocrinol. 2: 75. Review.
- [298] Volpe S, Galeati G, Bernardini C, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Seren E, Spinaci M. 2008. *Comparative Immunolocalization of Heat Shock Proteins (Hsp)-60, -70, -90 in Boar, Stallion, Dog and Cat Spermatozoa*. Reprod Domest Anim. 43(4): 385-92.
- [299] Bermudez V, Bermudez F, Arraiz Z, Nallet A et al. 2007. *Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución*. AVFT 26(2): 76-86. [on-line] <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-02642007000200002&script=sci_arttext> [Accessed: September 16, 2009]
- [300] Bragado MJ, Aparicio IM, Gil MC, Garcia-Marin LJ. 2010. *Protein kinases A and C and phosphatidylinositol 3 kinase regulate glycogen synthase kinase-3A serine 21 phosphorylation in boar spermatozoa*. J Cell Biochem. 109(1): 65-73.
- [301] Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. 2009. *The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa*. Theriogenology 72(6): 784-97.
- [302] Courtens JL, Paquignon M, Blaise F, Ekwall H, Ploen L. 1989. *Nucleus of the boar spermatozoon: structure and modifications in frozen, frozen-thawed and sodium dodecyl sulphate-treated cells*. Mol Reprod Dev. 1(4): 264-77.
- [303] Cremades T, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Abaigar T, Vázquez JM, Martínez EA. 2005. *Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa*. J Androl. 26(5): 610-8.



- [304] Flores E, Taberner E, Rivera MM, Peña A, Rigau T, Miró J, Rodríguez-Gil JE. 2008. *Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates*. Theriogenology 70(6): 936-45.
- [305] Johnson LA, Aalbers JG, Willems CM, Sybesma W. 1981. *Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms*. J Anim Sci. 52(5): 1130-6.
- [306] Medrano A & Holt WV. 1998. *Variación individual en susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. [Inter-individual boar sperm susceptibility to freezing-thawing protocols]*. Arch. Zootec. 47: 319-27.
- [307] Holt WV. 2000. *Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences*. Theriogenology 53(1): 47-58.
- [308] Hernández M, Roca J, Ballester J, Vazquez JM, Martínez EA, Johannisson A, Saravia F, Rodríguez-Martínez H. 2006. *Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability*. Int J Androl. 29(6): 583-91.
- [309] Medrano A, Watson PF, Holt WV. 2002. *Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope*. Reproduction 123(2): 315-22.
- [310] Hernández, M, Roca J, Gil MA, Vázquez JM, Martínez EA. 2007. *Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability*. Theriogenology 67: 1436-45.
- [311] Thurston LM, Watson PF, Holt WV. 2002. *Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?* Cryo Letters 23(4): 255-62.
- [312] Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. 2002. *Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability cryopreservation*. Biol Reprod. 66(3): 545-54.
- [313] Medrano A, Holt WV, Watson PF. 2009. *Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation*. Andrologia 41(4): 246-50.
- [314] Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR Jr. 2006. *Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm*. Reproduction 131(5): 887-94.
- [315] Medrano A, García-Gil N, Ramió L, Rivera MM, Fernández-Novell JM, Ramírez A, Peña A, Briz MD, Pinart E, Concha I, Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2006. *Hexose-specificity of hexokinase and ADP-dependence of pyruvate kinase play important roles in the control of monosaccharide utilization in freshly diluted boar spermatozoa*. Mol Reprod Dev. 73(9): 1179-94.
- [316] Bucci D, Spinaci M, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Galeati G. 2008. *Immunodetection of hexose transporters in mammalian spermatozoa*. Vet Res Commun. 32(1): S119-21.
- [317] Huang SY, Kuo YH, Lee WC, Tsou HL, Lee YP, Chang HL, Wu JJ, Yang PC. 1999. *Substantial decrease of heat shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa*. Theriogenology 51(5): 1007-16.
- [318] Brouwers JF, Silva PF, Gadella BM. 2005. *New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in viable boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing*. Theriogenology 63(2): 458-69.
- [319] Parrilla I, Vazquez JM, Caballero I, Gil MA, Hernandez M, Roca J, Lucas X, Martinez EA. 2009. *Optimal characteristics of spermatozoa for semen technologies in pigs*. Soc Reprod Fertil Suppl. 66: 37-50.

- [320] Feitsma H & Leenhouwers JI. 2009. *Comparing the results of fresh and frozen semen used for international linkage of nucleus herds in pig breeding*. *Reprod Dom Anim.* 44(3): 102.
- [321] Gil J, Jimenez M, Diaz C, Sanchez R, Martin Rillo S. 1995. *Swine AI with frozen boar semen in work routine*. In: *Proceeds. 3rd International Conference on Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany*. *Reprod Dom Anim.* 31(1): 289-90.
- [322] Gil J, Díez J, Llamas PJ, López JM. 2001. *Inseminación con semen congelado de verraco utilizando la técnica de la IA postcervical. Primeros resultados*. *Anaporc* 217: 104-5.
- [323] Abad M, Garcia JC, Sprecher DJ, Cassar G, Friendship RM, Buhr MM, Kirkwood RN. 2007. *Effect of insemination-ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm*. *Reprod Domest Anim.* 42(4): 418-22.
- [324] Yamaguchi S, Funahashi H, Murakami T. 2009. *Improved Fertility in Gilts and Sows after Artificial Insemination of Frozen-Thawed Boar Semen by Supplementation of Semen Extender with Caffeine and CaCl(2)*. *J Reprod Dev.* 55(6): 645-9.
- [325] Fraser L, Strzezek R, Strzezek J. 2007. *Fertilizing capacity of boar semen frozen in an extender supplemented with ostrich egg yolk lipoprotein fractions-a pilot study*. *Pol J Vet Sci.* 10(3): 131-5.
- [326] Salvador I, Viudes-de-Castro MP, Bernacer J, Gómez EA, Silvestre MA. 2005. *Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadina goats: a field assay*. *Reprod Domest Anim.* 40(6): 526-9.
- [327] Mezalira A, Dallanora D, Bernardi M, Wentz I, Bortolozzo FP. 2005. *Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows*. *Reprod Domest Anim.* 40(1): 1-5.
- [328] Waberski D. 2009. *Critical steps from semen collection to insemination*. In: *Proceeds. 21st Annual Meeting of the EU-AI Vets, Ghent, Belgium*, pp. 66-9.
- [329] Broekhuijse MLWJ, Feitsma H, Gadella BM. 2009. *Relationship computer assisted semen analysis of boar semen and reproductive performance in sows*. In: *Proceeds. 21st Annual Meeting of the EU-AI Vets, Ghent, Belgium*, pp. 45-53.
- [330] Bolarín A, Hernández M, Vazquez JM, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Roca J. 2009. *Use of frozen-thawed semen aggravates the summer-autumn infertility of AI weaned sows in the Mediterranean region*. *J Anim Sci.* 87(12): 3967-75.
- [331] Martínez EA, Vázquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vázquez JL, Day BN. 2002. *Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows*. *Reproduction* 123(1): 163-70.
- [332] Großfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WM, Rath D. 2008. *New aspects of boar semen freezing strategies*. *Theriogenology* 70(8): 1225-33.
- [333] Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Puigmulé M, Garcia E, Bonet S. 2008. *Quality of frozen-thawed boar sperm after different dilutions in BTS*. In: *Proceeds. 1st Joint International Meeting Spanish Association for Animal Reproduction and the British Andrology Society, 2008. Gijón, Spain*. *Reprod. Dom. Anim.* 43 (4): 72. Abstract.
- [334] Galli A, Signori T, Balduzzi D. 1998. *Statistical Methods to Produce "Good" Bovine Frozen Semen*. *Reprod Dom Anim.* 33(3-4): 125-32.
- [335] Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. 2005. *Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability*. *Theriogenology* 63(5): 1320-33.



- [336] Holt C, Holt WV, Moore HD, Reed HC, Curnock RM. 1997. *Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials*. J Androl. 18(3): 312-23.
- [337] Gil MA, Roca J, Cremades T, Hernández M, Vázquez JM, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA. 2005. *Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?* Theriogenology 64: 305-16.
- [338] Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Garcia-Gil N, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. 2008. *Valuable boar sperm parameters when searching for freezability traits*. In: Proceeds. 5th International Conference on Boar Semen Preservation. 2007. Alliston, ON, Canada. Theriogenology 70(8): 1396.
- [339] Gil MA, Almiñana C, Roca J, Vázquez JM, Martínez EA. 2008. *Boar semen variability and its effects on IVF efficiency*. Theriogenology 70(8): 1260-8. Review.
- [340] Gadea J. 2005. *Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility*. Theriogenology 63(2): 431-44.
- [341] Tsakmakidis IA, Lymberopoulos AG, Khalifa TAA, Avramidis TT. 2009. *Field-fertility of porcine semen*. Reprod Dom Anim. 44(3): 128.
- [342] Oh SA, You YA, Park YJ, Pang MG. 2009. *The sperm penetration assay predicts the litter size in pigs*. Int J Androl. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2009.00976.x.
- [343] Spötter A, Hamann H, Müller S, Distl O. 2008. *Effect of Polymorphisms in Four Candidate Genes for Fertility on Litter Size in a German Pig Line*. Reprod Domest Anim. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2008.01304.x.
- [344] Václavková E & Urbánková L. 2009. *Influence of backfat thickness on reproduction parameters in Czech Landrace gilts*. Reprod Dom Anim. 44(3): 129. Abstract.
- [345] Ramírez O, Tomàs A, Barragan C, Noguera JL, Amills M, Varona L. 2009. *Pig melatonin receptor 1a (MTNR1A) genotype is associated with seasonal variation of sow litter size*. Anim Reprod Sci. 115(1-4): 317-22.
- [346] van den Brand H, van Enckevort LC, van der Hoeven EM, Kemp B. 2009. *Effects of dextrose plus lactose in the sows diet on subsequent reproductive performance and within litter birth weight variation*. Reprod. Domest. Anim. 44(6): 884-8.
- [347] Li K, Ren J, Xing Y, Zhang Z, Ma J, Guo Y, Huang L. 2009. *Quantitative trait loci for litter size and prenatal loss in a White Duroc x Chinese Erhualian resource population*. Anim Genet. 40(6): 963-6.
- [348] Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA. 2006. *Factors influencing boar sperm cryosurvival*. J Anim Sci. 84(10): 2692-9.
- [349] Schmidt H & Kamp G. 2004. *Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis*. Reproduction 128(2): 171-79.
- [350] Núñez-Martínez I, Morán JM, Peña FJ. 2006. *Two step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance*. J Androl. 27(4): 596-603.
- [351] Flowers WL. 2009. *Selection for boar fertility and semen quality--the way ahead*. Soc Reprod Fertil Suppl. 66: 67-78.

- [352] Angulo C, Rauch MC, Droppelmann A, Reyes AM, Slebe JC, Delgado-López F, Guaiquil VH, Vera JC, Concha II. 1998. *Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C*. J Cell Biochem. 71(2):189-203.
- [353] Westhoff D & Kamp G. 1997. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa*. J Cell Sci. 110(15): 1821-9.
- [354] Feiden S, Wolfrum U, Wegener G, Kamp G. 2008. *Expression and compartmentalisation of the glycolytic enzymes GAPDH and pyruvate kinase in boar spermatogenesis*. Reprod Fertil Dev. 20(6): 713-23.
- [355] Jones AR & Connor DE. 2004. *Control of glycolysis in mature boar spermatozoa: effect of pH in vitro*. Reprod Fertil Dev. 16(3): 319-24.
- [356] Jones AR. 1998. *Chemical interference with sperm metabolic pathways*. J Reprod Fertil Suppl. 53: 227-34. Review.
- [357] Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Puigmulé M, Garcia E, Torner E, Castillo M, Bonet S. 2010. *Does fructose in BTS improve quality parameters in boar frozen-thawed sperm?* In: Proceeds. 14th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR). Eger, Hungary. Abstract book (ref. P3)
- [358] Powers MV, Clarke PA, Workman P. 2008. *Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90AA1 function and induces tumor-specific apoptosis*. Cancer Cell 14(3): 250-62.
- [359] Han Y, Haines CJ, Feng HL. 2007. *Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility*. Arch Androl. 53(4): 169-77. Review.
- [360] Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT. 1994. *Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation*. J Androl. 15(3): 255-65.
- [361] Tabuchi T, Shidara O, Harayama H. 2008. *A 32-kDa tyrosine-phosphorylated protein shows a protease-dependent increase in dead boar spermatozoa*. J Reprod Dev. 54(6): 502-7.
- [362] Yeste M, Holt WV, Briz M, Bonet S, Lloyd RE. 2009. *Boar spermatozoa do not induce changes in heat shock protein gene expression without direct contact with oviductal epithelial cells*. Reprod Dom Anim. 44(3): 132.
- [363] Ferlin A, Speltra E, Patassini C, Pati MA, Garolla A, Caretta N, Foresta C. 2010. *Heat shock protein and heat shock factor expression in sperm: relation to oligozoospermia and varicocele*. J Urol. 183(3): 1248-52.
- [364] Sánchez ER, Redmond T, Scherrer LC, Bresnick EH, Welsh MJ, Pratt WB. 1988. *Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells*. Mol Endocrinol. 2(8): 756-60.
- [365] Peknicova J, Pexidrova M, Kubatova A, Koubek P, Tepla O, Sulimenko T, Draber P. 2007. *Expression of beta-tubulin epitope in human sperm with pathological spermogram*. Fertil Steril. 88(4): 1120-8.
- [366] Secciani F, Bianchi L, Ermini L, Cianti R, La Sala GB, Focarelli R, Bini L, Rosati F. 2009. *Protein profile of capacitated versus ejaculated human sperm*. J Proteome Res. 8(7): 3377-89.



References

[367] Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Puigmulé M, Garcia E, Torner E, Castillo M, Bonet S. 2010. *Testing sonication conditions on boar sperm pellets to optimize protein recovery in supernatants*. In: Proceeds. 10th Conference of the Spanish Association of Animal Reproduction (AERA). Cáceres, Spain. Abstract book (ref. 012)

Image: Saint Anthony with pig in background, 1480-1490 (Piero di Cosimo, National Gallery of Art, Washington DC)

Appendix



Techniques, material and future perspectives of boar sperm cryopreservation

1. TECHNIQUES AND MATERIAL

The quality of sperm must be assessed before performing any procedure to assure the viability of the sample. Many sperm parameters can be evaluated at this regard: morphology, motility, concentration, membrane integrity and the percentage of non-altered acrosomes (osmotic resistance test) (WHO, 2010).

1.1. Analysis of the boar sperm quality (I): morphology

A minimum of 80% morphologically normal boar spermatozoa must be present on a good quality sample, according to the criteria established in the present thesis. The morphology is often assessed in FS although it can optionally be evaluated after freezing. Morphological changes that could take place from FS to FT sperm often concern only the sperm volume due to osmotic challenge (Petrunkina et al., 2005; Garcia-Herreros et al., 2008). The boar sperm morphology can be evaluated with the following protocol:

1. Gently drop 5-10 μ l of semen on a slide and cover with a coverslip.
2. Place the slide in a moist chamber (a Petri dish with wet filter paper) and wait for sperm to remain immotile.



3. Identify anomalous sperm features under a phase contrast microscope (x200) using positive phases and counting at least 300 spermatozoa per sample (distal droplets, Dd, should not be considered).

- ☞ Proximal droplets (Pd)
- ☞ Size/shape of the head
- ☞ Tails folded by the connecting piece
- ☞ Tails folded by the midpiece
- ☞ Tails folded by the Jensen's ring (JR)
- ☞ Coiled tails
- ☞ Isolated heads
- ☞ Broken tails
- ☞ Agglutinations

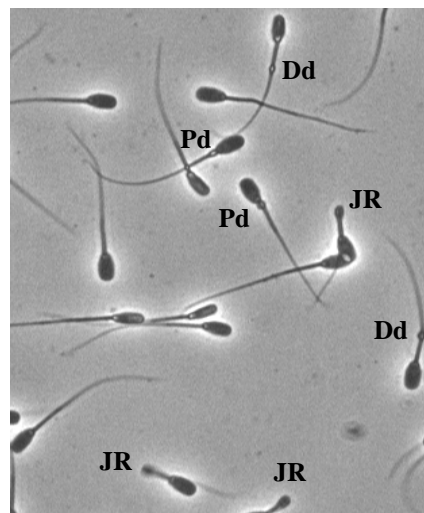


Figure 1 A Boar sperm (phase contrast x200).

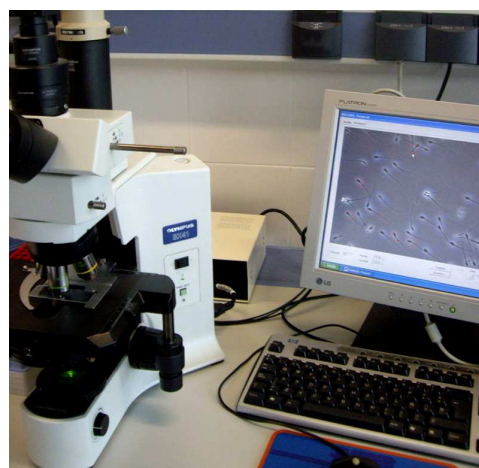


Figure 2 A Boar sperm morphology visualized through a computerized-assisted sperm analysis system (SCA2002®, Microptic SL, Barcelona).

1.2. Analysis of the boar sperm quality (II): motility

A minimum of 80% total sperm motility and 60% progressive motile boar spermatozoa must be present on a good quality sample of FS. At 240 min after thawing, over the 40% of sperm progressive motility is considered acceptable (good freezability ejaculate), according to the criteria established in the present thesis and to previous literature (Cerolini et al., 2001; Maldjian et al. 2004; Cremades et al. 2005).

Computerized-assisted sperm analysis (CASA) retrieves objective data for further analyses. However, the analysis of motility needs to be performed accurately since there is a high variation among pig breeds (Casas et al. 2010) and among sperm samples even from a same ejaculate. This fact is observed when assessing replicates, whose sperm can go from vigorous movement to paralysis in seconds and provoke confusion to the observer. This happens since the motility of sperm is based upon a mechanism very sensitive to the environment. For instance, EDTA in semen extenders can reduce motility since it is a calcium chelant. Moreover, as it is explained by Vyt et al. (2007), the sperm motility is better preserved when there is little contact with ambient air because extenders containing bicarbonate, which are most of them, provoke an efflux of CO₂ from the extender to the air that is directly correlated with the volume of air in contact with the sample. This allows compensation between the low CO₂ content of the air and the amount of CO₂ in the sample. The loss of CO₂ increases the pH of the extender and in turn that of sperm. It provokes increased motility, possibly related to the sensitivity of the enzymes to cytosolic pH, followed by a dramatical motility loss during storage. This loss is presumably linked to energy exhaustion caused by the initial rise in motility. For that reason it is not recommended to store samples in recipients leaving a considerable air space. This process occurring along days of storage could similarly operate when drops of semen are left for some seconds on a heat plate exposed to ambient air before motility assessment. In this case, the enhancement of motility is desirable because the observer wants the sperm shows its better motility during the assessment. Moreover, little variations in temperature have effects on motility too. Other deviations in motility are the obtention in some samples of higher total motility percentage compared to the percentage of sperm with membrane integrity. It is hypothesized the computer may confound some non-spermatic particles in the fluid as sperm cells, all them moving following the Brownian motion (i.e. the random movement of particles suspended in a fluid. Brown, 1828). Even dead sperm is sometimes classified by the computer as motile sperm because of the Brownian motion. Thus, several replicas must be performed to avoid bias in data. The boar sperm motility can be evaluated with the following protocol:

1. Place a sample of semen at 37°C and leave for 20 min until the spermatozoa recover its motility (this step is omitted when samples are taken from FT sperm).
2. Gently drop 20 µl of the sample on a Makler[®] counting chamber (see section 3 in appendix) and leave some seconds warming on a 37°C plate. Put the coverslip and rapidly assess motility under a phase contrast microscope (x100) using negative phases. Repeat with another drop when motility starts to decrease, counting at least 3 drops per sample and capturing 1500 spermatozoa per drop. Optionally samples can be performed a second assessment on-farm using conventional slides and a scale from 0 to 5 to describe the degree of motility observed. The computerized system gives different motility parameters:
 - Total motility %.
 - Circular trips %.



- Curvilinear velocity in $\mu\text{m/s}$ (VCL).
- Straight-linear velocity in $\mu\text{m/s}$ (VSL).
- Average velocity in $\mu\text{m/s}$ (VAP).
- Linearity index % ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$): linearity of the curvilinear trajectory.
- Straightness index % ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$): linearity of the mean trajectory.
- Oscillation index % ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL}$): oscillation of the real trajectory with respect to the mean trajectory.
- Amplitude of lateral head displacement in μm (ALH): mean width of the head oscillation as the sperm cell swims.
- Beat Cross frequency in Hz (BCF): frequency of crossings between the curvilinear trajectory and the mean trajectory.
- Progressive motility %: spermatozoa showing more than 45% of their STR.

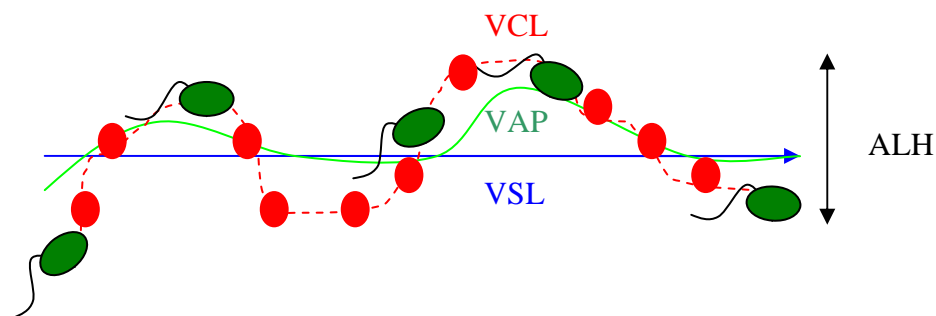


Figure 3A Representation of some motility parameters assessed by a computerized system over the displacement trajectory of a spermatozoon.

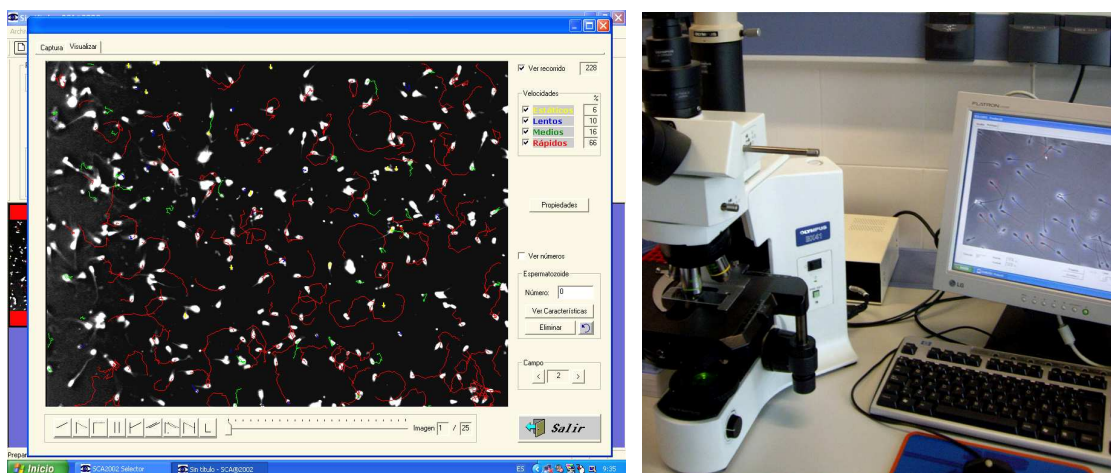



Figure 4A Boar sperm motility visualized through a computerized-assisted sperm analysis system (SCA2002[®], Microptic SL, Barcelona).

Frames captured	25
Frames captured per second	25
Area of a spermatozoon	[10-80] μm^2
Progressive spermatozoa	45% of their STR
Minimum frames to calculate ALH	10
Connectivity	11
Min/Max number of points ● tracked in a spermatozoon's trajectory	10/100

Table 1A Default parameters used in the present thesis for computerized assessment of the boar sperm motility with SCA2002[®] (Microptic SL, Barcelona).

1.3. Analysis of the boar sperm quality (III): concentration

perm counting is essential on the purpose of diluting semen to a desired extent. The number of sperm per ml of sample is the first parameter calculated to pack commercial doses and, also it is in many protocols in which dilutions are required. The following protocol details how to calculate the concentration using a Makler[®] counting chamber (Makler, 1980):

1. Dilute the sperm sample in formaldehyde saline solution (9 g NaCl and 30 ml formaldehyde per liter of distilled water). A dilution of 1:100; v:v is normally performed (5 μl of the sperm sample in 495 μl of solution). If the semen sample is too diluted try performing a 1:2; v:v dilution.
2. Put 20 μl of the sperm dilution in a Makler[®] counting chamber (10 μm deep) and count three rows or strips (10 squares per row). Repeat this count with new drops. Count only those spermatozoa inside the squares and those located over each line converging in one angle of the square (only this angle), conserving the same criteria in the different squares counted.
3. The number of spermatozoa counted in one strip of 10 squares indicates their concentration in $\times 10^6$ spz/ml, and a media is retrieved from different strips and drops. This concentration is calculated from the volume under one row of the chamber (0.001 mm^3). Remember to multiply by the factor of the dilution performed.

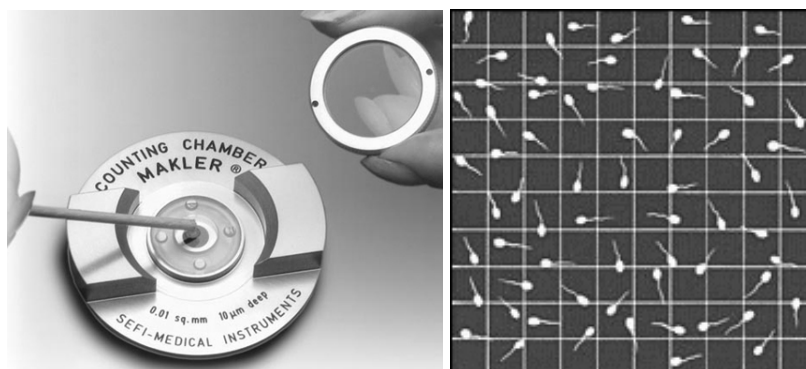


Figure 5A Makler[®] counting chamber (courtesy of Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel).

1.4. Analysis of the boar sperm quality (IV): membrane integrity

The membrane integrity of boar sperm is one of the most used parameters to estimate the sperm viability and fertility together with motility (Sutkeviciene et al., 2009) and for that reason terms like “dead” and “alive” are frequently associated with “altered membrane” and “intact membrane”, although they do not share the same terminological context. A minimum of 80% sperm displaying membrane integrity must be present on a good quality sample of FS, according to the criteria established in the present thesis. At 240 min after thawing, over the 40% of sperm displaying membrane integrity is considered acceptable (good freezability ejaculate). The membrane integrity of sperm can be evaluated either with the eosin-nigrosin dye or with the SYBR[®]14-PI staining (Garner & Johnson, 1995; Christensen et al., 2004). Fluorochromes have been used in the present thesis because they do not interfere with the egg yolk when using FT sperm (Nagy et al., 2003). SYBR[®]14 is a membrane permeable green fluorochrome that labels DNA in all cells whereas propidium iodide (PI) labels in red only the DNA of cells with altered membranes.

1. Prepare working solutions of SYBR[®]14 and PI (Sperm Viability Kit, Ref. L-7011. Molecular probes, Eugene, OR, USA). The SYBR[®]14 must be diluted 1:9; v:v in DMSO to make a 0.1 mM working solution. The PI is used at the concentration of the original solution in the kit (2.4 mM). Aliquot the fluorochromes to avoid repeated freeze-thawing cycles.
2. Dilute semen to 10×10^6 spz/ml in BTS or in other buffer without phosphate, which could interfere with SYBR[®]14. When using FT sperm (diluted 1:3; v:v in BTS), dilute 100 μ l of semen in 900 μ l of BTS to obtain a 1 ml sample at 10×10^6 spz/ml.

3. Add 1 μ l of SYBR[®]14 0.1 mM to an aliquot of 1 ml of diluted semen and vortex gently.
4. Incubate 10 min at 37°C.
5. Add 5 μ l of PI 2.4 mM and vortex gently.
6. Incubate 5 min at 37°C.
7. Count at least 200 spermatozoa per replica under a fluorescence microscope (x400) or alternatively analyze 20000 events by flow cytometry.

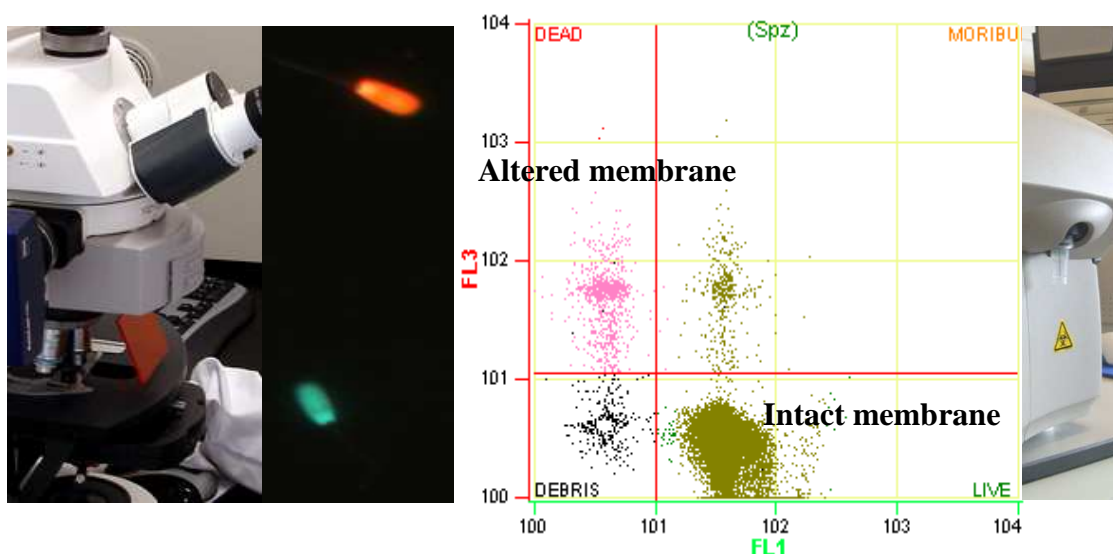


Figure 6A Representative images on the two methods employed in the present thesis to assess the membrane integrity of the boar spermatozoon. On the left, fluorescence microscopic assessment showing two labelled spermatozoa (x400). On the right, 20000 spermatozoa classified upon membrane integrity after flow cytometry assessment.

1.5. Analysis of the boar sperm quality (V): osmotic resistance test (ORT)

The osmotic resistance test consists of challenging sperm to a lower osmolality medium than seminal plasma and to a medium at a similar osmolality. It tests the capacity of sperm to fertilize when it is submitted to the osmotic pressure of the female tract. Good viability sperm must resist changes in osmolality and must show a low percentage of altered acrosomal membranes. A minimum of 80% sperm with intact acrosomes must be present on a good quality sample of FS, and also in FT sperm at 240 min after thawing (good freezability ejaculate), according to the criteria established in the present thesis. The following protocol has been adapted in our laboratory from the protocols described by Schilling et al. (1984) and Pérez-Llano et al. (1998):



1. Heat to 37°C the isotonic solution (300 mOsm; 3.42 g sodium citrate in 100 ml distilled water) and the hypotonic solution (150 mOsm; 1.14 g sodium citrate in 100 ml distilled water).
2. Mix 0.5 ml of semen with 1.5 ml of hypotonic solution and 0.5 ml of semen with 1.5 ml of isotonic solution (control). Any particular concentration of the semen sample is required.
3. Leave at 37°C for 15 min.
4. Count under a phase contrast microscope (x400) and using positive phases, the percentage of intact acrosomes in each solution (at least 100 spermatozoa per solution) and apply the following formula: $\frac{1}{2}$ (% intact acrosomes in the isotonic solution + % intact acrosomes in the hypotonic solution).

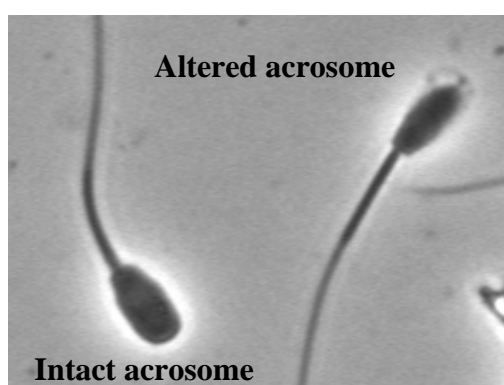


Figure 7A Representative image of two boar spermatozoa showing intact and altered acrosomes after the ORT test (phase contrast x400).

1.6. Immunolabelling of boar sperm

Immunolabelling is enclosed in the biological discipline of immunocytochemistry and consists in the detection of antigens, generators of antibodies. Antibodies, also called immunoglobulins, are glycoproteins produced in blood by the immune system of animals to defend against foreign particles, the antigens. Antigens contain sugar or protein residuals on their surface (epitopes) that are not recognized by the immune system. Antibodies bind to these epitopes and mediate the signalling pathways leading to the elimination of antigens.

The immune system generates as many antibodies as antigens it recognizes, and a group of antibodies recognizing a same antigen bind to different epitopes of the antigen. It is said the immune system produce polyclonal antibodies (antisera) because different cells recognizing one antigen can produce different antibodies against it, which represents a long-term defence because it assures a source of antibodies against the antigen even though the

antigen has changed in some epitopes. Polyclonal antibodies are commercially produced immunizing individuals from mammalian species for any antigen (carbohydrate or protein) desired.

The use of antibodies in immunolabelling requires conjugating the antibody to a molecule that could be visualized by the researcher. In immunolabelling for fluorescence microscopy the antibody is conjugated to a fluorochrome. In immunolabelling for western blot the antibody is conjugated to an enzyme that catalyzes the reaction of a substrate that produces chemiluminescence.

To develop a more specific antigen-detection system than polyclonal antibodies, monoclonal antibodies were produced (Köhler & Milstein, 1975). It is a solution of antibodies that target one exclusive epitope of the antigen. They are produced by extracting the spleen of an animal that has been challenged with an antigen of choice. The spleen contains precursors of the cells that produce the antibodies and are transfected with an immortal cell line (tumoral cells), generating hybrid cells called hybridomas. Hybridomas divide indefinitely when cultured in vitro and are screened to identify a hybridoma that secretes antibodies specific against a desired epitope of the antigen. Because monoclonal antibodies are highly specific, they are useful to avoid the background that normally produce polyclonal antibodies in immunolabelling.

In research, those antibodies that bind directly to the antigen are called primary antibodies whereas those that bind to a primary antibody, the primary acting as antigen of the last, are called secondary antibodies. Secondary antibodies are used to increase the intensity of the signal as they are conjugated with a probe for their detection. Because they are often polyclonal, many of them can bind to a same primary antibody. This system is called indirect immunofluorescence. In some cases the primary antibodies are conjugated to a probe without the necessity of secondary antibodies, which is called direct immunolabelling.

In the present thesis three different protocols of immunocytochemistry have been used: immunolabelling for fluorescence microscopy to detect the sperm membrane antigen GLUT3, immunolabelling for fluorescence microscopy to detect the sperm cytosolic antigens HSP90AA1 and Cu/ZnSOD and, immunolabelling of the three sperm proteins through one-dimensional western blotting.

Immunolabelling for fluorescence microscopy: sperm membrane antigens

1. Drop sperm samples onto polylysine-coated slides. Prepare also one replicate, one negative control (without primary antibody) and one autofluorescence control (non-labelled sample). Leave sperm settle for 10 min without completely drying.



2. Fix samples submerging slides during 20 min in 3% paraformaldehyde solution (3 g paraformaldehyde in 100 ml distilled water. Boil in water bath and add NaOH 1 N until the solution becomes transparent). The solution must be at the same temperature of semen.
3. Rinse in PBS (3 x 5 min).
4. Continue with the immunolabelling procedure avoiding the slides completely dry in any step of the procedure or alternatively store them in silica gel at -80°C after air drying before continuing with the procedure.
5. Put one drop of the primary antibody dilution (in PBS) on slides and leave for 1 h at room temperature, preferably in a moist chamber. Incubate the negative and autofluorescence controls with PBS only.
6. Rinse thoroughly with PBS (5 x 5 min).
7. Put one drop of the secondary antibody dilution (in PBS) on slides except on the autofluorescence control and left for 30 min at room temperature in dark.
8. Rinse thoroughly with PBS (5 x 5 min).
9. Immediately put one drop of mounting media (e.g. Fluoromount-G, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in each slide and cover with a coverslip. Seal with nail polish.
10. Store in dark at 4°C or observe at x1000 oil under a fluorescence microscope.

Immunolabelling for fluorescence microscopy: sperm cytosolic antigens

1. Drop sperm samples onto polylysine-coated slides. Prepare also one replicate, one negative control (without primary antibody) and one autofluorescence control (non-labelled sample). Leave sperm settle for 10 min without completely drying.
2. Fix samples submerging slides in -20°C methanol for 5 min and immediately permeabilize membranes with acetone at room temperature during 30 sec.
3. Rinse in PBS (3 x 5 min).
4. Continue with the immunolabelling procedure avoiding the slides completely dry in any step of the procedure or alternatively store in silica gel at -80°C after air drying before continuing with the procedure.
5. Block the unspecific binding sites during 30 min with blocking solutions (5-10%; w:v foetal bovine serum -FBS-, bovine serum albumin -BSA- or normal goat serum -NGS- in PBS).
6. Put one drop of the primary antibody dilution (in PBS) on slides and left for 1 h at room temperature, preferably in a moist chamber. Incubate the negative and autofluorescence controls with PBS only.
7. Rinse thoroughly with PBS (5 x 5 min).

- Put one drop of the secondary antibody dilution (in blocking solution) on slides except on the autofluorescence control and left for 30 min at room temperature in dark.
- Rinse thoroughly with PBS (5 x 5 min).
- Immediately put one drop of mounting media (e.g. Fluoromount-G, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) in each slide and cover with a coverslip. Seal with nail polish.
- Store in dark at 4°C or observe at x1000 oil under a fluorescence microscope.

One-dimensional western blotting for sperm samples

- Centrifuge semen samples twice at 600 x *g* for 10 min in PBS and aliquot into 2 ml tubes. Continue with the protocol or store pellets at -80°C.
- Resuspend pellets in 300-1000 µl ice-cold lysis buffer (pH 6.8), also called homogenizing or RIPA buffer, and sonicate (50% amplitude and at least 40 long-lasting pulses. Bandelin Sonopuls HD2070, MS73 tip. Bandelin Electronic, Berlin, Germany). Lysis buffer must contain 10 mM Tris-HCl, 15 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 150 mM potassium fluoride (KF), 0.6 M saccharose, 14 mM β-mercaptoethanol and a mixture of protease inhibitors: 10 µg/ml leupeptin, 1 mM benzamidine and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). Alternatively dilute a commercial protease inhibitor cocktail at 1:100; v:v (Ref. P8340, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- After 30 min in ice, centrifuge the homogenized suspensions at 4°C at maximal speed for 15 min.
- Calculate the total protein amount in supernatants using the Bradford method: 20 µl sample in 1000 µl Bradford reagent, incubate 5 min at ambient temperature and read at 595 nm. Perform a standard curve with BSA (Bradford, 1976).
- Boil the volumes of supernatants containing 1-10 µg of protein for 2-5 min in sodium dodecyl sulphate (SDS) sample buffer 5x (4:1; v:v): 250 mM Tris pH 6.8; 50 mM dithiothreitol (DTT); 10%; w:v SDS; 50%; v:v glycerol; 0.5%; w:v bromophenol blue. This procedure denaturalizes proteins before loading on SDS-PAGE gels (Laemmli, 1970). Samples can be stored at -80°C after this step.
- Prepare stacking gels and separating gels. Stacking gels are prepared with 5%; w:v, of 30% acrylamide/0.8% bisacrylamide mix, 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS, 10% ammonium persulfate and 0.1% tetramethylethylenediamine (TEMED). Separating gels are prepared with the same reagents but with 1.5 M Tris-HCl (pH 6.8) and a higher percentage of acrylamide mix (for this thesis, 10%; w:v). The percentage of acrylamide of the separating gel for a correct resolution of the different proteins depends on the weight of the protein: increase the percentage of acrilamide to 15% for proteins with low weight (fewer than 30 KDa). The thickness of gels depends on



the quantity of sample to be loaded. For the present thesis, 1.5 mm gels of 10 wells have been used, which could be loaded with a maximum of 66 μ l sample each.

7. Load samples, immediately after boiling and performing a brief spinning, into wells placing gels inside the electrophoresis buffer (Tris, glycine and SDS). Load also the molecular weight standards. Hamilton syringes assure precise loading (Hamilton company, Bonaduz, GR, Switzerland). For better performance of the electrophoresis, all wells should contain the same volume of sample.
8. Run samples at 80 V in the stacking gel and then at constant voltage (180 V) through the separating gel, before the bromophenol blue front escapes from the gel.
9. For the transference of proteins, place the gel on a nitrocellulose or a Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (this last previously activated 10 sec with methanol). Wet all with transference buffer (Tris, glycine and methanol) to prevent drying and avoid the formation of bubbles between the gel and the membrane. Place the gel and the membrane between two Whatman[®] 3MM filter papers and a sponge pad in each side. This system will allow the transference of proteins from the gel (anode,-) to the membrane (cathode, +) (Burnette, 1981).
10. Place the “sandwich” on the electrophoresis container with transference buffer and with ice to prevent overheating and leave for 1-1:30 h at 100 V.
11. Stain the nitrocellulose membrane with red Ponceau to verify the correct transference of the proteins and rinse with distilled water.
12. Submerge the membrane for 30 min or overnight in blocking solution (PBS plus 3%; w:v BSA and 0.1%, v:v Tween20).
13. Incubate at 4°C overnight with blocking solution containing the primary antibody diluted at the concentration tested.
14. Rinse thoroughly with PBS-Tween 20 (3 x 5 min).
15. Incubate 1 h at room temperature with blocking solution containing the secondary antibody (1:5000; v:v) in blocking solution.
16. Rinse thoroughly with PBS-Tween 20 (5 x 5min).
17. Develop the reaction for 5 min incubating the membrane with a chemiluminescent horseradish peroxidase (HRP) substrate.
18. Capture the protein patterns exposing the membrane against a conventional photograph film inside a cassette.
19. Scan the protein patterns obtained and quantify blot intensities through informatics.

Western blot assays should also use internal standards when comparing different samples to assess whether a protein expression observed on a blot is not influenced by the amount of protein loaded in the well. The expression of that protein must be normalized against the expression showed by other protein on the same sample. The standardizing or normalizing protein must be highly conserved along the evolution in eukaryotes, that is, it must be a protein with similar expression in all cells whatever the treatment. Tubulin and actin are two of these

proteins. Alpha-tubulin (α -tubulin) is one of the two monomers forming tubulin. It is a 55 KDa protein forming the basic subunit of microtubules in cytoskeleton (Alberts et al., 2004), and it is frequently used in western blot assays as a standard protein. Once an antibody is hybridized against the protein of interest, the membrane can be later deshybridized and reblotted with α -tubulin to assess its expression on the sample. Differences in the expression of α -tubulin among samples are supposed to be due to different volumes loaded in wells, so the expression of the protein of interest is normally expressed as a rate with the expression of the standardizing protein in the same sample and membrane.

1.7. Boar sperm cryopreservation

Cryopreservation of boar sperm in the present thesis has been performed following the Hülseberger method (Westendorf et al., 1975).

1. Preferably select for cryopreservation those ejaculates displaying over 60% of sperm with progressive motility, 80% of sperm with normal morphology, 80% of sperm with intact membranes and, 80% of sperm with non-altered acrosomes.
2. Hold ejaculates at 15-17°C overnight after collection. This holding time with seminal plasma is believed to give resistance to sperm during freezing (Johnson et al., 2000).
3. Centrifuge ejaculates at 15-17°C and 640 x g for 3 min.
4. Recover sperm pellets of each ejaculate in 50 ml falcon tubes in a cooling cabinet at 15-17°C. Take care that during the process all material in contact with ejaculates is at their same temperature and avoid any contact with the cold surfaces containing sperm. Be careful not to mismatch the identification of ejaculates.
5. Dilute pellets in lactose-egg yolk (LEY) freezing medium until achieving a pale yellow colour. This first dilution protects sperm without seminal plasma. Shake gently while dropping the freezing medium.
6. Calculate the concentration of samples with the Makler[®] counting chamber and then add more LEY to obtain a concentration of 1.5×10^9 spz/ml. The LEY freezing medium provides resistance to the sperm membranes against cold-shock at the 5°C thanks to its content in lactose (colligative cryoprotectant) and egg yolk (membrane stabilizer).
7. Cool ejaculates to 5°C in the cabinet during at least 150 min. To achieve a slow and progressive decrease in temperature place each ejaculate in a water bath at the same temperature of the cabinet.
8. When ejaculates have arrived to the 5°C, dilute them to 1×10^9 spz/ml in LEYGO freezing medium containing LEY with 6%; v:v glycerol and 1.5%; v:v Equex STM[®] paste (Nova Chemical Sales, Scituate, USA). Drop LEYGO very slowly into



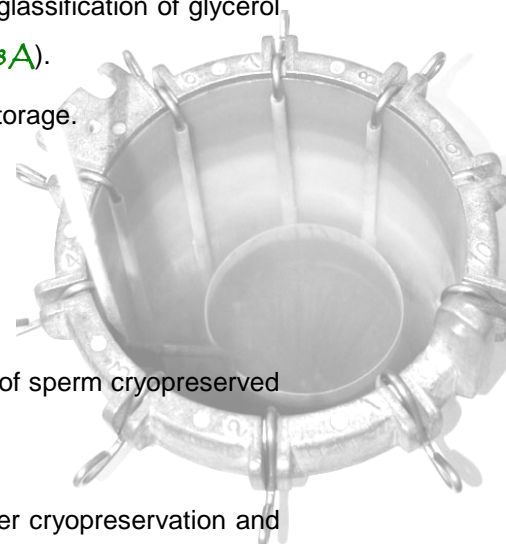
- ejaculates since it has higher density than LEY and shake gently. Verify the concentration obtained is the correct. The LEYGO freezing medium contains glycerol as a colligative cryoprotectant and a synthetic detergent with SDS that helps incorporating the low density lipoproteins of the egg yolk to the sperm membrane.
9. Pack and seal sperm in 0.5 ml plastic straws using a filling machine placed in the cabinet. The straws must be labelled for a correct identification. Leaving an air bubble at the middle of the straw will prevent that the expansion of ice pops up the sealing.
 10. Rapidly transfer straws to a programmable freezer at 5°C. The freezing programme for boar sperm consists of 5 min and 13 sec of cooling (Thurston et al., 2003). It first provides a slow cooling rate to permit the adaptation of sperm to the osmotic conditions and a rapid nucleation to avoid undercooling. Thereafter, rapid cooling rates avoid dehydration of the cell and a holding time at -80°C aids the action of cryoprotectants to avoid ice formation inside sperm. The cooling rates are the following: A) -6°C/min from 5 to -5°C (1 min 40 sec); B) -39.82°C/min from -5 to -80°C (1 min 53 sec), C) held for 30 sec at -80°C for correct glassification of glycerol and, D) -60°C/min from -80 to -145°C (1 min 10 sec) (Figure 8A).
 11. Immediately plunge straws into liquid N₂ (-196°C) for further storage.

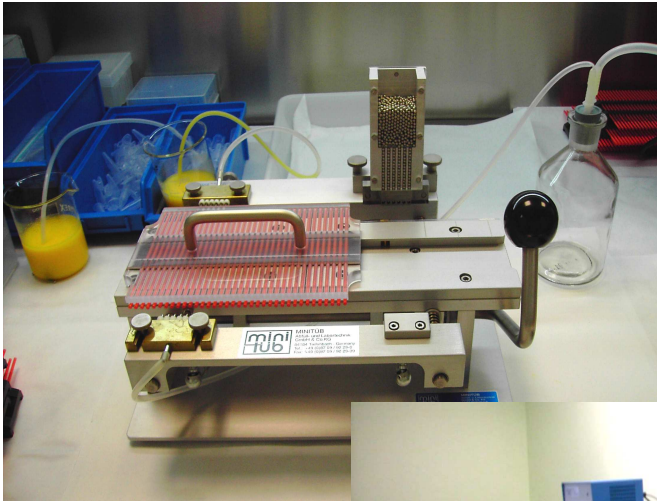
1.8. Thawing cryopreserved boar sperm

The obtention of FT boar sperm requires a rapid thawing of sperm cryopreserved in straws.

1. Leave straws equilibrating at least 12 h in liquid nitrogen after cryopreservation and before thawing.
2. Rapidly submerge a straw in a water bath at 37°C and shake gently under water during 20 sec. This allows uniform thawing of sperm in the straw.
3. Rapidly dry the surface of the straw with filter paper and cut by the sealing.
4. Place the straw by the side cut in a tube containing BTS at 37°C.
5. Cut by the side with cottons and blow gently inside the straw to drop all the content in the tube. A minimal of four straws should be thawed for representative results (Figure 9A).

An optimal dilution to assess the sperm quality parameters in BTS is 1:3; v:v, the dilution proposed when inseminating by post-CAI (1 straw for each 1.5 ml BTS). Higher dilutions than 1:4; v:v are detrimental for the sperm progressive motility (Casas et al., 2008).





FS

80% morphologically normal sperm
 80% total motility on sample
 60% progressive motility on sample
 80% sperm with intact membranes
 80% sperm with intact acrosomes

FT sperm (240 min after thawing)

40% progressive motility on sample
 40% sperm with intact membranes
 80% sperm with intact acrosomes

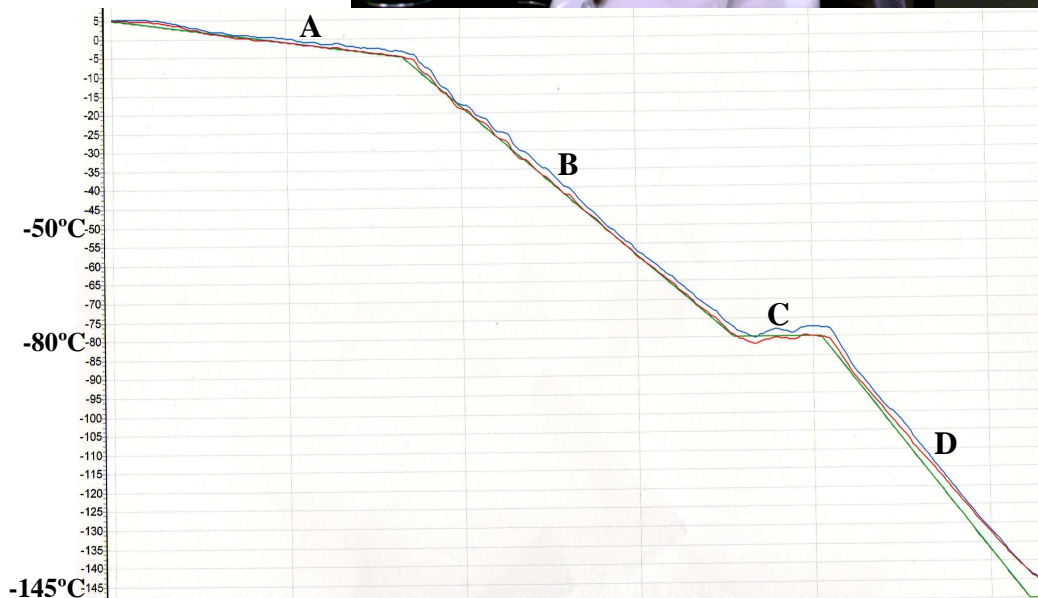
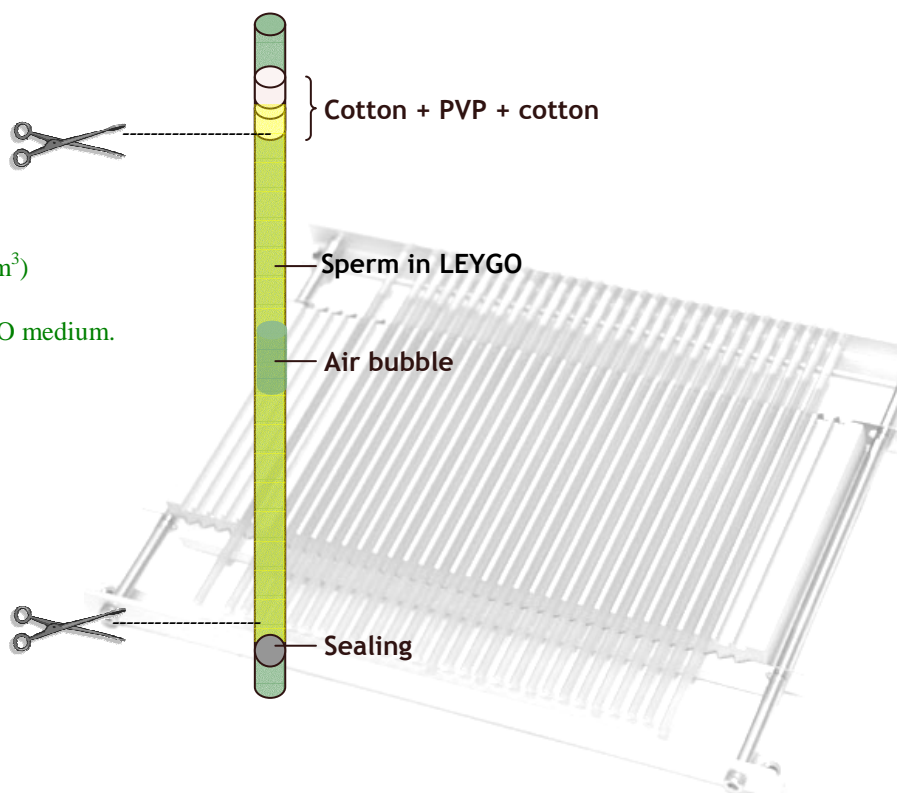


Figure 8A Equipment in a cryopreservation laboratory. Upper on the left, a semi-automatic straw filling machine. Upper on the right, minimal quality parameter values considered acceptable in FS and in FT sperm (GFEs) and, a general view of the cooling cabinet and the programmable freezer. Below, the curve displayed by the programmable freezer when freezing boar sperm from 5 to -150°C, where A-D are the different cooling rates achieved.



After approximately 30 min of incubation the pattern of sperm movement becomes more linear, like that observed before freezing, in comparison with the movement just after thawing. The pattern that appears immediately after thawing is the response to the different stresses during freezing-thawing (Eriksson et al., 2001, Hernández et al., 2007a). It is recommended to assess parameters at 240 min after thawing to assure its viability after insemination.

Figure 9A Sperm straw of 0.5 ml (0.5 cm^3) containing 0.5×10^9 spermatozoa in LEYGO medium.



1.9. Preparation of boar sperm cryopreservation media

LEY (NSF-I; Kikuchi et al., 1997)

β -lactose: 80%; v:v, 310 mM (106.113 g/l)

Egg yolk: 20%; v:v

Kanamycin: 80 mg/l

1. Wash fresh eggs with tap water and disinfectant and then dry them (5 dozens for approximately 2 liters of medium).
2. Break the eggs, discard the egg white (albumin) and leave the egg yolk on a filter paper. Roll carefully the egg yolk on the paper to discard the rests of egg white. If the egg yolk breaks do not use it.
3. Measure the total volume of egg yolks and add half of this volume with distilled water.
4. Cover the test tube with parafilm and shake softly.

5. Centrifuge the solution at 1000 x *g* during 30 min at room temperature or preferably at 5°C.
6. Three different phases will be obtained: an upper phase consisting of water; a middle phase consisting of low density lipoproteins (LDL), low molecular weight proteins and water; a lower phase of high density lipoproteins (HDL) and high molecular weight proteins. Only the middle phase must be recovered.
7. Measure the total volume recovered (volume X), corresponding to the 20% of the final LEY solution. Approximately one third of this volume consists of water. Separately prepare, in distilled water, a volume (Y) of β -lactose (106.113 g/l) and kanamidine (80 mg/l) corresponding to the 80% of volume X minus X/3.
8. Mix the two solutions to obtain LEY and verify the pH is between 6.2-6.3 and the osmolality is between 310-330 mOsm.
9. Distribute into 50 ml falcons tubes and store at -20°C for a maximum of one year.

LEYGO (NSF-II; Kikuchi et al., 1997)

LEY: 92.5%; v:v

Equex STM® or Orvus-ES® Paste: 1.5%; v:v

Glycerol: 6%; v:v

The solution can be prepared at the moment of use. Alternatively, it can be stored at -20°C for a maximum of one year.

BTS (Pursel & Johnson, 1975)

The solution can be stored at 4°C for a maximum of one week. To prepare 100 ml of BTS mix the following compounds in distilled water:

3.694 g glucose, 0.599 g sodium citrate, 0.126 g sodium bicarbonate, 0.125 g EDTA, 0.075 g potassium chloride and 0.005 g kanamycin.





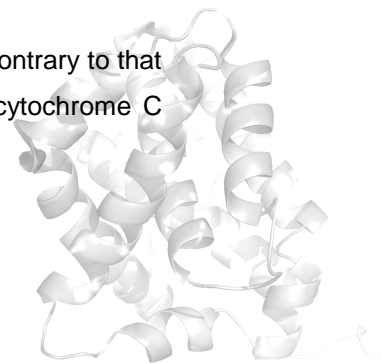
2. FUTURE PERSPECTIVES

As it has been concluded in the present thesis, boar PFEs display not only lower fertility but also higher hyperactivation than GFEs. It has also been demonstrated this fact is related to differential expression of sperm proteins in FS owing to the nature of ejaculates. This section is intended as a review of current literature on some candidates that could be assayed as molecular markers of cold-shock together with the HSP90AA1. The section is followed by a brief review on cold-shock.

Bax (Bcl-2-associated X protein)

Bax is a 21 KDa ubiquitous protein also found in sperm cells. Its effect is contrary to that of Bcl-2, being overexpressed during capacitation and apoptosis together with cytochrome C (Choi et al., 2008).

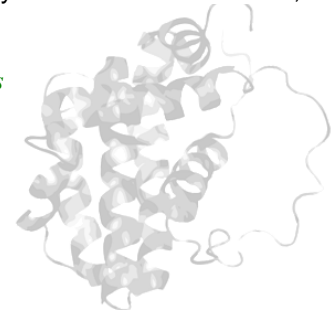
The image file is courtesy of Wikimedia Commons



Bcl-2 (B-cell/lymphoma 2)

Bcl-2 is a 26 KDa protein in the outer face of membranes from the endoplasmic reticulum, nucleus and mitochondria. When Bcl-2 is overexpressed cytochrome C is inhibited, which blocks apoptosis and capacitation (Choi et al., 2008).

The image file is courtesy of Wikimedia Commons



CALPAIN (Calcium-dependent cysteine proteases)

This is a family of enzymes that onsets apoptosis on cells from the entrance of calcium ions [Ca(+2)]. It has been observed the cooling storage of kidneys for transplanting provokes the activation of CALPAIN in the cell deriving in the increase of ROS and of the mitochondrial volume (Salahudeen, 2004). The same volume changes have been reported on mitochondria in boar FT sperm despite it has not been studied its relation with CALPAIN (Watson, 2000; Petrunkina et al., 2005; García-Herreros et al., 2008). The inhibition of CALPAIN by calpastatin (Whipple et al., 1992) avoids apoptosis induced by cold ischemia in rat liver cells (Sindram et al., 1999) and in rat sinusoidal endothelial cells (Upadhyaya, 2003).

The image file is from qcri.queensu.ca/calpain.jpg

Cholesterol

Changes in membrane lipid composition are critical for bacterial adaptation to low temperatures (Yamanaka, 1999). Similarly, the achievement of cryocapacitation in boar sperm during freezing is mainly explained by the poor cholesterol content of its plasmatic membrane, which facilitates a lipid clustering that contributes to increase the permeability of the membrane (Watson, 2000). Moreover, it will later interfere with lipidic changes in the process of capacitation in boar sperm, during which the cholesterol is concentrated at the apical ridge of the acrosome for its release (van Gestel et al., 2005). The beneficial effects of adding cholesterol to the boar sperm membranes are verified: cyclodextrins are molecules that incorporate or remove cholesterol from biological membranes and the exposure of boar FS during 15 min to cyclodextrins (1 mg per 120×10^6 spz) that have been loaded with cholesterol improves the in vitro fertilizing ability of sperm after cryopreservation (Tomás et al., 2009). Detection of cholesterol should be performed in FS because it is difficult to eliminate the rests of cholesterol from the egg yolk in the freezing medium.

The image file is courtesy of [Wikimedia Commons](#)

Comparison with cold-adapted organisms

Some of the signalling events during sperm cryocapacitation, similarly to those observed during capacitation (see [Figure 25](#) in *Bibliographic Revision*), are also observed in plant cells experiencing an abrupt decrease in temperature (Kacperska, 1999). This fact illustrates the conservative nature of some mechanisms in living organism and could help to better understand a particular process. For example, the pyruvate dehydrogenase, an enzyme that collaborates in the catabolism of carbohydrates, has been identified as a cold-shock protein in *Escherichia coli* (Gounot & Russell, 1999). The study of some of these proteins shared by different species may help in the search for boar sperm freezability markers.



Cytochrome C

Cytochrome C is a 12 kDa protein in the inner membrane of mitochondria. Through proapoptotic signals (e.g. a decrease in ATP for short time periods) or via caspases, mitochondria release cytochrome C to cytosol (Skulachev, 1998 and 2006) that regulates both capacitation and apoptosis in boar spermatozoa (Choi et al., 2008). Perhaps the complex cross-talking of pathways could explain discrepancies in literature about the transmembrane potential of mitochondria against stress (Martin et al., 2007 in bovine; Guthrie et al., 2008 in boar), the extralocation of phospholipids (Guthrie et al., 2005; Saravia et al., 2007) and, the DNA fragmentation (Hernández et al., 2006; Fraser & Strzerek, 2007). Moreover, cytochrome C participates in the activation of HSP73 (HSC70) (Gao et al., 1996).

The image file is courtesy of Wikimedia Commons

HSP60/HSP70 (heat shock proteins 60/70)

Stress-related or chaperone proteins. The capacitation process does not affect the distribution of HSP60 in the midpiece but that of HSP70 in the equatorial region of the head (Volpe et al., 2008) and also its expression, which decreases (Choi et al., 2008). HSP70 increases in the muscle of the carp under cold-shock (Ali et al., 2003) and is involved in the correct folding of polypeptides, among other functions (Tavaria et al., 1996). HSP70 is overexpressed in cryopreserved pancreatic islets (Kanitkar et al., 2008). Conversely, the effects of cryopreservation on HSP60 remain to be studied. In neuronal and cardiac tissue, HSP60 forms a complex with Bax, either in mitochondria or in cytosol, and avoid its antiapoptotic effects, whereas it links to Bcl-2 in mitochondria to delay the release of cytochrome C and dissociates from Bcl-2 in cytosol to avoid the entrance of Bax in mitochondria (Chan et al., 2007). The same authors have not observed such association in HSP70, although it also contributes to block apoptosis. Moreover, it has been also discussed that the increase in a certain precursor of spermadhesins together with the increase in the chaperone proteins improve the quality of boar FT sperm (Huang et al., 2009). Altogether indicates the necessity of studying the different proteins to know its individual function in the context of boar cryopreserved sperm.

The image file is courtesy of Wikimedia Commons

NO (Nitric oxide)

Nitric oxide is a gas that mediates certain physiological and pathological processes in sperm. It has been linked to spermatogenesis, capacitation and motility (together with SOD; Kurpisz et al., 1996; Lewis et al., 1996; Balercia et al., 2004) but also with damage to DNA when concentrated as it has been observed in infertile patients (Amiri et al., 2007).

The image file is courtesy of Wikimedia Commons

PLSCR1-4 (Phospholipid scramblases 1-4)

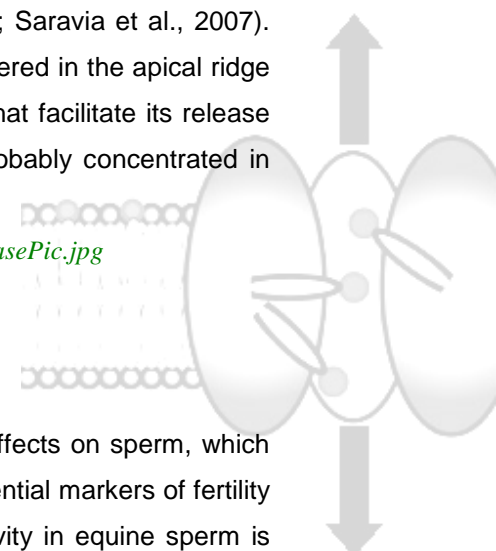
Transmembrane transporter family with four isoforms. They are responsible of the movement of phospholipids from the inner to the outer face of the plasmatic membrane and they depend on the calcium concentration inside the cell, not on ATP (Zwaal et al., 2005). The phospholipids in the inner face are negatively charged and the increase in the internal calcium concentration provokes a redistribution of charges that changes the configuration of scramblases. In the case of apoptosis, the externalization of phospholipids mediates the recognition of leucocytes that will phagocitose the cell. True capacitation in human and boar sperm cells seems also mediated by the activation of scramblases via the influx of calcium (de Vries et al., 2003; Harrison & Gadella, 2005). The activation of scramblases has been also related to cryopreservation, as observed in equine sperm (Thomas et al., 2006). Differential degree of activation of scramblases during boar sperm cryopreservation could be the cause for discrepancies in literature about the outcomes of the Annexin-V assay, based on the externalization of phospholipids (Guthrie et al., 2005; Peña et al., 2005; Saravia et al., 2007). Moreover, in true capacitated boar sperm the membrane lipids are reordered in the apical ridge of the acrosome forming “rafts”, microdomains enriched in cholesterol that facilitate its release during the process (van Gestel et al., 2005). These lipidic rafts are probably concentrated in PLSCR1 (35 KDa), as found in human epithelial cells (Sun et al., 2002).

The image file is from <http://en.wikipedia.org/wiki/File:ScramblasePic.jpg>

Proteins in seminal plasma

Seminal plasma contains components that mediate protective effects on sperm, which is the reason some seminal plasma proteins have been identified as potential markers of fertility in boars (Novak et al., 2010). For instance, part of the antioxidant activity in equine sperm is derived from SOD in seminal plasma absorbed onto the plasma membrane (Baumber & Ball, 2005). Seminal plasma contains also other sperm coating components, called decapacitation factors (Baldi et al., 2000), that stabilize the plasmatic membrane and maintain sperm uncapacitated and un motile to prevent premature capacitation (Vadnais et al., 2005a; Vadnais & Roberts, 2007; Muiño-Blanco et al., 2008).

Cryocapacitation is undesirable because it is like a premature capacitation, whereas it is important for fertilization that capacitation occur later in the female tract. There, most seminal plasma is eliminated after backflow and only those sperm with particular membrane receptors are retained in the uterus (Satake et al., 2006). One of these receptors is cholesterol, whose removal by acceptors in the oviductal fluid promotes capacitation (Visconti et al., 2002; Naz & Rajesh, 2004). Some of these receptors may be attached during contact of sperm with seminal plasma to prevent membrane vesicularization before capacitation, as reported in ram FT sperm (Colás et al., 2009).





The post-thaw membrane integrity is significantly higher in sperm having spent prolonged time with its seminal plasma before cryopreservation (Tamuli & Watson, 1994; Eriksson et al., 2001). This holding time reduces cryocapacitation and increases the *in vivo* fertilizing competence, provoking also a fall in sperm motility after thawing (Okazaki et al., 2009) that may be related with a decrease in hyperactivation related to cryocapacitation. Reduction in motility has been only observed in PFEs (Okazaki et al., 2009), in accordance with results in this thesis that suggest higher hyperactivation in the PFEs than in the GFEs. Addition of seminal plasma after thawing also improves membrane integrity (Larsson & Einarsson 1975; Watson, 2000; Vadnais et al., 2005b; Muiño-Blanco et al., 2008), although fertility seems not restored (Abad et al., 2007). Adding a 10% of seminal plasma from the same ejaculate during thawing is enough to increase the sperm membrane stability without motility changes (Okazaki et al., 2009). However, thawing boar FT sperm in 50% seminal plasma from the same ejaculate improves not only the percentage of sperm membrane integrity, but also the sperm motility together with an improve in the *in vivo* fertility (García JC et al., 2010). This indicates the seminal plasma contains not only decapacitating factors but also molecules that enhance capacitation with the purpose of fertilizing. Conversely, Abad et al. (2007) hold that seminal plasma added after thawing does not improve fertility. Such variety of observations on FT sperm suggests cryocapacitation ranges a wide interval of injuries from reversible damages to irreversible ones. The physiological roles of seminal plasma in boar FT sperm are limited if sperm hyperactivation has yet occurred, since it could be impossible a total reversion of the lipid-phase separation of the membrane (Watson, 2000; Maxwell et al., 2007). Individual differences in the composition of seminal plasma could have much to say about the resistance of sperm to cold-shock and its posterior recovery.

Some evidences indicate the addition of seminal plasma after thawing has only effects on PFEs, not on GFEs, and when using seminal plasma from GFEs (Hernández et al., 2007b; Okazaki et al., 2009). This suggests that lipid-phase changes in the GFEs are not reversed since they may have not experienced such changes and, that this fact may reside in a different composition of their seminal plasma compared to the PFEs (Rodríguez-Martínez et al., 2008; García EM et al., 2009; Saravia et al., 2009).

A boar ejaculate contains spermatozoa with different patterns of motility that can be clustered into subpopulations. These patterns of motility are strongly linked to their resistance to cryopreservation and, in turn, they seem to be conditioned to the proteins present in seminal plasma, for what these proteins may have a role in cryocapacitation (Rodríguez-Martínez et al., 2008). Seminal plasma can be divided into portions during ejaculation that differ in the content of substrates (e.g. zinc, fructose, bicarbonate) and proteins (e.g. spermadhesins, epididymal cauda fluid proteins), resulting in different physiological effects on sperm: an increase in motility related to capacitation, an enhancement in membrane stability related to uncapacitated sperm, a combination of both (Rodríguez-Martínez et al., 2008; García EM et al., 2009; Rodríguez-

Martínez et al., 2009; Saravia et al., 2009) or, even a detrimental effect on postthaw sperm function (Fraser et al., 2007). The following four factors in seminal plasma could be candidates to be studied in GFEs and in PFEs:

PAF (Platelet Activating Factor; 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) is a signalling phospholipid in seminal plasma with pleiotropic properties, in addition to platelet activation. The enzymes for its activation and desactivation, some of them identified as phospholipases (Soubeyrand et al., 1998), are present in semen. The synthesis of PAF enhances capacitation, observed by an increase in the motility and fertility of sperm, and for that reason high fertility boars have more PAF in sperm than low fertility boars (Roudebush, 2001). The PAF receptor is present on sperm cells and the addition of PAF to the thawing medium improves the motility of thawed boar sperm (Bathgate et al., 2007; Kordan et al., 2009). On the other hand, the acrosomal integrity is improved when adding to the cryopreservation medium the enzyme for PAF inactivation (Bathgate et al., 2007).

The image file is courtesy of Wikimedia Commons

Prosaposin or proSAP (pro Sphingolipid Activator Proteins) is a glycoprotein in seminal plasma involved in fertilization. This protein contains a 60-aminoacid sequence highly conserved among mammals that contributes to the sperm-egg contact. A synthetic peptide derived from this sequence has been demonstrated to improve the sperm-oocyte binding in human, boar and bull if added to the thawing solution of cryopreserved sperm (Amann et al., 1999). Prosaposin is the precursor of saposins A-D and saposin B is the cofactor of arylsulfatase A (As-A), a protein that also mediates the binding of sperm to the oocyte (Gadella et al., 1993; Carmona et al., 2002; Matzner et al., 2009) and that has in turn been related to HSP70 (Tanphaichitr et al., 1999).

The image file is courtesy of Wikimedia Commons

Relaxin is a peptide hormone found in the seminal plasma of some species. It accelerates not only motility but also the acrosome reaction and the utilization of glucose in boar spermatozoa (Miah et al., 2006). At this respect, its effects may be compared to those produced by PAF and opposed to those of spermadhesins.

The image file is courtesy of Wikimedia Commons

Spermadhesins are a family of glycoproteins in seminal plasma, the two members PSP-I/II representing more than the 50% of proteins in seminal plasma. They improve motility, membrane integrity and mitochondrial activity of sperm and, their receptors are localized in the acrosomal region. In FS they can migrate to the post-acrosomal region until finally disappearing (Caballero et al., 2009; De Graaf et al., 2008) and, it may be due to alterations on the acrosomal cap. Capacitation seems to be retarded in FS and levels of calcium are decreased by effect of spermadhesins (Caballero et al., 2004); for this reason PSP-I correlates negatively with motility



Appendix

and the litter size in FS (Novak et al., 2010). Spermadhesins do not affect the penetrability of FS into the oocyte but that of FT sperm, indicating different response to spermadhesins from the membrane receptors of FS and FT sperm (Caballero et al., 2004). The same authors indicate the configuration of spermadhesin membrane receptors is reversible, like it is cryocapacitation when adding seminal plasma after thawing; thus, the two spermadhesins could be one of the components mediating the effects of seminal plasma on FT sperm. In this sense, Huang et al. (2009) have recently shown that a precursor of spermadhesins together with chaperone proteins improve the quality of boar FT sperm.

The image file is from <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/1spp/traces.jpg>



COLD-SHOCK IN BOAR SPERM. Epilogue.

Membrane damage is the first event of cold-shock and consequently pointed out as one of the main causes for mammalian sperm sensitivity to freezing (Guthrie et al., 2005; Kadirvel et al., 2009; Ortega-Ferrusola et al., 2009; Secciani et al., 2009; Thomson et al., 2009). Cold-shock in boar sperm starts at the 5°C, as the permeability of plasmatic and mitochondrial membranes increases through mechanical lipid reordering and osmotic changes (Watson, 2000; Guthrie & Welch, 2005; Casas et al., 2009). This fact jeopardizes the correct functioning of Ca(+2)-ATPases (Kim et al., 2008), provoking an influx of Ca(+2) that enhances the phospholipid scrambling due to the enzymatic action of scramblases (Zwaal et al., 2005). Such disarrangement further originates mitochondrial pores that decrease the mitochondrial membrane potential and in turn the oxidative phosphorylation activity, as observed in human sperm (O'Connell et al., 2002). Failure of the oxidative phosphorylation would not be a problem considering that boar sperm obtains most energy from pyruvate/lactate produced by the glycolytic activity in cytosol (Marín et al., 2003; Rodríguez-Gil, 2006); however, if none pyruvate enters Krebs cycle in mitochondria for the oxidative phosphorylation, the concentration of pyruvate/lactate in cytosol boosts, reducing the cytosolic pH that in turn downregulates the intake of glucose (Jones & Connor, 2004; Peña et al., 2009). The shortage of glucose totally arrests the oxidative phosphorylation and the ATP that is derived, which later compromises the ability of sperm to fertilize due to disorders in true capacitation (Pons-Rejraji et al. 2009). The opening of mitochondrial pores does not only affect the production of ATP but additionally breaks the equilibrium in reactive oxygen species (ROS) levels as there is uncontrolled release of ROS and of pro-apoptotic factors from this organelle to cytosol (Peña et al., 2009). The numerous polyunsaturated fatty acids in boar sperm membranes are the target of such ROS excess, which produce low to moderate lipid peroxidation, promoting even greater membrane structural disordering and permeabilization (Watson, 2000; Browers et al., 2005; Satorre et al., 2007; Guthrie et al., 2008; Moran et al., 2008; Awda et al., 2009; Kumaresan et al., 2009; Peña et al., 2009).

The disfunction of true capacitation in cold-shocked sperm occurs because this process is finely regulated by the levels of ROS from the oxidative phosphorylation (Thannickal & Fanburg, 2000; de Lamirande & O'Flaherty, 2008; Yoshimoto et al., 2008; Awda et al., 2009) and, by the ATP that activates many proteins of the process (González-Fernández et al., 2009; Ramió, 2009), some of them contributing the characteristic hyperactivation of the spermatozoa motility (Petrunkina et al., 2003; Ramió, 2009). In this sense, maintenance of the sperm mitochondrial activity has been suggested to be crucial for a good freezability of boar ejaculates, because preserving the oxidative phosphorylation would avoid sperm cryocapacitation and permit the achievement of true capacitation later (Flores et al., 2010).

Different terms have been used to name cold-shock simultaneously to the increasing knowledge on this topic. Cold-shock is considered a "sub-lethal damage" or a "premature ageing", as discussed for human (Alvarez & Storey, 1993) and boar sperm (Peña et al., 2009), since the mitochondrial alterations do not necessarily imply the death of the sperm cell and because these alterations remind those occurring in other cells during human ageing (Lee & Wei, 2007). In fact, certain mitochondrial activity must be kept in cold-shocked sperm since the hyperactivated motility occurs after being at 5°C and it is still capable of fertilizing after cryopreservation (Gil et al., 2005; Casas et al., 2009). Cold-shock is also known as "cryocapacitation" because, like in true sperm capacitation, it is triggered by the influx of calcium and provokes the sperm hyperactivation (Bailey et al., 2000; Baldi et al., 2000; Green & Watson, 2001; Pons-Rejraji et al., 2009). This may be the reason why FT sperm responds to in vitro capacitation earlier than FS does, as observed in dog sperm (De los Reyes et al., 2009). The processes occurring during cold-shock also coincide with the earlier events described in apoptotic cells (Ortega-Ferrusola et al., 2009; Sokolowska et al., 2009), thus renaming cold-shock as "apoptotic-like" changes as reported in bovine (Martin et al., 2007) and equine sperm (Ortega-Ferrusola et al., 2008). For example, the decrease in the sperm membrane potential during cold-shock is a feature observed in apoptosis too (Martin et al., 2007; Ortega-Ferrusola et al., 2008; Flores et al., 2010) and, the pathological ATP and ROS levels of cold-shock act as pro-apoptotic signals for cytochrome c efflux from mitochondria (Skulachev, 1998 and 2006; Choi et al., 2008). Furthermore, cytochrome c is a molecule that regulates both the apoptosis and the capacitation phenomenon (Choi et al., 2008), which illustrates the intricated network of events in the boar sperm metabolism.



References in appendix

- Abad M, Garcia JC, Sprecher DJ, Cassar G, Friendship RM, Buhr MM, Kirkwood RN. 2007. *Effect of insemination-ovulation interval and addition of seminal plasma on sow fertility to insemination of cryopreserved sperm*. *Reprod Domest Anim*. 42(4): 418-22.
- Alberts A, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. *Biología Molecular de la Célula*. 4a ed. Ediciones Omega. Barcelona.
- Ali KS, Dorgai L, Abrahám M, Hermes E. 2003. *Tissue- and stressor-specific differential expression of two hsc70 genes in carp*. *Biochem Biophys Res Commun*. 307(3): 503-9.
- Alvarez JG & Storey BT. 1993. *Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant*. *J Androl*. 14(3): 199-209.
- Amann RP, Hammerstedt RH, Shabanowitz RB. 1999. *Exposure of human, boar, or bull sperm to a synthetic peptide increases binding to an egg-membrane substrate*. *J Androl*. 20(1): 34-41.
- Amiri I, Sheikh N, Najafi R. 2007. *Nitric oxide level in seminal plasma and its relation with sperm DNA damages*. *Iran Biomed J*. 11(4): 259-64.
- Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM. 2009. *Reactive oxygen species and boar sperm function*. *Biol Reprod*. 81(3): 553-61.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. *Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon*. *J Androl*. 21(1): 1-7. Review.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. 2000. *Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction*. *Front Biosci*. 5: E110-23. Review.

- Balercia G, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, Ricciardo-Lamonica G, Mazzanti L. 2004. *Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility*. J Androl. 25(2): 245-9.
- Bathgate R, Maxwell WM, Evans G. 2007. *Effects of platelet-activating factor and platelet-activating factor: acetylhydrolase on in vitro post-thaw boar sperm parameters*. Theriogenology 67(4): 886-92.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. 2005. *Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants*. Am J Vet Res. 66(5): 772-9.
- Bradford MM. 1976. *A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72: 248-54.
- Brouwers JF, Silva PF, Gadella BM. 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(2): 458-69. Review.
- Brown R. 1828. *A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies*. Phil Mag. 4: 161-173.
- Burnette WM. 1981. *Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins*. Anal Biochem. 112(2): 195-203.
- Caballero I, Vazquez JM, Gil MA, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Rodriguez-Martinez H, Martinez EA. 2004. *Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro?* J Androl. 25(6): 1004-12.
- Caballero I, Vazquez JM, Mayor GM, Almiñana C, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martinez EA. 2009. *PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa*. Int J Androl. 32(5): 505-13.
- Carmona E, Weerachatanukul W, Soboloff T, Fluharty AL, White D, Promdee L, Ekker M, Berger T, Buhr M, Tanphaichitr N. 2002. *Arylsulfatase A is present on the pig sperm surface and is involved in sperm-zona pellucida binding*. Dev Biol. 247(1): 182-96.



Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Puigmulé M, Garcia E, Bonet S. 2008. *Quality of frozen-thawed boar sperm after different dilutions in BTS*. Proceedings of the 1st Joint International Meeting Spanish Association for Animal Reproduction and the British Andrology Society. 2008. Gijón, Spain. *Reprod Dom Anim*. 43(4): 72.

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. 2009. *Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins*. *Theriogenology* 72(7): 930-48.

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Puigmulé M, Garcia E, Torner E, Castillo M, Bonet S. 2010. *Freezability differences among ejaculates of three different pig breeds*. In: *Proceeds. 1st International Congress on Controversies in Cryopreservation of Sperm Cells, Reproductive Cells, Tissues and Organs (CRYO)*. Valencia, Spain. Abstract book (ref. 831628)

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM. 2001. *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen*. *Reproduction* 121(3): 395-401.

Chan JY, Cheng HL, Chou JL, Li FC, Dai KY, Chan SH, Chang AY. 2007. *Heat shock protein 60 or 70 activates nitric-oxide synthase (NOS) I- and inhibits NOS II-associated signaling and depresses the mitochondrial apoptotic cascade during brain stem death*. *J Biol Chem*. 282(7): 4585-600.

Christensen P, Stenvang JP, Godfrey WL. 2004. *A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen*. *J Androl*. 25(2): 255-64. Erratum in: *J Androl*. 25(3):432.

Choi YJ, Uhm SJ, Song SJ, Song H, Park JK, Kim T, Park C, Kim JH. 2008. *Cytochrome c upregulation during capacitation and spontaneous acrosome reaction determines the fate of pig sperm cells: linking proteome analysis*. *J Reprod Dev*. 54(1): 68-83.

Colás C, Junquera C, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. 2009. *Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock*. *Microsc Res Tech*. 72(8): 566-72.

Cremades T, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Abaigar T, Vázquez JM, Martínez EA. 2005. *Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa*. *J Androl*. 26(5): 610-8.

de Graaf SP, Leahy T, Marti J, Evans G, Maxwell WM. 2008. *Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation*. *Theriogenology* 70(8): 1360-3.

de Lamirande E & O'Flaherty C. 2008. *Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases*. *Biochim Biophys Acta*. 1784(1): 106-15. Review.

de los Reyes M, Medina G, Palomino J. 2009. *Western blot analysis of proacrosin/acrosin in frozen dog sperm during in vitro capacitation*. *Reprod Domest Anim*. 44(2): 350-3.

de Vries KJ, Wiedmer T, Sims PJ, Gadella BM. 2003. *Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells*. *Biol Reprod*. 68(6): 2122-34.

Eriksson BM, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Lucas X, Rodriguez-Martinez H. 2001. *Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa*. *Theriogenology* 55(8): 1593-605.

Flores E, Fernández-Novell JM, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2010. *Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network*. *Theriogenology*. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.018.

Fraser L, Dziekońska A, Strzezek R, Strzezek J. 2007. *Dialysis of boar semen prior to freezing-thawing: its effects on post-thaw sperm characteristics*. *Theriogenology* 67(5): 994-1003.

Fraser L & Strzezek J. 2007. *Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing?* *Theriogenology* 68(2): 248-57.

Gadella BM, Colenbrander B, Van Golde LM, Lopes-Cardozo M. 1993. *Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: evidence that desulfation of seminolipid occurs only after ejaculation*. *Biol Reprod*. 48(3): 483-9.

Gao B, Eisenberg E, Greene L. 1996. *Effect of constitutive 70-kDa heat shock protein polymerization on its interaction with protein substrate*. *J Biol Chem*. 271(28): 16792-7.

García-Herrerros M, Barón FJ, Aparicio IM, Santos AJ, García-Marín LJ, Gil MC. 2008. *Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation*. *Int J Androl*. 31(5): 490-8.

García EM, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM. 2009. *Distinct effects of boar seminal plasma fractions exhibiting different protein profiles on the functionality of highly diluted boar spermatozoa*. *Reprod Domest Anim*. 44(2): 200-5.



García JC, Dominguez JC, Pena FJ, Alegre B, Gonzalez R, Castro MJ, Habing GG, Kirkwood RN. 2010. *Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility*. Anim Reprod Sci. 119(1-2): 160-5.

Garner DL & Johnson LA. 1995. *Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide*. Biol Reprod. 53(2): 276-84.

Gil MA, Roca J, Cremades T, Hernández M, Vázquez JM, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA. 2005. *Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?* Theriogenology 64(2): 305-16.

González-Fernández L, Ortega-Ferrusola C, Macias-Garcia B, Salido GM, Peña FJ, Tapia JA. 2009. *Identification of protein tyrosine phosphatases and dual-specificity phosphatases in mammalian spermatozoa and their role in sperm motility and protein tyrosine phosphorylation*. Biol Reprod. 80(6): 1239-52.

Gounot AM & Russell NJ (Coord.) *Physiology of cold-adapted organisms*. In: Margesin R & Schinner F (Eds.). *Cold-adapted organisms: ecology, physiology, enzymology and molecular biology*. 1999. Ed. Springer, Heidelberg (Germany).

Green CE & Watson PF. 2001. *Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation*. Reprod. 122(6): 889-98.

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

Guthrie HD, Welch GR, Long JA. 2008. *Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility*. Theriogenology 70(8): 1209-15.

Harrison RA & Gadella BM. 2005. *Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation*. Theriogenology 63(2): 342-51. Review.

Hernández M, Roca J, Ballester J, Vázquez JM, Martínez EA, Johannisson A, Saravia F, Rodríguez-Martínez H. 2006. *Differences in SCSA outcome among boars with different sperm freezability*. Int J Androl. 29(6): 583-91.

Hernández, M, Roca J, Gil MA, Vázquez JM, Martínez EA. 2007a. *Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability*. Theriogenology 67: 1436-45.

Hernández M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Vázquez JM, Martínez EA. 2007b. *Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars*. J Androl. 28(5): 689-97.

Huang SY, Pribenszky C, Kuo YH, Teng SH, Chen YH, Chung MT, Chiu YF. 2009. *Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing*. Anim Reprod Sci. 112(1-2): 136-49.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. 2000. *Storage of boar semen*. Anim Reprod Sci. 62(1-3): 143-72. Review

Jones AR & Connor DE. 2004. *Control of glycolysis in mature boar spermatozoa: effect of pH in vitro*. Reprod Fertil Dev. 16(3): 319-24.

Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A, Kathiravan P. 2009. *Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium*. Anim Reprod Sci. 116(3-4): 244-53.

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(1): 258.

Kanitkar M & Bhonde RR. 2008. *Curcumin treatment enhances islet recovery by induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during cryopreservation*. Life Sci. 82(3-4): 182-9.

Kacperska A (Coord.). *Plant responses to low temperature: signaling pathways involved in plant acclimation*. In: Margesin R & Schinner F (Eds.). *Cold-adapted organisms: ecology, physiology, enzymology and molecular biology*. 1999. Ed. Springer, Heidelberg (Germany).

Kim JC, Li Y, Lee S, Yi YJ, Park CS, Woo SH. 2008. *Effects of cryopreservation on Ca²⁺ signals induced by membrane depolarization, caffeine, thapsigargin and progesterone in boar spermatozoa*. Mol Cells 26(6): 558-65.

Köhler G & Milstein C. 1975. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature 256(5517): 495-7.



Kordan W, Lecewicz M, Tobolski J. 2009. *Effect of platelet-activating factor on motility, plasmalemma integrity, the process of capacitation and acrosome reaction of fresh and cryopreserved boar spermatozoa.* Pol J Vet Sci. 12(2): 175-81.

Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, Bardoloi RK, Das A, Kumar S, Naskar S. 2009. *Preservation of boar semen at 18 degrees C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa.* Anim Reprod Sci. 110(1-2): 162-71.

Kurpisz M, Miesel R, Sanocka D, Jedrzejczak P. 1996. *Seminal plasma can be a predictive factor for male infertility.* Hum Reprod. 11(6): 1223-6.

Laemmli UK. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature 227(5259): 680-5.

Larsson K & Einarsson S. 1975. *Fertility and post-thawing characteristics of deep frozen boar spermatozoa.* Andrologia 7(1): 25-30.

Lee HC & Wei YH. 2007. *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging.* Exp Biol Med. 232(5): 592-606.

Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U. 1996. *Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility.* Mol Hum Reprod. 2(11): 873-8.

Makler A. 1980. *The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation.* Fertil Steril. 33(3): 337-8.

Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. 2004. *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen.* Theriogenology 63 (2): 411-21.

Marin S, Chiang K, Bassilian S, Lee WN, Boros LG, Fernández-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodriguez-Gil JE, Cascante M. 2003. *Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization.* FEBS Lett. 554(3): 342-6.

Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, Grizard G, Durand P, Levy R. 2007. *Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa.* Hum Reprod. 22(2): 380-8.

Matzner U, Breiden B, Schwarzmann G, Yaghootfam A, Fluharty AL, Hasilik A, Sandhoff K, Gieselmann V. 2009. *Saposin B-dependent reconstitution of arylsulfatase A activity in vitro and in cell culture models of metachromatic leukodystrophy.* J Biol Chem. 284(14): 9372-81.

- Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui Rel-H, Evans G. 2007. *Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility*. Soc Reprod Fertil Suppl. 64: 13-38. Review.
- Miah AG, Tareq KM, Hamano K, Kohsaka T, Tsujii H. 2006. *Effect of relaxin on acrosome reaction and utilization of glucose in boar spermatozoa*. J Reprod Dev. 52(6): 773-9.
- Moran JM, Madejón L, Ortega Ferrusola C, Peña FJ. 2008. *Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa*. Theriogenology 70(1): 91-6.
- Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. 2008. *Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress*. Reprod Domest Anim. 43(4): 18-31. Review.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. 2003. *A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles*. Biol Reprod. 68(5): 1828-35.
- Naz RK & Rajesh PB. 2004. *Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction*. Reprod Biol Endocrinol. 2: 75. Review.
- Novak S, Ruiz-Sanchez A, Dixon WT, Foxcroft GR, Dyck MK. 2010. *Seminal Plasma Proteins as Potential Markers of Relative Fertility in Boars*. J Androl. 31(2): 188-200.
- O'Connell M, McClure N, Lewis SE. 2002. *The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function*. Hum Reprod. 17(3): 704-9.
- 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(3): 491-8.
- Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galán Y, Varela-Fernández E, Gallardo-Bolaños JM, Muriel A, González-Fernández L, Tapia JA, Peña FJ. 2008. *Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm*. J Androl. 29(2): 213-21.
- Ortega-Ferrusola C, González Fernández L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macías García B, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. 2009. *Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes*. Reproduction 138(1): 55-63.



Peña FJ, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Macías García B. 2009. *Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review*. *Reprod Domest Anim.* 44(2): 345-9. Review.

Pérez-Llano B, Sanchez-Sanchez, JL, Lorenzo-González P, García-Casado P. *A short version of the osmotic resistance test for boar semen*. In: *Proceedings of the International Pigs Veterinary Society Congress, 15, IPVS 1998, Birmingham*, p. 61.

Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. 2003. *Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation*. *J Androl.* 24(3): 423-37.

Petrunkina AM, Jebe E, Töpfer-Petersen E. 2005. *Regulatory and necrotic volume increase in boar spermatozoa*. *J Cell Physiol.* 204(2): 508-21.

Pons-Rejraji H, Bailey JL, Leclerc P. 2009. *Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis*. *Reprod Fertil Dev.* 21(4): 525-37.

Pursel VG & Johnson LA. 1975. *Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure*. *J Anim Sci.* 40(1): 99-102.

Ramió L. 2009. *Dinàmica de la motilitat, fosforil·lació de proteïnes i l'activitat mitocondrial de l'espermatozoide porcí durant la capacitació i reacció acrosòmica "in vitro"*. Doctoral thesis. Autonomous University of Barcelona.

Rodríguez-Gil JE. 2006. *Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration*. *Reprod Domest Anim.* 41(2): 11-20. Review.

Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Peña FJ. 2008. *Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing*. *Theriogenology* 70(8): 1242-50. Review.

Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Peña FJ, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Calvete JJ. 2009. *The physiological roles of the boar ejaculate*. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 66: 1-21.

Roudebush WE. 2001. *Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function*. *Asian J Androl.* 3(2): 81-5.

- Saravia F, Hernández M, Wallgren M, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. 2007. *Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate*. Int J Androl. 30(6): 485-99.
- Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, Peña FJ, Roca J, Rodríguez-Martínez H. 2009. *Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks*. Theriogenology 71(4): 662-75.
- Satake N, Elliott RM, Watson PF, Holt WV. 2006. *Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct*. J Exp Biol. 209(8): 1560-72.
- Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB. 2007. *Alpha-Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm*. Theriogenology 68(7): 958-65.
- Salahudeen AK. 2004. *Cold ischemic injury of transplanted kidneys: new insights from experimental studies*. Am J Physiol Renal Physiol. 287(2): F181-7.
- Schilling E, Vengust M, Smidt D. *ORT - A new test to predict the freezability and storage of boar spermatozoa*. In: Proceedings of the International Pigs Veterinary Society Congress, 8, IPVS 1984, Ghent, p. 296.
- Secciani F, Bianchi L, Ermini L, Cianti R, Armini A, La Sala GB, Focarelli R, Bini L, Rosati F. 2009. *Protein profile of capacitated versus ejaculated human sperm*. J Proteome Res. 8(7): 3377-89.
- Skulachev VP. 1998. *Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades*. FEBS Lett. 423(3): 275-80.
- Skulachev VP. 2006. *Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis*. Apoptosis 11(4): 473-85.
- Sindram D, Kohli V, Madden JF, Clavien PA. 1999. *Calpain inhibition prevents sinusoidal endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver*. Transplantation 68(1): 136-40.
- Sokolowska A, García BM, Fernández LG, Ortega-Ferrusola C, Tapia JA, Peña FJ. 2009. *Activated caspases are present in frozen-thawed canine sperm and may be related to post thaw sperm quality*. Zygote 17(4): 297-305.



Soubeyrand S, Lazure C, Manjunath P. 1998. *Phospholipase A2 from bovine seminal plasma is a platelet-activating factor acetylhydrolase*. *Biochem J.* 329(1): 41-7.

Sun J, Nanjundan M, Pike LJ, Wiedmer T, Sims PJ. 2002. *Plasma membrane phospholipid scramblase 1 is enriched in lipid rafts and interacts with the epidermal growth factor receptor*. *Biochemistry.* 41(20): 6338-45.

Sutkeviciene N, Riskeviciene V, Januskauskas A, Zilinskas H, Andersson M. 2009. *Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen*. *Acta Vet Scand.* 51: 53.

Tamuli MK & Watson PF. 1994. *Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation*. *Vet Rec.* 135(7): 160-2.

Tanphaichitr N, White D, Taylor T, Attar M, Rattanachaiyanont M, Kates M. 1999. *Role of male germ-cell specific sulfogalactosylglycerolipid (SGG) and its binding protein, SLIP1, in mammalian sperm-egg interaction*. In: *The Male Gamete: from basic knowledge to clinical applications*. Ed. C. Gagnon. Cache Press, Vienna. Pages 227-35.

Tavaria M, Gabriele T, Anderson RL, Mirault ME, Baker E, Sutherland G, Kola I. 1995. *Localization of the gene encoding the human heat shock cognate protein, HSP73, to chromosome 11*. *Genomics* 29(1): 266-8.

Thannickal VJ & Fanburg BL. 2000. *Reactive oxygen species in cell signaling*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(6): L1005-28. Review.

Thomas AD, Meyers SA, Ball BA. 2006. *Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation*. *Theriogenology* 65(8): 1531-50.

Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. 2009. *Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis*. *Hum Reprod.* 24(9): 2061-70.

Thurston LM, Holt WV, Watson PF. 2003. *Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison*. *Theriogenology* 60(1): 101-13.

Tomás C, Gil MA, Mocé E, Hernández M, Martínez EA, Vázquez JM, Roca J. 2009. *Exposure of fresh sperm to cholesterol-loaded cyclodextrins improves in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm*. *Reprod Dom Anim.* 44(3): 128 (Abstract).

- Upadhyaya GA, Topp SA, Hotchkiss RS, Anagli J, Strasberg SM. 2003. *Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells.* Hepatology 37(2): 313-23.
- Vadnais ML, Kirkwood RN, Tempelman RJ, Sprecher DJ, Chou K. 2005a. *Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay.* Anim Reprod Sci. 87(1-2): 121-32.
- Vadnais ML, Kirkwood RN, Specher DJ, Chou K. 2005b. *Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining.* Anim Reprod Sci. 90(3-4): 347-54.
- Vadnais ML & Roberts KP. 2007. *Effects of seminal plasma on cooling-induced capacitative changes in boar sperm.* J Androl. 28(3): 416-22.
- van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Helms JB, Brouwers JF, Gadella BM. 2005. *Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells.* Mol Hum Reprod. 11(8): 583-90.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. 2002. *Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity.* J Reprod Immunol. 53(1-2): 133-50. Review.
- Volpe S, Galeati G, Bernardini C, Tamanini C, Mari G, Zambelli D, Seren E, Spinaci M. 2008. *Comparative immunolocalization of heat shock proteins (Hsp)-60, -70, -90 in boar, stallion, dog and cat spermatozoa.* Reprod Domest Anim. 43(4): 385-92.
- Vyt P, Maes D, Sys S, Rijsselaere T, Van Soom A. 2007. *Air contact influences the pH of extended porcine semen.* Reprod Dom Anim. 42(2): 218-20.
- Watson PF. 2000. *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.* Anim Reprod Sci. 60-61: 481-92. Review.
- Westendorf P, Richter L, Treu H. 1975. *[Deep freezing of boar sperma. Laboratory and insemination results using the Hülsenberger paillete method]* (German). Dtsch Tierarztl Wochenschr. 82(7): 261-7.
- Whipple G & Koohmaraie M. 1992. *Freezing and calcium chloride marination effects on beef tenderness and calpastatin activity.* J Anim Sci. 70(10): 3081-5.



Appendix

WHO, World Health Organization. 2010. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th edition. WHO Press, Geneva, Switzerland.

Yamanaka K. 1999. *Cold shock response in Escherichia coli*. J Mol Microbiol Biotechnol. 1(2): 193-202.

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 acid 2-O-alpha-glucoside*. Cryobiology 57(1): 30-6.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. 2005. *Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells*. Cell Mol Life Sci. 62(9): 971–988.

Image: Duroc piglets (own work)

Versió en català





Llistat d'Articles

Aquesta tesi es presenta com a compendi de tres
articles:

ARTICLE I

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. *Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability*. *Animal Reproduction Science* 2010 Mar; 118(1): 69-76.

La revista ***Animal Reproduction Science*** té un índex d'impacte d'**1.890** i es situa en el primer quartil en la categoria d'Agricultura, Làctics i Ciències Animals (© 2008 Journal Citation Reports, publicat per Thomson Reuters).

ARTICLE II

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. *Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins*. *Theriogenology* 2009 Oct 15; 72(7): 930-48.

La revista ***Theriogenology*** té un índex d'impacte de **2.041** i es situa en el primer quartil en la categoria de Ciències Veterinàries (© 2008 Journal Citation Reports, published by Thomson Reuters).



ARTICLE III

Casas I, Sancho S, Ballester J, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Rodríguez-Gil JE, Bonet S. *The HSP90AA1 content of boar sperm and the prediction of the ejaculate freezability*. *Theriogenology* 2010 (en premsa).

La revista ***Theriogenology*** té un índex d'impacte de **2.041** i es situa en el primer quartil en la categoria de Ciències Veterinàries (© 2008 Journal Citation Reports, published by Thomson Reuters).

Imatge: Porcs en un bosc de Cornwall (Sir Alfred J. Munnings, 1878-1959. Col·lecció privada)



Abreviacions i Símbols

aC	Abans de Crist	etc.	<i>et cetera</i> (i demés)
ADN	Àcid desoxiribonucleic	F1	Porcs híbrids obtinguts del creuament de dues races pures de GPs
AKAP	Proteïna d'ancoratge a A-cinasa	F2	Porcs híbrids obtinguts del creuament de porcs F1
ALH	Amplitud del desplaçament lateral del cap	FBS	Sèrum fetal boví
AMP	Monofosfat d'adenosina	FS	Semen refrigerat
As-A	Arilsufatasa A	FSH	Hormona estimulant dels fol·licles
Atm	Atmosferes (unitats de pressió)	FT	Criopreservat-descongelat
ATP	Trifosfat d'adenosina	g	Gram
ATPase	Cinasa del trifosfat d'adenosina	x g	Força centrífuga (unitats <i>g</i>)
Bax	Proteïna X associada a Bcl-2	GDP	Difosfat de guanidina
Bcl-2	Linfoma 2 de cèl·lules B	GFES	Ejaculacions amb bona congelabilitat
BCF	Freqüència de batec de la cua	GGP	Besavis
BLUP	Millor predictor lineal no esbiaixat	GLUT	Proteïna transportadora de glucosa
BSA	Albúmina sèrica bovina	GMP	Monofosfat de guanidina
BTS	Solució d'escalfament de Beltsville	GnRH	Hormona alliberadora de gonadotropines
Ca(+2)	Ió calci	GP	Avis
CALPAIN	Proteases de la cisteïna dependents de calci	GTP	Trifosfat de guanidina
CASA	Anàlisis computeritzat de semen	h	Hores
CEE	Comunitat Econòmica Europea	H₂O₂	Peròxid d'hidrogen
cm	Centímetres	hCG	Gonadotropina coriònica humana
col.	Col·laboradors	HCl	Clorur d'hidrogen
CPAs	Crioprotectors	HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
Cu/ZnSOD	SOD lligada a Coure i Zinc	HEPES	Àcid 4-(2-hidroxiètil)-1-piperazona-etanosulfònic
DAG	Diacilglicerol	HOST	Test d'inflament hipoosmòtic
DMSO	Dimetilsulfoxi	HRP	Peroxidasa de rave
DTT	Dithiothreitol	HSP90AA1	Proteïna citosòlica de xoc tèrmic de 90 KDa, plegament alfa, classe A, membre 1
DUI	Inseminació artificial intrauterina profunda	Hz	Hertz
eCG	Gonadotropina coriònica equina	IA	Inseminació Artificial
EDTA	Àcid Etilendiaminotretacètic	i.e.	<i>id est</i> (això és)
EFABAR	Codi europeu de bones pràctiques per la cria i reproducció d'animals de granja	i col.	i col·laboradors
e.g.	<i>exempli gratia</i> (exemples)	intra-CAI	Inseminació artificial cervical
EQUEX STM[®]	Nom comercial d'un detergent sintètic	IP₃	Inositol trifosfat
		J	Joules
		K	Graus kelvin
		KCl	Clorur potàssic
		KDa	Quilodalton
		KF	Fluorur potàssic

Kg	Quilogram	PGF	Prostaglandina
l	Litre	PI	Iodur de propidi
LDL	Lipoproteïnes de baixa densitat	PLSCR	Scramblasa de fosfolípids
LEY	Crioprotector amb lactosa i rovell d'ou	PMNs	Neutròfils polimorfonucleats
LEYGO	Crioprotector amb lactosa, rovell d'ou, glicerol i Orvus-Es [®] /EQUEX STM [®] Paste	PMSG	Gonadotropina sèrica d'euga gestant
LIN	Índex de linearitat (VSL/VCL)	proSAP	Proteïnes activadores de pro-esfingolípids
LH	Hormona luteïnitzant	PSP	Espermadesines del plasma seminal
Lp	Coefficient/taxa de permeabilitat a l'aigua	PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
M	Molar (mol/litre)	PIP₂	Fosfoinositol bifosfat
mg	Mil·ligram	PK	Proteïna cinasa
mM	Mil·limolar (mmol/litre)	post-CAI	Inseminació artificial postcervical
mm	Mil·límetre	PVA	Alcohol polivinílic
min	Minuts	PVDF	Difluorur de polivinil
ml	Mil·lilitre	PVP	Polivinilpirrolidona
MOPS	Àcid 4-Morfolina propàrsulfònic	QTL	Loci de caràcter quantitatiu
mOsm	Mil·liosmols	RIPA	Tampó d'assaig de ràdio-immunoprecipitació
MW	Pes molecular	ROS	Espècies reactives d'oxigen
N	Normal (equivalents de solut per litre de dissolució)	s or sec	Segons
N₂	Nitrogen	SDS	Sodi dodecil sulfat
NaCl	Clorur sòdic	SEM	Error estàndard de la mitjana
NADH	Nicotinamida adenina dinucleòtida	Ser	Serina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtida fosfat	SOD	Superòxid dismutassa
NaOH	Hidròxid sòdic	spz	Espermatozoides
NGS	Sèrum normal de cabra	STR	Índex de rectitud (VSL/VAP)
nm	Nanòmetres	SYBR[®]	Nom comercial de colorants sintètics d'àcids nucleics
NO	Òxid nítric	TEMED	Tetrametiletilediamina
O²⁻	Radical superòxid	Thr	Treonina
ORT	Test de resistència osmòtica	TRIS	Tris(hidroximetil)aminometà
Orvus-Es[®]	Nom comercial d'un detergent sintètic	Tyr	Tirosina
PAF	Factor d'activació plaquetària; 1-O-alkuil-2-O-acetil-sn-glicero-3-fosfolina	UE	Unió Europea
PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida	UTJ	Unió uterotubàrica
PBS	Tampó fosfat salí	V	Volts
PCA	Anàlisi de components principals	v	Volum
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa	VAP	Velocitat mitjana
PFEs	Ejaculacions amb mala congelabilitat	VCL	Velocitat curvilínia
		VSL	Velocitat rectilínia
		w	Pes
		WEI	Interval deslletament-estre
		WOB	Índex d'oscil·lació (VAP/VCL)
		µl	Microlitre (10 ⁻³ ml)
		µm	Micròmetre (10 ⁻³ mm)



Índex

Agraïments.....	xii-xiii
Llistat d'Articles.....	189-190
Abreviacions i Símbols.....	191-192
Taules i Figures.....	195-196
Resum/Resumen/Résumé.....	197/199/201
Revisió Bibliogràfica.....	203-247

Generalitats de la cria, la reproducció i la criopreservació espermàtica porcines

1. Generalitats de la cria porcina	
1.1. El porc domèstic.....	203
1.2. Cria porcina a Espanya com a membre de la CEE (2000-2008).....	205
1.3. Cria porcina comercial.....	205
1.4. Piétrain: una raça excel·lent per mascles finalitzadors.....	210
2. Reproducció porcina	
2.1. Generalitats del l'espermatozoide porcí.....	213
2.2. Fisiologia reproductiva del mascle porcí.....	215
2.3. Fisiologia reproductiva de la truja.....	218
2.4. Inseminació artificial (IA) en porcí: rerefons històric i estat de les tècniques actuals.....	220



3. Criopreservació d'esperma porcina	
3.1. Física de la congelació en cèl·lules vives.....	233
3.2. Criopreservació d'esperma porcina (I): fites rellevants, diluents de congelació i aplicacions del procés.....	238
3.3. Criopreservació d'esperma porcina (II): reptes	241
Objectius.....	249
Article I (només versió en anglès).....	47-57
Article II (només versió en anglès).....	58-79
Article III (només versió en anglès).....	80-112
Discussió General.....	251-262
Conclusions Generals.....	263-265
Referències (només versió en anglès).....	125-148
Apèndix (només versió en anglès).....	149-186



Taules i Figures

A LA REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

Figura 1 Caps de bestiar porcí a la UE el desembre de 2007.....	206
Figura 2 Caps de bestiar porcí a la UE el desembre de 2007.....	206
Figura 3 Piràmide d'exploració porcina comercial amb dos nuclis de selecció.....	207
Figura 4 El sistema d'exploració porcina de Selecció Batallé®, amb quatre nuclis de selecció..	209
Figura 5 Cicle de producció porcina en les granges de producció	211
Figura 6 Alguns dels mascles Piétrain seleccionats per la present tesi.....	212
Figura 7 Estructura de l'espermatozoide porcí.....	214
Figura 8 Anatomia reproductiva del mascle porcí.....	216
Figura 9 Espermatogènesi i vesicularització de l'acrosoma després del contacte amb l'oòcit (reacció acrosomal).....	217
Figura 10 Anatomia reproductiva de la truja.....	219
Figura 11 Oogènesi.....	220
Figura 12 Instruments d'IA animal importats de Rússia pel Dr Eng. Luis Thomasset el 1935..	221
Figura 13 Un mascle Piétrain muntant un maniquí i extracció de la fracció rica mitjançant el mètode de la mà enguantada	224
Figura 14 Temporització de la IA mitjançant la detecció de l'estre en truges.....	225
Figura 15 Factors que intervenen, en mamífers, sobre la selecció d'espermatozoides en el sistema reproductiu de la femella.....	226
Figura 16 Mort embrionària i fetal en porcí.....	227
Figura 17 Fetus porcins abortats d'uns 40 dies de vida.....	228
Figura 18 Un garrí en presentació cranial durant el part i un model mostrant diferents fetus a les banyes uterines d'una truja.....	228
Figura 19 Dibuix esquemàtic de les tres principals tècniques d'IA porcina.....	230
Figura 20 Inseminacions cervical i intrauterina amb dosis refrigerades de semen.....	231
Figura 21 Gràfic representant la solidificació de solucions per súperrefredament i per congelació típica.....	234
Figura 22 Possibles esdeveniments que tenen lloc a les cèl·lules durant la congelació.....	236
Figura 23 Supervivència de diferents tipus cel·lulars segons la taxa de refredament.....	237
Figura 24 Imatge de microscopi electrònic d'una secció practicada en una palleta de 0.25 ml i imatge d'un espermatozoide humà criopreservat atrapat en medi de congelació concentrat	241
Figura 25 Vies hipotètiques de senyalització durant la fosforil·lació de residus proteics que activen proteïnes involucrades en fenòmens de capacitació i apoptosi.....	247
Taula 1 Composició (g/l) dels diluents d'IA porcina més comuns.....	222
Taula 2 Principals paràmetres analitzats en semen refrigerat pur, sense diluir, destinat a IA.....	223
Taula 3 Índexs reproductius usats en les granges porcines	229

A L'APÈNDIX (només versió en anglès)

Figura 1A	Esperma porcina (contrast de fases x200).....	150
Figura 2A	Morfologia espermàtica porcina visualitzada a través d'un sistema computeritzat d'anàlisi d'esperma.....	150
Figura 3A	Representació d'alguns paràmetres de motilitat analitzats per un sistema computeritzat sobre la trajectòria de desplaçament d'un espermatozoide.....	152
Figura 4A	Motilitat espermàtica porcina visualitzada a través d'un sistema computeritzat d'anàlisi d'esperma.....	152
Figura 5A	Cambra de comptatge de Makler.....	154
Figura 6A	Imatges representatives dels dos mètodes utilitzats en la present tesi per analitzar la integritat de membrana de l'esperma porcina	155
Figura 7A	Imatge representativa de dos espermatozoides porcins mostrant acrosomes intactes i alterats després del test de l'ORT (contrast de fases x400).....	156
Figura 8A	Equipament d'un laboratori de criopreservació, paràmetres mínims de qualitat espermàtica i corba dibuixada pel biocongelador en congelar esperma porcina dels 5 als -150°C.....	163
Figura 9A	Palleta d'esperma de 0.5 ml (0.5 cm ³) contenint 0.5 x 10 ⁹ espermatozoides diluïts en LEYGO.....	164
Taula 1A	Paràmetres emprats per defecte en la present tesi per l'anàlisi computeritzada de la motilitat espermàtica porcina mitjançant el software SCA2002®	153

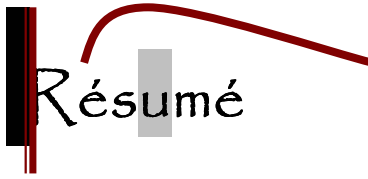
L'ús d'esperma criopreservada en la inseminació artificial (IA) d'espècies d'interès productiu permet un major control sanitari i la creació de bancs de germoplasma d'alt valor genètic, entre d'altres avantatges. En el mercat porcí la major part de les inseminacions són encara realitzades amb semen refrigerat degut a l'èxit de l'aplicació de diluents de llarga durada i també a causa de la sensibilitat de l'esperma porcina a la criopreservació. Malgrat que aquesta sensibilitat ve donada per característiques particulars de la fisiologia espermàtica en l'espècie, algunes ejaculacions mantenen els paràmetres de qualitat espermàtica després de la criopreservació (ejaculacions amb bona "congelabilitat", GFEs) enfront d'altres que no sobreviuen al procés (ejaculacions amb mala "congelabilitat", PFEs). El primer objectiu de l'estudi va ser comparar ambdós grups en termes de fertilitat in vivo. El segon objectiu va ser testar l'eficiència de la inseminació postcervical (post-CAI) amb l'esperma criopreservada. El tercer objectiu va ser buscar predictors de la congelabilitat de les ejaculacions tant en les GFEs com en les PFEs i en tres passos del procés de criopreservació (a 17°C, a 5°C i a 240 min postdescongelació). Aquest objectiu es va dur a terme mitjançant l'avaluació de paràmetres convencionals de qualitat espermàtica i a través de l'estudi de la localització i la reactivitat sota el microscopi de tres proteïnes (GLUT3, HSP90AA1 i Cu/ZnSOD) relacionades amb la fisiologia espermàtica i amb possibles rols en la congelabilitat. El quart objectiu va ser quantificar l'expressió de les tres proteïnes per transferència western tant en les ejaculacions GFEs com en les PFEs i en els tres passos mencionats per tal de determinar el seu potencial com a predictores de la congelabilitat. Pel primer i el segon objectiu, 86 truges van ser inseminades per post-CAI amb 26 ejaculacions de mascles Piétrain dividides en una porció refrigerada a 17°C (tractament control) i una porció criopreservada, ambdues porcions classificades alhora com a GFEs o PFEs. Els resultats més rellevants van demostrar que les probabilitats d'embaràs eren dues vegades menors en inseminacions amb esperma criopreservada d'ejaculacions PFEs ($P < 0.05$) que en inseminacions amb l'esperma criopreservada

d'ejaculacions GFEs, fet que indica que les ejaculacions amb percentatges elevats d'espermatozoides mòbils progressius i amb integritat de membrana (per sobre del 40% en les GFEs) són més favorables a provocar embarassos que no pas aquelles ejaculacions amb una pobre funció espermàtica in vitro (PFEs). Ni el nombre de truges que van donar a llum, ni la quantitat de garrins, ni el risc de reflux espermàtic van ser significativament diferents entre les inseminacions amb esperma criopreservada d'ejaculacions GFEs i les inseminacions control amb semen refrigerat, la qual cosa demostra la bona aplicabilitat de la inseminació post-CAI en esperma criopreservada. Finalment, pel tercer i quart objectius van ser criopreservades 29 i 11 ejaculacions de mascles Piétrain, respectivament. Dos paràmetres cinètics espermàtics, la linealitat (LIN) i la rectitud (STR), van mostrar una hiperactivació de la mobilitat superior en les ejaculacions PFEs que en les GFEs després de 30 min a 5°C durant la criopreservació. A més, la combinació d'ambdós paràmetres va donar una fiabilitat al voltant del 72% en la predicció de la congelabilitat de les ejaculacions porcines. Tot i que no va ser possible predir la congelabilitat mitjançant l'avaluació de les tres proteïnes sota el microscopi, els resultats de transferència western van revelar diferències en l'expressió de la HSP90AA1 en l'esperma a 17°C, molt possiblement relacionades amb la millor supervivència a la criopreservació dels espermatozoides d'ejaculacions GFEs. Aquests resultats suggereixen que la promoció de la criopreservació d'esperma porcina per la seva aplicació en IA passa pel desenvolupament de tests per la predicció de la congelabilitat en semen refrigerat.

Resumen

El uso de esperma criopreservada en inseminación artificial (IA) de especies de interés productivo permite un mayor control sanitario y la creación de bancos de germoplasma de alto valor genético, entre otras ventajas. En el mercado porcino la mayor parte de las inseminaciones todavía se realizan con semen refrigerado debido al éxito de los diluyentes de larga duración y también a consecuencia de la sensibilidad de la esperma porcina a la criopreservación. A pesar de que dicha sensibilidad viene dada por las características particulares de la fisiología espermática en la especie, ciertas eyaculaciones mantienen los parámetros de calidad espermática (eyaculaciones con buena “congelabilidad”, GFEs) frente a otras que no sobreviven al proceso (eyaculaciones con mala “congelabilidad”, PFEs). El primer objetivo del estudio fue comparar ambos grupos en términos de fertilidad in vivo. El segundo objetivo fue testar la eficiencia de la inseminación post-cervical (post-CAI) con esperma criopreservado. El tercer objetivo fue buscar predictores de la congelabilidad de las eyaculaciones tanto en eyaculaciones GFEs como en PFEs y en tres pasos del proceso de criopreservación (a 17°C, a 5°C y a 240 min post-descongelación). Este objetivo se llevó a cabo mediante la evaluación de parámetros convencionales de calidad espermática y a través del estudio de la localización y la reactividad bajo el microscopio de tres proteínas (GLUT3, HSP90AA1 y Cu/ZnSOD) relacionadas con la fisiología espermática y con posibles roles en la congelabilidad. El cuarto objetivo fue cuantificar la expresión de las tres proteínas por transferencia western tanto en espermatozoides de eyaculaciones GFEs como en PFEs y en los tres pasos mencionados para determinar su potencial como predictoras de la congelabilidad. Para el primer y el segundo objetivo 86 cerdas fueron inseminadas mediante post-CAI con 26 eyaculaciones de verracos Piétrain divididas en una porción refrigerada a 17°C (tratamiento control) y una porción criopreservada, las dos porciones clasificadas a la vez en GFEs o PFEs. Los resultados más relevantes demostraron que las probabilidades de embarazo eran dos veces menores en inseminaciones con esperma criopreservada de PFEs

($P < 0.05$) que en inseminaciones con espermatozoides móviles progresivos e integridad de membrana (sobre el 40% en las GFEs) son más proclives a provocar embarazos que no aquellas eyaculaciones con una pobre función espermática in vitro (PFEs). Ni el número de cerdas que dieron a luz, ni la cantidad de lechones, ni el riesgo de reflujo espermático fueron significativamente diferentes entre las inseminaciones con espermatozoides criopreservados de eyaculaciones GFEs y las inseminaciones control con semen refrigerado, hecho que demuestra la buena aplicabilidad de la inseminación post-CAI en espermatozoides criopreservados. Finalmente, para el tercer y cuarto objetivos fueron criopreservados 29 y 11 eyaculaciones de verracos Piétrain, respectivamente. Dos parámetros cinéticos espermáticos, la linealidad (LIN) y la rectitud (STR), mostraron una hiperactivación de la movilidad superior en los espermatozoides de eyaculaciones PFEs que en los de eyaculaciones GFEs después de 30 min a 5°C durante la criopreservación. Además, la combinación de ambos parámetros dió una fiabilidad alrededor del 72% en la predicción de la congelabilidad de las eyaculaciones porcinas. A pesar de que no fue posible predecir la congelabilidad mediante la evaluación de las tres proteínas bajo microscopio, los resultados de transferencia western revelaron diferencias en la expresión de la HSP90AA1 en la espermatozoos a 17°C, muy posiblemente relacionadas con la mejor supervivencia de las eyaculaciones GFEs a la criopreservación. Estos resultados sugieren que la promoción de la criopreservación de espermatozoos porcinos para su aplicación en IA pasa por el desarrollo de tests en semen refrigerado para la predicción de la congelabilidad.



Résumé

L'utilisation du sperme cryoconservé dans l'insémination artificielle (IA) en espèces avec intérêt productif permet un meilleur contrôle de la santé et la création de banques spermatiques d'haut valeur génétique, parmi d'autres avantages. Dans le marché porcin la plupart des inséminations sont encore jouées avec la semence réfrigéré à conséquence du succès de la mise en œuvre de diluants à long terme et aussi à cause de la sensibilité du sperme porcine à la cryoconservation. Bien que cette sensibilité est donnée par les particularités de la physiologie des spermatozoïdes en cette espèce, quelques éjaculations gardent les paramètres de qualité spermatique après de la cryoconservation (bonne "congélabilité", GFEs) en face des autres qui ne survivent pas au procès (mauvais "congélabilité", PFEs). Le premier objectif de cette étude était de comparer les deux groupes en termes de fertilité in vivo. Le deuxième objectif était de tester l'efficacité de l'insémination post-cervicale (post-CAI) avec sperme cryoconservé. Le troisième objectif était de trouver des facteurs prédictifs de la congélabilité des éjaculations à la fois en éjaculations GFEs en tant que en PFEs et en trois étapes dans le procès de cryoconservation (à 17°C, à 5°C et à 240 min post-décongélation). Cet objectif fut réalisé en évaluant des paramètres classiques de la qualité spermatique, et avec l'étude de la localisation et la réactivité sous le microscope de trois protéines (GLUT3, HSP90AA1 et Cu / Zn SOD) ayant ses fonctions liées à la physiologie spermatique et avec rôles potentiels en la congélabilité. Le quatrième objectif était de quantifier l'expression de ces trois protéines par Western blot, à la fois en spermatozoïdes des éjaculations GFEs en tant que en PFEs et en les trois étapes mentionnées ci-dessus, afin de déterminer leur potentiel en tant que prédicteurs de congélabilité. Pour les objectifs premier et deuxième, 86 truies furent inséminées pour post-CAI avec 26 éjaculations de mâles Piétrain divisées en une partie réfrigérée à 17°C (traitement contrôle) et en une portion cryoconservé, alors que les deux portions furent classifiés comme GFEs ou PFEs. Les résultats les plus importants ont montré que les chances de grossesse furent deux fois plus faibles après

d'inséminations avec sperme cryoconservé des éjaculations PFEs ($P < 0.05$) qu'après d'inséminations avec sperme crioconservé des éjaculations GFEs, indiquant que les éjaculations avec pourcentages élevés des spermatozoïdes mobiles progressifs et d'intégrité membranaire (supérieurs à 40% en éjaculations GFEs) sont plus favorables à se traduire en grossesse que les éjaculations avec une pauvre fonction spermatique in vitro (PFEs). Ni le nombre de truies qui vont donner naissance, ou le nombre de porcelets, ou le risque de reflux du sperme étaient significativement différentes entre les inséminations avec sperme cryoconservé des éjaculations GFEs et les inséminations avec du semence réfrigéré, ce qui démontre la bonne applicabilité de l'insémination post-CAI en sperme crioconservé. Enfin, pour le troisième et le quatrième buts furent cryoconservés 29 et 11 éjaculations de mâles Piétrain, respectivement. Deux paramètres cinétiques spermatiques, la linéarité (LIN) et la rectitude (STR), vont montrer une plus grande hyperactivation de la mobilité dans le sperme des éjaculations PFEs que dans le sperme des éjaculations GFEs après 30 min à 5°C au cours de la cryoconservation. En outre, la combinaison de ces deux paramètres vont donner une fiabilité d'environ 72% en la prédiction de la congelabilité des éjaculations porcines. Malgré il n'était pas possible de prédire la congelabilité en évaluant les trois protéines sous le microscope, les résultats de western blot vont révéler des différences dans l'expression de la HSP90AA1 dans le sperme à 17°C, probablement lié à la meilleure survie de le sperme des éjaculations GFEs à la cryoconservation. Ces résultats suggèrent que la promotion de la cryoconservation du sperme porcine pour son usage en IA exige le développement de tests pour prédire la congelabilité en sperme réfrigéré.

Revisió Bibliogràfica



Generalitats de la cria, la reproducció i la criopreservació espermàtica porcines

1. GENERALITATS DE LA CRIA PORCINA

1.1. El porc domèstic

El porc domèstic (*Sus scrofa scrofa* o *Sus scrofa domestica*; Linné, 1758) pertany a família *Suidae* de l'ordre *artiodactyla*. Aquest mamífer segueix una dieta omnívora, pot pesar entre 50 i 350 kg, i desenvolupa estructures socials anomenades porcades o baconades. No té glàndules sudorípares per la qual cosa elimina la calor acumulada mitjançant la respiració i rebotant-se pel fang i l'aigua. La incapacitat per suar i el creixement escàs de cerres són característiques que expliquen la seva reconeguda sensibilitat davant els canvis de temperatura [1, 2]. Malgrat que el porc és considerat un criador no estacional, tant la qualitat del semen com la libido són més baixes a l'estiu (juliol-octubre) degut al fotoperíode extrem de l'estació [3, 4]. Les elevades temperatures afecten la funcionalitat dels testicles pel fet que estan directament exposats a les condicions ambientals alterant a la vegada la producció espermàtica i la libido [5-7]. Els primers signes de l'estre o pubertat tenen lloc a l'edat de 6 mesos en les femelles, essent més progressius en els mascles en els quals pot arribar als 5 o als 18 mesos [8]. El període que segueix és la postpubertat, la qual acaba quan es manifesta la maduresa sexual al voltant dels 12 mesos tant en mascles com en femelles [9]. Les truges que han parit una o més d'una vegada s'anomenen primípares i múltípares, respectivament, mentre que aquelles que encara no han parit reben el nom de nul·lípares. La mitjana de vida dels porcs criats en granja és de 3-4 anys malgrat que la seva esperança de vida real és de 6 a 15 anys [1, 10].



Els porcs han estat domesticats de manera independent en diferents regions del món a partir de poblacions primitives de *Sus scrofa* (senglar). Les primeres domesticacions van tenir lloc a Tailàndia i a la Xina al voltant del 10000 aC i posteriorment hi va haver una hipotètica introgressió de races domèstiques asiàtiques en les races europees i americanes, possiblement entre el 7000 i el 3000 aC [9, 11, 12]. La cria porcina va afavorir l'establiment de comunitats humanes al qual va seguir el comerç de la carn i la pell del porc [1, 9]. Fins al segle XX la cria porcina estava destinada bàsicament al consum propi. La cria per finalitats comercials va anar en increment fins establir-se les actuals granges comercials, els escorxadors i la indústria porcina en general. La importació de races adaptades a la cria intensiva va permetre el creixement de la indústria de la carn però va determinar alhora l'extinció de moltes races autòctones [13].

És àmpliament acceptat que les races porcines actuals van evolucionar de tres espècies primitives [12]: asiàtica (*Sus vittatus*), cèltica (*Sus scrofa*), i ibèrica amb orígens africans (*Sus mediterraneus*), tot i que es creu que aquesta última podria ser una subespècie de la cèltica [14, 15]. A Espanya, les races Vitoriana, Baztan i Large-White van derivar de porcs cèltics establerts al nord de la península mentre que les races de línia ibèrica, possiblement introduïdes pels Fenicis des del nord d'Àfrica, es van estendre al llarg de la costa peninsular [15]. Recentment s'ha descobert que totes les poblacions porcines són altament polimòrfiques, fins i tot en cas d'endogàmia, la qual cosa és indicativa d'una complexa història filogenètica [16].

Actualment hi ha registrades més de 200 races porcines arreu del món [11] i la seva classificació es pot basar en caràcters morfològics [17], país d'origen [18] o aptituds reproductives i productives [19]. Atenent aquest últim sistema, les races pures que tenen tant aptituds productives (paternals) com reproductives (maternals) són la Large-White, la Landrace, la Yorkshire, la Duroc i l'Spotted (races generals). La Piétrain, la Landrace Belga i la Hampshire són races que bàsicament tenen aptituds productives (races paternals) mentre que la Meishan i la Polonesa-Xinesa són races sexualment precoses amb bona prolificat i adaptabilitat (races maternals) [19]. Les races generals són tan versàtils que són intensivament seleccionades pels grangers vers millors índexs productius o de prolificat; les línies que es deriven de la selecció per prolificat s'anomenen línies de selecció hiperprolífiques. De tal intensitat de selecció se n'obtenen individus d'una mateixa raça amb diferents al·lels fixats per un caràcter depenent del seu historial de selecció, i cada productor desenvolupa la seva pròpia línia de porcs. No obstant el creuament és la causa més freqüent d'extinció de les races autòctones també és el sistema que sosté la indústria de carn porcina moderna ja que els híbrids són més versàtils i resistent que les races pures [20].

1.2. La cria porcina a Espanya en el marc de la UE (2000-2008)

La cria porcina a Espanya representa el 40% de la producció agrònoma total, alçant-se com a segon país dins de la Unió Europea (UE) en estoc carni (*Figura 1*). La indústria càrnica porcina espanyola és el sector amb més caps de bestiar (més de 25 milions d'animals censats el 2007) seguit pel sector oví, boví i caprí [21]. Catalunya és la primera comunitat autònoma en nombre de caps de bestiar porcí, arribant als 6 milions d'animals censats el 2007 [21] (*Figura 2*). Des de l'any 2000, Espanya ha estat el quart productor mundial de porc darrere la Xina, els Estats Units i Alemanya [22]. Havent comptabilitzat al voltant de 600 explotacions comercials el 2008, per sobre de 200 sols a Catalunya [23], Espanya ha produït més de 3 milions de tones de càrnica porcina i ha experimentat un creixement en el nombre d'exportacions [24]. Aquests bons resultats han incentivat la recerca en temes de producció porcina amb el propòsit principal de millorar la qualitat de la carn per al seu consum.

1.3. L'explotació porcina comercial

Generalment es pot escollir entre dues opcions en el moment d'establir una explotació porcina: cria particular o bé cria comercial (diferents granges que cooperen sota propietat d'un productor). Degut a l'increment de la demanda i a la introducció de tecnologies punteres l'organització de les granges s'ha fet més complexa i la cria comercial és la més estesa actualment.

Un exemple d'explotació porcina comercial el trobem a Selecció Batallé® [25]. Aquesta companyia ha desenvolupat un programa de millora genètica amb l'objectiu de seleccionar i produir individus que atenguin la demanda comercial. Aquest programa consisteix en una cadena de producció càrnica constituïda per tres tipus diferents de granges: granges o nuclis de selecció, granges de multiplicació i granges de producció o comercials. Aquestes granges s'estableixen formant una jerarquia piramidal en la qual el nucli de selecció es troba al cim (*Figura 3*). La finalitat d'aquesta cadena de producció és disseminar les característiques dels individus èlit des de la punta de la piràmide fins la base, on els porcs són duts a escorxador per la seva venda a mercat [26, 27]. L'objectiu principal és obtenir porcs de venda amb els mínims costos i la màxima qualitat de la carn, havent d'implementar estrictes controls per evitar la propagació de malalties entre les diferents granges. Selecció Batallé® compleix el recentment establert Codi de Bones Pràctiques per la Cria i Reproducció d'Animals de Granja (EFABAR) de la UE [28].



Fig. 1 Caps de bestiar porcí a la UE el desembre de 2007 (milers d'animals)

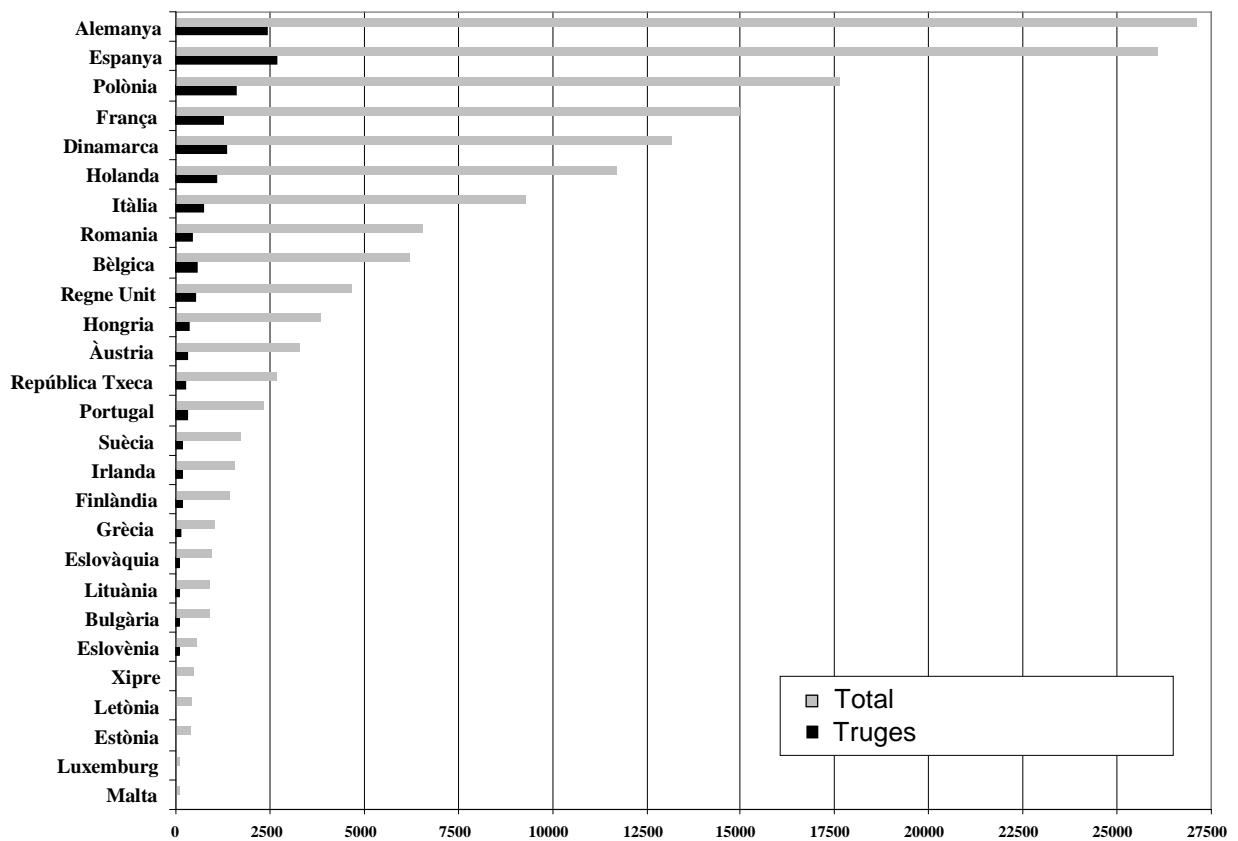
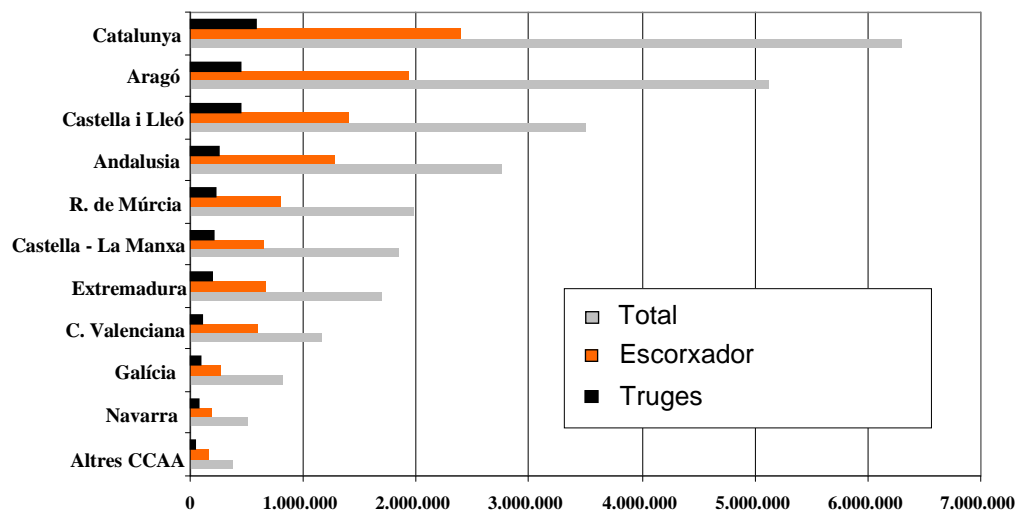


Fig. 2 Caps de bestiar porcí a Espanya el desembre de 2007 (milers d'animals)



Figures 1, 2 Modificades a partir de fonts del Ministeri Espanyol de Medi Ambient i Medi Rural i Marí. Subdirecció General d'Estadístiques Agroalimentàries (MAPA). Enquestes Ramaderes; Bestiar porcí, resultats del 2007 [21].

Un **nucli de selecció** és una granja dedicada a la millora genètica. Els individus de pura raça que tinguin trets especials d'interès pel productor són inclosos en el programa genètic per tal de millorar la raça desenvolupant noves línies experimentals. Hi pot haver tants nuclis de selecció com races incloses al programa, amb un mínim de dues races que seran creuades més endavant en les granges de multiplicació. Quatre races són les que es troben incloses al programa de millora genètica de Selecció Batallé®: Landrace, Duroc, Piétrain i Yorkshire. Totes elles són majoritàriament formades per truges degut al fet que la proporció truges:mascles en un nucli de selecció, considerant les tècniques modernes d'insmeïnació artificial (IA), es troba entre 7:1-80:1. Els individus que es troben al nucli s'anomenen besavis (GGP) i pertanyen tant a races paternals com a races maternals. Els millors individus són seleccionats per ser encreuats i obtenir avis (GP). Aproximadament el 6% de les femelles GP que neixen són retingudes al nucli (les que tenen un millor rendiment d'acord amb el programa) mentre que més del 70% són retirades del programa; només el 3% són destinades a les granges de multiplicació i la resta són venudes. En canvi, gairebé tots els mascles GP són exclosos del programa, un petit percentatge és o bé venut o bé enviat a les granges de multiplicació i menys d'un 1% és retingut al nucli. Els individus exclosos són normalment sacrificats. Tots aquests percentatges poden variar considerant les fluctuacions dels mercat [25].

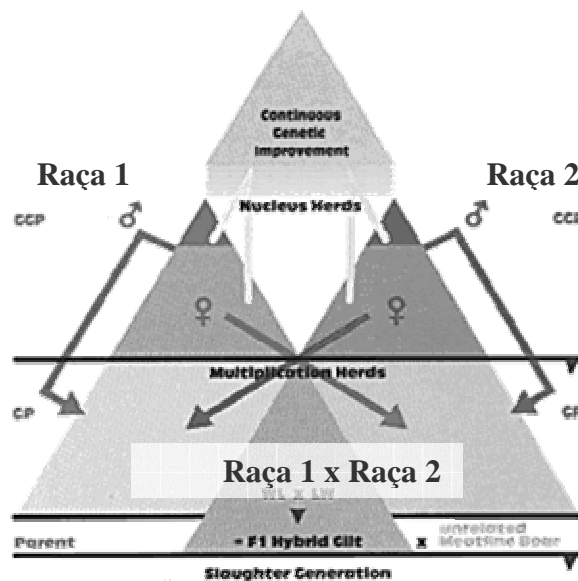


Figura 3 Piràmide d'exploració porcina comercial amb dos nuclis de selecció (modificat de *Breeding programs, JJGenetics, 2008 [27]*).

Els controls de rendiment (assaigs a granja) són la base per escollir els animals genèticament superiors. Els càlculs dels valors genètics dels GGP requereixen anàlisis genealògics i el testatge dels trets inclosos en els objectius del programa de millora genètica,



i.e. espessor de la capa de greix dorsal, greix intramuscular, garrins nascuts vius, creixement diari, índex de conversió (alimentació requerida per Kg de carn obtingut) o número de tetines [25]. Durant molts anys un dels tests més practicats ha estat la detecció del gen causant de la síndrome de l'estrés porcí (anomenat gen de l'halotà pels efectes negatius de l'anestèsic inhalatori d'halotà en els porcs que manifesten aquesta malaltia recessiva). Els individus portadors de dos al·lels nn, codificadors del gen de l'halotà, presenten mala qualitat càrnica com a resultat de la seva extrema sensibilitat a l'estrés. És conegut que un elevat percentatge de la població Piétrain expressa els dos al·lels recessius, la qual cosa explica la seva sensibilitat a les condicions ambientals. Contràriament, els individus de raça Yorkshire no són portadors de l'al·lel (NN) i els de raça Duroc i Landrace poden portar un al·lel (Nn) sense manifestar la malaltia, tot i que en els últims anys s'ha exercit una forta pressió selectiva en contra dels individus portadors i la majoria d'ells són ara homozigots (NN). Des de l'any 2000 està essent desenvolupada la identificació de gens amb efectes sobre trets d'interès comercial (Loci de caràcter quantitatiu, QTL) [29], però caràcters com la prolificitat o l'índex de creixement diari, amb una baixa heredabilitat, no poden ser avaluats mitjançant genotipatge i requereixen models estadístics com el BLUP (millor predictor lineal no esbiaixat) basat en observacions sobre factors que interfereixen en la població porcina de l'explotació [30].

Després dels controls de rendiment els individus GGP amb baix valor genètic són enviats a l'escorxador o a centres d'IA per proporcionar semen a les granges de producció, mentre que els individus seleccionats per caràcters paternals o maternals són encreuats per obtenir GP. Un percentatge de la descendència femenina de les línies maternals és destinat a diferents granges de multiplicació i la descendència masculina de les línies paternals és directament destinada a les granges de producció (mascles finalitzadors) [31]. En el cas de Selecció Batallé®, la línia paternal està formada per besavis/es de raça Piétrain i Yorkshire i els avis que resulten de cada raça es destinen directament a les granges de producció com a mascles finalitzadors. La línia maternal està formada per besavis/es de raça Landrace i Duroc i els avis Landrace i les àvies Duroc són destinats a les granges de multiplicació (Figura 4).

En les **granges de multiplicació** s'encreuen els avis (GP) de línies maternals obtinguts en el nucli de selecció. A Selecció Batallé®, les àvies Duroc són inseminades amb semen d'avis Landrace per obtenir híbrids F1 en els quals la millor genètica de cadaraça conflueix. S'anomena heterosi o "vigor híbrid" el fenomen pel qual el rendiment de la descendència excedeix el rendiment mitjà dels progenitors. Les truges híbrides obtingudes són venudes a les granges de producció degut a l'increment de la proporció truges:mascles en aquestes granges [32]. Els costos derivats de la selecció als nuclis es reparteixen entre un nombre creixent d'animals al llarg de la piràmide. El ratio aproximat de truges als nuclis de selecció, granges de multiplicació i granges de producció és actualment de 1:4:70 [25].

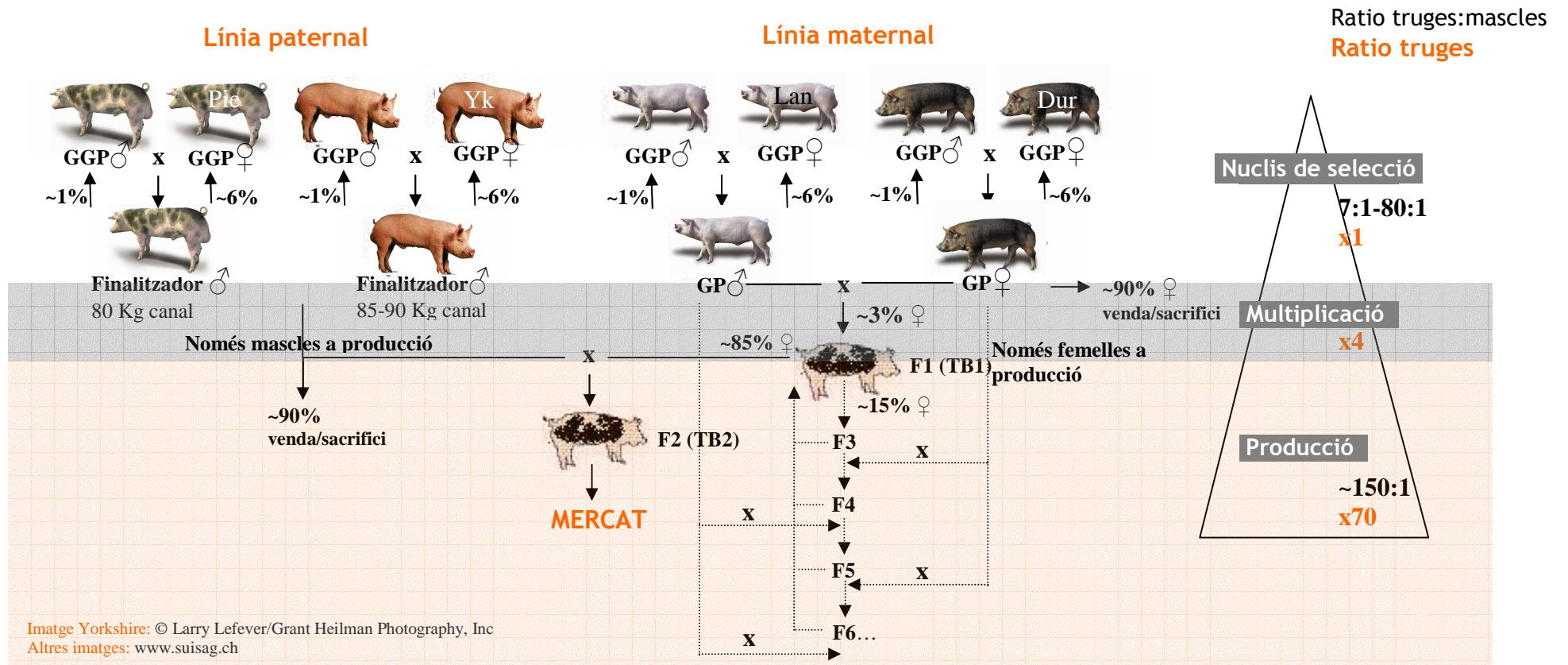


Figura 4 El sistema d'exploració porcina de Selecció Batallé®, amb quatre nuclis de selecció (dades per cortesia de Selecció Batallé®. Dibuixos de Thompson LH. [32]).

Lan= Landrace; Yk= Yorkshire; Pie= Piétrain; Dur= Duroc. Les línies discontinúes representen el sistema rotaterminal. Els percentatges poden variar segons el mercat.



Els individus nascuts a les **granges de producció** són destinats al mercat per dur-los finalment a l'escorxador. La proporció truges:mascles en aquestes granges pot trobar-se per sobre de 150:1 [33] i les truges F1 són cíclicament inseminades amb dosis seminals procedents de mascles finalitzadors (GP), els quals proporcionen un elevat rendiment productiu a la descendència. Per tant, els trets paternals o productius són hereditats a través de les dosis seminals. Els mascles finalitzadors influeixen en la taxa de parts i en la mida dels garrins de la ventrada i contribueixen en un 50% a la genètica de la descendència (F2), i els avis de línies maternes encreuats en les granges de multiplicació contribueixen cadascun un 25% a la genètica de l'F2 [32].

A Selecció Batallé® fins 10×10^6 individus F2 poden ser duts a l'escorxador en un any [25]. Aquest tipus de cadena de producció càrnica és anomenat sistema d'encreuament terminal. En els sistemes rotaterminals, el 85% de les truges F1 segueixen el sistema terminal i el 15% són cíclicament inseminades amb semen de les races maternals progenitores. Aquest últim sistema permet assegurar un estoc de femelles per substituir les F1 ja que tenen les mateixes característiques. Es permet així reduir la inversió en animals pel nucli de selecció i minimitza el risc sanitari associat a l'entrada d'animals als nuclis [34]. Les granges de producció formen un sistema tancat en el qual les femelles F1 són cíclicament inseminades per una major eficiència productiva [35] (Figura 5). Per maximitzar l'aprofitament de l'explotació es recomana un màxim de 7 parts abans de retirar la truja del cicle [36].

1.4. Piétrain: una raça excel·lent per mascles finalitzadors

Piétrain és la raça pura preferent per aconseguir una producció exitosa en els sistemes d'encreuament terminals (Figura 6). Aquest porc de pell clapejada prové de la vil·la Piétrain situada 53 Km a l'est de Brussel·les (Bèlgica). És un animal amb poques cerres, cos llarg i robust, orelles erectes i extremitats més curtes que les d'altres races. La raça Piétrain, malgrat ser prolífica, presenta un baix índex reproductiu (pocs garrins per truja i any), poca capacitat de cria dels garrins i pobra producció de llet. A més, té uns baixos índexs de creixement i de conversió, encara que aquests han millorat en algunes línies seleccionades. Contràriament, els animals d'aquesta raça són molt musculats i tenen poc greix (la proporció de magre respecte de greix és de 9:1) [25, 37]. Els mascles Piétrain són sovint utilitzats com a mascles finalitzadors en la millora de la qualitat de la canal (permeten aconseguir fins un 83% de carn en canal), independentment de la truja inseminada. No obstant, la seva muscularitat deriva d'una mutació en el gen de l'halotà que també li provoca una elevada sensibilitat a l'estrès i una mala qualitat de la carn. El gen encara és rastrejat en els controls de rendiment ja que el 80% de la població mundial de Piétrain és homozigota recessiva (nn) pel gen. La baixa qualitat càrnica dels Piétrain determina la conversió dels individus en productes frescos com

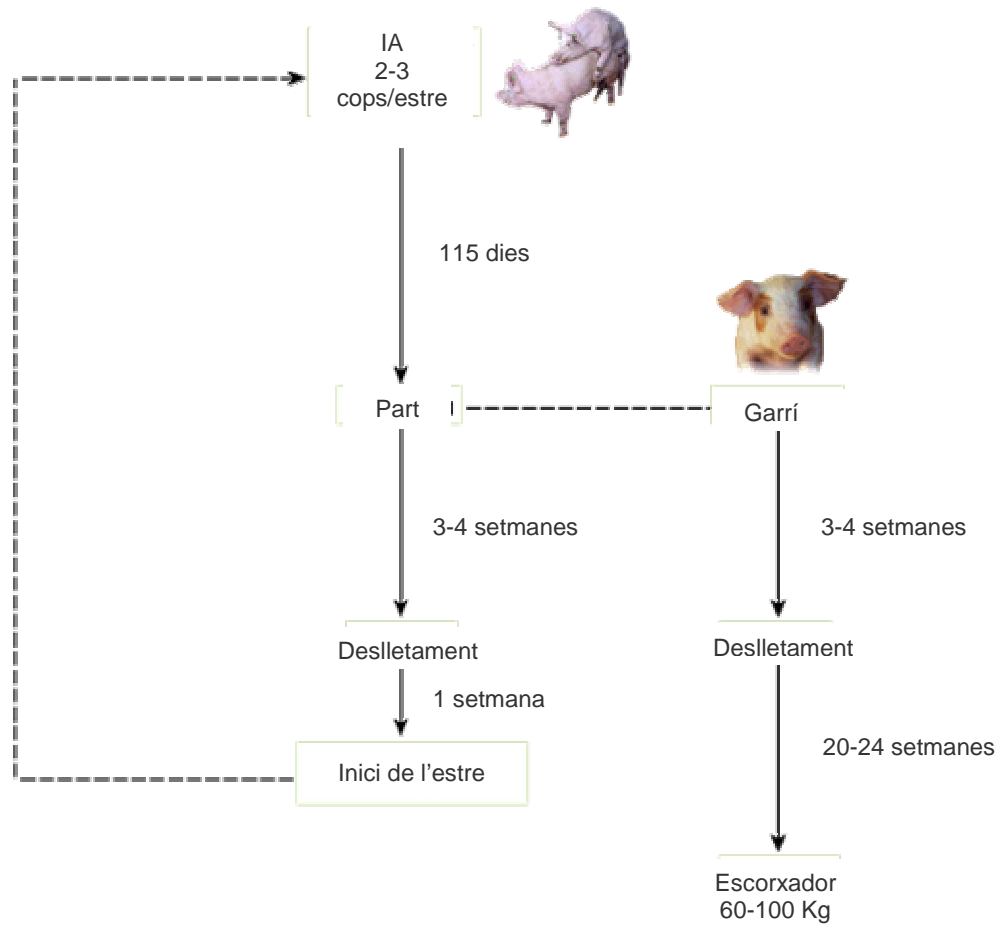


Figura 5 Cicle de producció porcina en les granges de producció (extret de *Living Countryside* ©, UK agriculture [35]).

pernil dolç, salsitxes o mortadel·la, enlloc de productes curats com pernil salat, cansalada o llonza. Els paràmetres prototip de la raça són els següents [37, 38]:

- ☛ Pes final (Kg): 230-300
- ☛ Creixement diari als 20-90 Kg (g/dia): 575
- ☛ Índex de conversió als 20-90 Kg (Kg/Kg): 3.25
- ☛ Edat de les truges al primer part (dies): 342
- ☛ Garrins nascuts vius/part: 9-9.5
- ☛ Garrins deslletats/part: 7-8
- ☛ Llargada de la canal (cm): 92
- ☛ Magre en la canal (%): 60



TB47956



TB47956

TB50405

TB53647

TB53688

Figura 6 Alguns dels mascles Piétrain seleccionats per la present tesi (cortesia de Selecció Batallé®,
Novembre 2006).



2. REPRODUCCIÓ PORCINA

El rendiment reproductiu dels porcs és bàsic en l'economia de les explotacions, raó per la qual els individus de les línies maternals són curosament seleccionats envers els millors índexs de parts i prolificitat. Molts factors estan implicats en els resultats reproductius d'un individu, ja siguin intrínsecs (i.e. raça, edat, fisiologia) o extrínsecs (i.e. temperatura, humitat, fotoperíode, ritme d'extraccions, alimentació) [39-41].

2.1. Generalitats de l'espermatozoide porcí

L'espermatozoide porcí és una cèl·lula altament especialitzada d'uns 45 μm de longitud total, dividida en tres seccions principals: cap (7 μm), peça de connexió o coll (0.7 μm) i cua (37 μm). Aquestes seccions estan envoltades per una bicapa contínua anomenada plasmalemma o membrana plasmàtica [42, 43] (Figura 7).

El **cap** és ovalat i pla i conté una vesícula en bicapa, anomenada acrosoma, que cobreix la meitat del nucli com un barret, extenent-se des de la part apical del cap fins la regió equatorial; aquesta zona s'anomena regió acrosomal. L'acrosoma conté mucopolisacàrids, proteïnes, lípids i enzims hidrolítics per digerir les cobertes oocitàries en el moment de la fecundació. Malgrat que la membrana acrosomal és una vesícula contínua, la superfície encarada a la membrana plasmàtica s'anomena membrana acrosomal externa i la superfície encarada al nucli rep el nom de membrana acrosomal interna. A la vora apical d'una de les



cares del cap hi ha una protuberància en forma de ferradura d'uns 0.4 µm d'ample, causada per una dilatació de l'acrosoma. Sota la regió equatorial, la regió postacrosomal conté material fibrós dens entre el plasmalemma i l'embolcall nuclear.

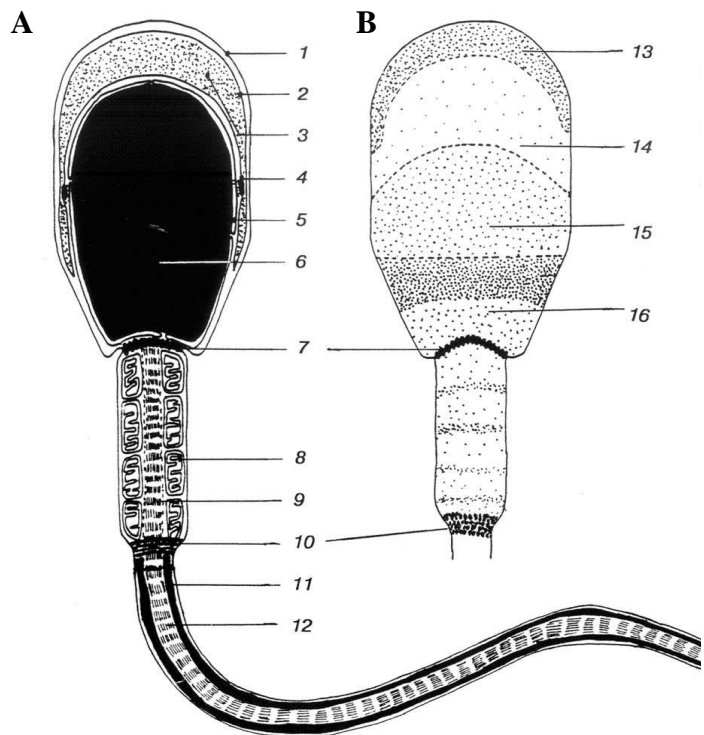
La **peça de connexió** és la regió més propensa al trencament degut a la seva primesa. S'encarrega de mantenir en contacte el cap amb la cua.

La **cua** impulsa l'espermatozoide amb un moviment helicoïdal endavant i està formada per tres peces: la peça intermèdia, amb estructura d'axonema coberta per una beina mitocondrial (vàries mitocondries disposades helicoïdalment al voltant de l'axonema); la peça principal, amb estructura d'axonema coberta per una beina fibrosa; la peça terminal, únicament amb estructura axonemàtica [42, 43]. La peça intermèdia està connectada a la peça principal per l'anell de Jensen, una circumferència de subunitats filamentoses empaquetades que uneix les dues peces i impedeix desplaçaments de la beina mitocondrial [45].

Figura 7 Estructura de l'espermatozoide porcí (modificat de *Gadella i col., 2008 [44]*).

(A) Vista en secció de l'espermatozoide porcí. Les línies sòlides representen membranes en bicapa. 1, membrana plasmàtica o plasmalemma; 2, membrana acrosomal externa; 3, matriu amb enzims acrosomals; 4, membrana acrosomal interna; 5, embolcall nuclear; 6, nucli; 7, peça de connexió (coll); 8, peça intermèdia; 9, axonema i mitocondries; 10, Anell de Jensen; 11, beina fibrosa; 12, axonema + fibres denses externes.

(B) Vista de la superfície del cap i la peça intermèdia de l'espermatozoide porcí amb els subdominis: 13, vora apical; 14, regió acrosomal; 15, regió equatorial; 16, regió postacrosomal.




La qualitat i el volum del semen porcí, tal com succeeix amb la fertilitat, estan influïts per molts factors [6, 46, 47] classificats com a intrínsecs (e.g. genètica, edat, raça [48-50]) o

extrínsecs (e.g. ritme d'extracció, ambient [3, 51-53]). La influència de tals factors en la qualitat espermàtica es pot contrastar amb diferents paràmetres funcionals [54, 55]: morfologia, motilitat, integritat de membrana [41], integritat de l'ADN, percentatge d'acrosomes alterats (test de resistència osmòtica, ORT), inflamació acrosomal (test de resistència hipoosmòtica, HOST), estatus funcional [56], etc.

La morfologia és un dels indicadors de l'habilitat que té l'espermatozoide per fecundar, ja que la presència de cues doblegades o enrotllades impedeix que l'espermatozoide nedi correctament i les anomalies del cap, freqüentment, assenyalen alteracions del material genètic. A més, molts subproductes provinents de la maduració espermàtica són alliberats en forma de gota citoplasmàtica. Es tracta d'una protuberància esfèrica, lligada a la peça de connexió (gota proximal), que migra al llarg de la peça intermèdia durant el recorregut de l'espermatozoide per l'epidídim fins que és alliberada a l'alçada de l'anell de Jensen (gota distal) en el moment de l'ejaculació. La presència de gotes proximals a l'ejaculació es considera una anomalia morfològica, ja que indica que el procés de maduració pot no haver-se desenvolupat correctament [48, 57-59]. És encara controvertida la inclusió de les gotes distals com a anomalia morfològica en les dosis destinades a IA. En tot cas, la retenció de gotes citoplasmàtiques quan l'esperma està entrant en el tracte reproductor de la femella s'associa, en mamífers, a casos d'infertilitat, tant si la gota és proximal com distal [57, 60].

2.2. Fisiologia reproductiva del mascle porcí

 El sistema reproductiu del mascle porcí està format per sis unitats coordinades: el cervell, l'hipotàlem i la glàndula pituitària; els testicles i els epidídim; i el tracte urogenital amb les seves glàndules accessòries (la pròstata, dues vesícules seminals i dues glàndules bulbouretrals o de Cowper) (Figura 8). Un porc sa arriba a la pubertat als 7-9 mesos d'edat i és el moment en què comença la producció d'espermatozoides als testicles (procés d'espermatogènesi), on la temperatura disminueix dels $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ als $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ per evitar inhibir el procés [5, 61, 62].

L'espermatogènesi (Figura 9) té lloc als túbuls seminífers dels testicles i comprèn el pas de cèl·lula primària diploide (espermatogònia) a cèl·lula haploide (espermàtida), després de successives mitosis (fase proliferativa) i una meiosi (fase meiòtica), i també les posteriors modificacions fins a l'espermatozoide (espermiogènesi, diferenciació o compartimentalització). Les espermatogònies es divideixen per mitosi convertint-se en espermatòcits i aquests

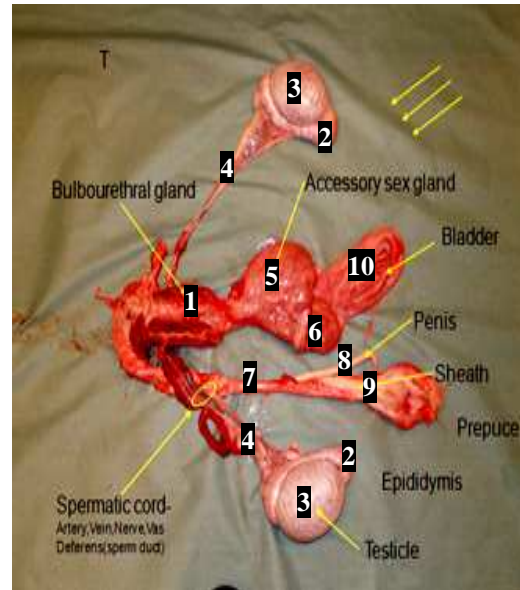
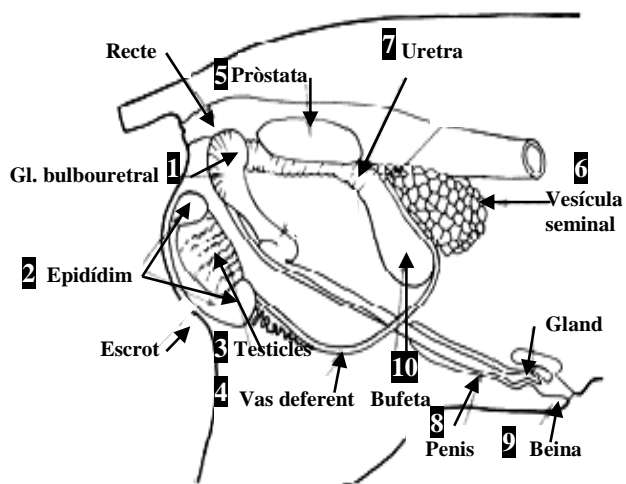


Figura 8 Anatomia reproductiva del mascle porcí (a l'esquerra, dibuix extret de Thomson LH., 2008 [32]; a la dreta, imatge modificada de shpswine [69]).

romanen units per ponts citoplasmàtics formant sincitis per tal de coordinar el seu desenvolupament fins convertir-se en espermàtides. Les espermàtides s'associen amb les cèl·lules de Sertoli, les quals els fagociten l'excés de citoplasma i els proporcionen el glicogen que les nodrirà durant els diferents canvis estructurals que s'esdevinguin fins que siguin alliberades a la llum dels túbuls (espermiació). Les cèl·lules de Sertoli formen alhora la barrera hematotesticular que impedeix reaccions autoimmunitàries contra les cèl·lules haploides. En l'espermàtide l'aparell de Golgi es transforma en l'acrosoma i un centríol organitza l'axonema de la cua. Les histones són substituïdes per protamines per una major compactació de l'ADN. Les mitocondries es fusionen i migren cap a la cua per produir l'energia que necessitarà l'espermatozoide pel seu desplaçament, alhora que es redueix el contingut citoplasmàtic. El seu citoplasma residual serà expulsat, prenent la forma de gotes citoplasmàtiques, durant el procés que segueix a l'espermatogènesi, la **maduració** a l'epidídim, al llarg de 14-18 dies [63]. En la maduració s'adquireixen les funcions de mobilitat i fertilitat a través de canvis en el patró proteic de la superfície espermàtica [64-66], per la qual cosa poden aparèixer anomalies morfològiques en aquesta etapa [67], i l'esperma és després emmagatzemat al cauda de l'epidídim fins el moment de l'ejaculació. Els canvis finals a l'espermatozoide són promoguts al tracte reproductor de la truja donant lloc als processos de **capacitació** i reacció acrosomal; aquest últim consisteix en la fusió de les membranes acrosomal i plasmàtica de l'espermatozoide després del contacte amb l'oòcit (Figura 9).

Els esdeveniments que succeeixen al tracte reproductor del mascle són regulats per hormones secretades des de la glàndula pituïtària. Aquesta és estimulada amb senyals del cervell que afavoreixen la secreció de l'hormona alliberadora de gonadotropines (GnRH) a l'hipotàlem la qual, a la vegada, estimula la glàndula pituïtària perquè secreti dues gonadotropines: l'hormona estimulant dels fol·licles (FSH) i l'hormona luteïnitzant (LH). La FSH regula la producció d'estrògens a les cèl·lules de Sertoli dels testicles per un correcte funcionament de l'espermatogènesi i la LH incrementa l'elaboració de testosterona per part de les cèl·lules intersticials o de Leydig, també als testicles, per la producció de semen i l'aparició de la libido o desig sexual [68]. El procés d'espermatogènesi és cíclic i triga unes 7 setmanes [62].

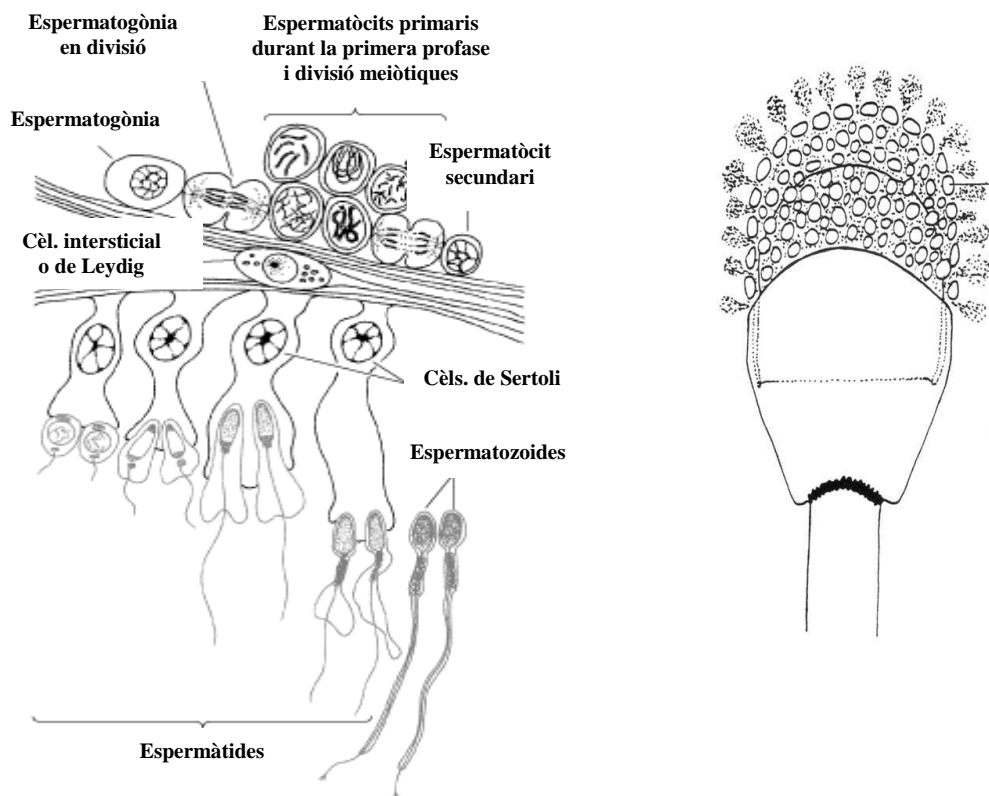


Figura 9 A l'esquerra, l'espermatogènesi als testicles (extret d'Answer.com [68]). A la dreta, vesicularització de l'acrosoma després del contacte amb l'òocit (reacció acrosomal). La fusió de la membrana acrosomal externa amb el plasmalemma resulta en l'expulsió dels enzims vesiculars (extret de Gadella i col., 2008 [44]).

Durant l'ejaculació, els espermatozoides surten de l'epidídim i són barrejats amb secrecions de les glàndules accessorïes del tracte urogenital, les qual formaran el plasma seminal. L'ejaculació final o semen és la suma dels espermatozoides i el plasma seminal. El plasma seminal del mascle porcí conté, sobretot, proteïnes secretades per les glàndules accessorïes [70-73]. Aquest elevat contingut proteic protegeix els espermatozoides [74],




impedeix la seva aglutinació i intervé en el procés de fertilització per la seva importància en la capacitat [75, 76]. Addicionalment, el plasma seminal conté carbohidrats com la glucosa, el sorbitol i la fructosa per assegurar un bon rendiment del metabolisme espermàtic [70]. El pH de l'ejaculació es troba al voltant de 7.4 unitats i la seva omolaritat entre 290-300 mOsm, essent el rang de tolerància osmòtica de l'espermatozoide de 240-380 mOsm. Una ejaculació es pot dividir en tres fraccions principals: preespermàtica, espermàtica o rica, i postespermàtica [39, 77].

En la fracció **preespermàtica** s'expulsa la tapioca. Es tracta d'una substància gelatinosa de les glàndules bulbouretrals que lubrica i aïlla el tracte urogenital de la pol·lució externa. Aquesta fracció també inclou una secreció prostàtica que provoca la líquefacció del semen.

La fracció **espermàtica o rica** és abundant en espermatozoides, motiu pel qual presenta un aspecte lletós (oscil·la entre 0.4 i 1.8×10^9 spz/ml [77, 78]), i té un volum entre 40-100 ml depenent de factors com el fotoperíode, les característiques individuals, el ritme d'extraccions, la raça, l'edat, etc. [78]. Es compon, principalment, de secrecions del cauda epididimari, les vesícules seminals i la pròstata. El fluid epididimari i el de les vesícules seminals aporten proteïnes que protegeixen els espermatozoides, participen a la fertilització i faciliten el transport de l'esperma, mentre que la secreció prostàtica neutralitza l'orina i prevé l'aglutinació espermàtica i l'acidesa del tracte reproductor de la truja [79-82]. Tals secrecions també aporten hidrats de carboni simples (i.e. glucosa, fructosa i sorbitol), essencials pel metabolisme de l'espermatozoide porcí [83].

La fracció **postespermàtica** reuneix la secreció residual de les vesícules seminals i els últims grumolls de tapioca que segellen el tracte genital de la truja després de la munta.

2.3. Fisiologia reproductiva de la truja

 El sistema reproductor de les truges està format per set unitats coordinades: el cervell, l'hipotàlem, la glàndula pituitària, els ovaris, els oviductes (4-8 cm de llargada, anomenats també trompes de fal·lopi, dividits en la unió uterotubàrica -UTJ-, l'istme, l'ampolla i l'infundíbul amb les seves fimbries), l'úter (dividit en un cos i dues banyes) i el tracte genital (cèrvix i vagina) [61, 80] (Figura 10).

El cicle reproductiu d'una truja nul·lípara o múltipara dura uns 21 dies i es divideix en estre (dies 0-2, receptives als mascles), diestre (dies 3-15, fase luteínica) i proestre (dies 16-21, fase fol·licular) [62].

L'**estre**, també anomenat "heat period" (en anglès, període de calor), dura entre 36 i 72 h, depenent del número de parts que ha sofert la femella, i es caracteritza per canvis de comportament (e.g. mantenir el contacte amb un mascle, practicar el reflex d'immobilitat davant un mascle i en aplicar-li pressió dorsal, olorar els flancs d'altres individus) i per canvis fisiològics (e.g. vulva rogenca i turgent, canvis en els sons vocals). Aquests canvis són més pronunciats en presència d'un mascle [84]. L'estre és desencadenat pels estrògens que secreten als ovaris els fol·licles madurs, els quals produeixen la secreció de la LH. Aquesta hormona causa l'ovulació dels fol·licles dominants unes 40 h després de l'inici de l'estre i la involució dels altres. Un cop ha tingut lloc l'ovulació, amb una mitjana de 17 oòcits expulsats [85], cada oòcit és fèrtil durant unes 8 h abans de degenerar. Es creu que la poliovulació s'esdevé en el porc com a possible resposta a la intensa selecció artificial que pateix aquesta espècie [86].

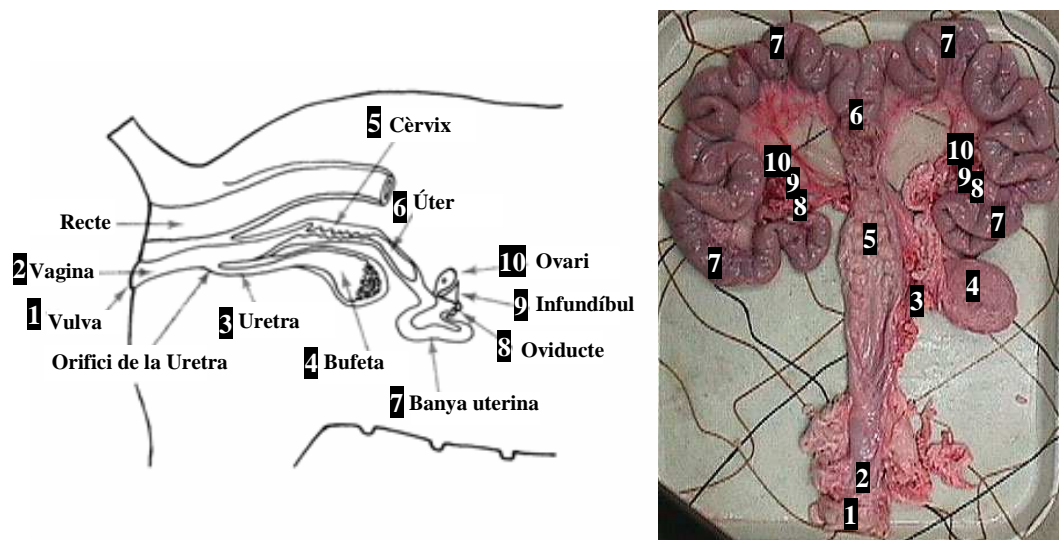


Figura 10 Anatomia reproductiva de la truja (a l'esquerra, dibuix extret de Thomson LH., 2008 [32]; a la dreta, imatge modificada de the University of Wisconsin [87]).

El **diestre** es caracteritza per la degeneració a cossos luti, productor de progesterona, dels fol·licles que no han estat fertilitzats. La funció de la progesterona és la de mantenir l'embaràs en cas de fertilització i impedir una nova ovulació. Si no hi ha embaràs, al voltant del dia 16 del cicle reproductiu el cortisol secretat pel còrtex suprarenal estimula l'alliberament a l'úter de l'àcid gras prostaglandina (PGF) per tal que els cossos luti degenerin i cessi la producció de progesterona [33, 85].

L'**embaràs** interromp el cicle reproductiu però els cossos luti romanen funcionals i continuen secretant progesterona. Les truges tenen cicles gestacionals de 3 mesos, 3



setmanes i 3 dies (114 ± 2 dies), que precedeixen a períodes de lactància de 3-4 setmanes. Al final de la gestació, la producció de PGF a l'úter i la d'estrògens a la placenta promouen el part, el qual normalment dura entre 2 i 3 h, mentre l'oxitocina des de la glàndula pituïtària estimula les contraccions uterines i la baixada de llet a les glàndules mamàries. L'aturada de l'estímul de succió quan els garrins són deslletats fa que es recuperi la fisiologia normal de l'úter i que l'estre torni a aparèixer al cap de 3 o 7 dies (interval deslletament-estre, WEI) [33, 85].

El **proestre** comença a partir de la secreció de PGF des de l'úter. La PGF desencadena l'alliberament de l'hormona FSH de la glàndula pituïtària per tal d'activar un nou grup de fol·licles i iniciar l'oogènesi (Figura 11). A cada ovari maduren de 6 a 10 fol·licles alhora i els nivells d'estrògens es van incrementant per iniciar l'estre. Els primers símptomes de la libido poden sorgir en aquest període [33, 85].

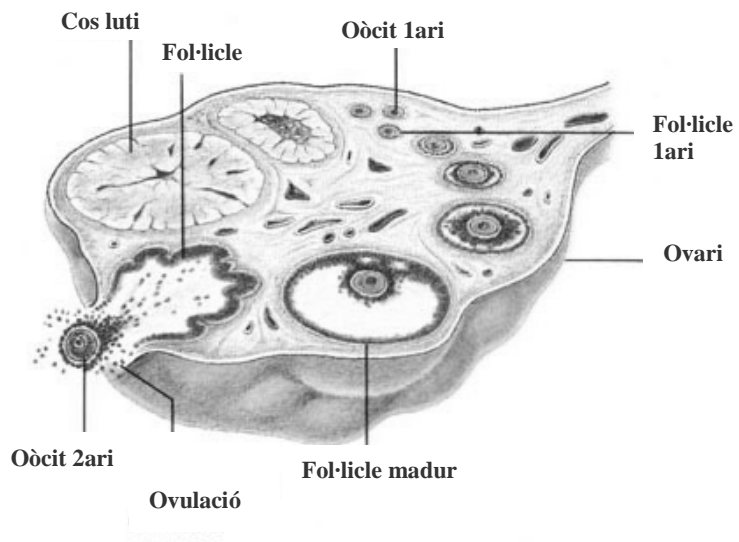


Figura 11 Oogènesi
(extret de *Biology 102* [88]).

2.4. Inseminació artificial (IA) en porcí: rerefons històric i estat de les tècniques actuals

Una ejaculació porcina conté normalment entre 10000 i 100000 milions d'espermatozoides [89]. En les explotacions comercials porcines la munta natural és inviable econòmica i temporalment perquè un mascle pot copular com a màxim amb dues femelles en un període de 24 h. La inseminació artificial (IA) permet una major difusió de la genètica del mascle i fa més aprofitable cada ejaculació ja que aquestes són envasades en 10 o 40 dosis

80-90 ml (3×10^9 spz/dosi [89]), la qual cosa permet inseminar de 5 a 20 femelles amb una sola ejaculació [90].

Segons dades de l'any 2007, la IA en porcí representa més del 90% de les còpules realitzades en la majoria de països europeus, el 75% a Amèrica del Nord i a Brasil i més del 50% arreu del món [91]. El capellà i fisiòleg italià Lazzaro Spallanzani va ser el primer l'any 1779 d'assajar la IA utilitzant peixos, amfibis i, més endavant, gossos [92]. El desenvolupament més important del procediment zootècnic de la IA va començar el 1899 de mans del rus Ivanow [93] (Figura 12). L'adaptació de la IA en porcí no va ser fins entrada la segona meitat del segle XX, coincidint amb el creixement de la indústria càrnica [94, 95]. La seva pràctica va anar acompanyada de l'estudi de mètodes de recollida del semen [96] i el seu emmagatzematge [97-99], els quals es troben en constant millora [89, 100]. La IA porcina va ser introduïda a Espanya als anys 80 per Santiago Martín Rillo [101, 102].

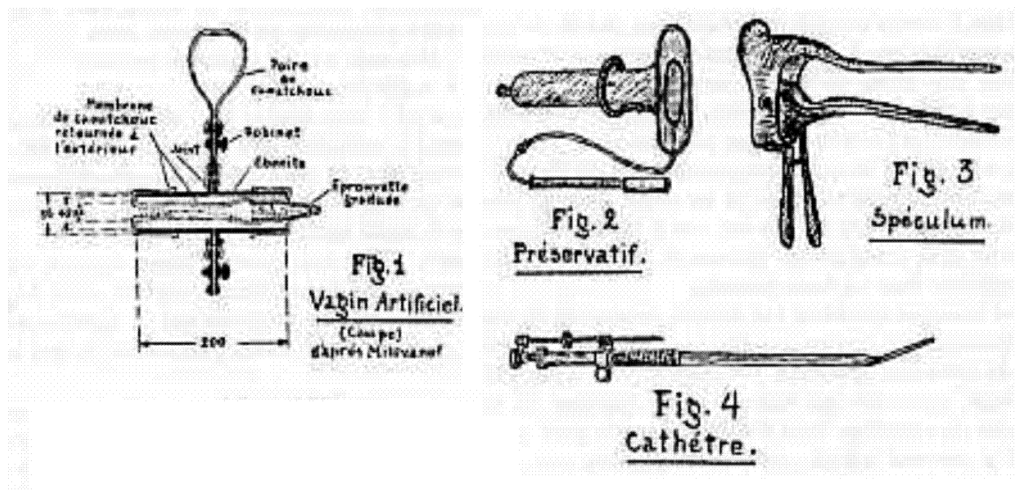


Figura 12 Instruments d'IA animal importats de Rússia pel Dr. Eng. Luis Thomasset el 1935 (extret de wikipedia.org [103]).

La metodologia d'IA porcina es basa en l'ús de **diluent**s després de l'extracció del semen, permetent una millor conservació dels espermatozoides. Encara que els espermatozoides resisteixen un ampli rang de pressions osmòtiques (de 240 a 380 mOsm), no són tant tolerants al canvis de pH. A més, si no hi ha nutrients, el procés de glicòlisi a l'espermatozoide produeix àcid làctic que fa disminuir el pH de l'ejaculació. De manera similar, els canvis de temperatura podrien afectar la motilitat i la viabilitat espermàtiques per la qual cosa l'ejaculació s'ha de preservar a 15-17°C, rebaixant així el metabolisme cel·lular i impedit el creixement de bacteries [104]. El semen pur és barrejat amb diluents que contenen components d'aport energètic (e.g. glucosa, fructosa), de protecció contra l'estrès tèrmic (e.g. albúmina sèrica bovina -BSA-) i l'oxidació, de control de l'acidesa (tampons de tipus zwitterió com el bicarbonat, el citrat sòdic, el TRIS, el MOPS o l'HEPES [98]) o de control d'electròlits



per mantenir unes condicions isotòniques (e.g. NaCl, KCl). També contenen EDTA per bloquejar l'activitat del calci, i antibiòtics per la inhibició de microorganismes [100].

Els primers diluents per semen porcí van aparèixer a la dècada dels 70, a partir de modificacions de tampons que ja havien estat utilitzats amb èxit en la IA bovina en la dècada dels 50 [98]. Aquests tampons mantenien la fertilitat durant no més de quatre dies, per la qual cosa es van anomenar “diluents de curta durada”. La solució de descongelació de Beltsville (BTS), primerament concebuda per semen criopreservat i congelat (FT) per Pursel i Johnson el 1975 [105] i després adaptada al semen refrigerat (FS) [99], és el diluent de curta durada més utilitzat en la IA porcina. No va ser fins als anys 80 quan Gottardi i col·laboradors van formular el primer diluent de llarga durada, anomenat Zorlesco, el qual mantenia la capacitat fertilitzant del semen durant set dies gràcies a la inclusió de BSA i cisteïna per l'estabilització de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide [106]. Més endavant va ser millorat amb l'aparició de nous diluents comercials com l'MR-A®, desenvolupat el 1984 per Martín Rillo i Eulogio Alias [100, 101] (Taula 1).

DILUENTS DE SEMEN PORCÍ

	Curta durada (1-3 dies)			Llarga durada (4-7 dies)					
	IVT	Kiev	BTS	Zorlesco	Modena	MR-A®	ZORPVA	Reading	Androhep®
	1959	1965	1975	1980	1981	1984	1985	1989	1990
Glucosa	3	60	37	11.5	25	√	11.5	11.5	26
Citrat sòdic	24.3	3.7	6.0	11.7	6.90	√	11.65	11.65	8.0
EDTA		3.7	1.25	2.3	2.25	√	2.35	2.35	2.4
Bicarbonat sòdic	2.4	1.2	1.25	1.25	1.00	√	1.75	1.75	1.2
Clorur potàssic	0.4		0.75						
Acetilcisteïna	0.05								
HEPES									9.0
BSA				5.0	3.00	√			2.5
TRIS				6.5	5.65		5.5	5.5	
Àcid cítric				4.1	2.00		4.1	4.1	
Cisteïna				0.1	0.05	√	0.7	0.7	
Trehalosa								1	
PVA							1	1	
Acetat potàssic						√			
MOPS						√			
mOsm	290	380	330	240	282	290	275	300	309
pH		7.2	7.2		6.9	6.9			6.8

Taula 1 Composició (g/l) dels diluents d'IA porcina més comuns (modificat de Gadea J., 2003 [100]).

Els diluents de semen són afegits a la fracció espermàtica rica de l'ejaculació porcina. L'ejaculació no ha de ser diluïda més de 10 vegades per evitar reduir la motilitat i la viabilitat [107], i tampoc s'han de fer més de dues extraccions de semen per setmana. Aquests requisits van ser establerts el 1984 per Martin Rillo [101, 102], el qual també va suggerir la inseminació de les femelles dues vegades per estro per assegurar el cobriment del període ovulatori. La pràctica moderna de la IA no manifesta cap rellevància en l'ús de semen preescalfat, podent-se inseminar amb dosis a la temperatura de refrigeració (15-17°C). La truja en estro pot absorbir la dosi gràcies al peristaltisme de les parets uterines (autoinseminació) [111]. A vegades, les dosis contenen una barreja de semen de dos o més mascles porcins sense observar-se interferències negatives sobre la qualitat seminal (inseminació heterospèrmica o agrupada), o bé contenen additius per compensar l'efecte de la dilució sobre el plasma seminal. Sigui com sigui, el semen destinat a IA ha de posseir uns valors mínims en **paràmetres de qualitat** abans que les dosis siguin envasades. Fins i tot després d'aprovar la qualitat de les dosis és recomanable que la motilitat dels espermatozoides sigui contrastada una segona vegada a granja. Els paràmetres de qualitat seminal més importants en porcí es mostren a la **Taula 2**.

Paràmetres de qualitat seminal en porcí	Valor òptim a l'ejaculació
Consistència	De lletosa a cremosa
Color	De gris-blanquinós a blanc
Volum	50-500 ml
Concentració espermàtica	10-100 x 10⁹ spz/ejaculació (mitjana 0.25 x 10⁹ spz/ml)
Motilitat total	> 70% (> 62% progressius)
Morfologia anormal (incloent gotes citoplasmàtiques)	< 20-30%
Gotes citoplasmàtiques (proximals i distals)	< 15%

Taula 2 Principals paràmetres analitzats en semen refrigerat pur, sense diluir, destinat a IA (González-Urdiales i col., 2006 [78], Althouse GC., 1997 [108], Flowers WL., 1998 [109] i Crabo BG., 1997 [110]).

Els mascles porcins són entrenats per muntar maniquís durant l'extracció. En l'entrenament dels mascles joves, el maniquí és impregnat de semen o bé de saliva/orina d'una truja, malgrat que en els primers mesos d'entrenament es pot requerir una truja en estro per encoratjar el mascle [112]. El mètode més freqüent d'extracció és el **mètode de la mà enguantada** (Figura 13).

Per dur a terme el mètode de la mà enguantada, s'introdueixen 50 ml de diluent a 35-38°C dins una gerra tèrmica. La bossa de recollida inclou un filtre per descartar les fraccions



pre- i postespermàtiques. Davant el maniquí, el mascle entrenat mostrarà un comportament sexual abans de muntar-lo. Abans de treure el penis de la seva beina, tot simulant la penetració, la zona que el circumda s'ha de netejar per evitar contaminació provinent de l'orina. Una pressió suau al prepuci el buidarà d'orina abans de l'ejaculació. El penis és bastant llarg i la punta és espiraliforme. El mascle porcí pot trigar de 7 a 15 min per ejacular de 50 a 500 ml de semen, tot i que només es recollirà la fracció rica, diluint-la en BTS a una proporció aproximada de 2:1; v:v. També es guarda una mostra de 2 ml de semen pur, sense diluir, per mesurar la concentració de la fracció rica i calcular el número de dosis de 80-90 ml i 3×10^9 spz que es podran envasar i enviar a les granges. Un cop recollit, el semen s'ha d'emmagatzemar i transportar a 17°C (cortesia de *Semen Cardona SL*).



Figura 13 A l'esquerra, un mascle Piétrain muntant un maniquí. A la dreta, extracció de la fracció rica mitjançant el mètode de la mà enguantada (cortesia de *Selecció Batallé®*, Novembre 2006).

Les truges inicien espontàniament el proestre en deslletar els garrins, però també es pot induir amb gonadotropines externes si es vol sincronitzar un llarg nombre de truges (gonadotropina coriònica equina -eCG- o gonadotropina sèrica d'euga gestant -PMSG- per promoure el desenvolupament fol·licular i gonadotropina coriònica humana -hCG- o GnRH per induir l'ovulació). El **moment d'ovulació** es calcula després de la detecció de l'estre, de manera que la IA es pugui practicar abans de la degeneració dels oòcits i dintre el període de viabilitat dels semen diluït. Les truges s'inspeccionen una o dues vegades/dia després del deslletament i s'inseminen 24 h després de la detecció de l'estre, unes hores abans del moment d'ovulació [113]. Com a assegurança, les truges es poden inseminar per segona vegada al voltant del moment d'ovulació, és a dir, 18-24 h més tard malgrat que, si la inspecció es practica un sol cop al dia, és millor escurçar aquest període per evitar un retard en la inseminació respecte l'ovulació [112] (**Figura 14**). En espermatozoides separats per citometria, o en aquells que han estat criopreservats, es recomana realitzar la primera inseminació 4 h abans del moment d'ovulació degut a la seva baixa viabilitat [114, 115].

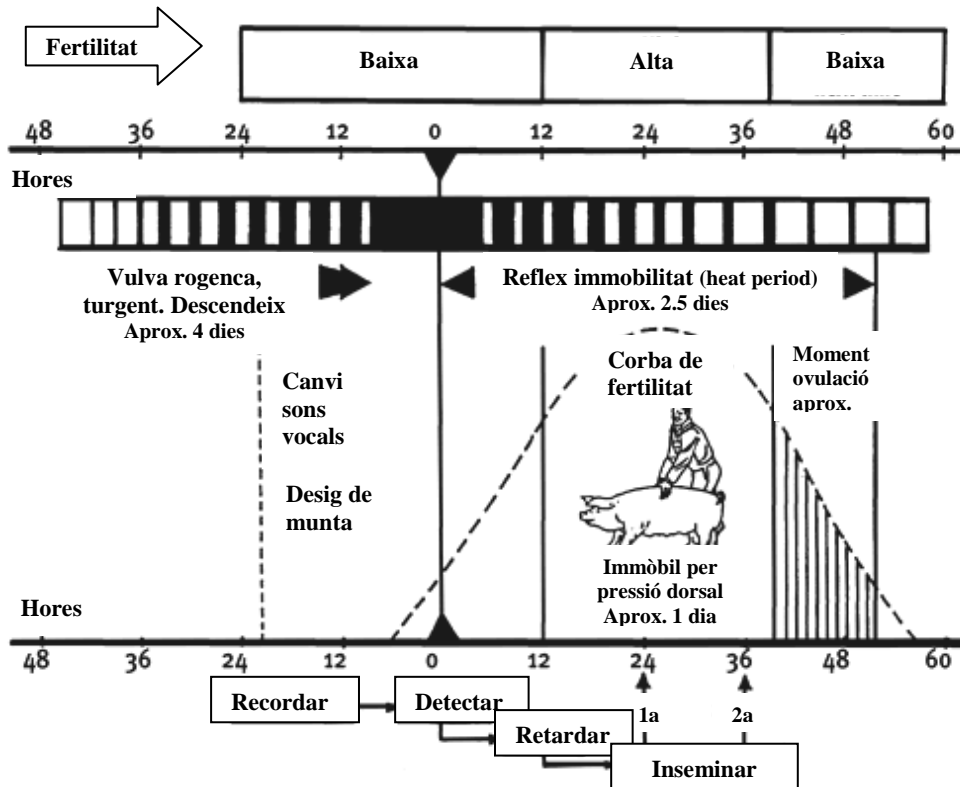


Figura 14 Temporització de la IA mitjançant la detecció de l'estre en truges (extret de *Queensland*

Primary Industries and Fisheries, 2009 [112]).

Des de les banyes uterines, els espermatozoides arriben als oviductes en els primers 30 min després d'una IA convencional [33], i en 1 o 2 h ja hi ha una població espermàtica suficientment important per fertilitzar [116]. S'han descrit dos **reservoris seminals** a cada oviducte, la UTJ i l'istme, on els espermatozoides s'uneixen a les cèl·lules epitelials oviductals i mantenen la seva capacitat fertilitzant a l'espera de l'ovulació. Aquells espermatozoides incapaços d'unir-se a aquestes cèl·lules perden la seva integritat de membrana abans de l'ovulació i deixen de ser viables [116, 117]. Hi ha molts factors que determinen si un espermatozoide s'unirà o no a les cèl·lules epitelials oviductals [117, 118] (Figura 15).

Grans quantitats d'espermatozoides es perden de camí cap als oviductes degut al reflux vaginal de semen [119, 120] o a la fagocitosi uterina [121]. S'ha suggerit que els espermatozoides haurien d'entrar als reservoris seminals dels oviductes abans que certs components de senyalització, presents al plasma seminal, arribessin a l'úter i provoquessin un reclutament massiu de neutròfils polimorfonucleats (PMNs) a l'endometri, els quals eliminen patògens i espermatozoides sobrats [122]. Sembla ser que els espermatozoides amb capacitat per unir-se a les cèl·lules epitelials oviductals presenten determinats factors del plasma seminal adherits a la seva superfície, no només per prevenir la pròpia capacitat abans d'arribar als reservoris seminals sinó també per fer-los tolerants davant el tracte genital de la femella tot



interferint-ne la immunitat [122]. La interacció d'aquests espermatozoides amb cèl·lules epitelials oviductals els manté viables i no capacitats de 24 a 42 h [123, 124].

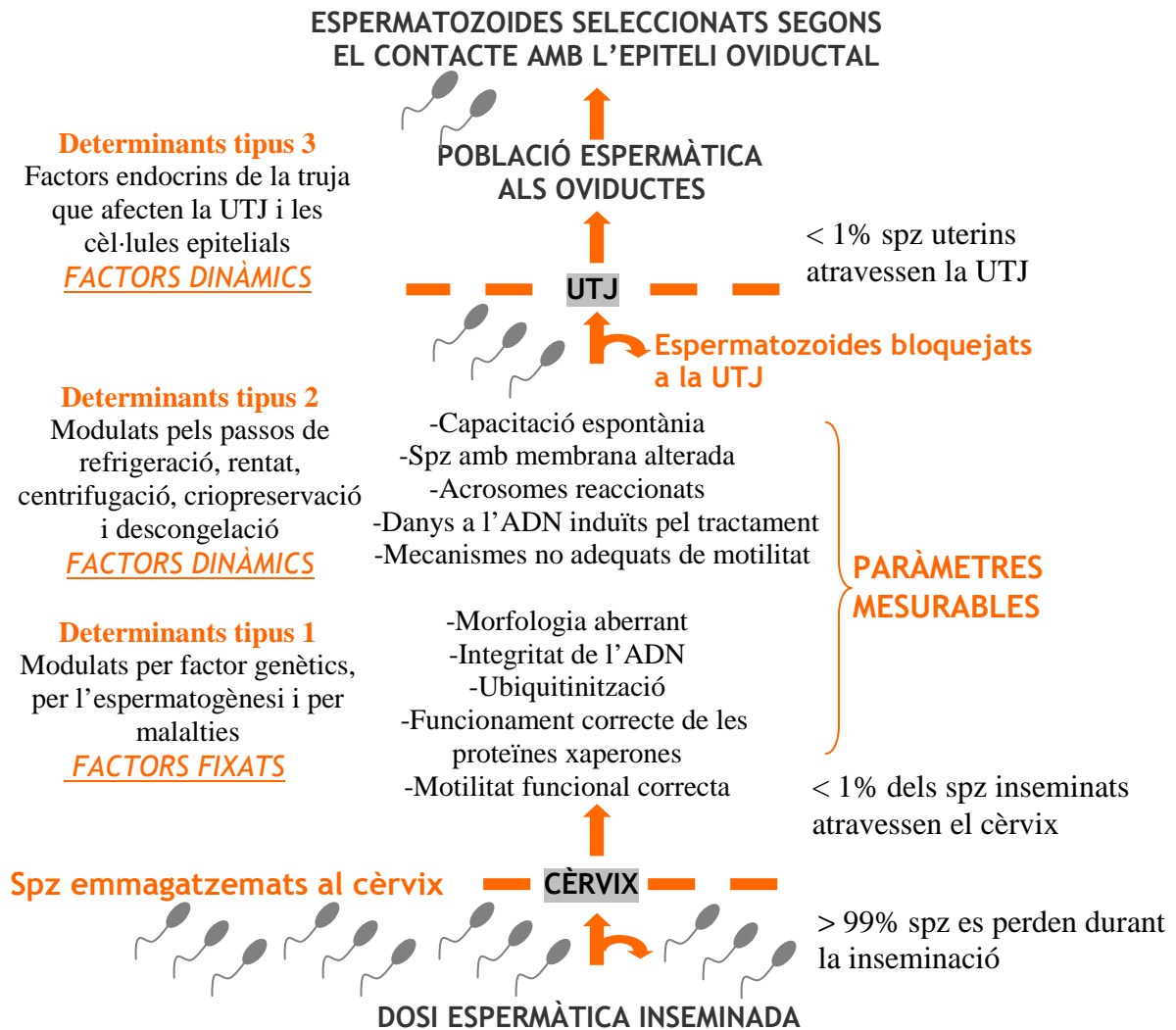


Figura 15 Factors que intervenen, en mamífers, sobre la selecció d'espermatozoides en el sistema reproductiu de la femella (modificat de Holt WV., 2009 [118]).

La **fertilització** s'esdevé a l'ampolla de cada trompa de fal·lopi. Només els espermatozoides que s'han capacitat, després de deixar els reservoris seminals, tenen l'habilitat de reconèixer l'oòcit i penetrar-ne la zona pel·lúcida [115]. La capacitació espermàtica és activada per la pèrdua del plasma seminal i per les condicions del medi a l'ampolla tubàrica després de l'ovulació. Consisteix en una sèrie de fenòmens de senyalització que promouen la redistribució de lípids i proteïnes a la membrana plasmàtica de l'espermatozoide, i l'increment del seu metabolisme aeròbic (fosforil·lació oxidativa) per obtenir més recursos energètics [125]. Aquests esdeveniments faciliten, més endavant, la reacció de l'acrosoma i, amb ella,

l'alliberament d'enzims hidrolítics que digereixen la zona pel·lúcida i permeten que l'espermatozoide penetri l'òocit, ajudat per la hiperactivació de la motilitat [126, 127]. La capacitació és un procés reversible; no és així la reacció acrosomal [125].

Si hi ha **embaràs**, aproximadament 12 oòcits ovulats en la truja (d'una mitjana de 17) s'adhereixen a la paret uterina en forma de blastòcits (dies 11 a 16 després de la fertilització). La fallada de la implantació és una de les raons que explica la reducció en el número de garrins. Abans de la implantació, els blastòcits poden migrar d'una banya uterina a l'altra [85].

Un mínim de 4 o 5 embrions han d'estar implantats al dia 40 per continuar amb l'embaràs (inici del període fetal), i la mort embrionària dins el període fetal resulta en l'expulsió o la retenció del fetus. L'esquelet dels garrins retinguts comença un procés de calcificació anomenat momificació (Figura 16). Cada embrió implantat amb èxit és envoltat per membranes plenes de fluid que formen la placenta [85] (Figura 17).

L'embaràs de les truges és diagnosticat pel no retorn a l'estre a partir del dia 18 després de la IA (taxa de no retorn) i la seva verificació es realitza per ultrasons (a partir del dia 22) o per palpació rectal (a partir del dia 30). El part pot ser induït externament amb PGF i tenir lloc 18-36 h després. Durant el part els garrins surten, a intervals, en presentació cranial (encarats a la vagina) o caudal (d'esquenes a la vagina) (Figura 18). L'administració d'oxitocina externa o el suport manual també ajuden durant el part [33].

CONSEQUÈNCIES DE LA MORT EMBRIONÀRIA I FETAL EN PORCÍ

Edat i posició dels embrions	Fallada	Resultat
Dia 0 - Ovulació	No Ovulació	Anestre
Dia 0 - Fertilització	No Fertilització	Retorn normal estre a dia 21
Dia 2 - Descens de l'òvul fertilitzat	Mortalitat embrionària total abans del dia 10	Retorn normal estre a dia 21
Dia 3 - Embrió de 0.2 - 0.5mm	Sols 5 embrions presents a dia 10	Retorn retardat estre a dia 24-38
Dies 4 a 12 - Migració dels embrions entre banyes	Hi ha implantació però tots els embrions moren abans del dia 35 i són absorbits	Pseudoembaràs. Retorn estre a dies 40-70
Dies 12 a 14 - Implantació (embaràs) 5mm -10mm	1-2 embrions sobreviuen després del dia 35	Part retardat. Només 1-2 garrins
	Tots els embrions moren després del dia 35 i són momificats. Un fetus mor després del dia 35	Truja gestant però no pareix. Momificació



Figura 16 Mort embrionària i fetal en porcí (extret de *The Pig Site.com* [84]).

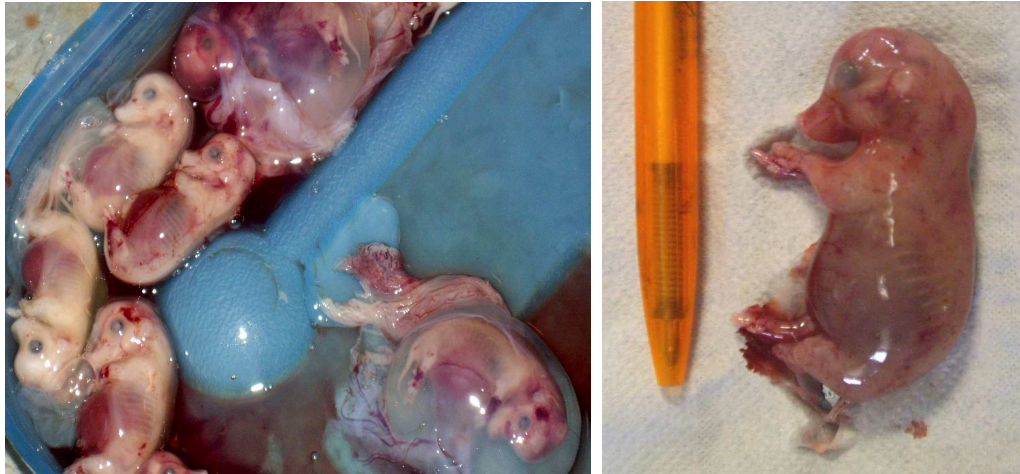


Figura 17 Fetus porcins abortats d'uns 40 dies de vida. A la imatge de l'esquerra es poden observar dos fetus envoltats per la placenta (cortesia de *Magapor® SL*, Juliol 2008).

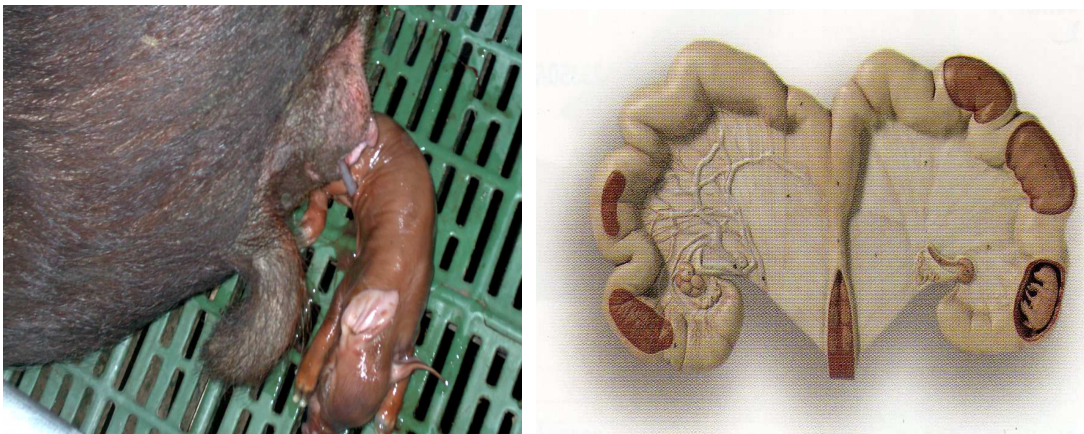


Figura 18 A l'esquerra, un garrí en presentació cranial durant el part (cortesia de *Selecció Batallé®*, Febrer 2007). A la dreta, un model mostrant diferents fetus a les banyes uterines d'una truja (cortesia de *Minitube®*, Alemanya).

Els resultats de **fertilitat** després d'una IA són sovint presentats com a taxa de no retorn (femelles inseminades que no retornen a l'estre), taxa d'embarassos (femelles gestants del total inseminades), taxa de parts (femelles en part del total d'inseminades) i prolificitat (número de garrins nascuts morts o vius en una garrinada/ventrada). També hi ha altres paràmetres per avaluar el rendiment reproductiu, tal com es mostra a la **Taula 3**.

Índexs Reproductius	Esperat	Nivell d'interferència
Interval deslletament-estre	< 7 dies	> 10 dies
Retorns a l'estre als 21 dies	< 10%	> 15%
Retorns anormals a l'estre (25-37 dies)	< 3%	> 5%
Abortaments	< 2%	> 2%
Taxa de parts	> 85%	< 80%
Nascuts vius/garrinada	10-12	< 10
Mort fetal	< 5%	> 10%
Momificacions	< 1%	> 2%
Deslletaments/garrinada	9.5	9
Mortalitat predeslletament	< 10%	> 15%
Garrinades/truja inseminada/any	2.5	< 2
Garrins deslletats/truja inseminada/any	≥ 23	< 20
Taxa d'animals sacrificats	30-50%	> 50%

Taula 3 Índexs reproductius usats en les granges porcines (*The Merck Veterinary Manual, 2008* [33]).

Actualment es poden practicar tres **mètodes d'IA** porcina, depenent del lloc de deposició del semen: IA convencional o cervical (intra-CAI), IA intrauterina postcervical (post-CAI) i IA intrauterina profunda (DUI) [128] (Figures 19 i 20). Les sondes d'IA han de garantir una concentració mínima de 0.05×10^9 spz a la UTJ per mantenir les taxes de fertilització i el número de garrins per part [131]. La sonda s'ha d'insertar cap amunt per evitar pressionar la bufeta de la truja i la punta s'ha d'ancorar als plecs del cèrvix per prevenir el reflux tot estimulant, a través del contacte, el peristaltisme de les parets cervicals durant la penetració [132]. Les sondes d'IA han d'adaptar-se a les característiques anatòmiques del penis del mascle porcí i del tracte reproductor de la truja. La vagina de la truja té uns 25-30 cm de llargada depenent del nombre de parts [133] i el cèrvix és més llarg que el d'altres espècies (15-25 cm) i ple de plecs espiraliformes. El cos uterí és curt (5-15 cm) però prolongat en dues llargues banyes (50-120 cm) que acaben en els oviductes (4-8 cm) i els ovaris (1-2 cm) [77, 84, 128, 134]. Aquesta estructura permet tan l'emmagatzematge de grans volums de semen com embarassos de 9 o 14 garrins essent, a la vegada, una selectiva barrera pels espermatozoides, particularment davant mostres de semen de baixa concentració o baixa viabilitat (e.g. mostres separades per citometria i/o criopreservades).

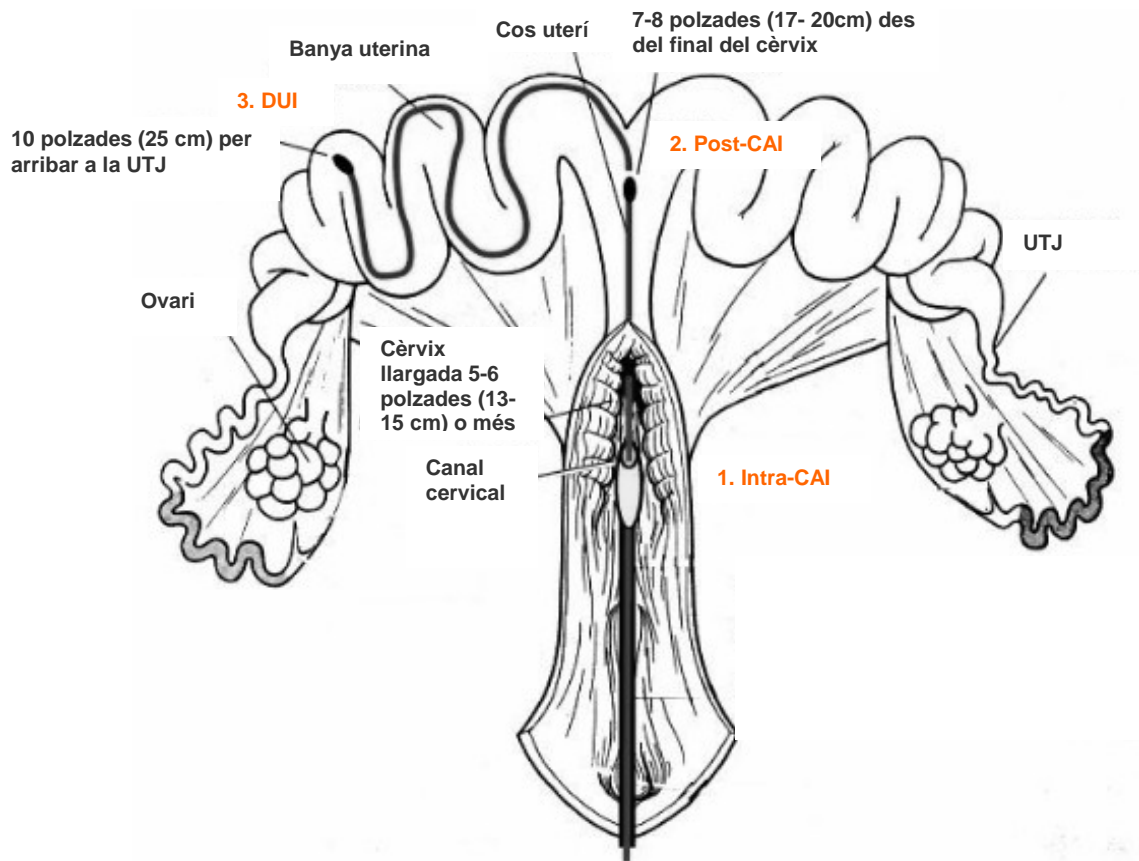


Figura 19 Dibuix esquemàtic de les tres principals tècniques d'IA porcina
(extret de *Department of Animal Science, NCSU, 2002 [129]*).

En la **intra-CAI** s'inserta una cànula que diposita el semen al final del cervix o a l'entrada de l'úter, depenent de l'amplada del canal cervical, com succeeix en la munta natural.

- ☛ Any d'introducció en porcí: Dècada dels 50 [94, 95], adaptat de boví.
- ☛ Concentració de les dosis de semen refrigerat : 3×10^9 spz (límit inferior de 1.5×10^9 spz).
- ☛ Volum de les dosis de semen refrigerat: 80-90 ml.
- ☛ Característiques de la sonda d'IA: cànula de plàstic rígid, d'uns 50 cm, amb punta terminal de plàstic espiraliforme o punta d'espuma adaptable als plecs cervicals. Diàmetre extern/intern aproximat: 7/4 mm.
- ☛ Millors resultats obtinguts amb semen refrigerat: 80-90% en taxes de fertilitat, embaràs i part; 10-14 garrins/part.
- ☛ Referències: [62, 89, 90, 94, 95, 101, 102, 120, 121, 128, 130, 134].

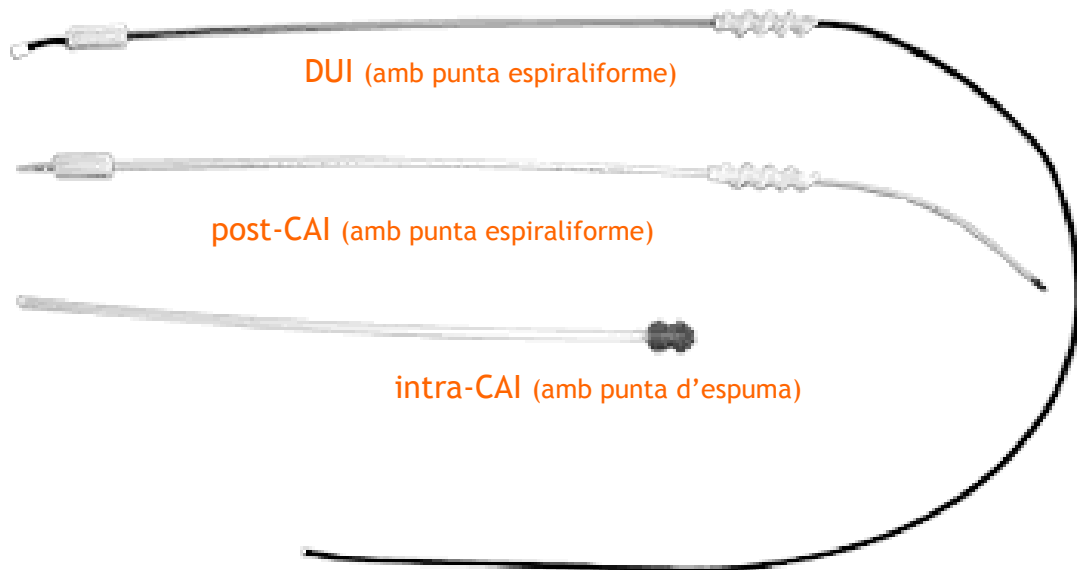


Figura 20 A l'esquerra, inseminació cervical convencional amb una dosi refrigerada de semen (cortesia de *Selecció Batallé*®, Febrer 2007). A la dreta, inseminació intrauterina amb una dosi refrigerada de semen (cortesia de *Magapor*® SL, Juny 2008). L'última fotografia mostra les sondes utilitzades en les tres tècniques d'IA porcina (fotografia modificada de *Gil J.*, 2007 [130]).

En la **post-CAI**, el semen s'introdueix directament al cos uterí, de manera que el camí fins l'oòcit és escurçat, dipositant els espermatozoides a major fondària que en la IA convencional. Aquest factor dóna certs avantatges: menor reflux de semen, menys espermatozoides per dosi i menor volum de les dosis [134]. Són característiques interessants per optimitzar les dosis, particularment en treballar amb esperma separada per citometria o criopreservada. Aquesta última aplicació s'exposa a l'**ARTICLE I**.



Revisió Bibliogràfica

- ☛ Any d'introducció en porcí: 2000 [135].
- ☛ Concentració de les dosis de semen refrigerat: $1-1.5 \times 10^9$ spz (límit inferior de 0.5×10^9 spz).
- ☛ Volum de les dosis de semen refrigerat: 30-50 ml (límit inferior de 15 ml).
- ☛ Característiques de la sonda d'IA: sonda flexible de ~70 cm introduïda dins una cànula d'intra-CAI.
- ☛ Millors resultats obtinguts amb semen refrigerat: 80-90% en taxes de fertilitat, embaràs i part; 10-14 garrins/part.
- ☛ Referències: [128, 130, 134-139, 140, 142, 143].

En la **DUI** el semen és dipositat al segment proximal d'una banya uterina (2/3 de fondària), a uns 25 cm de la UTJ. Aquesta tècnica comparteix els avantatges de la post-CAI, afegint-hi una menor pèrdua d'espermatozoides, per la qual cosa es requereix encara menys volum i concentració de semen [144]. Aquestes característiques el fan, avui dia, el mètode d'elecció per inseminar amb esperma criopreservada i/o separada per citometria. No obstant, concentracions més baixes de 0.6×10^9 spz per dosi comprometen el nombre de garrins per part, degut a la incidència de fertilitzacions unilaterals o parcialment bilaterals, és a dir, amb fetus localitzats només en una banya uterina o amb desequilibri del nombre de fetus en una banya respecte l'altra.

- ☛ Any d'introducció en porcí: 2000 [145, 146].
- ☛ Concentració de les dosis de semen refrigerat: 0.6×10^9 spz (límit inferior de 0.15×10^9 spz)
- ☛ Volum de les dosis de semen refrigerat : 20 ml (límit inferior de 7.5 ml).
- ☛ Característiques de la sonda d'IA: sonda flexible d'uns 180 cm introduïda dins una cànula d'intra-CAI.
- ☛ Millors resultats obtinguts amb semen refrigerat: 80-90% en taxes de fertilitat, embaràs i part; 9-12 garrins/part.
- ☛ Referències: [128, 130, 134, 144-152].



3. CRIOPRESERVACIÓ D'ESPERMA PORCINA

3.1. Física de la congelació en cèl·lules vives

Deixant de banda les tecnologies emergents, les cèl·lules vives es poden preservar actualment fins a 15 dies en refrigeració (emmagatzematge en líquid) o per més temps, congelant l'aigua del seu interior [128]. Hi ha dues maneres per congelar cèl·lules: per **criopreservació** (congelació en equilibri amb el gel) o per **vitrificació** (congelació lliure de gel). Aquesta secció és un apropament a la congelació en equilibri amb el gel per tractar-se de la metodologia emprada en la present tesi.

En la congelació en equilibri amb el gel, el punt de congelació o nucleació de les solucions és la temperatura a la qual apareixen els primers cristalls de gel. El terme "nucleació" es refereix al creixement espontani d'un cristall de gel a partir d'una partícula "llavor" o d'una superfície freda, un punt fred que permet la configuració de l'estructura del gel al seu voltant (fenomen de *seeding*, que traduït literalment seria "granar"). Dos successos poden tenir lloc durant la criopreservació segons la naturalesa de la solució i les característiques de la congelació: congelació típica o súperrefredament (*undercooling*).

Al principi de la **congelació típica** (Figura 21, línia blava) la temperatura d'una solució decreix ràpidament però, després de la nucleació, s'estableix un equilibri temporal entre el refredament i l'escalfament (calor latent de fusió del gel), pel fet que la formació de gel és un procés exotèrmic. Aquest pla d'equilibri es troba una mica inclinat en el cas de solucions, en les quals s'hi troben partícules entre les molècules d'aigua ja que, quants més cristalls de gel es



formen, més concentrada es torna la solució i més difícil és la unió de molècules d'aigua per formar gel (el punt de congelació decreix progressivament). Contràriament, el pla d'equilibri és horitzontal en el cas de l'aigua pura, en la qual no hi ha partícules i, per tant, hi és més senzill fer créixer un cristall de gel un cop iniciada la nucleació. Quan tota l'aigua de la solució s'ha solidificat i la calor latent de fusió del gel s'ha dissipat, l'equilibri es trenca i la temperatura decreix de nou.

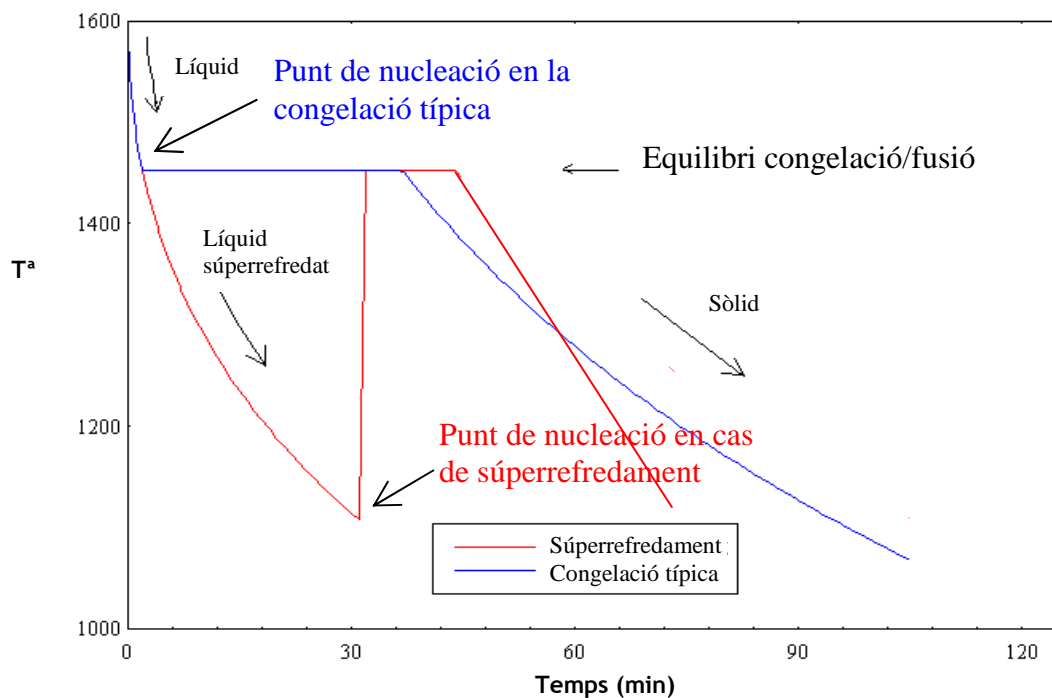


Figura 21 Gràfic representant la solidificació de solucions per súperrefredament i per congelació típica (modificat de *National Aeronautics and Space Administration (NASA)* [154]).

En el **súperrefredament** (Figura 21, línia vermella), les solucions es refreden molt per sota del seu punt de congelació, sense que la nucleació hi tingui lloc, en un fet provocat per diversos factors (e.g. taxa de refredament, molècules de solut, volum de líquid) [153]. El súperrefredament es dona quan no hi ha una superfície freda que imposi l'ordre cristal·lí del gel als àtoms de l'aigua. Sense aquest punt, no hi ha nucleació i la solució es súperrefreda fins solidificar a una determinada temperatura (temperatura de transició a l'estat vítri) sota la forma d'estructura vítria amorfa (vitrificació). Com que és una estructura metastable, la nucleació té possibilitats creixents de produir-se espontàniament a mesura que la solució és refredada. Quan, finalment, es dona la nucleació l'estructura cristal·lina del gel es propaga com una ona des del punt de nucleació [154]. Malgrat que la nucleació en les solucions súperrefredades s'esdevé a temperatures més baixes que en la congelació típica, l'equilibri establert durant la

formació del gel també es localitza al punt de congelació de la solució. La diferència de temperatura entre la solució súperrefredada i el seu punt de congelació, fa que la taxa d'escalfament fins al punt de congelació sigui més ràpida que si la solució no es trobés súperrefredada, com també el retorn a la temperatura de transició a estat vitri un cop dissipada la calor latent de fusió del gel.

Aquestes taxes tant elevades d'escalfament/refredament no són desitjables en les cèl·lules vives, tal com s'explicarà més endavant. En aquests casos, es pot induir la nucleació al començament de la criopreservació, per evitar els canvis bruscs de temperatura [153]. Alguns animals que sobreviuen a la congelació inclouen proteïnes a la sang que actuen com a punts de nucleació [155]. El súperrefredament pot també minimitzar-se congelant les cèl·lules a l'interior de contenidors amb elevada taxa superfície/volum, com són les palletes de 0.5 ml en les quals s'envasen els espermatozoides criopreservats. Les parets del contenidor actuen com a punts de nucleació, permetent així l'expansió uniforme de l'ona de glaç i la dissipació progressiva de la calor latent de fusió del gel [156].

Evitar el súperrefredament és un punt al qual s'hi ha de prestar atenció per assegurar una congelació exitosa en el cas de la criopreservació, però la supervivència de les cèl·lules en congelació va lligada també a molts altres paràmetres que no sempre es poden controlar. La congelació en equilibri amb el gel es caracteritza per la coexistència de dues fases o fraccions en la solució: una fracció no congelada i una fracció amb cristalls de gel. Les cèl·lules són excloses dels cristalls de gel i migren cap a la fracció no congelada de la solució, on són exposades a nombrosos factors d'estress: reducció de la temperatura, increment de la concentració iònica i de soluts, deshidratació, formació de bombolles de gas, viscositat, canvis de pH, etc. Aquests fenòmens determinen una resposta cel·lular basada en canvis de fase dels lípids de membrana, despolimerització del citoesquelet, trencament osmòtic, solubilització de les proteïnes de membrana, processos incontrolats de difusió, alteracions mecàniques a les membranes i al citoesquelet, desnaturalització de proteïnes, etc. [153, 157].

La **resposta osmòtica** de les cèl·lules es considera el primer determinant de la resistència cel·lular davant la formació de gel a la solució [153]. La pressió osmòtica ve donada per la temperatura i el nombre de partícules de la solució, d'acord amb la fórmula:

$$P = R \times T \times \Sigma C,$$

on P és la pressió osmòtica; R, la constant dels gasos (8.314472 J/K mol); T, la temperatura i C, la concentració. A mesura que el medi extracel·lular es congela després de la nucleació, es torna més concentrat i l'aigua tendeix a sortir de la cèl·lula degut a l'increment de la pressió osmòtica, de manera que la cèl·lula es va deshidratant progressivament [158, 159]. La quantitat d'aigua que es perd depèn de dos tipus de factors, que afecten la permeància de l'aigua a



través de la membrana cel·lular: intrínsecs (i.e. osmolaritat de la solució intracel·lular, quocient superfície/volum cel·lulars, coeficient de permeabilitat de la membrana a l'aigua - L_p -, contingut aquós del citoplasma) i extrínsecs (i.e. osmolaritat de la solució extracel·lular i taxa de refredament). Els factors intrínsecs vénen donats per la tipologia cel·lular. Meryman proposa, l'any 1971, que les cèl·lules poden ser deshidratades fins un volum mínim, anomenat volum osmòticament inactiu, que és determinat pel citoesquelet [160]. Una cèl·lula no pot respondre a la pressió osmòtica més enllà d'aquest volum, fet que provoca la ruptura de la membrana plasmàtica. S'ha determinat que el 67% del volum cel·lular total (líquids i sòlids) i el 23% de l'aigua en l'espermatozoide porcí són osmòticament inactius, amb un L_p de 0.84-1.03 $\mu\text{m}/\text{min atm}$ que concorda amb l'alteració de l'espermatozoide per sota els 210 mOsm/Kg [161, 162]. Per impedir lesions importants a les cèl·lules, els factors extrínsecs es poden controlar i adaptar a la resposta osmòtica d'aquestes. Per una banda, l'osmolaritat de la solució extracel·lular es pot modificar a través de l'addició de crioprotectors d'efectes col·ligatius [158] (veure secció 3.2). Per altra banda, la taxa de refredament es pot emmotllar a les característiques de les cèl·lules, tenint en compte l'**Hipòtesi dels dos Factors** dels danys per congelació postulada el 1972 [163]. Aquesta hipòtesi exposa que sota taxes de refredament massa elevades, com succeeix en el súperrefredament, l'aigua de la cèl·lula no té temps per sortir i es forma gel intracel·lular que malmet els orgànuls, particularment en cèl·lules amb una taxa reduïda de superfície per volum (baixa permeabilitat). Sota taxes de refredament massa lentes, l'aigua surt de la cèl·lula i s'impedeix la formació de gel al seu interior, però, a la vegada, la cèl·lula és deshidratada fins al volum mínim i exposada, durant massa temps, als canvis de pH i a la toxicitat del crioprotector ("efectes de la solució"), fet que provoca un trencament de la membrana i l'alteració de les funcions cel·lulars. Per tant, la taxa de refredament òptima és aquella que s'adapta a la resposta osmòtica de la cèl·lula per tal de minimitzar la deshidratació i impedir el gel intracel·lular (Figura 22).

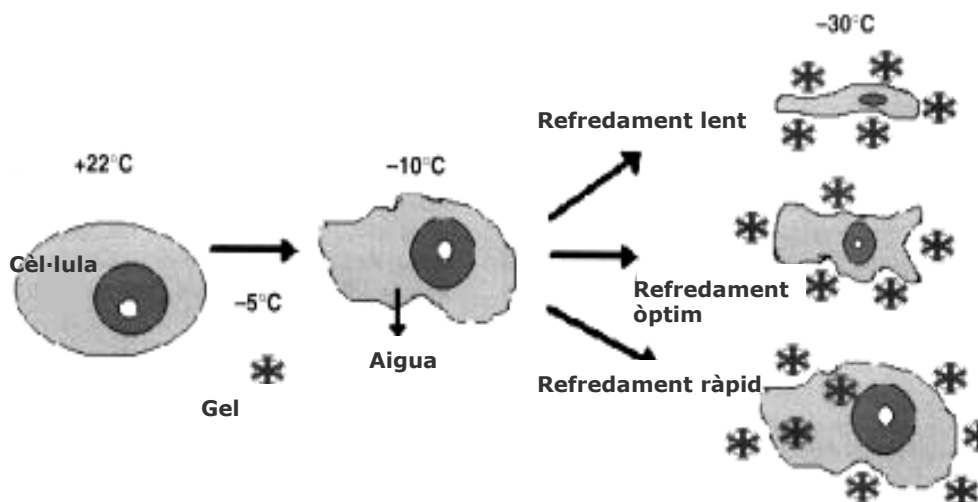


Figura 22 Possibles esdeveniments que tenen lloc a les cèl·lules durant la congelació

(extret de *National Academy of Sciences*, 2000 [159]).

Una **taxa de refredament òptima** ha d'encaixar amb les complexes propietats osmòtiques de la cèl·lula viva que és congelada, motiu pel qual no consisteix en una disminució lineal de la temperatura sinó en diferents taxes de refredament, formant una corba que segueix els canvis físics no lineals en la concentració extracel·lular de soluts i en la permeabilitat de la membrana al llarg de la congelació [164, 165]. Les corbes de refredament òptimes de diferents espècies i tipologies cel·lulars s'exposen a la (Figura 23). Els espermatozoides de toro, boc, porc i semental són més sensibles a la criopreservació que els de gos, gat, conill o humà [166]. La majoria de cèl·lules només poden difondre l'aigua a través de la bicapa lipídica, però els glòbuls vermells toleren, en particular, elevades taxes de refredament perquè poden expel·lir ràpidament l'aigua intracel·lular a través de proteïnes que funcionen com a canals d'aigua (aquaporines) [167].

En l'espermatozoide, les proteïnes transportadores de glucosa (GLUT) podrien actuar com a canals d'aigua [168] i, recentment, s'hi han trobat també aquaporines [168, 169], fet que podria explicar la major supervivència a elevades taxes de refredament en comparació a d'altres tipus cel·lulars. La velocitat del flux d'aigua a través de les membranes també depèn de la permeabilitat del crioprotector del medi de congelació [167].

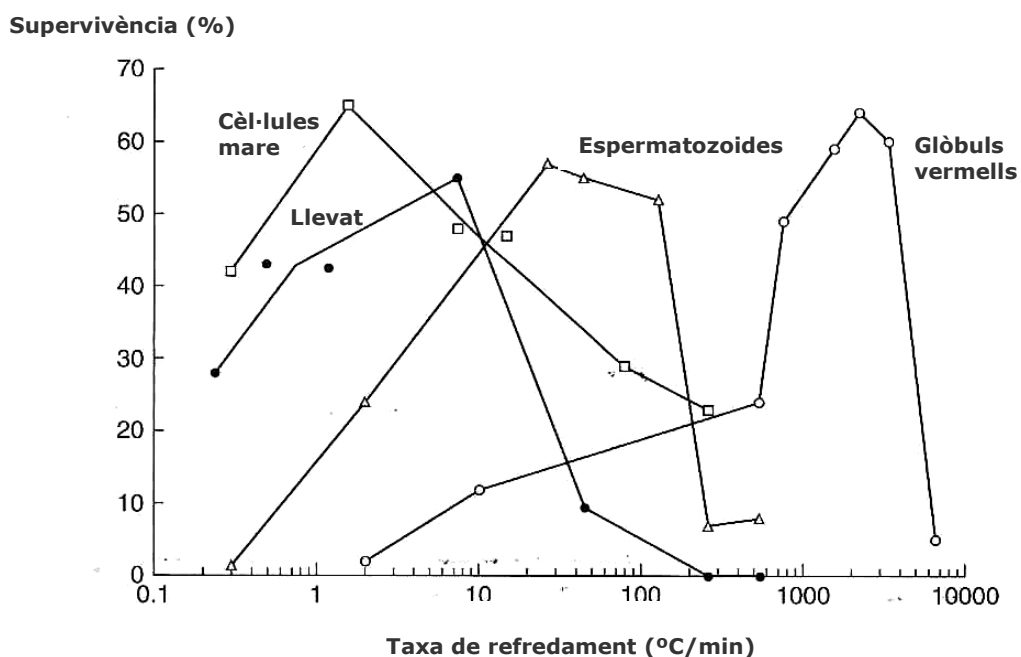


Figura 23 Supervivència de diferents tipus cel·lulars segons la taxa de refredament


(extret de *Physical parameters of cooling in cryonics, revisió 1990-2005* [167]).



No és menys important el fet d'aconseguir una **taxa de descongelació òptima** que una taxa de refredament òptima [158]. Durant la descongelació, les cèl·lules es rehidraten com a conseqüència del sobtat davallament de la concentració extracel·lular per fusió del gel. La supervivència d'una cèl·lula durant la descongelació depèn, bàsicament, de la tolerància de la mateixa a la toxicitat del crioprotector i de la resposta mecànica de la seva membrana al retorn a les condicions fisiològiques [170]. La toxicitat no és un problema comú perquè el crioprotector queda diluït en el medi de descongelació. Durant aquesta, s'apliquen taxes ràpides d'escalfament per prevenir la recristal·lització (conversió de petits cristalls de gel en cristalls més grans que malmetrien la cèl·lula) però, fins i tot així, no es garanteix la recuperació cel·lular si durant la criopreservació hi ha hagut danys irreversibles.

Finalment, hom es pot preguntar per què no preservar les cèl·lules vives a -80°C enlloc de criopreservar-les a -196°C . Aquesta preferència es deu a la major estabilitat de l'estructura del gel per sota els -100°C , fet que impedeix qualsevol recristal·lització [171]. És més, l'emmagatzematge de les mostres congelades en nitrogen líquid (-196°C) prevé contra reaccions tèrmiques, de manera que sols la lenta ionització provinent de radiacions podria esdevenir nociva al llarg dels segles [158, 172]. No obstant, la criopreservació no elimina els microorganismes d'elevada criotolerància i resistents als antibiòtics del medi crioprotector i, per això, certes publicacions recomanen realitzar controls bacteriològics de les mostres abans de congelar [173].

3.2. Criopreservació d'esperma porcina (I): fites rellevants, diluents de congelació i aplicacions del procés

pallanzani va ser, al segle XVIII, el primer en congelar espermatozoides i practicar la IA [174]. Aquest naturalista italià va realitzar observacions sobre la recuperació de les cèl·lules espermàtiques congelades en neu i va demostrar la funció dels espermatozoides en la fecundació. L'interès en espermatozoides congelats destinats a IA es va incrementar al 1932, particularment en boví, quan Milovanov i Selivanova [175] i Bernstein i Petropavlovsky [176] van descobrir la utilitat del rovell d'ou i del glicerol, respectivament, com a crioprotectors. A l'any 1938, Jahnel va implementar el nitrogen líquid per la criopreservació d'esperma [177, 178] i, dos anys més tard, el danès Sorensen va idear una palleta per envasar-hi els espermatozoides, amb una elevada superfície que permetia una nucleació uniforme per reduir el súperrefredament [179]. Polge i col·laboradors van ser els pioners de la ciència de la IA en porcí [95] i també van ser els primers, a l'any 1970, en aconseguir una ventrada de garrins després d'una IA laparoscòpica amb semen congelat [180], disset anys més tard que en humà [181]. Al 1971, diferents científics (Crabo i Einarsson [182], Graham i col., [183] i Pursel i Johnson [184]) van practicar la IA en porcí emprant les primeres sondes cervicals, i al 1975 es van desenvolupar dos mètodes de criopreservació espermàtica per porcí: el mètode americà o

mètode **Beltsville** (Pursel i Johnson [105]) i el mètode alemany o **mètode Hülsenberger** (Westendorf i col., [185]). Ambdós es basen en la utilització de diluents de congelació, que inclouen els següents crioprotectors (CPAs): rovell d'ou, glicerol i Orvus-ES[®] o Equex STM[®] Paste (detergents comercials sintètics, en forma de pasta de sabó concentrada, que serveixen per emulsionar els lípids del rovell d'ou; contenen sodi dodecil sulfat -SDS-). Els dos mètodes divergeixen en el tipus de sucre que porta el diluent de congelació i en la manera de criopreservar [186]. El mètode Beltsville es basa en l'addició de glucosa i congela els espermatozoides, sota la forma de pèl·lets rodons, dins de forats fets en neu carbònica. El mètode Hülsenberger utilitza lactosa i envasa els espermatozoides en palletes que es congelen amb vapors de nitrogen líquid. L'últim mètode és el més estès actualment.

Per aconseguir un millor control de les taxes de refredament, al 1989 es van començar a utilitzar **biocongeladors programables** [187]. Els protocols moderns de criopreservació en semen porcí inclouen un descens lent dels 17°C als 5°C dins el medi de congelació, durant el qual el rovell d'ou interacciona amb els espermatozoides. Aquest període, que dura unes 3 h, podria reduir-se segons indiquen alguns investigadors [188]. El segueix una corba dels 5°C als -150°C, després d'afegir glicerol i Orvus-ES[®]/Equex STM[®] Paste al medi de congelació, que es pot practicar utilitzant diferents taxes de refredament [189]. Normalment, es manté la mostra uns quants segons a -80°C, que és prop de la temperatura de transició del glicerol a l'estat vitri i en permet la correcta vitrificació [167, 190]. Johnson i col., [191] van demostrar, l'any 2000, que el semen porcí sostingut en el seu plasma seminal durant un mínim de 2-7 h a 17°C abans de la criopreservació, anomenat "holding time" (temps de sosteniment, espera o repòs), adquiria més resistència al **xoc per fred**, propietat que ja havia estat descrita molts anys abans [192, 193]. Els beneficis del plasma seminal en la fertilitat espermàtica són també observats quan és afegit a la solució de descongelació que revitalitza els espermatozoides després de la criopreservació, tal com van descriure per primer cop Larsson i Einarsson el 1975 [194]. Es creu que alguns efectes del xoc per fred són revertits per certs factors del plasma seminal [195, 196].

Els **diluents de congelació** es basen en els mateixos components que s'utilitzen per conservar el semen refrigerat, amb la diferència que inclouen els ja anomenats CPAs, substàncies que minimitzen els efectes del xoc per fred. Els CPAs es poden classificar com a col·ligatius (de protecció osmòtica; incrementen el nombre de partícules del solut) o no-permeables (estabilitzadors de membrana). Els CPAs van ser descoberts als fluids d'animals ectotèrmics que habiten en ambients freds [155, 197].

Els CPAs **col·ligatius** prevenen l'expansió del gel, dificultant l'addició de molècules d'aigua als cristalls de gel en creixement i, per tant, eviten l'increment de la concentració extracel·lular de la solució i la deshidratació cel·lular: glicerol (també anomenat glicerina),



lactosa, sorbitol, glucosa, ficoll (polímer de sucrosa), etc. Aquests CPAs són permeables a les cèl·lules i relativament poc tòxics a concentracions al voltant d'1M [163]. Polge, Smith i Parkes van ser els primers, l'any 1949, de provar els beneficis del glicerol en la criopreservació d'esperma [198].

Els CPAs **no-permeables** estableixen proteïnes i lípids de la membrana plasmàtica per prevenir l'entrada de gel. Un exemple de CPAs no-permeables són el rovell d'ou, el dimetilsulfoxi (DMSO), l'albumina sèrica bovina (BSA) i l'àcid etilendiaminotretacètic (EDTA). La introducció del rovell d'ou i el DMSO en espermatozoides criopreservats no va arribar fins el 1964 [199-202]. Aquests CPAs no protegeixen en absència de CPAs col·ligatius, però n'augmenten l'efectivitat i n'impedeixen un ús a concentracions tòxiques [163]. Se suposa que les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), naturalment presents al rovell d'ou, incrementen la taxa de colesterol:fosfolípids insaturats de la membrana espermàtica i, per això, ajuden en la preservació de la seva integritat [203-206].

En medicina veterinària, la criopreservació està fortament lligada al desenvolupament de la IA [207]. La taxa d'embaràs i la mida de la garrinada es redueixen quan s'utilitzen espermatozoides porcins criopreservats, motiu pel qual el seu ús es troba limitat a programes especials de cria [89]. Malgrat que la primera ventrada de garrins amb semen congelat es va obtenir el 1970 [180], a l'any 2000 el 99% de les inseminacions porcines encara es realitzaven amb semen refrigerat, mentre que en boví gairebé el 100% de les inseminacions provenien de semen congelat [191]. Encara avui dia la sensibilitat de l'esperma porcí al xoc per fred i el cost de les dosis congelades, degut tant a la tecnologia requerida com al manteniment dels tancs de nitrogen [186], han frenat l'expansió de la criopreservació al mercat porcí. Així i tot, la criopreservació presenta diferents punts d'interès, fins i tot en porcí [206]:

- Emmagatzematge indefinit d'esperma.
- Intercanvi segur de material genètic a llargues distàncies.
- Major control sanitari.
- Creació de bancs de germoplasma: preservació d'espècies amenaçades i de material d'alt valor genètic.
- Estoc assegurat de semen en períodes de baixa productivitat.

Els últims treballs sobre la millora de la criopreservació de semen porcí són liderats en l'última dècada per una llarga llista de grups d'arreu del món.

3.3. Criopreservació d'esperma porcina (II): reptes

L'espermatozoide porcí presenta trets particulars que el caracteritzen com el menys capacitat d'entre els espermatozoides de mamífer per sobreviure a la criopreservació (mala **congelabilitat** o congelabilitat pobra).

Durant la criopreservació, l'espermatozoide migra cap a la fracció no congelada de la solució (veure secció 3.1.) (Figura 24). Tot i que el medi de congelació evita la formació de gel, hi ha molts altres factors que durant el xoc per fred afecten la integritat de l'espermatozoide. El més important està relacionat amb canvis de fase dels lípids de membrana i amb el trencament osmòtic, el qual indueix bona part de les alteracions posteriors [153, 209-213]. La morfologia espermàtica és un dels paràmetres que afecta, en porcí, la resistència de l'espermatozoide al xoc per fred pel fet que les anomalies de forma i volum del cap es relacionen amb una tolerància pobra als canvis osmòtics [214-217]. L'habilitat de l'espermatozoide porcí per regular el seu volum durant l'exposició a condicions hipertòniques, com succeeix durant la formació de gel, és important per la correcta funcionalitat espermàtica i té serioses implicacions en la criopreservació [218].

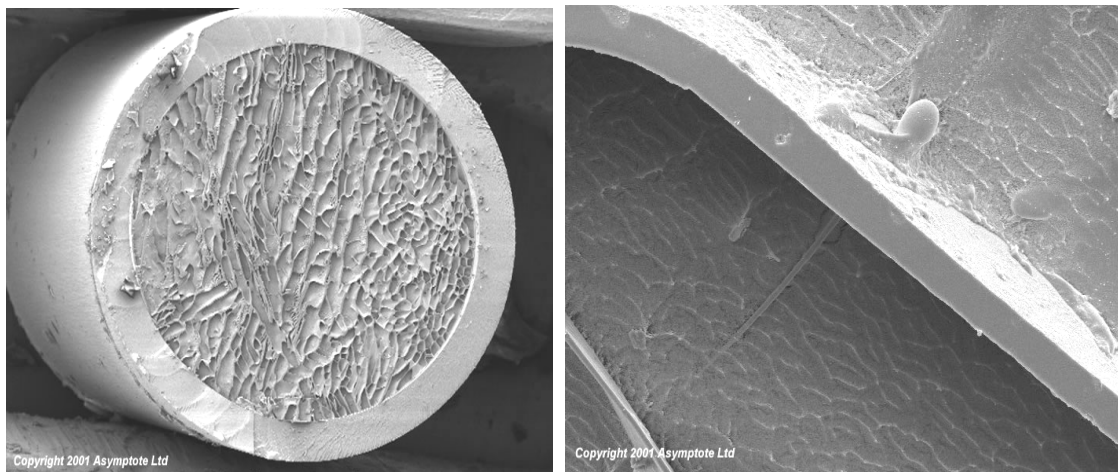


Figura 24 A l'esquerra, imatge de microscopi electrònic d'una secció practicada en una palleta de 0.25 ml, revelant l'estructura de la matriu formada per medi de congelació concentrat (glicerol/rovell d'ou). Els espais eren prèviament ocupats per gel. A la dreta, un espermatozoide humà criopreservat atrapat en medi de congelació concentrat, amb la cua i el cap en espais anteriorment ocupats per gel (Copyright©2008 Asymptote Ltd. [208]).



La capacitat per regular el volum es veu compromesa durant el xoc per fred, moment en què la congelació produeix una transició de fase dels lípids de la membrana de líquid-cristal·lí a gelificat, a una determinada temperatura segons el lípid i, per tant, s'interfereix en la permeabilitat selectiva de l'espermatozoide [219]. Alguns lípids que encara es troben en fase líquida es veuen atrapats entre fases gelificades, mostrant tal condensació que exclouen les proteïnes transmembrana de la seva estructura. La permeabilitat de l'espermatozoide a l'aigua i als ions s'incrementa dramàticament als punts d'unió entre diferents fases lipídiques, especialment a la zona del cap [220]. S'ha publicat que el colesterol interfereix en la condensació de les fases gelificades i que, per aquest motiu, ajuda a rebaixar la permeabilitat en les unions entre fases [221, 222]. Contràriament, la permeabilitat es veu potenciada pels fosfolípids insaturats, els quals contenen dobles enllaços responsables de la fluïdesa lipídica i que, alhora, faciliten l'aparició de porus a la membrana [223]. L'empaquetament lipídic en fases gelificades s'observa a partir dels 5°C durant la criopreservació d'espermatozoides de mamífer i tan sols és parcialment revertit després de la descongelació, no podent-se restaurar la distribució original de les molècules, malgrat la presència de rovell d'ou i glicerol [224].

La membrana de l'espermatozoide porcí és particularment propensa a formar fases gelificades perquè té un dels índexs molars colesterol:fosfolípids més baixos d'entre les diferents espècies (0.26) [225, 226] i, també, perquè té un elevat contingut de fosfolípids insaturats [227-230]. Les lipoproteïnes del rovell d'ou supleixen part d'aquesta escassetat de colesterol i, alhora, protegeixen algunes funcions de l'espermatozoide [231]. La composició de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide porcí podria derivar de la maduració en el pas per l'epidídim, ja que se sap que, durant aquest procés, es perd part del colesterol de les membranes [232]. En relació a aquest fet, s'ha demostrat que l'espermatozoide de porc es torna més sensible al xoc per fred a mesura que avança per l'epidídim [233].

L'increment en la permeabilitat de la membrana plasmàtica de l'espermatozoide porcí i en la concentració del medi de congelació durant la criopreservació provoquen un flux descontrolat d'aigua a través de l'espermatozoide, que empitjora encara més l'estabilitat de la membrana. Tot plegat activa l'entrada d'ions, els efectes dels quals s'assemblen als successos de la capacitació [234]. Aquesta capacitació "prematura" durant el xoc per fred, anomenada **criocapacitació**, interfereix en la resposta de l'espermatozoide als senyals requerits per una correcta fertilització i, també, per la pròpia supervivència dins els oviductes [234-236]. Les similituds de la criocapacitació amb la capacitació real en espermatozoides, tant de porc com d'altres espècies de mamífer, són revisades per Bailey i col., 2000 [237], i per Green i Watson, 2001 [234], i inclouen:

🔗 Increment de la permeabilitat de la membrana plasmàtica als ions

Durant la capacitació real augmenta l'influx de calci i bicarbonat [238-240], essent l'influx de calci mitjançat per una ATPasa [241-243]. La congelació de l'esperma també incrementa la presa de calci [231].

🔗 Reorganització de la membrana plasmàtica i alliberament de colesterol

Els influxos de calci i bicarbonat durant la capacitació real activen vies de senyalització promotores del reordre lipídic de la membrana plasmàtica i de la sortida de colesterol de la mateixa, especialment al cap de l'espermatozoide [244, 245]. Aquesta reordenació s'assembla a l'empaquetament per fases que es produeix en els lípids durant el xoc per fred. En la capacitació real, el reordenament forma microdominis ("lipid rafts", rais lipídics) enriquits en colesterol [44, 246]. La formació d'aquests microdominis podria facilitar la sortida de colesterol mitjançada per l'albumina, i seria estimulada per l'exposició de la fosfatidilserina i la fosfatidiletanolamina a la cara externa de la membrana plasmàtica per contacte amb el bicarbonat [247-251]. L'alliberament de colesterol augmenta la fluïdesa de la membrana als ions i intervé en els esdeveniments posteriors de la capacitació, els quals duren a la fusió de la membrana acrosomal externa amb la membrana plasmàtica durant la reacció acrosòmica que precedeix a la fertilització [126, 252]. L'exposició de la fosfatidilserina i la fosfatidiletanolamina [253] i la davallada del contingut de colesterol [228] també s'observen en l'espermatozoide porcí després del xoc per fred, erigint-se com a possibles raons de la sensibilitat acrosomal espermàtica durant el procés [254]. Aquesta reordenació lipídica sembla ser reversible i, per tant, podria ser parcialment reestablerta o bé previnguda pel plasma seminal [195, 196]. En alguns casos s'ha observat com la capacitació real, en el cas de l'esperma porcina, és realitzada en absència de bicarbonat [255]. El fet pot ser degut al contingut en colesterol, més aviat pobre, de la membrana, característica que li atorga una fluïdesa molt superior en comparació amb la d'espermatozoides d'altres mamífers i permetria, hipotèticament, assolir la capacitació real, fins i tot, sense perdre cap molècula de colesterol. Això simplificaria també l'activació de la criocapacitació.

🔗 Cascada de senyalització per la fosforil·lació proteica

L'influx d'ions estimula, alhora, una cascada senyalitzadora per l'activació de proteïnes cinases (PKs) que activen, tot fosforil·lant residus Tyr/Ser/Thr, proteïnes mitjanceres d'esdeveniments de la capacitació real, com la hiperactivació de la motilitat [255-257]. Aquest últim esdeveniment també s'ha pogut observar en espermatozoides amb xoc per fred, com es discuteix a l'**ARTICLE II**.

🔗 Alliberament d'espècies reactives d'oxigen (ROS)

Durant la capacitació real s'accelera la fosforil·lació oxidativa a la peça intermèdia, amb la finalitat de produir l'ATP que es necessita pel moviment hiperactivat, resultant en una pujada de la producció de ROS [258]. L'augment de ROS està descrit també en la criocapacitació i, en



aquest cas, se suggereix que el nivell de ROS derivats de la fosforil·lació oxidativa baixa durant la criopreservació per alteració del mecanisme al mateix moment en què, paradoxalment, la pèrdua del potencial mitocondrial que provoca aquesta alteració determina l'obertura de porus mitocondrials, a través dels quals s'alliberen ROS al citoplasma juntament amb d'altres factors [258].

➤ Característiques apoptòtiques

La mort cel·lular per lesions accidentals s'anomena necrosi, a diferència de l'apoptosi, que involucra vies de senyalització cap a una mort cel·lular programada. L'apoptosi es caracteritza per una disminució del potencial mitocondrial, l'alliberament de factors proapoptòtics des dels mitocondris, l'activació de caspases, l'increment de la permeabilitat de la membrana plasmàtica, la fragmentació de l'ADN i l'exposició de la fosfatidilserina. Alguns dels processos són els mateixos que s'activen en la capacitat real. Recentment, aquests marcadors d'apoptosi (excepte la fragmentació de l'ADN) també han estat relacionats amb la congelabilitat de l'esperma caní [259] i equí [260], i s'han contrastat en espermatozoides criopreservats d'altres mamífers [258, 261-269]. No s'ha trobat fragmentació de l'ADN en l'espermatozoide porcí criopreservat, tot i que sí que s'han detectat determinades lesions en la seva estructura nuclear [270]. En el cas del toro, l'espermatozoide criopreservat mostra un mecanisme de "característiques apoptòtiques", tal com ha estat descrit, perquè sols s'observen les fases de degradació primerenques que caracteritzen l'apoptosi, resultant en un estat espermàtic subletal [264]. De fet, hi ha evidències indicatives de l'operativitat exclusiva de l'apoptosi durant l'espermatogènesi, ja que en l'esperma ejaculada l'elevada compactació de l'ADN dificulta la seva fragmentació [271]. Addicionalment, alguns estudis evidencien externalitzacions de fosfatidilserina en l'espermatozoide, independents de l'activació de caspases [247, 249] i més relacionades amb la capacitat que amb l'apoptosi [265]. No obstant, s'ha confirmat que la capacitat real i l'apoptosi comparteixen alguns processos i molècules [272, 273], i les evidències apunten que succeeix el mateix en la criocapacitació.

En la **Figura 25** es mostren vies hipotètiques de senyalització de la capacitat real que es podrien activar també en el xoc per fred. Un estudi en espermatozoides criopreservats sobre les molècules participants d'aquesta cascada d'esdeveniments permetria investigar si també es troben involucrades en el xoc per fred.

A banda dels canvis de fase lipídics i del trencament per osmosi, durant el xoc per fred es produeixen també lesions col·laterals en l'esperma que no s'haurien d'oblidar. Algunes d'elles ja han estat mencionades anteriorment, e.g. disminució del potencial de la membrana mitocondrial [301], peroxidació dels lípids de membrana [231], inestabilitat de la cromatina [302], i alteracions en la motilitat i la viabilitat [212, 303, 304]. Freqüentment, aquestes lesions comporten la mort de la meitat dels espermatozoides criopreservats [234]. Tot plegat altera la fertilitat de l'esperma, amb una reducció de la taxa de parts del voltant del 20% [305].

Quan s'inverteix en la creació d'un banc d'esperma congelada, el rendiment reproductiu de l'espermatozoide és, a vegades, secundari davant l'excel·lència genètica dels individus. Per aquest motiu no és menys important, en comparació amb l'optimització del protocol de criopreservació, considerar l'optimització de la tècnica d'IA per superar la debilitat de l'esperma criopreservada, particularment mitjançant **[186]**:

- ☛ Sincronització de l'ovulació de les truges i establiment de l'horari d'inseminació adequat.
- ☛ Utilització de tècniques d'inseminació intrauterina per optimitzar les dosis.

Aquesta qüestió es discuteix a l'**ARTICLE I**. En la major part dels assajos realitzats en l'última dècada amb semen criopreservat de porc s'aconsegueixen taxes de part superiors al 70%, properes a les obtingudes en boví **[186]**. Per poder arribar a aquest exitós percentatge és també de gran importància la selecció de les ejaculacions segons la seva congelabilitat, com ha succeït en boví **[186]**.

Malgrat que l'espermatozoide porcí és, de tot els espermatozoides de mamífer, el més sensible al xoc per fred, existeixen també diferències entre races, individus i ejaculacions **[306-308]**. És a dir, algunes ejaculacions porcines es poden congelar sense perdre considerablement la seva qualitat espermàtica. En termes generals, hi ha mascles amb **bona congelabilitat** i mascles amb **mala congelabilitat** o de congelabilitat pobra **[309]**, terminologia actualment aplicada a nivell de les ejaculacions. Les diferències en la fertilitat de camp entre ejaculacions porcines amb bona i mala congelabilitat es revisen a l'**ARTICLE I**.

La millora dels protocols de criopreservació és un dels factors determinants del guany de congelabilitat de les últimes dècades **[192, 310]**, però en general s'accepta l'existència d'una base genètica en la supervivència de l'espermatozoide porcí a la criopreservació **[311-313]**. En aquest aspecte, es proposa que les variacions en la resistència a la congelació podrien estar subjectes, per exemple, a la morfologia del cap de l'espermatozoide **[214]** o a la quantitat d'àcids grassos poliinsaturats de cadena llarga de la seva membrana plasmàtica **[314]**. Aquests descobriments fan pensar en característiques de l'espermatozoide porcí que participen en l'adquisició de la condició de criocapacitat. El desenvolupament de nous tests per detectar canvis a nivell molecular entre ejaculacions de diferent congelabilitat té com a propòsit determinar la congelabilitat d'una ejaculació abans que tingui lloc la seva criopreservació. Aquests tests s'haurien de fonamentar en les bases moleculars del xoc per fred, les quals, possiblement, rauen en les semblances entre la criocapacitació i la capacitació real i, fins i tot respecte l'apoptosi. El tema és desenvolupat en els **ARTICLES II i III**, en els quals es descriuen estudis sobre la localització i l'expressió de tres molècules: la proteïna transportadora



Revisió Bibliogràfica

de glucosa GLUT3 [294, 315, 316], la proteïna de xoc per calor HSP90AA1 [297, 298, 317] i l'enzim antioxidant Cu/ZnSOD [272, 318] (Figura 25).

Imatge: Font particular



Objectius

La present tesi proposa quatre objectius principals relacionats amb els reptes que, actualment, afecten la criopreservació d'esperma porcina, tal com s'exposa a la revisió bibliogràfica. En resposta a aquests quatre objectius s'han publicat tres articles que s'anomenen al final de cada punt.

1. Comparar ejaculacions amb bona congelabilitat (GFEs) i ejaculacions amb mala congelabilitat (PFEs) en termes de fertilitat in vivo utilitzant esperma criopreservada i controls de semen refrigerat. **ARTICLE I (pàgines 47-57)**
2. Testar l'eficiència de la inseminació postcervical (post-CAI) en el manteniment de la fertilitat en utilitzar esperma criopreservada i controls de semen refrigerat. **ARTICLE I**
3. Buscar predictors de la congelabilitat de les ejaculacions, tant en ejaculacions GFEs com en PFEs, i en tres passos del procés de criopreservació (a 17°C, a 5°C i a 240 min postdescongelació), mitjançant l'avaluació de paràmetres convencionals de qualitat espermàtica i, a través de l'estudi de la localització i la reactivitat sota el microscopi de tres proteïnes en l'espermatozoide: proteïna membre 3 de la família de transportadores de glucosa (SLC2A3, àlies GLUT3), proteïna de xoc per calor 90-KDa alfa A1 (HSP90AA1), i proteïna superòxid dismutassa lligada a coure i zinc (Cu/ZnSOD). Aquestes proteïnes es troben relacionades amb la fisiologia espermàtica i tenen possibles funcions en la congelabilitat de les ejaculacions. **ARTICLE II (pàgines 58-79)**
4. Quantificar l'expressió de les tres proteïnes mitjançant transferència western, tant en ejaculacions GFEs com en PFEs i en els tres passos mencionats a l'objectiu 3, per tal de determinar el seu potencial com a predictors de la congelabilitat. **ARTICLE III (pàgines 80-112)**

Discussió General



Malgrat els avantatges, els avenços i tot allò que s'ha descrit a la revisió bibliogràfica respecte la pràctica de la IA porcina amb esperma criopreservada, l'any 2006 aquesta tan sols representava l'1% del total d'inseminacions en el sector porcí [128], percentatge que encara avui dia es manté baix. El fre a l'expansió de la IA porcina amb esperma criopreservada s'explica, principalment, pels pobres resultats que se n'obtenen, a diferència de l'èxit amb el semen refrigerat. La dèbil fisiologia del l'espermatozoide criopreservat restringeix la seva viabilitat i per tant li dificulta l'arribada als oòcits [319]. Un assaig a gran escala del 2009 que compara la taxa de parts i la prolificitat amb aquest tipus de dosis evidencia un 23% menys de truges gestants i 1.4 garrins per sota dels resultats normalment obtinguts amb el semen refrigerat [320]. A més, hi ha tècniques d'inseminació a l'espera per ser adaptades a un ús rutinari amb esperma criopreservada [319].

No obstant la inseminació convencional o cervical (intra-CAI) en porcí dóna taxes de fertilitat similars tant en semen refrigerat com amb esperma criopreservada, segons estudis del 1995 [321], es necessiten, almenys, $5-6 \times 10^9$ spz (10-12 palletes de 0.5 ml) en 80-90 ml per obtenir els mateixos resultats que amb dosis convencionals de semen refrigerat de només 3×10^9 spz en 80-90 ml, no resultant rentable degut a l'increment de cost de les dosis després de la criopreservació [128]. Amb la DUI s'aconsegueix una introducció dels espermatozoides a major fondària en el tracte de la truja i permet, amb un menor volum, arribar a taxes de part vora el 90% obtingut amb el semen refrigerat després d'una intra-CAI (Watson i Behan, 2002 [142]). Roca i col. ostenten, des del 2003, haver aconseguit la millor taxa de parts fins avui dia (77.55%) amb semen criopreservat i DUI, i amb només 1×10^9 spz (2 palletes de 0.5 ml) en 7.5 ml, després d'inseminar 49 truges sincronitzades hormonalment [144]. La DUI, però, sovint



provoca la caiguda de la prolificitat a causa de la incidència de fertilitzacions unilaterals o parcialment bilaterals, donada la reducció del número d'espermatozoides inseminats (Martínez i col., 2006 [150]).

Dimitrov i col. van comparar, l'any 2007, els tres mètodes actuals d'inseminació porcina (intra-CAI, post-CAI i DUI) en diferents assajos amb semen refrigerat i no van trobar diferències significatives en les taxes de parts, però sí menor prolificitat en la DUI en comparació amb la intra-CAI [143]. En l'última dècada, en les inseminacions en què s'utilitza DUI la mida de la ventrada no sol ser superior als 10 garrins, ni amb esperma criopreservada ni amb semen refrigerat [144, 151], mentre que la intra-CAI i la post-CAI, normalment, donen ventrades de 12 garrins amb semen refrigerat [135, 136, 140, 142]. El problema de la DUI ha estat resolt, en el cas del semen porcí refrigerat, incrementant la concentració de la dosi i el seu volum dels 0.15×10^9 spz en 7.5 ml als 0.6×10^9 spz en 20 ml (Martínez et al., 2006 [150]). La solució, però, no ha estat encara aplicada en esperma criopreservada, per la qual es necessiten dosis de concentració més elevada, perquè representa un augment del número de palletes que s'han d'utilitzar per inseminar. El mètode d'elecció en inseminacions amb esperma porcina criopreservada ha de contribuir a optimitzar costos sense sacrificar els resultats de fertilitat. Com que la DUI és, a dia d'avui, l'únic mètode d'eficiència comprovada per inseminar amb esperma criopreservada, l'**ARTICLE I** presenta un assaig de camp per testar l'adequació de la tècnica post-CAI com a mètode alternatiu d'inseminació amb esperma criopreservada. La post-CAI manté, en semen refrigerat, la taxa de parts i la prolificitat de la intra-CAI permetent, a la vegada, dosis de menor concentració i volum que les convencionals ($1-1.5 \times 10^9$ spz i 30-50 ml) [135, 137]. L'únic assaig publicat que compara l'eficiència de la post-CAI amb esperma criopreservada és una prova de camp de Gil J i col., del 2001, amb un baix número de truges [322]. Altres assajos que fan referència a la post-CAI no comparen la congelabilitat sinó que se centren en d'altres paràmetres, com la concentració i el volum (3×10^9 spz en 80 ml [323]; 2.5×10^9 spz en 50 ml [324]), el tipus de diluent [324, 325], o bé utilitzen altres espècies com la cabra [326]. Tal varietat de proves denota la falta d'un protocol estandarditzat de post-CAI per esperma criopreservada.

Els objectius principals de l'assaig en porcí descrit a l'**ARTICLE I** són comparar la post-CAI realitzada amb esperma criopreservada i la post-CAI practicada rutinàriament i comparar-ne els resultats en grups d'ejaculacions de diferent congelabilitat, alhora que també són avaluats els efectes del xoc per fred sobre els paràmetres de fertilitat. L'assaig pretén establir un protocol actualitzat per la pràctica de la post-CAI amb esperma congelada. Per aconseguir els objectius proposats s'han inseminat 45 truges múltiples amb aquest tipus d'esperma (més endavant es detallaran les proves control fetes amb semen refrigerat). Les observacions sobre l'eficiència de la tècnica suggereixen que no és agressiva per la truja, pel fet que només s'ha observat hemorràgia en una ocasió (2.22% de les truges inseminades amb esperma criopreservada) i també que presenta una baixa incidència de reflux espermàtic, tal i

com ha estat contrastat en un assaig del 2005 en què es compara la post-CAI amb la intra-CAI en semen refrigerat [327]. En la prova realitzada a l'**ARTICLE I**, el reflux ha estat observat en el 26.67% de les truges inseminades amb esperma criopreservada, percentatge similar al que es troba publicat en pràctiques amb semen refrigerat [327]. Addicionalment, la dosi espermàtica ha fluït fàcilment cap a l'úter i el catèter ha estat introduït sense cap resistència en el 95.56% de les truges, experiència contrastada també per Gil J. el 2006 [137] i per Levis i col. el 2002 [134]. El propòsit de la post-CAI no és substituir la DUI, sinó facilitar una tècnica alternativa en què no es requereixin a l'inseminador, com sovint es demanen, habilitats especials per evitar la resistència de les truges [141, 146, 151].

En l'assaig de l'**ARTICLE I** també s'ha obtingut una bona prolificitat, però la taxa de parts ha resultat inesperadament més baixa que, per exemple, l'obtinguda el 2007 per Fraser i col. amb 8 truges múltiples inseminades [325]. Aquests investigadors van obtenir un 75% de parts en injectar 2×10^9 spz congelats (4 palletes de 0.5 ml) en una dosi de 100 ml. Aquesta taxa només és igualada a l'**ARTICLE I** en treballar amb semen refrigerat, mentre que la taxa de parts més alta obtinguda amb esperma criopreservada és del 50%, després de la injecció de 7.5×10^9 spz criopreservats (15 palletes de 0.5 ml) en una dosi de 30 ml. Taxes del 50% també han estat publicades per Abad i col. el 2007 en practicar la post-CAI amb 3×10^9 spz criopreservats (6 palletes de 0.5 ml) en una dosi de 80 ml [323]. Resulta difícil considerar totes les possibles fonts de variació, des de la recollida del semen fins la inseminació, entre les diferents proves de camp [328]. La unió de la qualitat espermàtica i de diferents variables de laboratori determinen només el 6-7% de la variança en els resultats de fertilitat (Broekhuijse i col., 2009 [329]). La major part de les diferències en els resultats entre assajos es creuen degudes a factors com la variació estacional de la fertilitat de la truja, particularment crítica en el cas de l'esperma criopreservada [330], les condicions d'estabulació dels animals o la selecció espermàtica als oviductes, aquest últim revisat per Holt WV. el 2009 [118]. L'expertesa de l'inseminador contribueix també a aconseguir uns bons resultats de fertilitat, de manera que els tècnics sense experiència poden reduir la fertilitat si la IA no és practicada adequadament. Alguns dels possibles problemes de manipulació que hagin pogut afectar les inseminacions durant la prova descrita a l'**ARTICLE I** són discutides al següent paràgraf. Abans, però, és important fer esment que la separació dels resultats de les inseminacions, tant de l'esperma criopreservada com del tractament control amb semen refrigerat, en dos grups de congelabilitat (GFEs i PFEs) ha augmentat el nombre de tractaments a comparar i, a la vegada, ha disminuït els individus dins de cada tractament, representant una major influència dels individus sobre la taxa de parts. D'aquesta manera, el sacrifici d'una truja gestant podria haver reduït dramàticament la taxa de parts en el tractament al qual pertanyia.

Alguns factors de manipulació durant les inseminacions de l'**ARTICLE I** necessiten ser revisats, com són el manteniment de l'esperma criopreservada a 37°C durant la inseminació o l'interval inseminació-ovulació, aquest últim punt discutit prèviament per Martínez i col., 2002



[331], Bolarín i col., 2006 [152], Abad i col., 2007 [323] i Großfeld i col., 2008 [332]. A més dels dos factors de manipulació mencionats anteriorment, les pèrdues d'espermatozoides en injectar-los al tracte reproductor de la femella poden haver contribuït també a minorar la taxa de parts. Les pèrdues provindrien d'un acoblament defectuós de la sonda amb la xeringa utilitzada per injectar els espermatozoides criopreservats ja que, per la naturalesa experimental de la prova, la punta de la xeringa de plàstic no ha quedat correctament segellada en connectar-la amb el catèter.

Utilitzar dosis criopreservades al mateix volum i concentració que les dosis convencionals de semen refrigerat d'una intra-CAI, no sembla ser una garantia per compensar els inconvenients de manipulació de la post-CAI amb aquest tipus d'esperma. Abad i col., [323] reporten el 2007 taxes de part similars a les de l'ARTICLE I practicant la post-CAI amb dosis criopreservades de 80 ml i 3×10^9 spz (6 palletes de 0.5 ml), però d'altra banda n'obtenen una prolificitat inferior. Per contra, l'optimització de la post-CAI passa per reduir el número de palletes utilitzades en l'ARTICLE I (15 palletes de 0.5 ml per inseminació); d'altra manera resultaria massa car pels grangers tenint en compte que d'una ejaculació s'envasen normalment menys de 300 palletes (no més de 20 inseminacions amb el mètode descrit). De fet, se suggereix que, en inseminar amb post-CAI, es podrien utilitzar dosis criopreservades de menor volum i concentració que les descrites a l'ARTICLE I, sense comprometre la fertilitat. En aquest sentit, Gil J i col., demostren el 2004 que amb dosis refrigerades de 0.5 o 1×10^9 spz en 15 o 30 ml, respectivament, (equivalent a un màxim de 2 palletes de 0.5 ml) s'igualen la taxa de parts i la prolificitat d'una intra-CAI [136]. Malgrat tot, la reducció de volum i concentració de les dosis de post-CAI criopreservades requereix atendre algunes consideracions, tal i com es conclou dels resultats d'un assaig del 2008 en els nostres laboratoris [333]. Les tres consideracions que segueixen s'han pres en consideració en l'assaig de l'ARTICLE I. La primera és l'existència d'una elevada variabilitat dels paràmetres de qualitat entre palletes descongelades, establint-se la recomanació de practicar la post-CAI amb un mínim de quatre palletes per poder tenir una representativitat correcta de l'ejaculació. La segona tracta de la disminució de la motilitat espermàtica progressiva elevades a dilucions en BTS, com també es va observar en boví el 1998 [334]. Es proposa una dilució en BTS no superior a 1:4; v:v, recomanant una dilució de 1:3; v:v. La tercera consideració fa referència a la congelabilitat de les ejaculacions com a punt clau alhora d'incrementar la fertilitat després de practicar una post-CAI.

L'impacte de la congelabilitat de les ejaculacions porcines en els resultats de fertilitat és un fet generalment acceptat: l'esperma criopreservada presenta una fertilitat pobre en comparació amb el semen refrigerat. No obstant, l'ARTICLE I és l'únic assaig publicat que tracta de quantificar les diferències reals entre l'esperma congelada d'ejaculacions amb bona (GFEs) i mala (PFEs) congelabilitat, en relació al semen refrigerat i en termes de fertilitat in vivo. Segons dades dels últims cinc anys, les ejaculacions porcines de millor congelabilitat

mostren una integritat de membrana espermàtica i una motilitat total al voltant del 50% entre els 30 i els 150 min després de la descongelació [128, 296, 310, 335]. Malgrat que l'anàlisi de la motilitat en semen refrigerat explica tan sols el 9-15% de la varianza en la fertilitat [118, 329], tant els valors de motilitat com els d'altres paràmetres de qualitat espermàtica són encara els més utilitzats per mesurar la fertilitat de l'ejaculació porcina en semen refrigerat i en espermatozoides descongelats i també per mesurar la congelabilitat de les ejaculacions [310, 336-339]. En l'ARTICLE I s'han obtingut dos grups de congelabilitat divergent (GFEs i PFEs), després d'una anàlisi de conglomerats basada en la integritat de membrana espermàtica i en la motilitat progressiva a les 4 h de descongelació. Tal temporització ha estat escollida per assegurar la supervivència dels espermatozoides criopreservats, essent recomanat per aquest tipus d'esperma un interval de 4 h entre el moment de la inseminació i el de l'ovulació [114, 148]. En aquest punt de la descongelació, les ejaculacions classificades com a GFEs a l'ARTICLE I es caracteritzen per una motilitat progressiva i una integritat de membrana per sobre del 40%, mentre que els valors d'aquests paràmetres en les ejaculacions PFEs es troben per sota d'aquest percentatge.

Per poder comparar en l'assaig de l'ARTICLE I la influència de la congelabilitat en els resultats de fertilitat de la post-CAI, també s'han inclòs controls de semen refrigerat. Per això, a banda de les 45 truges inseminades amb esperma criopreservada, s'han inseminat 41 truges addicionals amb dosis de semen refrigerat provinents de les mateixes ejaculacions que l'esperma congelada. Les dosis refrigerades també s'han agrupat en dues categories depenent de la congelabilitat de la seva ejaculació corresponent, permetent, així, comparar quatre tractaments en l'assaig: FS-GFEs, FS-PFEs, FT-GFEs i FT-PFEs, essent FT l'esperma criopreservada i FS el semen refrigerat. El volum de les dosis utilitzades per inseminar ha estat de 30 ml en tots els tractaments, per evitar la interferència d'aquest paràmetre en els resultats però, mentre que la concentració de les dosis refrigerades s'ha calculat en 1×10^9 spz per dosi, la de l'esperma criopreservada es trobava més concentrada (7.5×10^9 spz per dosi). La concentració de les dosis refrigerades es basa en els assajos publicats sobre la post-CAI en inseminacions amb volums de 30 ml [138-140, 325, 326], no així les dosis criopreservades. En aquestes últimes ha resultat impossible mantenir la mateixa concentració de les dosis refrigerades en el volum de 30 ml per la recomanació esmentada abans sobre no diluir l'esperma criopreservada a proporcions superiors a 1:4; v:v.

Els resultats de fertilitat de l'ARTICLE I concorden amb els obtinguts in vitro per Gil MA i col. el 2005, els quals van demostrar que el percentatge de penetrabilitat en els oòcits dels espermatozoides de mascles porcins mals congeladors era menor que el d'espermatozoides de mascles bons congeladors [337]. Així, les taxes d'embaràs i de parts de l'ARTICLE I han estat inferiors en el tractament FT-PFEs que en el tractament FT-GFEs i els dos controls de semen refrigerat, mentre que cap dels dos paràmetres ha variat en comparar el tractament FT-GFEs amb els controls. Tot i que no s'ha observat cap variació en la taxa de parts del tractament FT-



GFes comparat amb els controls, la taxa de parts tampoc ha variat en aquest tractament respecte el de FT-PFes, la qual cosa suggereix que el xoc per fred també té cert efecte sobre la taxa de parts dels GFes. Contràriament a les taxes d'embarassos i parts, la prolificitat no ha resultat influïda per la congelabilitat de les ejaculacions perquè no s'han trobat diferències significatives entre els tractaments. Feitsma i Leenhouders tampoc reporten, el 2009, cap efecte del protocol de congelació sobre la mida de la garrinada [320] i, per tant, hi ha d'haver altres factors que tenen més pes sobre aquest paràmetre.

Els efectes dels paràmetres seminals clàssics (i.e. motilitat, morfologia, integritat de membrana) sobre la prolificitat són també pobres [340]. Tsakmakidis i col., en un estudi del 2009, no van observar cap correlació de la prolificitat amb la integritat de membrana, la motilitat, la morfologia o l'estabilitat de la cromatina en semen refrigerat [341]. Tal i com ja s'ha discutit per la DUI al principi d'aquesta secció, el volum i la concentració del semen injectat a la truja semblen ser els principals restrictors de la prolificitat. Ambdós paràmetres expliquen un elevat percentatge de la variància en la mida de la garrinada i en la capacitat fertilitzant de l'esperma, aquesta última mesurada com a taxa de penetració espermàtica in vitro [340, 342]. El volum i la concentració espermàtiques no estarien associades amb la prolificitat exclusivament per la seva implicació en el reclutament de PMNs a l'úter, com exemplifiquen Yamaguchi i col. el 2009 [324], sinó també per aportar als oviductes el percentatge d'espermatozoides funcionals que garanteixi la millor proporció espermatozoides:òcits. Segons indiquen els resultats de l'ARTICLE I, un volum de 30 ml a la concentració de 1×10^9 spz en les dosis de semen refrigerat i de 7.5×10^9 spz en les dosis d'esperma criopreservada sembla assegurar, en qualsevol dels tractaments assajats, el manteniment del número total de garrins nascuts i del número de garrins nascuts vius després d'una post-CAI. Com que la prolificitat depèn també de paràmetres com la raça [343] i les característiques de la truja i la seva manipulació, reguladors del nombre d'òvuls i del desenvolupament embrionari [340, 344-347], les truges inseminades a l'ARTICLE I han estat criades en les mateixes condicions i han estat assignades aleatòriament als quatre tractaments de l'assaig.

En conclusió, la tècnica d'IA utilitzada i la seva correcta pràctica no garanteixen per sí soles resultats exitosos de fertilitat en porcí, manifestant-se també la importància de seleccionar a favor dels GFes, tal com indica l'ARTICLE I. Quin factor determina la pertinença de les ejaculacions al grup de GFes o al de PFes? Encara que la supervivència de l'esperma porcina millora quan les condicions de criopreservació són òptimes [310], la congelabilitat de les ejaculacions depèn més de les característiques individuals del mascle que del propi procés de criopreservació [313, 348], deixant de banda factors ambientals que produeixen variabilitat en la congelabilitat entre ejaculacions [3, 4, 47, 49]. L'actual selecció de les ejaculacions destinades a criopreservació es basa en els resultats de paràmetres convencionals de qualitat seminal del semen refrigerat, els quals no informen de la congelabilitat tal i com aquests paràmetres estan essent analitzats els últims anys [348]. La introducció de nous tests per

predir la resistència de l'esperma al xoc per fred es presenta com una possibilitat interessant que ajudaria a millorar els resultats de fertilitat. El fort rerefons genètic que explica la variació en la congelabilitat de les ejaculacions entre macles **[311, 312]** faria possible una selecció prèvia de les ejaculacions més aptes per a ser criopreservades i permetria descartar les classificades com a PFEs, a no ser que hi hagués un interès especial en la genètica del mascle del qual provingués l'extracció, estalviant així temps i diners associats al procés de congelació.

En l'**ARTICLE II** es discuteix el paper que tenen els paràmetres convencionals de qualitat espermàtica i algunes proteïnes en la predicció de la congelabilitat de les ejaculacions porcines. S'ha notat que els paràmetres rutinaris de qualitat espermàtica (paràmetres cinètics, la integritat de membrana i el percentatge d'acrosomes no reaccionats després del test de l'ORT) són informatius de la congelabilitat des dels 5°C durant la criopreservació i no als 17°C, essent la combinació dels paràmetres cinètics LIN (índex de linearitat) i STR (índex de rectitud) la més útil en la predicció.

Els valors de LIN i STR estan inversament relacionats amb els nivells de xoc per fred als 5°C i la combinació d'ambdós índexs pot predir al voltant del 70% de les probabilitats de supervivència a la criopreservació. La relació dels dos paràmetres amb la congelabilitat es troba en l'increment del xoc per fred als 5°C durant la criopreservació, ajudat per l'eliminació del plasma seminal (que conté factors descapacitants) a través de la centrifugació de les ejaculacions abans del procés. El xoc per fred provoca una entrada d'ions Ca(+2) a l'espermatozoide, degut a l'augment de permeabilitat de la membrana plasmàtica que mitjanciac la hiperactivació de la motilitat, la tan anomenada "criocapacitació" **[212, 234, 237, 303]**. La criocapacitació desapareix en l'esperma criopreservada, com s'ha observat en l'**ARTICLE II**, possiblement pel malmetement de la motilitat. La hiperactivació del patró de motilitat a l'espermatozoide comporta una disminució dels índexs LIN i STR similar a la que s'observa durant la capacitació real **[349]**. Tal com es descriu en l'**ARTICLE II**, els índexs LIN i STR en les ejaculacions classificades com a PFEs han estat més baixos que en les classificades com a GFEs, fet que suggereix que les PFEs arriben a uns nivells més elevats d'hiperactivació. En concordança amb aquesta hipòtesi existeix un estudi que relaciona la hiperactivació en esperma canina amb la seva sensibilitat a la criopreservació (Núñez-Martínez i col., 2006 **[350]**). Les diferències de motilitat entre les dues categories d'ejaculacions porcines vénen donades per variacions entre elles en la quantitat d'espermatozoides més resistents a la criopreservació, la presència dels quals es revela sota la forma de subpoblació amb un patró de moviment característic (Rodríguez-Martínez i col., 2008 **[296]**).

A banda de la utilitat dels índexs LIN i STR i de les subpoblacions presents a l'ejaculació, també la morfometria del cap de l'espermatozoide té un paper predictiu ja que, segons un estudi del 2005, en semen refrigerat determina fins el 36% del percentatge de membranes espermàtiques intactes després de la descongelació **[216]**. Aquesta afirmació



possiblement prové de la relació de la mida del cap amb la resistència de l'esperma al xoc osmòtic durant la congelació, tal i com s'explica a la revisió bibliogràfica. Tot i això, ni la combinació LIN-STR, ni l'anàlisi de les subpoblacions mòbils, ni la morfometria del cap espermàtic són el 100% fiables en la predicció de la congelabilitat, per la qual cosa s'han de buscar altres paràmetres.

L'estimació de la fertilitat porcina millora en combinar l'anàlisi de paràmetres convencionals de qualitat espermàtica amb l'estudi de proteïnes presents al semen [351]. També els patrons de motilitat lligats a la congelabilitat semblen associar-se amb proteïnes localitzades a les diferents fraccions del plasma seminal [296]. Per tant, la predicció de la congelabilitat de les ejaculacions porcines podria optimitzar-se relacionant, en l'esperma, l'assaig de paràmetres convencionals amb l'estudi de molècules implicades en el procés de criocapacitació.

L'existència d'interrelacions entre la capacitació, l'apoptosi i la criocapacitació ens suggereix estudiar l'últim procés a partir de les molècules que participen en els altres dos, tant si es localitzen al plasma seminal com a l'espermatozoide. L'estudi que presenta l'**ARTICLE II** és un immunomarcatge per microscòpia òptica de tres proteïnes candidates, presents a l'espermatozoide porcí (GLUT3, HSP90AA1 i Cu/ZnSOD), per ser analitzades en semen refrigerat i en esperma criopreservada, tant en ejaculacions GFEs com en ejaculacions PFEs. L'objectiu ha estat comprovar si hi ha canvis en aquestes proteïnes que puguin determinar la resistència de l'esperma porcina al xoc per fred.

L'immunomarcatge de les tres proteïnes no ha presentat diferències, ni en semen refrigerat ni en esperma criopreservada, entre les ejaculacions GFEs i les PFEs en termes de localització i reactivitat. Per tant, l'anàlisi microscòpica de les tres proteïnes no és prou informativa per ser desenvolupada com a test predictor de congelabilitat en ejaculacions porcines. Encara que no hi ha hagut canvis en les proteïnes que es puguin associar a la congelabilitat, la reactivitat del marcatge en l'esperma criopreservada ha disminuït en comparació amb el semen refrigerat. Aquesta reducció de marcatge indica que el procés de criopreservació afecta la integritat de l'espermatozoide, especialment la de l'acrosoma, i que els danys per criopreservació comprenen alteracions irreversibles a l'estructura espermàtica, tant en GFEs com en PFEs. Encara que la fertilitat espermàtica es veu afavorida per l'addició de plasma seminal després de la descongelació de les palletes, com es va observar per primera vegada el 1975 [194], la reversió de la criocapacitació mitjançant el plasma seminal no sempre millora la fertilitat com es desitja [323]. En els següents paràgrafs es discuteixen els resultats de les tres proteïnes estudiades a l'**ARTICLE II**.

La proteïna GLUT3 és present a la membrana plasmàtica de la regió acrosomal i de les peces principal i distal. Aquest patró de localització ja ha estat descrit des del 1998 per algunes

publicacions, les quals remarquen la fina modulació de l'expressió de GLUT3 com a eina per a una presa de glucosa eficient [293, 352]. La distribució de la proteïna a l'espermatozoide es correspon amb la localització d'enzims glicolítics, que abasten d'energia immediata els processos de motilitat, a la cua, i els de senyalització espermàtica, en què intervenen receptors del cap [353, 354]. Els productes de la glicòlisi són més endavant metabolitzats a través de la fosforil·lació oxidativa (respiració) a la peça intermèdia per produir ATP addicional [353], essent molt més operativa durant la hiperactivació [255]. Com que la GLUT3 es localitza a la membrana plasmàtica, la pobra reactivitat que presenta després de la criopreservació es va relacionar el 2007 amb la pèrdua de fragments de membrana durant el procés [294]. D'altra banda, l'acumulació de lactat que té lloc després de la ruptura de la membrana frena l'entrada de glucosa a l'espermatozoide [258, 355] i, per tant, també podria alterar la reactivitat contra la GLUT3. S'ha de dir que, malgrat les restriccions de glucosa, el metabolisme de l'espermatozoide criopreservat no queda completament arrestat, tal i com es veu pels valors de motilitat presos en aquest punt (ARTICLE II). Se sap que l'espermatozoide també pot obtenir recursos energètics mobilitzant substrats endògens [356, 357].

La proteïna citosòlica HSP90AA1 és fosforil·lada durant la capacitació [284, 297] i inhibida en l'apoptosi [358], localitzant-se en la regió acrosomal, al llarg de la cua i en gotes citoplasmàtiques, tal com es va descriure el 2008 [298]. En l'assaig de l'ARTICLE II s'ha observat reactivitat contra la proteïna també en cues doblegades i enrotllades, suggerint una possible funció addicional en la regulació de la motilitat en l'espermatozoide madur equivalent a la descrita en l'immadur [298, 359]. D'altra banda, certa quantitat de proteïna podria perdre's cap al medi extracel·lular degut als danys ocasionats en la membrana durant la criopreservació, com suggereixen Huang i col. el 1999 [317].

L'enzim citosòlic Cu/ZnSOD es localitza a l'acrosoma i al llarg de la cua, tal com es va veure el 2008 [272], però la reactivitat és particularment forta a la peça intermèdia, tal com es discuteix a l'ARTICLE II. Aquesta distribució concorda amb la seva hipotètica funció en la regulació dels ROS produïts per fosforil·lació oxidativa des de les mitocondries, donat que se suggereix que el manteniment de l'equilibri en els nivells de ROS durant la capacitació col·labora en l'activació de la motilitat [279, 280]. Durant la criocapacitació, la proteïna Cu/ZnSOD podria igualment participar en l'eliminació dels ROS patològicament alliberats a causa de l'obertura de porus mitocondrials [258]. En espermatozoides porcins capacitats, la Cu/ZnSOD disminueix la seva expressió i desapareix en l'acrosoma en comparació amb espermatozoides porcins no capacitats [272], fet que suposadament es produeix en paral·lel a la reacció acrosomal. De manera comparable, existeix en l'esperma humana certa pèrdua de la Cu/ZnSOD des del citosol cap al medi extracel·lular degut a la disrupció de la membrana durant la criopreservació [360], com s'ha discutit per la GLUT3 i la HSP90AA1.



Finalment, els resultats de l'**ARTICLE II** posen en evidència danys en la superfície espermàtica degut tant a la congelació com al protocol d'immunomarcatge. Aquestes alteracions podrien haver emmascarat diferències entre GFEs i PFEs en la reactivitat de les tres proteïnes sota microscopi, havent-hi també altres autors que incideixen en aquest problema d'interpretació de resultats [237, 361]. Per resoldre aquesta qüestió s'ha considerat necessari realitzar anàlisis addicionals sobre l'expressió de les proteïnes. Així com l'immunomarcatge per microscòpia és una anàlisi qualitativa, l'immunomarcatge per transferència western és una anàlisi quantitativa amb major resolució per detectar diferències en l'expressió proteica. Per evitar confusions, s'ha utilitzat el terme "reactivitat" en referència als assajos microscòpics sobre les proteïnes, mentre que el terme "expressió" serà emprat per definir els resultats de la transferència western.

L'assaig de l'**ARTICLE III** té per objectiu quantificar, per transferència western, l'expressió de les tres proteïnes en semen refrigerat, als 5°C i en esperma criopreservada (als 240 min postdescongelació), tant en ejaculacions GFEs com en PFEs, amb la finalitat de predir la congelabilitat de les ejaculacions. També s'han dut a terme anàlisis de motilitat espermàtica. Encara que els índexs LIN i STR prediuen, d'acord amb l'**ARTICLE II**, al voltant del 70% de la supervivència espermàtica postdescongelació, en analitzar-los als 5°C, aquests no han evidenciat diferències entre GFEs i PFEs a aquesta temperatura, tot verificant que la seva confiança en la predicció no és del 100%. Tal confirmació remarca la necessitat de desenvolupar tests en semen refrigerat que permetin la selecció de les GFEs, mentre es realitza en paral·lel l'anàlisi dels paràmetres convencionals de qualitat espermàtica. L'**ARTICLE III** mostra resultats significants al respecte.

En l'**ARTICLE III** es proposa que les ejaculacions PFEs podrien ser menys resistents al xoc per fred que les GFEs, en part per un contingut menor d'HSP90AA1 en semen refrigerat i als 5°C. La proteïna té l'habilitat de contrarestar un ampli espectre de factors estressants que afecten els espermatozoides de mamífers (e.g. el gen *HSP90AA1* és sobrerregulat en les cèl·lules oviductals porcines per mantenir la supervivència dels espermatozoides després de la munta [362] i es coneix que l'expressió de la proteïna s'incrementa en homes que pateixen oligozoospermia [363]). La major quantitat d'HSP90AA1 en les ejaculacions porcines GFEs, en comparació amb les ejaculacions PFEs en semen refrigerat i als 5°C, podria tenir la funció d'interferir en l'estrès induït durant el xoc per fred. L'agut estrès provocat a les ejaculacions PFEs durant la criopreservació es confirma per la significativament elevada expressió de la proteïna Cu/ZnSOD en els seus espermatozoides criopreservats, en comparació amb els de les ejaculacions GFEs, tal i com s'exposa a l'**ARTICLE III**. Aquest resultat és afí als nivells de criocapacitació de les ejaculacions PFEs descrits a l'**ARTICLE II** i estaria presumptament relacionat amb una fosforil·lació superior de la Cu/ZnSOD en les ejaculacions PFEs durant la criocapacitació, tal com recentment s'ha observat l'increment de fosforil·lacions durant la capacitació de l'esperma porcina [255]. En contrast, però, la Cu/ZnSOD no es troba entre les

proteïnes que són diana de les fosforil·lacions durant la capacitació real perquè la seva expressió disminueix després d'aquest procés [272], suggerint que els nivells d'estrès i la seva regulació no són idèntics entre la criocapacitació i la capacitació real.

A diferència dels resultats de la HSP90AA1, en l'assaig de l'**ARTICLE III** no s'han trobat variacions significatives entre les ejaculacions GFEs i les PFEs en relació a l'expressió de la GLUT3 i la Cu/ZnSOD en semen refrigerat. No obstant, no s'ha descartat que les dues proteïnes puguin tenir funcions durant el xoc per fred, ja que ambdues tenen tendència a augmentar en el semen refrigerat de les ejaculacions PFEs, com es pot veure en els gràfics. La falta de significació estadística d'aquesta tendència està llargament discutida a l'article, així com també si la seva expressió podria respondre a una sensibilitat major de les ejaculacions PFEs a l'emmagatzematge en refrigeració i a una composició determinada del seu plasma seminal. La hipòtesi es recolza en les diferències, confirmades el 2007, en la composició del plasma seminal entre ejaculacions amb diferent congelabilitat [310] encara que, avui dia, no es coneixen quins són els components d'efectes crioprotectors.

En conclusió, la HSP90AA1 pot desenvolupar-se com a marcador molecular del xoc per fred en esperma porcina, mentre que les subtils diferències obtingudes per les proteïnes GLUT3 i Cu/ZnSOD entre ejaculacions GFEs i PFEs en semen refrigerat comprometen el desenvolupament d'ambdues com a predictor de la congelabilitat. La continuació de recerques dins la línia de l'**ARTICLE III** promet trobar nous predictors de congelabilitat en esperma porcina, com la HSP90AA1. A l'apèndix de la present tesi s'exposen suggerències sobre possibles candidats d'estudi.

El propòsit de l'**ARTICLE III** és comparar els nivells d'expressió proteica entre GFEs i PFEs però no entre els diferents passos de criopreservació. No obstant, els nivells d'expressió del control intern d'alfa tubulina semblen haver incrementat inesperadament després de la criopreservació, suggerint la possibilitat que la intensificació de les taques de tubulina podria relacionar-se amb canvis de l'expressió de la tubulina i no sols amb la quantitat de proteïna carregada als pouets. La regulació de l'expressió de tubulina en les pròpies cèl·lules està exemplificada en moltes publicacions. Per exemple, una porció significativa de la proteïna HSP90AA1, reguladora de l'estrès cel·lular, s'associa amb un complex de tubulina, tant al citosol de fibroblasts de ratolí com en cèl·lules epitelials intactes de ronyó de marsupial (Sánchez i col., 1988 [364]). Es proposa també que els epítops de tubulina podrien ser biomarcadors útils de l'estat patològic de l'esperma humana (Peknicova i col., 2007 [365]), en la qual la tubulina disminueix després de la capacitació (Secciani i col., 2009 [366]). Per tot plegat, es diu que la tubulina es troba relacionada amb l'estrès cel·lular (Choi et al., 2008 [272]) i, per aquesta raó, la seva expressió es podria associar també al xoc per fred. L'increment de tubulina podria indicar, d'altra banda, la presència de restes cel·lulars de rovell d'ou provinents del medi de criopreservació, però els rentats de la mostra abans de l'electroforesi fan que sigui



una possibilitat remota. La qüestió no ha estat discutida a l'article perquè no interfereix en els resultats però l'haurien de tenir en compte estudis posteriors sobre criopreservació que utilitzin estàndards de tubulina. Aquests estudis també haurien de considerar la degradació d'algunes proteïnes en les mostres d'esperma criopreservada ja que n'afecten l'expressió, i també que l'expressió d'aquestes depèn de la seva extracció eficient (e.g. condicions de sonicació òptimes [367]) la qual ha de ser homogènia entre mostres per no invalidar les comparacions.

La present tesi mostra com un coneixement general de la fisiologia de l'espermatozoide a través d'estudis multiparamètrics (i.e. anàlisis moleculars i de paràmetres convencionals de qualitat espermàtica), ajuda en el propòsit de predir els resultats de congelació d'una ejaculació donada, abolint finalment els efectes perjudicials de les ejaculacions PFEs sobre la fertilitat, amb independència del protocol de criopreservació que s'utilitzi. Al mateix temps, una millor comprensió de les diferències que determinen la resistència de les ejaculacions al xoc per fred, ajudaria en el disseny de nous diluents per contrarestar els factors responsables de la seva mala congelabilitat.



Conclusions Generals

De l'objectiu 1

1. La pertinença de les ejaculacions porcines al grup de GFEs o PFEs no interfereix en els paràmetres de fertilitat en les inseminacions realitzades amb semen refrigerat i post-CAI, però sí en les inseminacions realitzades amb esperma criopreservada i post-CAI.
2. L'esperma porcina criopreservada amb motilitat progressiva i integritat de membrana in vitro iguals o superiors al 40% (ejaculacions GFEs), és dues vegades més favorable a produir un embaràs que l'esperma criopreservada amb els dos paràmetres per sota d'aquest percentatge (ejaculacions PFEs), no trobant-se afectat el número de parts. No obstant, l'esperma criopreservada de les ejaculacions PFEs provoca tres vegades menys parts que el semen refrigerat. La congelabilitat de l'esperma porcina no influeix en la mida de la garrinada, expressada com a número de garrins nascuts vius o com a número total de garrins nascuts.

De l'objectiu 2

3. L'eficiència de la post-CAI en porcí es manté en utilitzar esperma criopreservada, tant si és procedent d'ejaculacions GFEs com d'ejaculacions PFEs, ja que el risc de reflux no varia en comparació amb el risc que mostra el semen refrigerat i, també, perquè les probabilitats de sagnat i resistència per part de la truja són baixes (menys de l'1% i el 3%, respectivament), sigui quina sigui la procedència de l'esperma.

4. La fertilitat obtinguda mitjançant post-CAI amb esperma criopreservada d'ejaculacions GFEs (61.54% de taxa d'embarassos i 53.85% de taxa de parts) necessita ser incrementada en posteriors assajos. Aquestes proves han d'encaminar-se, especialment, cap a la consecució de dosis d'esperma criopreservada de menor volum i concentració que les assajades en la present tesi (30 ml i 7.5×10^9 spz -15 palletes de 0.5 ml- amb doble inseminació).


De l'objectiu 3

5. Els índexs de motilitat espermàtica LIN (linearitat) i STR (rectitud) prediuen, amb una fiabilitat del 72%, la congelabilitat de les ejaculacions porcines, en ser analitzats conjuntament després de 30 min a 5°C durant el procés de criopreservació espermàtica. Els percentatges de LIN i STR, en aquest punt del procés, es troben per sobre el 40% i el 60%, respectivament, en les ejaculacions GFEs, indicant alhora una major criocapacitació en les ejaculacions PFEs durant el xoc per fred (d'acord amb la definició de moviment hiperactivat en espermatozoides capacitats in vitro).
6. L'immunomarcatge en esperma porcina, en termes de localització i reactivitat sota el microscopi, de la proteïna transmembrana transportadora de glucosa membre número 3 de la família 2 (SLC2A3, àlies GLUT3), de la proteïna citosòlica de xoc per calor de 90 KDa alfa A1 (HSP90AA1) i de l'enzim citosòlic superòxid dismutassa de coure i zinc (Cu/ZnSOD), no és útil per predir la congelabilitat de les ejaculacions porcines. En aquest sentit, no s'han trobat diferències en cap de les tres proteïnes entre les ejaculacions GFEs i PFEs, ni als 17°C ni als 240 min postdescongelació.
7. La menor reactivitat contra les tres proteïnes en esperma criopreservada, en comparació amb el semen refrigerat, mostra lesions concomitants del procés de criopreservació i del protocol d'immunomarcatge, les quals afecten l'estructura de l'espermatozoide porcí i les proteïnes que conté. Les alteracions estructurals són, particularment, severes a la regió acrosomal, observant-se tumefacció de la vora apical en alguns espermatozoides. En contrast amb el que succeeix en la reactivitat, la localització de les tres proteïnes no canvia després de la congelació i es relaciona amb les seves corresponents funcions en el metabolisme de l'esperma porcina. També s'ha trobat reactivitat contra la HSP90AA1 en cues doblegades i enrotllades, i contra la Cu/ZnSOD en la peça intermèdia, suggerint possibles funcions en la regulació de la motilitat espermàtica i dels nivells de ROS, respectivament.

De l'objectiu 4

8. L'expressió de la GLUT3, la HSP90AA1 i la Cu/ZnSOD, analitzada per transferència western en esperma porcina, és més resolutiva que les observacions de reactivitat proteica sota el microscopi. Les subtils diferències entre ejaculacions GFEs i PFEs, respecte l'expressió de les proteïnes GLUT3 i Cu/ZnSOD en semen refrigerat, comprometen el futur desenvolupament d'ambdues proteïnes com a predictores de la congelabilitat; malgrat això, l'expressió de la Cu/ZnSOD als 240 min postdescongelació es relaciona amb la major criocapacitació de les ejaculacions PFEs. La HSP90AA1 es pot desenvolupar com a marcador molecular en esperma per la predicció de la congelabilitat en les ejaculacions porcines, pel fet que s'expressa en major grau en les ejaculacions GFEs, tant als 17°C com als 5°C durant la criopreservació.



irona, maig de 2010



Cryopreserved Criopreservació BOAR SPERM



Universitat de Girona
2010



Parc Científic i Tecnològic
Universitat de Girona

Departament de Biologia
i
Institut de Tecnologia
Agroalimentària (INTEA)

