



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Criopreservación Espermática en la Especie
Porcina: Optimización de la Técnica

D^a María José Martínez Alborcia

2014



**TESIS DOCTORAL POR
COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

TESIS DOCTORAL POR
COMPENDIO DE PUBLICACIONES



1. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. PLoS One. 2012; 7(5):e36550.

2. Dead spermatozoa in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa. Roca J, Martinez-Alborcia MJ, Gil MA, Parrilla I, Martinez EA. Fertil Steril. 2013; 100(3):875-81.

3. Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing. Martinez-Alborcia MJ, Morrell JM, Parrilla I, Barranco I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. Theriogenology. 2012; Sep 15; 78(5):1117-25.

4. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. Martinez-Alborcia MJ, Morrell JM, Gil MA, Barranco I, Maside C, Alkmin DV, Parrilla I, Martinez EA, Roca J. Anim Reprod Sci. 2013; Aug;140(3-4):173-9

*Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria
Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum"
Universidad de Murcia*

*Este trabajo ha sido financiado por
Grupo de Excelencia de la Fundación Séneca
(04543/GERM/07)
y la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología
(CICYT-Ganadería, AGL2008-04127)*

A mis padres, mi abuela y Alberto



**ACKNOWLEDGEMENTS /
AGRADECIMIENTOS**

AGRADECIMIENTOS



Esta Tesis Doctoral es el fruto de la participación tanto directa como indirecta de un gran grupo de personas al cuál quisiera agradecer sinceramente todo el apoyo recibido durante todo este tiempo. Espero poder expresar todo mi agradecimiento a todos ellos a través de las palabras que escribiré a continuación.

En primer lugar quisiera agradecer a mi director de Tesis, el Dr. Jordi Roca, la confianza que depositó en mí al permitirme formar parte de su equipo. Sus consejos han sido una guía en los momentos difíciles y una gran fuente de aprendizaje. Todas sus enseñanzas las llevo guardadas y me acompañan a diario en mi andadura profesional y personal. Ha sido un placer haber trabajado juntos durante este tiempo. Gracias.

A mi directora de Tesis, la Dra. Inmaculada Parrilla. Por su dedicación y sus consejos. Porque es un ejemplo de esfuerzo, sacrificio y amor por su trabajo. Porque nos enseña que con tesón se puede alcanzar lo que se desea. A veces la vida nos pone a prueba y las circunstancias desfavorables cambian nuestros planes. Ella me ha enseñado que no debemos rendirnos, que hay que luchar, siempre, hasta el final.

Al Dr. Emilio Martínez. Un ejemplo de liderazgo, profesionalidad y de saber hacer. Sus consejos y las palabras justas en el momento oportuno no solo fueron una gran ayuda en determinados momentos, sino una lección para la vida.

Al Dr. Juan María Vázquez. Por permitirme formar parte de este grupo y por estar presente incluso cuando sus obligaciones no le permiten estarlo.

A las Dras. María Antonia Gil, Xiomara Lucas y Cristina Cuello. Todas ellas un ejemplo de grandes mujeres capaces de compaginar su vida personal con brillantes carreras profesionales. Gracias por su ayuda, consejos y apoyo en los momentos difíciles.

A mis compañeros de Departamento, Miguel, Jesús, David, Diego, Jonatan, Tati, Carmen, Cristina Patiño, Isabel, Cristina Martínez, Alicia, y los que una vez formaron parte de este equipo, Sonia y Toñi Murcia. Gracias por vuestra ayuda, alegría, compañía y sobre todo por vuestra amistad.

A Lola y Tania. Vosotras que estuvisteis en mis principios. Sufristeis mis penas y me acompañasteis en mis alegrías. Gracias por vuestra amistad y por saber sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba.

A los alumnos de máster, Nayeli, Gerard, Anthony, Ricardo, Erika. Gracias por vuestra ayuda y por enriquecer mi vida.

A la Fundación Séneca, por el respaldo financiero y a la empresa AIM Ibérica por facilitarme el material biológico sin el cual no habría sido posible realizar este trabajo, y muy especialmente al equipo del CIA Calasparra por su excelente predisposición a brindarme su ayuda siempre que fuese necesario.

A Alfonso Bolarín, mi tutor de empresa, por confiar en mi capacidad y por brindarme la oportunidad de formar parte del equipo de AIM Ibérica. Gracias por el tiempo dedicado y todos los buenos consejos y enseñanzas.

A la Dra. Dagmar Waberski. Por la acogida, el apoyo y los medios facilitados durante mis estancias en la Universidad de Hannover. A todo el equipo del Departamento de Reproducción Animal de la Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo) por hacerme sentir como en casa durante esos tres meses fríos de invierno.

A la Dra. Jane Morrell por su participación en la lectura crítica de los artículos y por facilitarnos el coloide sin el cual no habría sido posible la realización de esta Tesis.

A Hadeel, casi mi hermana. Compartir malos momentos crea lazos entre las personas. Afortunadamente, los buenos momentos también. Gracias por estos últimos.

A mi familia y amigos. Gracias por apoyarme y demostrarme que siempre puedo contar con vosotros aunque no os preste la atención que merecéis al tratar de perseguir mi sueño.

A mis suegros, por su ayuda y su apoyo durante todos estos años y acogerme como a una hija.

A mis padres. ¿Qué puede haber que no deba agradecerle a ellos? Gracias por su confianza y por su apoyo constante. Jamás tendré palabras que expresen todo el agradecimiento que siento por el sacrificio que han hecho para que hoy pueda estar escribiendo esta Tesis. Gracias a ellos soy quien soy y lo que soy. Tan solo espero que puedan sentirse tan orgullosos de mí como yo lo estoy de ellos.

A Alberto. Gracias por tu paciencia y por soportar mis ausencias. Eres el pilar que me sostiene y el que me da fuerzas para enfrentarme al día a día. No imagino cómo habría sido hacer esta andadura sin tu ayuda como tampoco imagino seguir el camino de la vida sin tu compañía.

Debido a todo lo aprendido de todos los que habéis estado presentes en esta etapa de mi vida, la termino siendo una persona diferente y dispuesta a afrontar los nuevos retos que me depara la vida con fuerza y optimismo. De nuevo gracias.

“Las ciencias aplicadas no existen, sólo las aplicaciones de la ciencia”*Louis Pasteur (1822-1895)*

.....

“Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores”
Julius Robert Oppenheimer (1904-1967)

INDEX/ÍNDICE



Extended summary/Resumen General	25
References/Referencias	57
Articles/Artículos	
1- <i>Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate.</i>	63
2- <i>Dead spermatozoa in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa</i>	75
3- <i>Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing</i>	85
4- <i>Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-p in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa</i>	97
Graphic Appendix/Apéndice gráfico	107
Appendix/Apéndice	115



**EXTENDED SUMMARY/
RESUMEN GENERAL**

EXTENDED SUMMARY

..... ●

Artificial insemination (AI) is extensively used by swine producers worldwide, playing a pivotal role in the improvement of herd productivity. Ideally, swine AI programs should use frozen-thawed (FT) sperm, given its additional advantages compared to liquid-stored semen, particularly those concerning international trade and biosecurity (Bailey et al., 2008). However, FT-sperm are infrequently used in commercial swine AI programs because of their lower efficiency with respect to liquid-stored semen (Grossfeld et al., 2008; Roca et al., 2011); more FT-spermatozoa are required per AI dose to achieve typically lower fertility outcomes (Rath et al., 2009). The biological reason for the large number of spermatozoa required per AI dose is related to the high cryosensitivity of boar spermatozoa; no more than 50 % of sperm survive cryopreservation (Roca et al., 2006). In addition, the spermatozoa that survive the cryopreservation process exhibit an impaired and shortened functional lifespan (Maxwell and Johnson 1997). Consequently, survivor FT-sperm exhibit difficulties in reaching the utero-tubal junction and fertilising the oocytes once deposited into the genital tract of the sow. Accordingly, despite the improvements made in current cryopreservation protocols (Rath et al., 2009), it is clear that more research is needed to optimise the cryopreservation protocols for boar spermatozoa to enable the more efficient application of FT-sperm in the AI-programs of the swine industry.

In addition to the particular sensitivity of boar spermatozoa to the freezing and thawing process (Watson, 2000), other factors, such as the individual boar's physiology and seminal attributes of the ejaculate as well as the sperm handling during cryopreservation, contribute to the success of sperm cryopreservation (Thurston et al., 2002; Holt et al., 2005; Hernandez et al., 2007). With respect to the seminal attributes of ejaculate, their relationship with the capability of spermatozoa to survive the cryopreservation process remains controversial (Roca et al., 2006; Cerolini et al., 2001). Boar ejaculates contain dead and morphologically or structurally damaged spermatozoa, which together make up a subpopulation of non-functional

spermatozoa whose proportion differs among boars and among ejaculates for each boar. Therefore, it is a common practice to select for cryopreservation only ejaculates exhibiting a low proportion of non-functional spermatozoa to improve the efficiency of the cryopreservation protocol (Roca et al., 2006), although the effectiveness of this selection criterion has not yet been scientifically proven. Nonetheless, it is clear that this selection criterion reduces the number of ejaculates accepted for cryopreservation, resulting in many ejaculates being discarded, including some from genetically valuable boars.

A large proportion of non-functional sperm in the ejaculate has been associated with the impairment of oocyte fertility, poor embryo quality and suboptimal pregnancy rates (Aitken and Sawyer 2003). As observed in other mammalian species, such as bovine (Upreti et al., 1998), non-functional spermatozoa present in semen samples are a source of reactive oxygen species (ROS), which attack the sperm membrane lipids, leading to the initiation of the lipid peroxidation (LPO) cascade. Boar spermatozoa are particularly sensitive to LPO because of the high content of unsaturated fatty acids in their plasma membrane (Cerolini et al., 2001). It is therefore likely that the non-functional sperm subpopulation could negatively influence the cryopreservation of the functional sperm subpopulation in boar. However, to the best of our knowledge, no specific studies have evaluated whether non-functional spermatozoa present in the semen samples before freezing influence the cryopreservation of functional spermatozoa. Knowing whether non-functional sperm negatively influence the cryopreservation of functional sperm and, if it is the case, determining the nature of the injury sustained by the functional sperm could be helpful to design strategies to minimise or avoid this negative effect, which would improve the efficiency of cryopreservation protocols without the need to discarding ejaculates from valuable boars.

According to the above background, the aim of the first experiment was to evaluate the impact of the non-functional sperm subpopulations present in the semen sample on the capability of functional spermatozoa to withstand the cryopreservation process (**PlosOne 2012, 7:e36550**). To achieve this objective, we developed an experimental approach in which semen samples with known different proportions of induced non-functional sperm were cryopreserved, and the quality and functionality of cryosurvival spermatozoa evaluated. Fifteen sperm-rich ejaculate fractions (SREFs) were collected

using the gloved-hand method from 5 fertile boars (3 SREFs per boar), and the SREFs were divided into 2 aliquots: A and B. Aliquot A remained untreated (native semen sample). Aliquot B was used to generate the population of induced non-functional spermatozoa by freeze-thaw cycles in the absence of a cryoprotectant, thereby mimicking the damaging effects undergone by those spermatozoa unable to sustain and adapt to the thermo-physical stresses associated with the freezing and thawing process. For this purpose, 15-mL tubes of SREF were immersed in liquid nitrogen for 9 min and immediately heated at 80 °C in a water bath for 3 min until the sample reached 35-36 °C. This procedure was repeated three times to ensure that no spermatozoa remained viable. Mixing aliquots A and B in different proportions then generated four different semen samples. The first semen sample included only aliquot A (native semen sample). To generate the other three semen samples, aliquots A and B were mixed to obtain 25, 50 and 75 % non-functional spermatozoa. Thereafter, the resulting semen samples were stored at 17 °C for 16 h and were frozen using the standard 0.5-mL straw freezing procedure described by Hernandez et al. (2007). Briefly, sperm pellets were diluted in Tris-glucose-citric acid-egg yolk (FE) extender to 1.5×10^9 cells/mL. After cooling to 5 °C for 120 min, the extended sperm cells were diluted with FE-glycerol-Equex extender (89.5 % FE + 1.5 % Equex STM and 9 % glycerol) to a final concentration of 1×10^9 cells/mL. The spermatozoa were then packed into 0.5-mL polyvinyl chloride (PVC) French straws and frozen using a controlled-rate freezing machine to -5 °C at a rate of 6 °C/min and from -5 °C to -80 °C at a rate of 40 °C/min, held for 30 s at -80 °C, further cooled to -150 °C at a rate of 70 °C/min and then plunged into liquid nitrogen for storage at -196 °C. The straws remained in liquid nitrogen for at least 1 week before thawing, which was performed in a circulating water bath at 37 °C for 20 s. The thawed semen samples were diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS; 1:1 v/v) and incubated at 37 °C for 30 min, at which point sperm quality and functionality were evaluated. Sperm quality was assessed according to motility and viability and functionality in terms of plasma membrane fluidity and intracellular ROS production under capacitating conditions. Each of these assessments, except motility, which was evaluated using a computer-assisted analysis (CASA), were performed by flow cytometry. In addition, the membrane lipid peroxidation (LPO) was also evaluated by the indirect measurement of the generation of malondialdehyde (MDA) using the BIOXYTECH MDA-586 Assay Kit. The percentage of viable sperm was evaluated by simultaneous assessment of plasma and acrosomal membrane integrity after staining

with Hoechst 33342 (H-42), propidium iodide (PI) and fluorescein-conjugated peanut agglutinin (PNA). The fluidity of the sperm plasma membrane was assessed using a triple fluorescent procedure, including H-42, Merocyanine 540 (M-540) and Yo-Pro-1. The intracellular generation of ROS was measured using 5-(and-6)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H₂DCFDA) following the procedure described by Guthrie and Welch (2006).

The percentages of motile and viable spermatozoa after thawing from each semen sample were normalised to the values obtained before freezing (initial semen traits). The data were analysed as a split-plot design by using a mixed linear analysis of variance ANOVA that included the fixed effects of the boar and semen sample (native, 25, 50 and 75 % non-functional spermatozoa) within each boar, with the random effect of replicates (SPSS, version 15 software; SPSS Inc., Chicago, IL). The results demonstrated that the normalised post-thaw sperm motility and viability decreased ($p < 0.01$) as the proportion of functional spermatozoa in the semen samples before freezing decreased, irrespective of the semen donor. However, the magnitude of the effect differed ($p < 0.01$) among boars. In addition, semen samples with the largest non-functional sperm proportion before freezing exhibited the highest ($p < 0.01$) levels of MDA after thawing. The functionality of the thawed viable spermatozoa was different between the semen samples with the highest and the lowest proportion of non-functional spermatozoa before freezing, with the highest ($p < 0.01$) generation of intracellular ROS and increased ($p < 0.01$) membrane fluidity from the viable sperm from samples with the largest proportion of non-functional spermatozoa. These findings indicate that non-functional spermatozoa in the semen samples before freezing negatively influence the cryopreservation of functional spermatozoa. This negative influence is evident not only by the reduced proportion of recovered functional spermatozoa after thawing but also by the altered functionality of the sperm that survive the cryopreservation process. This fact could have additional detrimental effects on the fertilisation ability of FT-sperm.

If the presence of non-functional sperm in raw semen samples causes dysfunctions in the cryosurviving spermatozoa, it is feasible to hypothesise that a large population of non-functional sperm in raw semen samples also affect the fertilising ability of FT-sperm. In this context, it is well known that cryosurviving spermatozoa result in poorer fertility outcomes compared with liquid-stored spermatozoa when used in AI programs

(Roca et al., 2011). Therefore, a second experiment was performed to elucidate whether non-functional spermatozoa present in raw semen samples before and during freezing influence the *in vitro* fertilising (IVF) ability of cryosurvival spermatozoa (Fertility & Sterility 2013, 100:875-881). Using the same experimental approach as the previous experiment, 4 sperm semen samples with different proportions of induced non-functional sperm were also prepared: native semen sample (< 10 %) and 25 %, 50 %, and 75 %. The accuracy of these proportions was tested by flow cytometry, and the semen samples from 15 ejaculates were cryopreserved following the protocol indicated above. After thawing, the semen samples were centrifuged with PorciPure™ Bottom Layer (600 xg for 20 min). After diluting the sperm pellets in BTS and after a second centrifugation (300 xg for 10 min), the sperm concentration (measured using a Nucleocounter-SP100, ChemoMetec, A/S) and viability (as indicated in the previous experiment) of each sperm pellet were assessed to calculate the total viable sperm count in each semen sample. The functionality of the spermatozoa, in terms of intracellular ROS generation and nuclear DNA fragmentation, was assessed before and after the PorciPure™ centrifugation gradient in sperm samples incubated under capacitating conditions (diluted in modified Tris-buffered basal medium; mTBM at a concentration of 20×10^6 cells/mL and incubated for 15 min in the dark at 39 °C under an atmosphere of 5 % (v/v) CO₂ and 100 % (v/v) humidity; Caballero et al., 2009). Intracellular ROS generation was evaluated as in the previous experiment, and nuclear DNA fragmentation was evaluated using a commercial variant of the sperm chromatin dispersion test (Sperm-Sus-Halomax®, Halotech DNA SL) following the procedure described by Enciso et al. (2006) and the manufacturer's instructions. The IVF ability of cryosurviving spermatozoa was assessed following the procedure described by Gil et al. (2003) and according to oocyte fertilisation (two pronuclei and a sperm tail inside of the ooplasm) and embryo development. A total of 1,041 *in vitro*-matured oocytes were inseminated using a fixed number of PorciPure™-purified viable spermatozoa (viable sperm: oocyte ratio of 300:1), regardless of the differing percentages among the 4 semen samples (native, 25 %, 50 %, and 75 % non-functional spermatozoa). To evaluate oocyte fertilisation, a random subset of putative fertilised oocytes were mounted onto slides at 18 h after IVF, fixed for 48–72 h in 25 % (v/v) acetic acid in ethanol at room temperature, stained with 1 % lacmoid in 45 % (v/v) acetic acid and examined under a phase contrast microscope at 400 x magnification. Embryo development was evaluated at 2 and 7 days after insemination using a stereomicroscope to assess

the cleavage rate (percentage of oocytes divided to 2–4 cells/total putative zygotes cultivated) and blastocyst formation (percentage of blastocyst/total putative zygotes cultivated), respectively. The total cell number of the resulting blastocysts was evaluated by staining the blastocysts with Vectashield containing 10 mg/mL H-42. The data were statistically analysed (IBM SPSS Statistics 19, SPSS Inc.) as a split-plot design using a mixed linear ANOVA that included the fixed effects of semen sample (native, 25 %, 50 %, and 75 % non-functional spermatozoa) and gradient centrifugation (only for the sperm functionality assessments) and the random effect of replicates.

The results reveal that high proportions of non-functional spermatozoa in raw semen samples before and during freezing increased ($p < 0.001$) intracellular ROS generation and the percentage of spermatozoa exhibiting nuclear DNA fragmentation after thawing. The proportion of non-functional spermatozoa in the raw semen sample before and during freezing also influenced ($p < 0.01$) the IVF outcomes of cryosurviving sperm, even though the number of viable FT-sperm used for IVF was the same in the four semen samples (native, 25 %, 50 %, and 75 % non-functional spermatozoa). The FT-sperm from semen samples with 50 % and 75 % non-functional spermatozoa exhibited lower fertilisation ability ($p < 0.01$) than the native and 25 % non-functional spermatozoa samples. Similarly, the cleavage rates and blastocyst development were also lower ($p < 0.01$) in the FT-sperm from the semen samples with 50 % and 75 % non-functional spermatozoa than those from the native and 25 % non-functional spermatozoa samples. The total number of cells in the *in vitro*-cultured blastocysts was not affected by the proportion of non-functional spermatozoa in the semen samples before freezing. These results indicate that the population of non-functional spermatozoa in raw semen samples before and during freezing negatively influences the IVF outcomes of cryosurviving spermatozoa. This process appears to be mediated by the excessive endogenous ROS generation in the cryosurviving sperm. Accordingly, a portion of the observed variability among donors, semen samples, and even assays in the IVF outcomes of FT-sperm could be related to the proportion of non-functional spermatozoa present in raw semen samples.

Because the non-functional sperm subpopulation in the semen sample negatively influences the functionality and fertilising ability of cryosurviving sperm, the removal of non-functional sperm from semen samples before freezing could be useful to improve the

efficiency of cryopreservation. Several sperm selection techniques, such as migration-sedimentation, glass wool filtration and colloid centrifugation, permit the selection of higher-quality spermatozoa from the rest of the ejaculate (Morrell and Rodriguez-Martinez, 2011). To date, filtration using either Sephadex columns or glass wool filters has been the most commonly used procedure. Filtration is effective in improving sperm quality in terms of the morphology and viability of substandard semen samples. However, filtration procedures significantly reduced the concentration of recovered spermatozoa, achieving mean recovery yields under 35 % (Morrell and Rodriguez-Martinez, 2011). Although a significant reduction in the number of spermatozoa recovered after the selection process is usual (Rodriguez-Martinez et al., 1997), greater sperm recovery rates are needed to implement this or another sperm selection technique as a routine procedure at the pig AI-centres, because the overall improvement in sperm quality does not compensate for sperm losses due to the selection process. Furthermore, these sperm selection techniques are not suitable for practical use in preparing sperm doses for animal AI because they are time-consuming and only work well with small volumes of semen, being impractical to process the ejaculates of farm animals with large volumes of ejaculates, such as boar. Recently, a more versatile colloid technique has been developed to work with large volumes of semen. The so-called single-layer centrifugation (SLC) is effective in selecting the best sperm subpopulation from larger volumes of boar ejaculate (Morrell and Wallgren, 2011) and could therefore be effective in removing the non-functional sperm subpopulation from boar semen samples before freezing, thereby improving the cryopreservation of the boar ejaculates.

Therefore, the aim of the third experimental study was to evaluate the cryopreservation of boar spermatozoa selected using SLC prior to freezing (**Theriogenology 2012, 78:1117-1125**). In the experiment, the initial semen traits of the ejaculates were considered to identify differences in the response to SLC among standard or substandard ejaculates. In addition, a hypothetical influence of SLC-selection in the functionality of FT-recovered spermatozoa was evaluated in semen samples exposed to *in vitro* capacitation conditions. The experimental approach contemplated 24 SREFs collected from 24 boars (1 per boar), which were divided into 2 groups according to their initial semen traits (sperm concentration, morphology, motility and viability): standard (n = 15) and substandard (n = 9). Sperm morphology, defined as the proportion of sperm with normal morphology, was assessed by counting

200 spermatozoa under a phase-contrast microscope (at a magnification of 400 x) from semen samples fixed in buffered 2 % formaldehyde solution. Sperm concentration, motility and viability were assessed as described in the first experiment. Semen samples from each SREF were split in 2 aliquots; one remained untreated (control samples), and the other was single-layer centrifuged using Androcoll-P-Large® (SLC samples). The procedure used for SLC was a modification of the procedure described by Van Wiene et al. (2011). Briefly, 15 mL of Androcoll-P-Large® was poured into a 50-mL Falcon centrifuge tube, and 15 mL of the extended SREF containing 100×10^6 spermatozoa/mL was pipetted carefully on top. Following centrifugation at 500 xg for 20 min at room temperature, the sperm concentration, morphology, motility and viability of the sperm pellet were measured to calculate the yield of the SLC procedure. Four of the 24 SLC-samples were discarded before freezing because the total number of spermatozoa recovered was less than 1×10^9 (minimum number of sperm necessary to freeze). A total of 20 control and SLC-treated semen samples were cryopreserved using the protocol detailed in the first experiment. Sperm motility, viability and functionality, in terms of plasma membrane fluidity and intracellular ROS generation, were assessed at 30 and 150 min post-thawing following the procedures described previously. The generation of MDA, as indicated in the first experiment, was measured at 30 min post-thawing. Statistical analyses were performed using SPSS Version 15 (SPSS, Chicago, IL). A two-step cluster procedure was performed to classify the 24 diluted SREF into 2 groups (standard or substandard) according to their initial ejaculate traits (sperm concentration and percentages of spermatozoa showing motility, progressive motility, viability and normal morphology). A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the initial semen traits between standard and substandard ejaculates. Differences in the recovery yields after SLC treatment among ejaculate groups (standard vs. substandard) were also evaluated using a one-way ANOVA. The possible effects of SLC treatment, ejaculate group and its interaction on the post-thaw sperm quality and functionality were examined with an ANOVA with repeated measures (30 and 150 min post-thawing), except for MDA generation (two-way ANOVA). The results revealed that the recovery yield of total, motile and viable sperm after SLC was higher ($p < 0.05$) in standard semen samples than in substandard semen samples. Post-thaw sperm motility and viability were higher ($p < 0.05$) in SLC than in control samples, regardless of the initial semen traits of the ejaculates. Additionally, thawed spermatozoa from SLC samples were more resistant ($p < 0.05$)

to LPO than those from control samples, regardless of the initial semen traits of the ejaculates. The SLC treatment also influenced the functionality of thawed spermatozoa undergoing an *in vitro* capacitation process. The percentage of viable sperm exhibiting high membrane fluidity was lower ($p < 0.05$) in the SLC treatment than in the control samples, regardless of the initial semen traits of the ejaculates. Thawed viable spermatozoa of SLC samples generated less ($p < 0.05$) intracellular ROS than those of control samples in the substandard ejaculates. These findings demonstrate that SLC using Androcoll-P-Large[®] may be a valuable tool in the cryopreservation protocol used for boar ejaculates, as sperm selection with this colloid centrifugation prior to freezing resulted in an overall improvement of sperm quality and functionality after thawing. However, this selection procedure should be optimised before its integration into a standard protocol for boar semen cryopreservation because the total sperm yielded remains very low, particularly in the ejaculates with substandard semen quality. This is one of the major obstacles that challenge the integration of Androcoll[®]-P into standard freezing protocols for boar semen because the sperm selection procedure should be chosen precisely to enhance the sperm quality of those ejaculates exhibiting poor sperm quality. Moreover, because the SREF of the boar ejaculate normally exceed 100 mL, an excessive number of 50-mL tubes would be required for SLC-processing an entire ejaculate.

However, the SLC method with Androcoll[®]-P has been scaled-up to process semen volumes as large as 150 mL (Androcoll-P-XL[®], Morrell and Wallgren, 2011), which may facilitate its incorporation into cryopreservation protocols for boar spermatozoa. In addition, to improve the sperm quality after thawing, the integration of SLC processing in the cryopreservation protocol of boar ejaculates could improve the biosecurity of the FT-sperm doses, as it has been proved to be effective in the removal of viruses from boar semen, such as porcine circovirus type 2 (Blomqvist et al., 2011). Additionally, as mentioned above, it is known that SLC processing before freezing modifies the functionality of FT-boar spermatozoa; however, how these functional modifications affect the fertilising ability of cryosurviving sperm is unknown. Consequently, the objective of the fourth experimental study was to evaluate the suitability and effectiveness of SLC as a routine procedure for selecting boar spermatozoa for cryopreservation (**Animal Reproduction Science 2013, 140:173-179**). The study focuses special attention on the effectiveness of SLC for processing

a whole SREF fraction and the fertilising ability of FT-sperm selected using SLC prior to freezing. To achieve this goal, 13 SREFs (1 per boar) were split into 3 aliquots. Two aliquots of 15 and 150 mL were SLC processed (500 xg for 20 min) using 15 and 150 mL (v/v) of Androcoll-P-Large® (SLC-15) and Androcoll-P-XL® (SLC-150), respectively. The third aliquot remained un-processed as a control. Sperm quantity and quality were evaluated, and the yield of the SLC-processed samples calculated. Control and SLC-processed semen samples were cryopreserved following the protocol detailed in the first experiment. Sperm motility and viability of 3 separate straws per semen sample were evaluated at 30 and 150 min post-thawing. Nuclear DNA fragmentation was assessed at 0 and 6 h after thawing. The sperm assessment procedures were described for the previous experiments. The IVF ability and embryo development were evaluated in 3 replicates. In each replicate, FT-sperm samples of the 13 boars were pooled to avoid the individual effect on IVF (Gil et al., 2008), and the FT-semen samples were centrifuged with PorciPure™ Bottom Layer, as indicated in the second experiment. After centrifugation, sperm concentration and viability were assessed to calculate the total number of viable sperm to inseminate the oocytes with the same number of viable sperm. A total of 679 *in vitro* matured oocytes were inseminated with a viable sperm:oocyte ratio of 300:1 following the procedure described by Gil et al. (2003). The *in vitro* fertilising ability and embryo development parameters recorded were the same that those already recorded in the second experiment. A one-way ANOVA was used to evaluate differences among the control, SLC-15 and SLC-150 semen samples (IBM SPSS Statistics 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences in the recovery yields between SLC-15 and SLC-150 after SLC processing were evaluated using a two-sample t-Test. The possible effects of SLC processing on the post-thaw sperm quality and *in vitro* fertilisation-embryo development assessments were analysed using an ANOVA model with repeated measures (2 evaluation times after thawing) and a mixed linear ANOVA with the fixed effect of treatment (control, SLC-15 and SLC-150) and the random effect of replicate, respectively. The percentages of spermatozoa that were morphologically normal and exhibited rapid and progressive motility were higher ($p < 0.01$), and those with fragmented nuclear DNA were lower ($p < 0.01$) after SLC than control semen samples, regardless of the Androcoll-P® used. The recovery rates of total, motile, viable and morphologically normal spermatozoa ranged between 20 and 100 %, and those with intact nuclear DNA ranged between 60 and 100 %, irrespective of the Androcoll-P® used. Post-thaw percentages of sperm motility (both total motility

and rapid progressive motility), viability and intact nuclear DNA were higher ($p < 0.05$) in the SLC-processed samples than in control semen samples, irrespective of the Androcoll-P® used. SLC-processing also improved ($p < 0.01$) the IVF ability of FT-sperm measured as the percentage of penetrated oocytes and the mean number of swollen sperm heads and/or male pronuclei in penetrated oocytes. However, there was no effect of SLC-processing on the *in vitro* ability of putative zygotes to develop into blastocysts. Overall, these results indicate that SLC processing of semen samples before freezing using Androcoll-P-LX® may be a valuable tool for implementing the cryopreservation protocol for boar spermatozoa because it is able to process the entire SREF of a boar ejaculate, improving both the sperm cryosurvival and the fertilising ability of thawed spermatozoa. However, efforts should be made to ensure continued high sperm recovery yields before considering the inclusion of SLC as a routine procedure in the cryopreservation protocol of boar ejaculates.

The results achieved in these four experimental studies have generated the following conclusions:

Non-functional spermatozoa present in boar semen samples before freezing negatively influence the cryopreservation of functional spermatozoa by reducing the proportion of recovered surviving spermatozoa after thawing and also by altering the functional and fertilisation ability of the sperm that survive the cryopreservation process.

Single Layer Centrifugation prior to freezing improves the boar sperm cryopreservation and post-thaw fertilisation ability of cryosurvival spermatozoa. However, further studies aimed at optimising the yield of SLC procedure are needed.

RESUMEN GENERAL

..... ●

La inseminación artificial (IA) es una biotecnología ampliamente utilizada por los productores de porcino en todo el mundo, jugando un papel fundamental en la mejora de la productividad. Idealmente, los programas de IA deberían utilizar espermatozoides congelados-descongelados dadas las ventajas adicionales respecto al semen fresco o refrigerado, especialmente las relativas a la bioseguridad y comercio internacional (Bailey y cols. 2008). Sin embargo, los espermatozoides criopreservados apenas se utilizan en la IA porcina debido a su menor eficiencia productiva con respecto al semen refrigerado (Grossfeld y cols. 2008; Roca y cols. 2011). Es decir, se requieren más espermatozoides por dosis de inseminación alcanzando, por lo general, peores resultados de fertilidad (Rath y cols. 2009). La razón biológica de este hecho está relacionada con la gran sensibilidad de los espermatozoides porcinos a la criopreservación, de tal manera que no más de un 50 % de los espermatozoides sobreviven al proceso de criopreservación (Roca y cols. 2006). Además, los espermatozoides que sobreviven a dicho proceso, poseen una vida funcional más corta (Maxwell y Johnson 1997). Este hecho conlleva que los espermatozoides que sobreviven a la descongelación, tienen dificultades para alcanzar la unión útero-tubárica y para fecundar los ovocitos una vez depositados en el tracto genital de la cerda. En consecuencia, y a pesar de las mejoras introducidas en los protocolos de criopreservación actuales (Rath y cols. 2009), es evidente que todavía es necesario seguir investigando para optimizarlos con el propósito de conseguir su aplicación rutinaria en los programas de IA de porcino.

Además de la especial sensibilidad de los espermatozoides de porcino al proceso de congelación-descongelación (Watson, 2000), existen otros factores, tales como la fisiología individual del verraco, las características seminales del eyaculado, así como la manipulación de los espermatozoides durante la criopreservación, que también contribuyen a la congelabilidad espermática (Thurston y cols. 2002; Holt et al., 2005; Hernández y cols. 2007). En cuanto a las características seminales del eyaculado,

todavía existe cierta controversia sobre su relación con la capacidad de supervivencia de los espermatozoides al proceso de criopreservación (Roca y cols. 2006; Cerolini y cols. 2001). Los eyaculados contienen espermatozoides muertos y morfológica o estructuralmente dañados, que en conjunto constituyen una subpoblación de espermatozoides no funcionales, cuya proporción difiere entre verracos así como entre eyaculados del mismo individuo. Por lo tanto, con el fin de mejorar la eficiencia del protocolo de criopreservación y aunque no está científicamente demostrado, es una práctica común la de seleccionar para la criopreservación sólo aquellos eyaculados que poseen una baja proporción de espermatozoides no funcionales (Roca et al., 2006). Este criterio de selección reduce el número de eyaculados aceptados para ser criopreservados, obligando a descartar un elevado número de eyaculados, incluyendo algunos procedentes de verracos genéticamente valiosos.

Una gran proporción de espermatozoides no funcionales en los eyaculados se ha asociado con alteraciones en la capacidad fecundante del eyaculado, con una peor calidad embrionaria y con tasas de gestación sub-óptimas (Aitken y Sawyer 2003). Tal y como se ha evidenciado en otras especies de mamíferos, como la especie bovina (Upreti y cols. 1998), los espermatozoides no funcionales presentes en las muestras de semen son una fuente de especies oxígeno reactivas (Reactive Oxygen Species, ROS), que atacan a los lípidos de la membrana espermática conduciendo a la iniciación de la cascada de peroxidación lipídica (Lipid Peroxidation, LPO). Los espermatozoides de porcino son particularmente sensibles a LPO debido al alto contenido de ácidos grasos insaturados en su membrana plasmática (Cerolini y cols. 2001), por lo tanto, es probable que en esta especie, la subpoblación de espermatozoides no funcionales presente en el eyaculado pueda tener una mayor repercusión negativa en la criosensibilidad de la subpoblación de espermatozoides funcionales. Sin embargo, actualmente no existen estudios específicos que hayan evaluado esa posible influencia. Conocer si los espermatozoides no funcionales influyen negativamente en la congelabilidad de los espermatozoides funcionales y, si así fuese, determinar la naturaleza de dicha influencia, podría ser útil a la hora de diseñar estrategias que tengan como objetivo minimizar o evitar los efectos perjudiciales, lo que mejoraría la eficiencia de los protocolos de criopreservación sin necesidad de desechar eyaculados procedentes de verracos con alto valor genético.

De acuerdo con todo lo expuesto anteriormente, el objetivo del primer estudio experimental fue evaluar el impacto de la sub-población de espermatozoides no funcionales presentes en los eyaculados sobre la capacidad de los espermatozoides funcionales para soportar el proceso de criopreservación (**PlosOne 2012, 7:e36550**). Para lograr este objetivo, desarrollamos un experimento en el que se criopreservaron muestras de semen con una proporción conocida y diferente de espermatozoides no funcionales. Se utilizaron 15 fracciones ricas (FR) de eyaculados procedentes de 5 verracos de fertilidad comprobada (3 FR por verraco) recogidas mediante el método de mano enguantada. Cada FR se dividió en 2 alícuotas: A y B. La alícuota A se mantuvo sin tratar (muestra de semen control) y la alícuota B se utilizó para generar la población de espermatozoides no funcionales. Para ello, los espermatozoides fueron sometidos a varios ciclos de congelación-descongelación en ausencia de crioprotector para imitar los efectos dañinos que sufren los espermatozoides que no resisten el proceso de criopreservación. Tubos de 15 mL de FR se sumergieron en nitrógeno líquido durante 9 min e inmediatamente se calentaron a 80 °C en un baño de agua termostatzado durante 3 min, momento en el que la muestra alcanzó los 35-36 °C. Este procedimiento se repitió 3 veces para asegurar que no quedaran espermatozoides viables. Las alícuotas A y B se mezclaron para generar cuatro muestras de semen con diferentes proporciones de espermatozoides no funcionales. La primera muestra se generó solo con la alícuota A (muestra de semen control). Para generar las otras 3 muestras de semen, las alícuotas A y B se mezclaron en diferentes proporciones para obtener muestras con un 25, 50 y 75 % de espermatozoides no funcionales. Las 4 muestras resultantes se almacenaron a 17 °C durante 16 h tras lo cual se congelaron en pajuelas de 0'5 mL utilizando el procedimiento de congelación estándar descrito por Hernández y cols. (2007) que resumimos a continuación. Las muestras de semen fueron centrifugadas (2.400 xg durante 3 min a 17 °C) y los pellets de espermatozoides se diluyeron con Tris-Glucosa-Ácido Cítrico suplementado con un 20 % de yema de huevo (TGC-Y) hasta alcanzar una concentración de $1'5 \times 10^9$ espz/mL. Tras el enfriamiento hasta los 5 °C, los espermatozoides se diluyeron con TGC-Y suplementado con glicerol y Equex (89'5 % de TGC-Y + 1'5 % Equex STM y 9 % de glicerol) hasta alcanzar una concentración final de 1×10^9 espz/mL. Los espermatozoides fueron entonces envasados en pajuelas de 0'5 mL de cloruro de polivinilo (PVC) y congelados utilizando biocongelador programable (hasta -5 °C a 6 °C/min y desde -5 °C a -80 °C a 40 °C/min, posteriormente se mantuvieron durante

30 s a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se enfriaron hasta alcanzar los $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de $70\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Las pajuelas se almacenaron en nitrógeno líquido durante al menos 1 semana. La descongelación se realizó en un baño de agua termostaticado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 s. Las muestras de espermatozoides descongelados se diluyeron en Beltsville Thawing Solution (BTS; 1:1 v/v) y se incubaron en oscuridad a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, momento en el que se evaluaron la calidad y la funcionalidad espermáticas. La calidad se evaluó en términos de motilidad y viabilidad, mientras que la funcionalidad lo fue en términos de fluidez de la membrana plasmática y la producción intracelular de ROS bajo condiciones de capacitación *in vitro*. Todas estas evaluaciones, a excepción de la motilidad, que fue evaluada utilizando un sistema de análisis espermático computarizado (CASA), se llevaron a cabo mediante citometría de flujo. Además, también se evaluó el grado de peroxidación de los lípidos de membrana mediante la medición indirecta de la generación de malondialdehído (MDA) usando el kit comercial MDA-586 de Bioxytech. El porcentaje de espermatozoides viables se obtuvo mediante la evaluación simultánea de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal después de la tinción con Hoechst-33342 (H-42), yoduro de propidio (PI) y conjugado de fluoresceína con aglutinina de cacahuete (PNA). La fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides se evaluó utilizando un procedimiento de triple tinción incluyendo H-42, Yo-Pro-1 y Merocianina 540 (M-540). La producción intracelular de ROS se evaluó usando 5-(y-6) clorometil-2',7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína de éster de acetilo (CM-H₂DCFDA) siguiendo el procedimiento descrito por Guthrie y Welch (2006). Los porcentajes de espermatozoides móviles y viables después de la descongelación de cada una de las muestras, fueron normalizados con respecto a los valores obtenidos antes de la congelación (características seminales iniciales). Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) lineal mixto que incluyó como efectos fijos el verraco y la muestra seminal (muestra de semen control, y con 25, 50 y 75 % de espermatozoides no funcionales) dentro de cada verraco, y tomando como efecto aleatorio el preplacado (SPSS, versión de software 15, SPSS Inc., Chicago, IL).

Los resultados mostraron que tanto la motilidad como la viabilidad espermáticas normalizadas tras la descongelación fueron menores ($p < 0.01$) cuanto mayor proporción de espermatozoides no funcionales había en las muestras de semen antes de la congelación, independientemente del verraco. Sin embargo, la magnitud

del efecto fue diferente ($p < 0'01$) entre verracos. Además, las muestras de semen con mayor proporción de espermatozoides no funcionales antes de la congelación mostraron los niveles más elevados ($p < 0'01$) de MDA después de la descongelación. En cuanto a la funcionalidad de los espermatozoides viables tras la descongelación, la muestra con mayor proporción de espermatozoides no funcionales antes de la congelación tuvo una generación intracelular de ROS más alta ($p < 0'01$) y un aumento ($p < 0'01$) de la fluidez de la membrana espermática con respecto a la muestra control. Estos hallazgos indican que los espermatozoides no funcionales presentes en las muestras de semen de verraco antes de la congelación tienen una influencia negativa en la congelabilidad de los espermatozoides funcionales. Esta influencia no sólo se evidencia por la reducida proporción de espermatozoides funcionales recuperados después de la descongelación, sino también por la alteración de la funcionalidad de los espermatozoides que sobreviven el proceso de criopreservación. Este hecho podría tener efectos perjudiciales adicionales sobre la capacidad de fertilización de los espermatozoides congelados-descongelados.

Si la presencia de espermatozoides no funcionales en las muestras seminales es capaz de provocar disfunciones en los espermatozoides que han sobrevivido al proceso de criopreservación, es factible plantear la hipótesis de que los espermatozoides no funcionales afecten a la capacidad de fertilización de los espermatozoides congelados-descongelados. En este contexto, es un hecho bien conocido que los espermatozoides criopreservados ofrecen peores resultados de fertilidad que los frescos o refrigerados en los programas de IA de porcino (Roca y cols. 2011). Por todo ello, se realizó un segundo estudio experimental con la finalidad de determinar si los espermatozoides no funcionales presentes en las muestras de semen antes y durante la congelación influyen en la capacidad de fertilización *in vitro* (FIV) de los espermatozoides que sobreviven al proceso de criopreservación (**Fertility & Sterility 2013, 100:875-881**). Utilizando el mismo enfoque experimental que en el estudio anterior, se prepararon cuatro muestras de semen con diferentes proporciones de espermatozoides no funcionales: la muestra de semen control (con menos del 10 % de espermatozoides no funcionales) y otras 3 con 25, 50 y 75 %, respectivamente. Estas muestras, procedentes de 15 eyaculados, fueron criopreservadas siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. Tras la descongelación, las muestras de semen se procesaron mediante gradiente de centrifugación con PorciPure™ Bottom Layer (600 xg durante 20 min). Los espermatozoides depositados en el fondo del tubo fueron diluidos con BTS y se sometieron a una segunda centrifugación (300 xg

durante 10 min), tras la cual se determinaron la concentración (Nucleocounter-SP100, ChemoMetec, A/S) y la viabilidad espermática (siguiendo el mismo procedimiento que en el estudio anterior) para calcular la cantidad de espermatozoides viables totales en las muestras seminales. La funcionalidad de los espermatozoides, en términos de generación intracelular de ROS, y fragmentación del ADN nuclear, se evaluaron antes y después de la centrifugación con PorciPure en muestras de esperma incubadas bajo condiciones de capacitación *in vitro* (dilución con un medio base Tris (mTBM) a una concentración de 20×10^6 espz/mL y se incubaron durante 15 min en oscuridad a 39 °C en una atmósfera con 5 % (v/v) de CO₂ y 95 % de humedad; Caballero y cols. 2009). La generación intracelular de ROS se evaluó como en el estudio anterior y la fragmentación del ADN nuclear se determinó mediante la utilización de una variante comercial de la prueba de dispersión de la cromatina espermática, (Sperm-Sus-Halomax®, Halotech ADN SL) siguiendo el procedimiento descrito por Enciso y cols. (2006) y las instrucciones del fabricante. La capacidad de fecundación *in vitro* (FIV) de los espermatozoides supervivientes a la criopreservación se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Gil y cols. (2003) y se evaluó de acuerdo con el porcentaje de ovocitos fecundados (dos pronúcleos y una cola espermática en el interior del ooplasma) y del desarrollo embrionario. Un total de 1.041 ovocitos madurados *in vitro* fueron inseminados utilizando un número fijo de espermatozoides viables purificados con PorciPure™ (ratio de espermatozoides viables:ovocito de 300:1), independientemente de los diferentes porcentajes de espermatozoides no funcionales de las muestras (control, 25, 50 y 75 %). Para evaluar el porcentaje de ovocitos fecundados, un grupo al azar de presuntos cigotos fueron montados sobre portaobjetos 18 h después de la FIV y se fijaron durante 48-72 h en una solución de acético:etanol del 25 % (v/v) a temperatura ambiente. Posteriormente se tiñeron con 1 % con lacmoid 45 % (v/v) en ácido acético y se examinaron bajo un microscopio de contraste de fases a 400X. El desarrollo embrionario se evaluó a los 2 y 7 días después de la inseminación utilizando un estereomicroscopio, evaluando los siguientes parámetros: porcentaje de divisiones (2-4 células) y blastocistos, respectivamente. El número total de células por blastocisto fue un indicador de la calidad embrionaria. Para el conteo del número total de células, los blastocistos se tiñeron con Vectashield con 10 mg/mL de H-42. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente (IBM SPSS Statistics 19, SPSS Inc.) utilizando un ANOVA mixto lineal, que incluyó como efectos fijos la muestra de semen (control, 25, 50 y 75 % de espermatozoides no funcionales)

y centrifugación con el gradiente (sólo para las evaluaciones de la funcionalidad de espermática) y como efecto aleatorio el replicado.

Los resultados mostraron que una alta proporción de espermatozoides no funcionales en muestras de semen antes y durante la congelación aumentó ($p < 0'001$) la generación intracelular de ROS por parte de los espermatozoides vivos y el porcentaje de espermatozoides con fragmentación del ADN nuclear después de la descongelación. La proporción de espermatozoides no funcionales en la muestra de semen antes y durante la congelación también influyó ($p < 0'01$) en los resultados de la FIV, a pesar de que el número de espermatozoides viables congelados-descongelados utilizado fue el mismo independientemente de la muestra de semen de procedencia (control, 25, 50, y 75 % de espermatozoides no funcionales). Los espermatozoides congelados-descongelados procedentes de las muestras seminales con 50 y 75 % de espermatozoides no funcionales mostraron una menor capacidad fecundante ($p < 0'01$) que los procedentes de las muestras control y con 25 % de espermatozoides no funcionales. Del mismo modo, las tasas de división y de desarrollo embrionario fueron más bajas ($p < 0'01$) con los espermatozoides congelados-descongelados procedentes de las muestras seminales con un 50 y 75 % de espermatozoides no funcionales. Sin embargo, el número total de células de los blastocistos cultivados *in vitro* no se vio afectado por la proporción de espermatozoides no funcionales presentes en las muestras de semen antes y durante la congelación. Estos resultados ponen de manifiesto que la población de espermatozoides no funcionales en las muestras de semen antes y durante la congelación influye negativamente en los resultados de FIV de espermatozoides que sobreviven a la criopreservación. Este proceso parece estar mediado por una excesiva generación de ROS endógeno por parte de los espermatozoides viables tras la descongelación. En consecuencia, una parte de la variabilidad observada entre individuos, muestras seminales, e incluso entre ensayos en los resultados de FIV con espermatozoides criopreservados podría estar relacionada con la proporción de espermatozoides no funcionales presentes en las muestras seminales de procedencia.

Debido a que la sub-población de espermatozoides no funcionales presentes en las muestras seminales antes y durante la congelación influye negativamente en la funcionalidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides congelados-

descongelados, la eliminación de dicha sub-población antes de la congelación podría ser útil para mejorar la eficiencia de los protocolos de criopreservación y la capacidad fecundante de los espermatozoides que sobreviven al proceso de congelación-descongelación.

Existen diversas técnicas de selección espermática, tales como la migración-sedimentación, filtración y la centrifugación con coloides, que permiten seleccionar la sub-población de espermatozoides funcionales del eyaculado (Morrell y Rodríguez-Martínez, 2011). La técnica llamada centrifugación de una sola capa (Single Layer Centrifugation; SLC), que utiliza un coloide denominado Androcoll-P®, podría ser de utilidad en porcino al permitir procesar con eficacia grandes volúmenes de semen (Morrell y Wallgren, 2011) y por lo tanto podría adecuarse a los actuales protocolos de criopreservación, esperando, como resultado, una mejora en la congelabilidad de los eyaculados en esta especie. En base a esta hipótesis, el objetivo del tercer estudio experimental fue evaluar la congelabilidad de espermatozoides de porcino seleccionados utilizando SLC antes de la congelación (Theriogenology 2012, 78:1117-1125). En el experimento se consideraron las características iniciales de los eyaculados con el fin de identificar las diferencias en la respuesta a la SLC entre eyaculados de calidad espermática estándar o sub-estándar. Además, de la influencia de la selección mediante SLC en la calidad espermática a la descongelación, la respuesta funcional de los espermatozoides congelados-descongelados se evaluó en muestras de semen expuestas a condiciones de capacitación *in vitro*. En el experimento se utilizaron 24 FR, procedentes de 24 verracos (1 por verraco), las cuales fueron divididas en 2 grupos en función de sus características seminales iniciales (concentración, morfología, motilidad y viabilidad espermática): estándar (n = 15) y sub-estándar (n = 9). La morfología de los espermatozoides, que se define como la proporción de espermatozoides con morfología normal, se evaluó contando 200 espermatozoides bajo el microscopio de contraste de fases (con un aumento de 400x) de las muestras de semen fijadas en solución de formaldehído al 2 %. La concentración, la motilidad y la viabilidad se evaluaron como se describe anteriormente en el primer experimento. Las muestras de semen de cada FR se dividieron en dos alícuotas, una permaneció sin tratar (muestras de control) y la otra se centrifugó mediante el procedimiento de SLC utilizando Androcoll-P-Large® (muestras SLC). El procedimiento utilizado para la SLC fue una modificación del descrito por Van Wienen y cols. (2011). Brevemente, se depositaron cuidadosamente

15 mL de la FR diluida a 100×10^6 espz/mL sobre una capa de 15 mL de Androcoll- P-Large® en un tubo Falcon de centrifuga de 50 mL. Después de la centrifugación a 500 xg durante 20 min a temperatura ambiente, la concentración, morfología, motilidad y la viabilidad espermática del pellet de espermatozoides resultante, se evaluaron para calcular el rendimiento del procedimiento de SLC. Cuatro de las 24 muestras SLC se descartaron antes de la congelación debido a que el número total de espermatozoides recuperados fue inferior de 1×10^9 espz/mL. Las muestras fueron criopreservadas utilizando el protocolo detallado en el primer estudio. La motilidad, viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides (en términos de fluidez de la membrana plasmática y de generación intracelular de ROS), se evaluaron a los 30 y 150 min post-descongelación siguiendo los procedimientos descritos en los anteriores estudios. La generación de MDA, como se indica en el primer experimento, se midió a los 30 min después de la descongelación. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 15 (SPSS, Chicago, IL). La clasificación de las FR entre los grupos estándar y sub-estándar, se realizó a través de un análisis de conglomerados de acuerdo sus características iniciales (concentración espermática, porcentajes de espermatozoides mótils, mótils progresivos, viables y morfológicamente normales). Se utilizó un ANOVA de una vía para comparar las características iniciales entre eyaculados estándar y sub-estándar. También se evaluaron las diferencias en los rendimientos de recuperación después del tratamiento SLC entre los grupos de eyaculados (estándar vs sub-estándar) utilizando un ANOVA de una vía. El posible efecto de SLC, grupo de eyaculado y su interacción en la calidad y funcionalidad espermática después de la descongelación se evaluó con un ANOVA de medidas repetidas (30 y 150 min post-descongelación). Para evaluar diferencias en la generación de MDA se utilizó un ANOVA de dos vías. Los resultados mostraron que el rendimiento de recuperación de espermatozoides totales, mótils y viables después de SLC fue mayor ($p < 0.05$) en las muestras estándar que en las sub-estándar. Después de la descongelación, la motilidad y viabilidad de los espermatozoides fue mayor ($p < 0.05$) en las muestras SLC que en las muestras control, independientemente de las características iniciales de los eyaculados. Además, los espermatozoides descongelados a partir de muestras SLC fueron más resistentes ($p < 0.05$) a la LPO que los de las muestras de control, independientemente de las características iniciales de los eyaculados. La SLC también influyó en la funcionalidad de los espermatozoides descongelados sometidos a un proceso de capacitación *in vitro*. Esta influencia se vio reflejada por un menor

($p < 0.05$) porcentaje de espermatozoides viables con alta fluidez de la membrana plasmática en las muestras SLC, independientemente de las características iniciales de los eyaculados. Los espermatozoides viables descongelados de las muestras SLC generaron menos ($p < 0.05$) ROS intracelular que los de las muestras control en los eyaculados sub-estándar. Estos hallazgos demuestran que el uso de SLC con Androcoll-P-Large® puede ser un procedimiento de utilidad para ser incorporado en el protocolo de criopreservación para espermatozoides de porcino, ya que la selección de espermatozoides con esta técnica antes de la congelación resultó en una mejora general de la calidad del esperma y de su funcionalidad después de la descongelación. Sin embargo, este procedimiento de selección debe ser optimizado antes de su integración en el protocolo estándar de criopreservación de semen porcino debido a que el total de espermatozoides recuperados tras SLC es aún muy bajo, sobre todo en los eyaculados de baja calidad espermática, precisamente aquellos que más precisarían el uso de este procedimiento.

Ya que la FR del eyaculado de verraco supera los 100 mL, sería necesario un número elevado de tubos de 50 mL para procesar toda una FR mediante el procedimiento SLC utilizando Androcoll-P Large®. Como alternativa se pueden procesar volúmenes de semen de hasta 150 mL empleando el coloide Androcoll-P-XL® (Morrell y Wallgren, 2011), que se adecuaría mejor a los protocolos de criopreservación de espermatozoides porcinos. Además de mejorar la calidad espermática después de la descongelación, la integración de SLC en el protocolo de criopreservación podría mejorar la bioseguridad de las dosis de espermatozoides congelados-descongelados, ya que se ha demostrado su eficacia en la eliminación de virus, tales como el Circovirus Porcino tipo 2 en muestras de semen (Blomqvist y cols. 2011). Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que la centrifugación mediante SLC antes de la congelación modifica la funcionalidad de los espermatozoides de verraco congelados-descongelados. Sin embargo, no se conoce cómo estas modificaciones funcionales afectan a la capacidad fecundante de estos espermatozoides. Por consiguiente, el objetivo del cuarto estudio experimental fue el de evaluar la idoneidad y eficacia de SLC, empleando el coloide Androcoll-P-XL®, como un procedimiento de rutina para la selección de los espermatozoides funcionales de los eyaculados de porcino para la criopreservación (**Animal Reproduction Science 2013, 140:173-179**). El estudio centra especial atención en la eficacia de SLC para procesar una FR completa

y la capacidad fecundante de los espermatozoides congelados-descongelados seleccionados mediante SLC antes de la congelación. Para lograr estos objetivos, 13 FR (1 por verraco) se dividieron en 3 alícuotas. Dos alícuotas de 15 y 150 mL fueron procesados mediante SLC (500 xg durante 20 min) usando 15 y 150 ml (v/v) de Androcoll-P-Large® (SLC-15) y Androcoll-P-XL® (SLC-150), respectivamente. La tercera alícuota se mantuvo sin procesar como control. Se evaluó la cantidad y calidad de espermatozoides tras el tratamiento SLC y se calculó su rendimiento (espermatozoides recuperados respecto a los iniciales). Las muestras control y SLC se criopreservaron siguiendo el protocolo detallado en el primer estudio. La motilidad y viabilidad espermáticas se evaluaron a los 30 y 150 min tras la descongelación en tres pajuelas independientes. La fragmentación del ADN nuclear se evaluó a las 0 y 6 h después de la descongelación. Los procedimientos de evaluación espermática utilizados son los descritos en los estudios anteriores. La FIV y el desarrollo embrionario se evaluaron en 3 replicados. En cada replicado, las muestras de los 13 verracos se combinaron con el fin de evitar el efecto individual en la FIV (Gil y cols. 2008). Para la FIV las muestras de espermatozoides congelados-descongelados se centrifugaron con PorciPure™, siguiendo el mismo procedimiento que se indica en el segundo estudio. Después de la centrifugación con PorciPure™, se evaluaron la concentración y la viabilidad espermática con la finalidad de inseminar los ovocitos con el mismo número de espermatozoides viables, independientemente de la muestra de procedencia. Se inseminaron un total de 679 ovocitos madurados in vitro con un ratio de espermatozoides viables:ovocito de 300:1 siguiendo el procedimiento descrito por Gil y cols. (2003). Los parámetros para evaluar la capacidad fecundante in vitro y el desarrollo embrionario fueron los mismos que se utilizaron en el segundo estudio. Se utilizó un ANOVA de una vía para evaluar las diferencias entre el grupo control, SLC-15 y SLC-150 (IBM SPSS Statistics 19; SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). Las diferencias en los rendimientos entre SLC-15 y SLC-150 se evaluaron mediante la *t* de Student. El posible efecto de la SLC en la calidad espermática post-descongelación y en la capacidad fecundante y el desarrollo embrionarios se evaluaron mediante un ANOVA de medidas repetidas (2 tiempos de evaluación después de la descongelación) y un ANOVA lineal mixto, tomando como efecto fijo el tratamiento (control, SLC-15 y SLC-150) y como efecto aleatorio el replicado.

Los porcentajes de espermatozoides que presentaron una morfología normal y una motilidad rápida y progresiva fueron mayores ($p < 0'01$) en las muestras SLC que en la muestra control, independientemente del Androcoll-P utilizado. En cuanto al porcentaje de espermatozoides con ADN nuclear fragmentado fue más bajo ($p < 0'01$) en las muestras SLC que las muestras control, independientemente del Androcoll-P utilizado. Los porcentajes de espermatozoides móviles tras la descongelación (tanto motilidad total como motilidad progresiva rápida), viables y con ADN nuclear intacto fueron mayores ($p < 0'05$) en las muestras SLC que en muestras control, independientemente del Androcoll-P utilizado. La SLC también mejoró ($p < 0'01$) la capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides congelados-descongelados en términos de porcentaje de ovocitos penetrados y número medio de cabezas espermáticas descondensadas por ovocito y/o pronúcleos masculinos en los ovocitos penetrados. Sin embargo, no hubo ningún efecto sobre la capacidad *in vitro* de los presuntos cigotos para desarrollar blastocistos. En general, estos resultados indican que el procesado de muestras de semen antes de la congelación utilizando Androcoll-P-XL® puede ser una herramienta con gran potencial para ser aplicada en el protocolo de criopreservación de espermatozoides porcinos, ya que es capaz de procesar toda la FR de un eyaculado de verraco de una forma rápida y práctica, mejorando tanto la supervivencia espermática a la descongelación como la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados. Sin embargo, debe mejorarse el rendimiento de SLC antes de considerar que técnica de selección espermática pueda ser incluida definitivamente como un procedimiento de rutina en el protocolo de criopreservación de eyaculados porcinos.

En su conjunto, los resultados obtenidos en estos 4 estudios experimentales han permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. Los espermatozoides no funcionales presentes en las muestras de semen de porcino antes de la congelación influyen negativamente en la congelabilidad de los espermatozoides funcionales. Lo cual se evidencia por una reducción en la proporción de espermatozoides funcionales recuperados tras la descongelación y por una menor capacidad fecundante y habilidad para desarrollar embriones *in vitro* por los espermatozoides que sobreviven al proceso de criopreservación.

2. La selección espermática mediante el gradiente de centrifugación de una sola capa Androcoll-P® utilizado antes de la congelación, mejora la congelabilidad espermática y la capacidad fecundante de los espermatozoides que sobreviven al proceso de criopreservación.



**GENERAL CONCLUSIONS/
CONCLUSIONES GENERALES**

1. **Non-functional spermatozoa present in boar semen samples before freezing reduces the proportion of recovered survival spermatozoa after thawing and alter the functionality of sperm that survive the cryopreservation process.**
La presencia de espermatozoides no funcionales en las muestras de semen porcino antes de la congelación reduce la crio-resistencia de los espermatozoides funcionales, además de alterar la funcionalidad de los espermatozoides que sobreviven al proceso de criopreservación.
2. **Non-functional spermatozoa present in boar semen samples before freezing negatively influences the *in vitro* fertilisation ability of cryosurvival spermatozoa.**
La presencia de espermatozoides no funcionales en las muestras de semen de porcino antes de la congelación influye negativamente en la capacidad *in vitro* de los espermatozoides que sobreviven al proceso de criopreservación para desarrollar embriones viables.
3. **Selection of spermatozoa through single layer centrifugation of boar semen samples prior freezing using Androcoll-P® improves the sperm quality and functionality after thawing.**
La selección espermática en muestras de semen del verraco antes de la congelación mediante el proceso de centrifugación en coloide de una sola capa usando Androcoll-P® mejora la calidad y funcionalidad espermática a la descongelación.
4. **Selection of spermatozoa through single layer centrifugation of boar semen samples prior freezing using Androcoll-P® improves the fertilising ability of sperm that survive the cryopreservation process.**
La selección espermática en muestras de semen del verraco antes de la congelación mediante el proceso de centrifugación en coloide de una sola capa usando Androcoll-P® mejora la capacidad fecundante de los espermatozoides que sobreviven el proceso de criopreservación.



**REFERENCES/
REFERENCIAS**

REFERENCES/REFERENCIAS

..... ●

Aitken RJ, Sawyer D. (2003). The human spermatozoon—not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol.* 518, 85-98.

Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Breque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology.* 70 (8), 1251-1259.

Blomqvist G, Persson M, Wallgren M, Wallgren P, Morrell JM. (2011). Removal of virus from boar semen spiked with porcine circovirus type2. *Anim. Reprod Sci.* 126, 108-114.

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), 505-513.

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.

Enciso M, Muriel L, Fernandez JL, Goyanes V, Segrelles E, Marcos M, Montejo JM, Ardoy M, Pacheco A, Gosalvez J. (2006). Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl.* 27, 106-11.

Gil MA, Abeydeera LR, Day BN, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. (2003). Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization on embryo development in pigs *Theriogenology.* 60, 767-776.

Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WM, Rath D. (2008). New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology.* 70(8), 1225-1233.

Guthrie HD, Welch GR. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci.* 84(8): 2089-2100.

Hernandez M, Roca J, Gil MA, Vazquez JM, Martinez EA. (2007). Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology.* 67(9), 1436-1445.

Holt WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. (2005). The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology.* 63 (2), 370-82.

Maxwell WM, Johnson LA. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev.* 46(3), 408-418.

Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. (2011) Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Vetmed Int* 2010, 4: 2011.

Morrell JM, Wallgren M. (2011). Colloid centrifugation of boar semen. *Reprod Domest Anim.* 46(2), 18-22.

Rath D, Bathgate R, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Strzezek J, Waberski D. (2009). Recent advances in boar semen cryopreservation. In: Rodriguez-Martinez H, Vallet JL, Ziecic AJ, eds. *Control of Pig Reproduction VIII Nottingham.* University Press. 51-66.

Roca J, Hernandez M, Carvajal G, Vazquez JM, Martinez EA. (2006). Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci.* 84(10), 2692-2699.

Roca J, Parrilla I, Rodriguez-Martinez H, Gil MA, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA. (2011). Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod Domest Anim.* 46(2), 79-83.

Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H. (1997). Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev.*9, 297-308.

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 following cryopreservation. *Biol Reprod.* 66(2), 545-554.

Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF. (1998). Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci.* 51(4), 275-287.

Van Wienen M, Johannisson A, Wallgren M, Parlevliet J, Morrell J. (2011). Single layer centrifugation with Androcoll™-P can be scaled-up to process larger volumes of boar semen. *ISRN Vet Sci.* 2011. doi: 10.5402/2011/548385.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. (2000). *Anim Reprod Sci.* (60-61), 481-92.

Articulo/Article 1: Plos One

Abstract

In the present study, the impact of non-functional spermatozoa on the cryopreservation success of functional boar spermatozoa was evaluated. Fifteen sperm-rich ejaculate fractions collected from five fertile boars were frozen with different proportions of induced non-functional sperm (0-native semen sample-, 25, 50 and 75% non-functional spermatozoa). After thawing, the recovery of motile and viable spermatozoa was assessed, and the functional of the spermatozoa was evaluated from plasma membrane fluidity and intracellular reactive oxygen species (ROS) generation upon exposure to capacitation conditions. In addition, the lipid peroxidation of the plasma membrane was assessed by the indirect measurement of malondialdehyde (MDA) generation. The normalized (with respect to a native semen sample) sperm motility (assessed by CASA) and viability (cytometrically assessed after staining with Hoechst 33342, propidium iodide and fluorescein-conjugated peanut agglutinin) decreased ($p < 0.01$) as the proportion of functional spermatozoa in the semen samples before freezing decreased, irrespective of the semen donor. However, the magnitude of the effect differed ($p < 0.01$) among boars. Moreover, semen samples with the largest non-functional sperm subpopulation before freezing showed the highest ($p < 0.01$) levels of MDA after thawing. The thawed viable spermatozoa of semen samples with a high proportion of non-functional spermatozoa before freezing were also functionally different from those of samples with a low proportion of non-functional spermatozoa. These differences consisted of higher ($p < 0.01$) levels of intracellular ROS generation

(assessed with 5-(and-6) chloromethyl-20,70-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester; CM-H₂DCFDA) and increased ($p < 0.01$) membrane fluidity (assessed with Merocyanine 540). These findings indicate that non-functional spermatozoa in the semen samples before freezing negatively influence the freezability of functional spermatozoa.

Url:<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0036550>

Articulo/Article 2: Fertility and Sterility

Abstract

OBJECTIVE:

To evaluate the influence of dead spermatozoa present in raw semen samples before and during freezing on the functionality and fertilization ability of frozen-thawed spermatozoa.

DESIGN:

Cryopreservation of raw semen samples with different known proportions of dead spermatozoa: native semen samples (<10%) and samples with 25%, 50%, and 75% dead spermatozoa.

SETTING:

A university-based veterinary andrology laboratory.

ANIMAL(S):

Five healthy and sexually mature boars.

INTERVENTION(S):

Sperm killed by three fast-freezing cycles.

MAIN OUTCOME MEASURE(S):

Assessment of intracellular generation of reactive oxygen species (ROS), nuclear DNA fragmentation, *in vitro* fertilization (IVF), and embryo development.

RESULT(S):

High proportions of dead spermatozoa in raw semen samples before and during freezing induce statistically significantly increased ROS generation and nuclear DNA fragmentation in frozen-thawed spermatozoa. These dysfunctional changes resulted in low ratios of *in vitro* penetrated oocytes and healthy developing embryos.

CONCLUSION(S):

A high proportion of dead spermatozoa present in raw semen samples before and during freezing negatively influences the functionality and IVF outcomes of frozen-thawed spermatozoa.

Url: [http://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(13\)00627-4/abstract](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(13)00627-4/abstract)

Articulo/Article 3: Theriogenology

Abstract

The aim of this experimental study was to evaluate the effectiveness of sperm selection using single-layer centrifugation (SLC) prior to freezing on the sperm cryosurvival of boar ejaculates. Twenty-four sperm rich ejaculate fractions (SREF), collected from 24 boars (one per boar),

were divided into two groups according to their initial semen traits: standard (n = 15) and substandard (n = 9). Semen samples from each SREF were split in two aliquots, one remained untreated (control samples) and the other was single-layer centrifuged (500 g for 20 min) using 15 mL of Androcoll-P Large (SLC samples). The yield of total, motile (assessed by CASA) and viable (cytometrically evaluated after staining with H-42, propidium iodide (PI) and FITC-PNA) sperm after SLC was higher ($p < 0.05$) in standard than substandard semen samples. The semen samples were cryopreserved using a standard 0.5-mL straw freezing protocol. Post-thaw sperm motility and viability (assessed at 30 and 150 min post-thawing) were higher ($p < 0.05$) in SLC than in control samples, regardless of the initial semen traits of the ejaculates. Additionally, thawed spermatozoa from SLC samples were more resistant ($p < 0.05$) to lipid peroxidation (BIOXYTECH MDA-586 Assay Kit) than those from control samples, regardless of the initial semen traits of the ejaculates. The SLC-treatment also influenced the functionality of thawed spermatozoa undergoing an *in vitro* capacitation process. The percentage of viable sperm showing high membrane fluidity (assessed with merocyanine 540) was lower ($p < 0.05$) in the SLC than in the control samples, regardless of the initial semen traits of the ejaculates. Thawed viable spermatozoa of SLC samples generated less ($p < 0.05$) reactive oxygen species (assessed with CM-H₂DCFDA) than those of control samples in the substandard ejaculates. These findings indicate that the sperm selection before freezing using SLC improves the freezability of boar sperm.

Url: [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(12\)00282-8/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(12)00282-8/abstract)

Articulo/Article 4: Animal Reproduction Science

Abstract

The goal of the present experiment was to evaluate the suitability and effectiveness of single layer centrifugation (SLC), using the pig-specific colloid Androcoll-P, as a routine procedure for selecting boar spermatozoa for cryopreservation. The study focuses special attention on the effectiveness of SLC for processing a whole sperm rich ejaculate fraction and the fertilizing ability of frozen-thawed (FT) sperm selected using SLC prior to freezing. Thirteen sperm rich ejaculate fractions (one per boar) were split into three aliquots. Two aliquots of 15 and 150 mL were SLC-processed (500×g for 20min) using 15 and 150 mL (v/v) of Androcoll-P-Large and Androcoll-P-XL, respectively. The third aliquot remained unprocessed as a control. The percentages of spermatozoa that were morphologically normal and showed rapid and progressive motility (assessed by CASA) spermatozoa were higher ($p < 0.01$) and those with fragmented nuclear DNA (sperm chromatin dispersion test) were lower ($p < 0.01$) after SLC than control semen samples, regardless of the Androcoll-P used. The recovery rates of total, motile, viable (flow cytometric evaluated after staining with H-42, PI and FITC-PNA) and morphologically normal spermatozoa ranged between 20 and 100% and those with intact nuclear DNA ranged between 60 and 100%, irrespective of the Androcoll-P used. Thereafter, the semen samples were cryopreserved using a standard 0.5-mL straw freezing protocol. Post-thaw percentages of sperm motility (both total motility and rapid progressive motility), viability and intact nuclear DNA were higher ($p < 0.05$) in SLC-processed than in control semen samples, irrespective of

the Androcoll-P used. SLC-processing also improved the *in vitro* fertilizing ability of FT-sperm (679 *in vitro* matured oocytes inseminated with a viable sperm:oocyte ratio of 300:1 and coincubated for 6h), measured as the percentage of penetrated oocytes and the mean number of swollen sperm heads and/or male pronuclei in penetrated oocytes. However, there was no effect of SLC-processing on the *in vitro* ability of putative zygotes to develop to blastocysts. Overall these results indicate that SLC-processing of boar ejaculates using Androcoll-P improves the quality and fertilizing ability of cryosurvival boar sperm. However, efforts should be made to ensure continued high recovery yields before considering the inclusion of SLC as a routine procedure in the cryopreservation protocol of boar ejaculates.

Url: [http://www.animalreproductionsociety.com/article/S0378-4320\(13\)00201-7/abstract](http://www.animalreproductionsociety.com/article/S0378-4320(13)00201-7/abstract)



GRAPHIC APPENDIX
APÉNDICE GRÁFICO

Figure 1. Sperm cryopreservation process. **A**, Sperm centrifugation; **B**, Spermatozoa diluted in Tris-glucose-citric acid-egg yolk extender; **C**, Cooling step to 5 °C in cooling chamber; **D**, Spermatozoa packed into 0.5 mL polyvinyl chloride (PVC) French straws; **E**, Freezing machine; **F**, Sperm thawing in water bath at 37 °C.

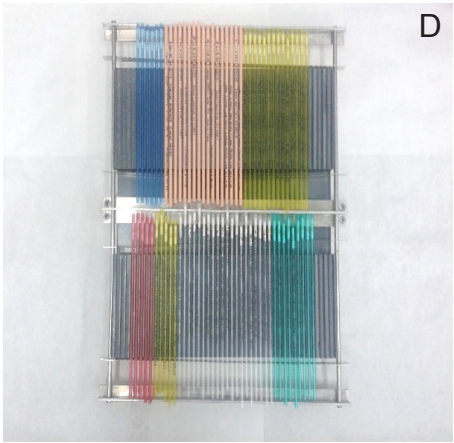
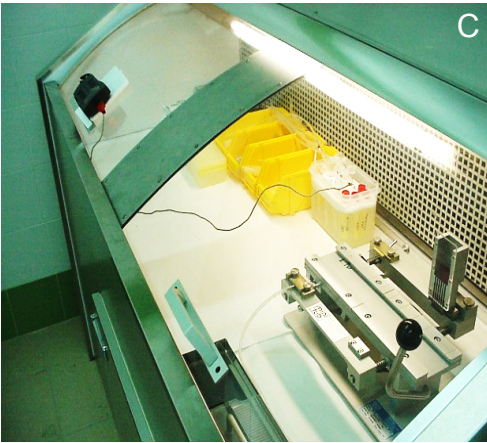
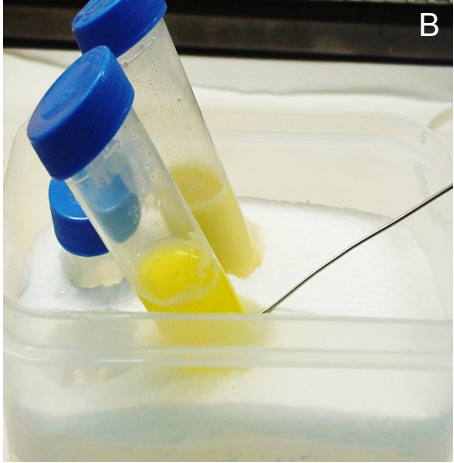
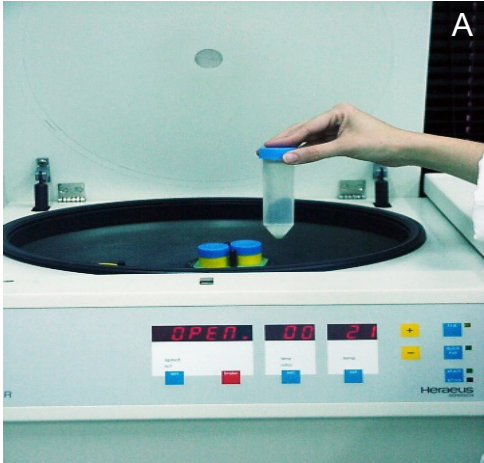


Figure 2. **A**, 500-mL and 50-mL centrifuge tubes; **B**, semen sample after SCL in 500-mL centrifuge tube; **C**, semen sample after SCL in 50-mL centrifuge tube. Arrow, layer with non-functional spermatozoa; asterisk, pellet with functional spermatozoa.

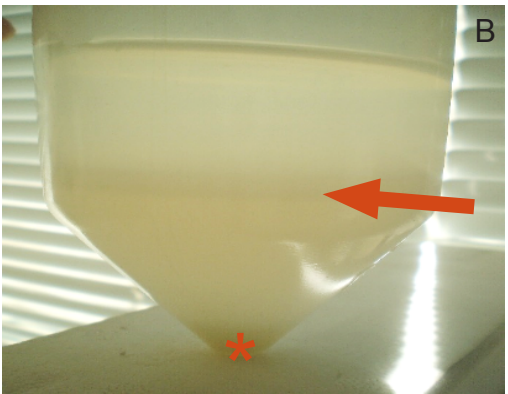
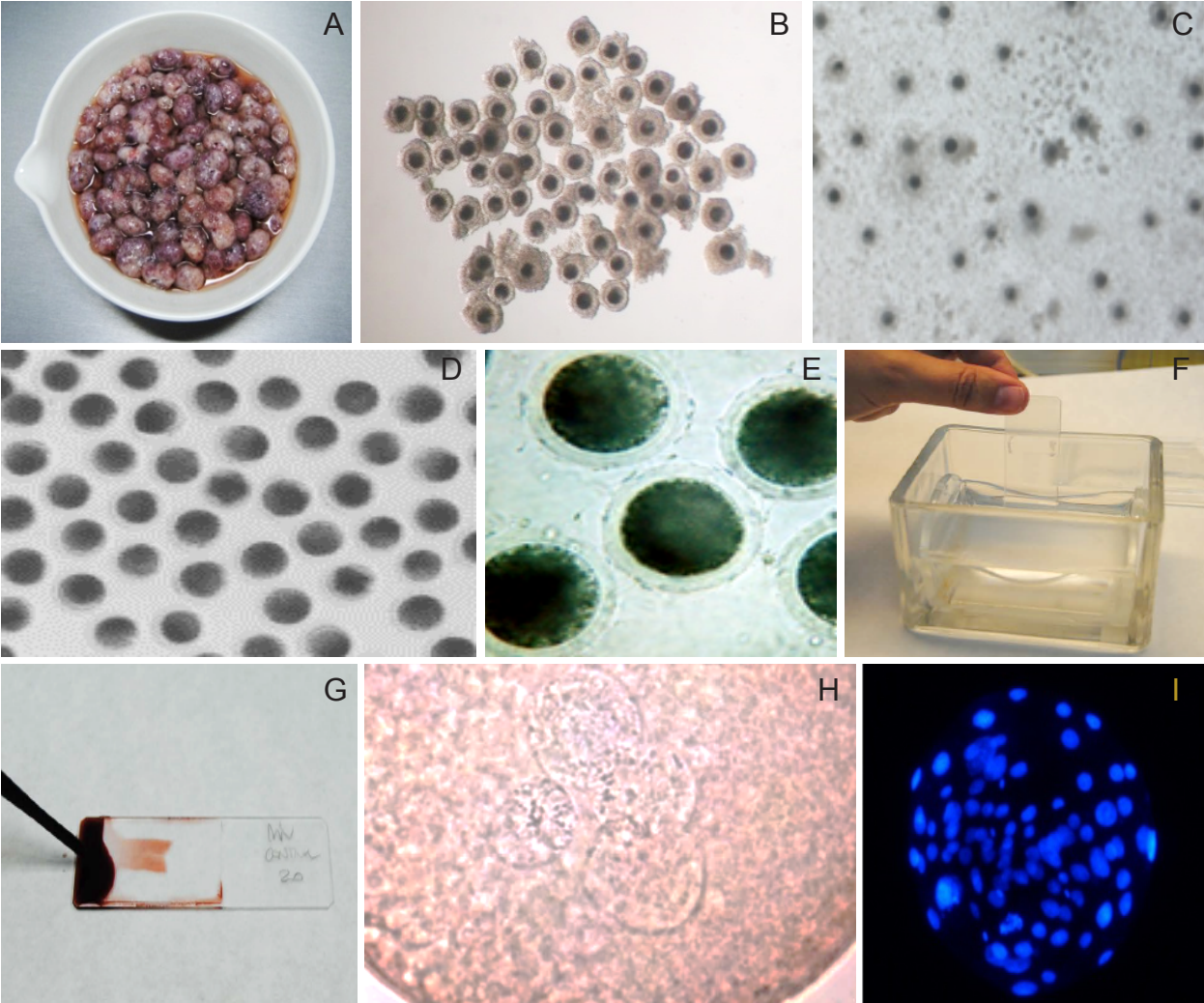


Figure 3. *In vitro* fertilization. **A**, Ovaries from prepubertal gilts; **B** Immature cumulus-oocytes complexes; **C**, Cumulus-oocytes complexes after 40 h of *in vitro* maturation; **D**, Denuded *in vitro* matured-oocyte before *in vitro* fertilization; **E**, Oocytes and spermatozoa bound to the zona pellucida after 6 h of *in vitro* fertilization; **F**, Fixation in a solution of acetic:acid ethanol (1:3); **G**, Staining with Lacmoid in 45 % (v/v); **H**, Assessment of fertilization parameters. Contrast microscope image of polyspermic zygote with four pronuclei at 400x magnification. **I**, Fluorescent image of H-42 of blastocyst after *in vitro* culture.





APPENDIX
APÉNDICE

ISI Web of KnowledgeSMJournal Citation Reports[®]

2012 JCR Science Edition

MARKED JOURNAL LIST

Sorted by: Journal Title

Abbreviated Journal Title	ISSN	2012 Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	2012 Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Score	Article Influence [®] Score
ANIM REPROD SCI	0378-4320	5803	1.897	1.943	0.156	180	7.3	0.00904	0.422
FERTIL STERIL	0015-0282	28243	4.174	3.950	0.885	469	7.0	0.05413	1.021
PLOS ONE	1932-6203	133246	3.730	4.244	0.407	23406	2.4	0.77844	1.545
THERIOGENOLOGY	0093-691X	13198	2.082	2.521	0.371	428	7.9	0.01558	0.525

[Acceptable Use Policy](#)
Copyright © 2014 Thomson Reuters.

