

## DISCURSO DE INGRESO

---

# Liofilización espermática: un nuevo horizonte en las técnicas de criopreservación\*

## Sperm freeze-drying: new perspective in cryopreservation techniques

Lydia Gil Huerta

Académica Correspondiente de la Sección de Veterinaria de la Real Academia de Doctores de España  
[gilhuertalydia@gmail.com](mailto:gilhuertalydia@gmail.com)

### RESUMEN

En la actualidad existen disponibles diversas técnicas que facilitan la criopreservación de espermatozoides humanos y animales. En las últimas décadas se han desarrollado varios protocolos de preservación de espermatozoides como la congelación lenta, la congelación rápida y la congelación ultrarrápida (es decir, la vitrificación) considerados todos ellos como métodos convencionales de preservación espermática.

Una técnica de preservación en desarrollo actualmente es la liofilización espermática, método de conservación en el que no se requiere nitrógeno líquido. Y donde las muestras espermáticas liofilizadas pueden mantenerse por periodos de tiempo prolongado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  e incluso a temperatura ambiente. Un problema que presenta es que los espermatozoides recuperados siguiendo este método son inmóviles, siendo necesario la utilización de la ICSI para una fecundación exitosa. No obstante, el daño del ADN espermático es mínimo en comparación con los métodos tradicionales.

En este trabajo se analiza de forma pormenorizada los diferentes pasos a seguir en el proceso de liofilización espermática en las distintas especies y los logros conseguidos de una gran importancia cuando esta técnica representa un método económico para la creación de biobancos de gametos.

**PALABRAS CLAVE:** Espermatozoides, criopreservación, liofilización

### ABSTRACT

Nowadays, there are several sperm cryopreservation techniques available in different animal species, including human. In the last decades different sperm preservation protocols have been developed such as slow freezing, fast freezing and ultrafast freezing (i.e. vitrification) considered all of them as conventional methods of sperm preservation.

A new preservation technique is sperm freeze-drying, in which liquid nitrogen is not required and lyophilized sperm samples can be maintained for long time periods at  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  and even at room temperature. The main problem of this methodology is that the spermatozoa are immobile, and the use of ICSI is necessary for successful fertilization. However, sperm DNA damage is reduced compared to traditional cryopreservation methods.

In this study, we explain the steps in the sperm freeze-drying process, in different species and the achievements obtained by this technique that represents an economic method for the gamete biobanks development.

**KEYWORDS:** sperm, cryopreservation, freeze-drying

---

\* Discurso de ingreso como Académica Correspondiente de la Dra. D<sup>a</sup>. Lydia Gil Huerta pronunciado el 13-12-2016

## 1.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN

---

El alto valor genético de las razas ganaderas actuales, así como la necesidad de proteger a las razas en peligro de extinción, ha hecho necesario el empleo cada vez más frecuente de las distintas técnicas de reproducción asistida o biotecnologías reproductivas tales como la Inseminación Artificial en sus distintas variantes, Fecundación *in vitro* (FIV) o incluso la inyección espermática intracitoplasmática (ICSI), técnica de gran interés a pesar de su alto coste económico. La aplicación de estas biotecnologías necesita implementar cada vez métodos más eficaces de conservación de gametos, que garanticen desde un transporte a largas distancias y/o el almacenamiento a largo plazo con una alta fertilidad (Monteiro *et al.*, 2013). Si nos centramos en los trabajos experimentales realizados en crio-preservación espermática, la mayoría corresponden a las últimas cinco décadas, a pesar de que ya han transcurrido varios siglos desde la publicación por primera vez de los primeros estudios de congelación de espermatozoides en las distintas especies. Sin embargo, a pesar de toda la tecnología disponible actualmente, relacionada con las técnicas de conservación, la fertilidad con semen congelado sigue siendo relativamente baja con respecto al semen fresco en la mayoría de las especies ganaderas (Watson 1995; Marco y Gadea 2003; Anel *et al.* 2005).

Históricamente, los primeros registros datan de 1776, y corresponden a Lazaro Spallanzani, naturalista y director del Museo de Historia Natural de Pavía (Italia), el cual observó cómo espermatozoides procedentes de humanos, caballos y ranas quedaban inmovilizados cuando entraban en contacto con nieve, viéndose sorprendentemente reactivados cuando de nuevo eran sometidos a altas temperaturas. Este hecho, junto con estudios realizados por Mantegazza (1866) en los cuales se consiguió con éxito la congelación de espermatozoides humanos a  $-17^{\circ}\text{C}$ , supuso el inicio de las técnicas de congelación celular.

En 1937, Bernstein y Petropavlovsky, incorporan las primeras soluciones con glicerol para llevar a cabo congelaciones con espermatozoides en distintos mamíferos como conejo, cobaya, morueco, toro, cerdo, caballo, así como aves, pudiendo alcanzar temperaturas de  $-21^{\circ}\text{C}$ . Este descubrimiento, incorpora el concepto de crioprotector así como su correcto manejo y su utilización, lo que fue determinante para el avance en los procesos de criopreservación celular. El primer estudio publicado sobre la utilización de glicerol pertenece a Rostland (1946), quien trabajó con esperma de rana a unas temperaturas de  $-4$  a  $-6^{\circ}\text{C}$ .

La incorporación del glicerol como elemento crioprotector fue introducido por Polge *et al.* en 1949, lo que supuso un sorprendente avance en el desarrollo de los sistemas de congelación celular. A partir de este hallazgo, se presentaron los primeros trabajos en congelación seminal utilizando el glicerol en las especies: cunícola (Smith y Polge 1950), bovina (Amann y Almquist 1957), caprina (Fraser 1962) y humana (Freund y Wiederman 1963).

Desde sus inicios, los procesos de congelación de semen bovino, por la importancia que tiene, no han variado mucho, obteniéndose tasas de supervivencia elevadas tras la descongelación lo que permitió la incorporación del semen congelado bovino en los sistemas comerciales.

Diversos factores inciden en la criopreservación, los cuales se pueden clasificar en dos tipos, los internos o fijos y los externos o variables. Entre los factores internos destacan la propia especie (Holt 2000; Bag *et al.* 2004), la conformación del espermatozoide (diámetro, volumen, relación volumen y superficie), su estado de hidratación, la permeabilidad de la membrana tanto al agua como a los crioprotectores a diferentes temperaturas, etc. No se debe olvidar tampoco las diferencias individuales en cuanto a la resistencia o susceptibilidad a la criopreservación (Wolf 1995; Aurich *et al.* 1996; Holt 2000).

Entre los factores externos podemos mencionar la composición de los diluyentes (concentración de los distintos componentes, aditivos, etc.), la temperatura inicial y final del proceso, la velocidad de enfriamiento, los periodos de equilibrio (Mazur 1984; Fiser y Fairfull 1986), la velocidad de congelación y descongelación o el tipo de dilución (Morris y Watson 1984; Watson 1985; Fiser y Fairfull 1986; Fiser y Marcus 1989). Dentro de estos factores externos, Yoshida (2000) y Bryne *et al.* (2000), consideran que los factores fundamentales que afectan la supervivencia de los espermatozoides son: la combinación de temperatura de almacenamiento, la rampa de descenso de temperatura, la composición química del diluyente, la combinación del crioprotector y la higiene. Para alcanzar la perfecta criopreservación de una muestra espermática se deben considerar todos los factores, pero en el laboratorio sólo se puede actuar sobre los externos.

En la actualidad, la criopreservación es el único método viable para el almacenamiento de los espermatozoides durante periodos indefinidos de tiempo (Gibb y Aitken 2016), sin embargo, el proceso de congelación-descongelación resulta en sí perjudicial. Los daños se observan tanto en: la membrana, el citoesqueleto, el acrosoma, provocando una reducción de la integridad acrosomal, alteraciones en la cabeza y en el espacio subacrosómico, en el núcleo por lesiones en el ADN, en los genes esenciales para la fertilización y el normal desarrollo embrionario (Valcarce *et al.* 2013) y en el flagelo produciendo alteraciones en la motilidad.

A pesar del daño que provoca la congelación en la célula espermática, también se consigue reducir su catabolismo y el daño celular. Al restringir la tasa metabólica de las células, se disminuye tanto la producción de metabolitos tóxicos tales como el peróxido de hidrógeno, aldehídos de lípidos y dióxido de carbono, como el agotamiento del ATP, necesario para mantener la homeostasia (Hammerstedt 1993; Vishwanath y Shannon 1997) y la motilidad de los espermatozoides. También se consigue la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la producción y acidificación del medio a través de la acumulación de ácido láctico y dióxido de carbono procedentes de la glucólisis y la fosforilación oxidativa respectivamente (Gibb y Aitken 2016). Pero una peroxidación excesiva puede dañar la membrana plasmática del espermatozoide, con la resultante pérdida de la motilidad y/o capacidad de fertilización del semen. El daño en la membrana aumenta su permeabilidad, disminuyendo la actividad metabólica de la célula debido a la permeabilización de enzimas, sustratos, cofactores de nucleótidos y ATP (Storey 1997).

Los estudios de los últimos años se centran en la capacidad de fertilización del semen congelado y su relación con la producción de sustancias reactivas de oxígeno (ROS). Numerosos estudios han demostrado el efecto negativo de la lipoxidación en los

espermatozoides sometido al proceso de criopreservación (Chatterjee y Gagnon 2001). Este proceso aumenta los niveles de ROS, hecho que ha sido demostrado en varias especies, tales como: bovino, equino, humana, ratón y porcino. Entre las sustancias ROS destacan el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el hidroxilo ( $OH^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Beckman y Ames 1998). La generación de ROS se produce por la inducción de la fosforilación de tiroxina, controlada por una cascada cuyo mediador por excelencia es la adenosina monofosfato cíclica (cAMC). En una atmósfera aeróbica, la producción de ROS es inevitable pero puede tener un doble efecto sobre la funcionalidad espermática, pudiendo ser beneficiosa a bajas concentraciones actuando directamente en las funciones fisiológicas de la fecundación así como perjudiciales por exceso de producción con la consiguiente oxidación lo que provoca una serie de repercusiones tales como daños en la integridad de membrana (De Lamirande y Gagnon 1992), disminución de la fertilidad (Roca *et al.* 2005) y descenso de la motilidad.

Además de los efectos que tiene sobre la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante, la criopreservación ha sido relacionada con la fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Se han estudiado los daños que produce la criopreservación a nivel del ADN del espermatozoide (Hu *et al.* 2008). Las pruebas rudimentarias de análisis seminal no nos dan información sobre el ADN. La fragmentación del ADN es un factor muy importante para garantizar la funcionalidad espermática y se ha observado que está íntimamente relacionado con la inestabilidad de la cromatina (Fraser y Strzezek 2007). La integridad se puede ver afectada, siendo más sensible el ADN al proceso de fragmentación, cuando los espermatozoides son sometidos a procesos de criopreservación, siendo modulado por factores como el diluyente utilizado (Waterhouse *et al.* 2009). No podemos olvidarnos del proceso de apoptosis, es un proceso natural durante la espermatogénesis, que podría tener un papel importante en los procesos de daño del ADN puesto que en la especie humana la criopreservación estimula la producción de caspasas (Paasch *et al.* 2004), así como en los bovinos (Martin y cols. 2004) directamente asociadas al daño del ADN. Puede ser que se produzcan apoptosis anómalas, provocando alteraciones en el ADN mediante la acción de endonucleasas (Sakkas *et al.* 2003).

A pesar de que la congelación espermática, es la técnica habitualmente utilizada como método de conservación a largo plazo, se ha visto que tiene numerosas desventajas que van desde el daño celular que provoca bajas tasas de fertilidad y finalmente el propio coste de mantenimiento de las muestras que hace buscar nuevas alternativas que reduzcan estos costes y simplifiquen el mantenimiento sin depender del nitrógeno líquido como medio de conservación a largo plazo.

## 2.- LIOFILIZACIÓN ESPERMÁTICA

---

### *Definición y antecedentes*

La liofilización es un proceso de conservación mediante sublimación, utilizado con el fin de reducir las pérdidas de los componentes volátiles o termo-sensibles. En este proceso de

secado, los productos obtenidos no se ven alterados en sus propiedades y se rehidratan fácilmente (Alvarado 1979; Alvarado 1996; Krokida 1998; Ramírez y Cañizares 2003).

La liofilización espermática surge ante la necesidad de nuevas técnicas de conservación y mantenimiento del material genético en diferentes especies animales. Es un método de conservación en el cual, tras la congelación, se consigue el secado de los materiales mediante la sublimación del hielo. El principal objetivo de este proceso es eliminar el agua de la muestra para inhibir las reacciones químicas y biológicas. Durante la liofilización no se alteran las propiedades del producto, siendo posible rehidratarlo fácilmente (Krokida *et al.* 1998).

Las ventajas frente a la criopreservación convencional son muchas: un menor espacio de almacenamiento, un menor coste económico, la prevención del daño térmico, la inhibición del crecimiento microbiano y la obtención de un producto más barato, estable y fácil de transportar y almacenar. El material liofilizado se puede conservar a distintas temperaturas y reconstruirse mediante la adición de agua.

Un proceso rudimentario de liofilización fue inventado por los incas para la fabricación del chuño (papa liofilizada) y charqui (carne de llama), 200 años a.C. y aprovechado posteriormente por los vikingos para la conservación del arenque. A mitad del siglo XIX reaparece en escena este procedimiento por la necesidad de conservación de tejidos animales y vegetales debido a los trabajos de Pasteur y otros científicos.

En 1905, Benedict empleó por primera vez el vacío para secar material animal. Posteriormente Shackell (1909) mejoró la técnica añadiendo una bomba de vacío mecánica al equipo de liofilización. Más tarde, gracias a esta técnica y este equipo fue posible producir bacterias liofilizadas (Hammer 1911; Rogers 1914; Swift 1921). El proceso se mejoró nuevamente gracias a Flosdorf y Mudd (1935), quienes liofilizaron tejidos animales, fármacos, plasma sanguíneo y antibióticos. Los primeros intentos de conservar células mediante deshidratación se realizaron sobre bacterias, virus y otros microorganismos (Flosdorf y Kimball 1939). Durante toda la Segunda Guerra Mundial y en la posguerra, la fabricación de plasma de sangre seco, fue quizás el primer uso real de la tecnología de liofilización como un proceso productivo comercial. En 1958, la liofilización fue aplicada a la industria alimentaria, especialmente a la leche, huevos, café, sopa y zumos (Ramírez y Cañizares 2003). En 2008, Loi *et al.* demostraron que células somáticas liofilizadas y almacenadas durante 3 años a temperatura ambiente, eran capaces de dirigir el desarrollo embrionario hasta la fase de blastocisto al transferir su núcleo a ovocitos enucleados.

Los científicos han centrado su atención en la adaptación de la tecnología de liofilización a la conservación de semen de mamíferos, para permitir su almacenamiento a temperatura ambiente durante prolongados periodos de tiempo. Los primeros intentos de liofilizar espermatozoides se llevaron a cabo en 1949. Se realizaron a partir de semen de gallo diluido en una solución de Ringer que contenía glicerol y eliminando el 90% de agua. Después de 2 horas de almacenamiento a temperatura ambiente, la muestra fue rehidratada y el 50% de los espermatozoides recuperaron su motilidad aunque nunca se determinó la fertilidad (Polge *et al.* 1949). Ulteriores intentos de liofilizar espermatozoides humanos (Sherman 1954) y bovinos (Bialy y Smith 1957) en un estado viable fueron infructuosos.

En 1998, Wakayama y Yanagimachi obtuvieron la primera descendencia viva a partir de semen de ratón liofilizado. Estos autores demostraron que semen muerto no significa ADN muerto, de modo que el semen de ratón podía ser liofilizado sin perder su capacidad de activar al ovocito y dar lugar a desarrollo embrionario empleando la técnica de ICSI.

Es a partir de esta fecha, que los diferentes grupos comienzan a investigar (**Tabla 1**) en el desarrollo de la técnica de liofilización aplicada a la conservación espermática.

**Tabla 1:** Grupos de investigación que trabajan en liofilización espermática

<b>Especie</b>	<b>Referencias</b>
Ratón	Kaneko <i>et al.</i> 2003
	Kaneko <i>et al.</i> 2005
	Kaneko <i>et al.</i> 2006
	Kaneko <i>et al.</i> 2012
	Kawase <i>et al.</i> 2005
	Kawase <i>et al.</i> 2007a, b, 2009
	Kusakabe <i>et al.</i> 2001, 2008
	Wakayama y Yanagimachi, 1998
	Ward <i>et al.</i> 2003
Conejo	Liu <i>et al.</i> 2004
	Dokingo <i>et al.</i> 2018
	Watanabe <i>et al.</i> 2009
Perro	Olaciregui <i>et al.</i> 2015a
	Olaciregui y Gil 2016
Gato	Ringleb <i>et al.</i> 2011
	García Campos <i>et al.</i> 2014
Cerdo	Kwon <i>et al.</i> 2004
	Men <i>et al.</i> 2013
	Choi <i>et al.</i> 2011
Caballo	Olaciregui <i>et al.</i> 2015b
	Abdalla <i>et al.</i> 2009
	Hara <i>et al.</i> 2011
Toro	Hara <i>et al.</i> 2014
	Keskintepe <i>et al.</i> 2002
	Martins <i>et al.</i> 2007a,b
Morueco	Olaciregui <i>et al.</i> 2017



Posteriormente en 2001, Kusakabe demuestra que durante la liofilización se mantiene la integridad cromosómica de los espermatozoides de ratón, así como su capacidad para activar espontáneamente los ovocitos y producir un desarrollo embrionario normal tras la ICSI. Por lo tanto, aunque el semen no sobrevive a la liofilización, se mantiene la capacidad de su núcleo de iniciar un desarrollo embrionario normal (Wakayama y Yanagimachi 1998; Kaneko *et al.*, 2003). Aunque las estructuras del espermatozoides pueden dañarse en el proceso de liofilización, los factores intracelulares que activan al ovocito son preservados (Ward *et al.* 2003).

### *Fases de la liofilización espermática*

Las principales fases del proceso de liofilización espermática (**Figura 1**) son: la preparación de la muestra y adición del medio de liofilización, la liofilización, el almacenamiento de la muestra, la rehidratación de los espermatozoides liofilizados, la evaluación del daño y finalmente la ICSI. Este proceso de liofilización espermática se aplica en las distintas especies animales y está basado en el protocolo inicial descrito por Wakayama y Yanagimachi (1998) con pequeñas modificaciones como se describe a continuación.



**Figura 1:** Fases del proceso de liofilización: Preparación de la muestra y adición del medio de liofilización, liofilización de la muestra, rehidratación de la muestra liofilizada, evaluación de daños e ICSI

#### *1.-Preparación de la muestra con el medio de liofilización*

Las muestras de semen para liofilizar pueden ser frescas (semen epididimario o eyaculados completos) o congeladas. En porcino se utilizan eyaculados completos (Kwon *et al.* 2004; Men *et al.* 2013). En la especie equina, Choi *et al.* (2011) emplean eyaculados libres de gel. En la especie cunícola, Liu *et al.* (2004) resuspenden el eyaculado directamente en el diluyente de liofilización y en la especie canina Watanabe *et al.* (2009) utilizan la segunda fracción del semen recogido por manipulación digital, que se resuspende en el medio de liofilización descrito por Kawase *et al.* (2007). En bovino, las muestras se obtienen a partir de semen congelado (Hara *et al.* 2011) y se depositan en el medio de liofilización.

Los medios de liofilización están diseñados para la inhibición de la acción de las endonucleasas, estas pueden aparecer por daño en la membrana espermática durante la

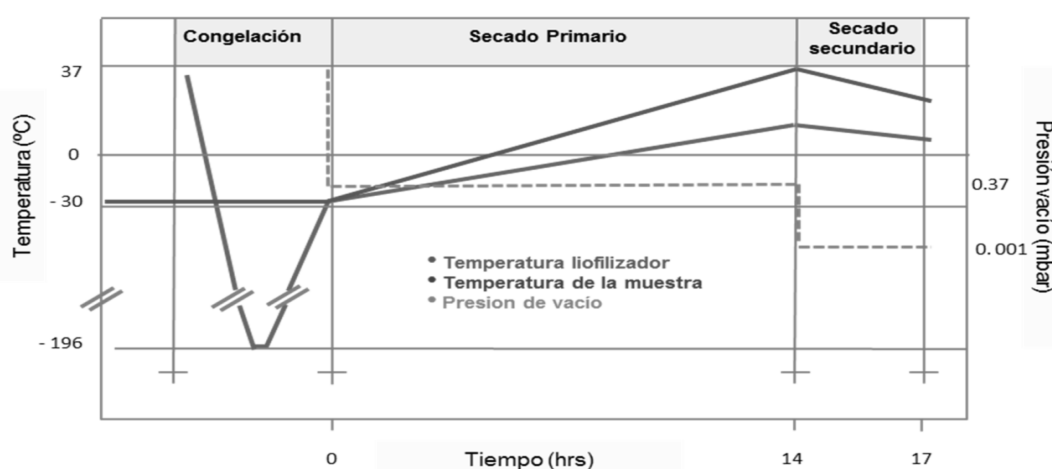
lioofilización o en la previa congelación sin crioprotectores, y activados por cationes divalentes como son  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Sotolongo *et al.* 2005), por ello la mayoría de los autores han empleado los secuestradores de cationes como el EGTA (*ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N',N'-tetraacetic acid*) y el EDTA (*2,2',2'',2'''-(ethane-1,2-diyldinitrilo) tetraacetic acid*). Ambos son igualmente efectivos inhibiendo las endonucleasas (Nakai *et al.* 2007). Los medios usados para la liofilización se basan en el medio definido por Kusakabe *et al.* (2001) constituidos de 50 mM EGTA, 50 mM NaCl, y 10 mM Tris-HCl buffer. Kaneko *et al.* (2003) indicaron que la solución de liofilización debe ser ligeramente alcalina, por ello todos los trabajos ajustan el pH de los medios de liofilización a 8.0.

Se han realizado variaciones en la composición de los medios, así Kaneko *et al.* (2006, 2012) sustituye EGTA por EDTA cuya acción quelante del calcio es similar. En la especie equina, Choi *et al.* (2011) utilizando un medio comercial, DMEM/F-12 y 10% suero fetal bovino (FCS) presentaron el primer potro nacido vivo a partir de semen liofilizado. En la especie bovina (Keskinetepe *et al.* 2002; Martins *et al.* 2007) usaron como medio el TCM199 con sales de Hank's suplementado con 10% FCS (Suero fetal bovino) pero no mejoran los resultados obtenidos en relación al medio con EGTA. Otro de los elementos que ha sido estudiado como parte de los medios de liofilización es la trehalosa. Se emplearon medios con trehalosa en: ratón (McGinnis *et al.* 2005), vacuno (Martins *et al.* 2007a) y cerdo (Men *et al.* 2013; García Campos *et al.* 2014). Crowe y Crowe (1992) indicaron que la trehalosa es un disacárido no reductor que exhibe una alta temperatura de transición a hielo y una gran estabilidad durante el procesado y almacenamiento. Debido a sus características, es capaz de estabilizar y proteger membranas y proteínas bajo condiciones ambientales extremas, permitiendo a organismos anhidrobióticos sobrevivir a ciclos de hidratación-deshidratación. El proceso natural por el cual la trehalosa ayuda a los organismos anhidrobióticos a sobrevivir a la deshidratación ha suscitado mucho interés por su potencial en el papel de protección de biomoléculas, incluyendo el ADN espermático (Crowe y Crowe 1992). McGinnis *et al.* (2005) reportaron que el porcentaje de embriones de dos células que se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto fue superior cuando se utilizó trehalosa en el medio de secado. Asimismo, Martins *et al.* (2007a) demostró que la presencia de trehalosa en un medio suplementado con FCS proporciona mejor protección al semen bovino que FCS sólo. En un estudio reciente con semen porcino, Men *et al.* (2013) sugirieron que la adición de trehalosa al medio de liofilización a concentraciones adecuadas, mejora la integridad del ADN después de los procesos de liofilización, pero no promueve la fertilización y posterior desarrollo al estadio de blastocisto. Por último, García Campos (2014) observó que un medio de liofilización suplementado con lactosa y sorbitol (50 mM NaCl, 10 mM Tris, 10 mM EDTA, 0.117 M sorbitol, 0.15 M lactosa) resultó con un 98% y 100% de integridad del ADN a dos diferentes temperaturas de almacenamiento (16 y 25°C). Se desconoce si la adición al medio de liofilización de antioxidantes, como es el ácido rosmarínico, reduce el daño provocado por el stress oxidativo durante proceso de liofilización, daño minimizado como se ha podido comprobar en la congelación espermática en distintas especies (Malo *et al.* 2010, 2011; Mascaro *et al.* 2013; Luño *et al.* 2014, 2015).



## 2.-Liofilización y almacenamiento de la muestra liofilizada

Todo proceso de liofilización, independientemente de la muestra, comienza con la fase de congelación, continúa con la fase de secado primario y finaliza con el secado secundario (Jennings 2002). En la **Figura 2** se muestran las condiciones de liofilización óptimas. Los principales factores que afectan a la liofilización del semen son la presión de vacío, la temperatura y el periodo de almacenamiento. La interacción entre temperatura, presión de vacío y secado, regula la cinética y el grado de secado, factores que ejercen un gran impacto sobre los espermatozoides (Hochi *et al.* 2011).



**Figura 2:** Condiciones de liofilización (Gil *et al.*, 2014)

La primera fase (congelación) está relacionada directamente con la cantidad de agua presente en la muestra. Se han utilizado para conseguir esta fase, distintos métodos. El más sencillo es la inmersión de los viales con la muestra en nitrógeno líquido durante 20 s (Kusakave 2001) o bien introducirlos en un congelador de -45°C o de -80°C (Keskintepe *et al.* 2002; Nakai *et al.* 2007; Men 2013). Durante la congelación, el agua forma cristales y los solutos quedan confinados a la región intersticial entre los cristales de hielo. La temperatura necesaria para congelar completamente la muestra depende de las características del solvente y de los componentes de la muestra.

El secado primario es cuando el material congelado se somete a la acción de vacío produciéndose la sublimación para eliminar el agua residual, perjudicial para la conservación. Kawase *et al.* (2007) determinaron que la presión de vacío era 0.37 mbar en la primera rampa de liofilización, aunque este valor es dependiente del propio liofilizador. Seguidamente se efectúa el denominado secado secundario que corresponde a la desorción o liberación de gran parte del agua adsorbida (Khalloufi 2001). Esta operación se realiza a temperatura constante y a vacío, lo que permite especialmente en el secado secundario eliminar el oxígeno, lo que garantiza la conservación de productos oxidables, si se guardan en envases herméticos.

Distintas presiones y tiempos de liofilización se han utilizado y como indican Hochi *et al.* (2011), éste es uno de los puntos de mayor importancia de todo el proceso, que repercutirá en el número de embriones o crías vivas obtenidas en las distintas especies animales (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Condiciones de liofilización

Especie	Referencias	Presión (mbar)	Tiempo (h)
Ratón	Kaneko <i>et al.</i> 2003	0.030-0.033	4
	Kaneko <i>et al.</i> 2005	0.037	4
	Kaneko <i>et al.</i> 2006	0.030 y 0.045*	4
	Kaneko <i>et al.</i> 2012	0.038 y 0.058*	4
	Kawase <i>et al.</i> 2005	0.040 y 0.001*	8 y 6*
	Kawase <i>et al.</i> 2007a, b, 2009	0.37 y 0.001*	13 y 6*
	Kusakabe <i>et al.</i> 2001, 2008	0.032-0.040	4
	Wakayama y Yanagimachi 1998	0.001	12
Conejo	Ward <i>et al.</i> 2003	0.030-0.033	4
	Liu <i>et al.</i> 2004	0.023-0.040	4
Perro	Watanabe <i>et al.</i> 2009	0.37 y 0.001*	-
	Olaciregui <i>et al.</i> 2015, 2016	0.053 y 0.018	
Gato	Ringleb <i>et al.</i> 2011	0.16	4
	García Campos <i>et al.</i> 2014	0.015 y 0.005*	24 y 6*
Cerdo	Kwon <i>et al.</i> 2004	0.039	-
	Men <i>et al.</i> 2013	0.13 y 0.13*	19 y 3*
	Choi <i>et al.</i> 2011	0.13	30
Caballo	Olaciregui <i>et al.</i> 2015	0.053 y 0.018	
	Abdalla <i>et al.</i> 2009	0.37 y 0.001*	14 y 3*
	Hara <i>et al.</i> 2011	0.37 y 0.001*	14 y 3*
Toro	Hara <i>et al.</i> 2014	1.98, 0.57 o 0.12	6
	Keskintepe <i>et al.</i> 2002	0.19	12-18
	Martins <i>et al.</i> 2007 a, b	0.35	12-16

Concluida la liofilización espermática, cuyo objetivo es conseguir una preservación duradera de los espermatozoides sin necesidad de utilizar nitrógeno líquido, se procede a su conservación. Se han mantenido las muestras a 4°C, 25°C, -80°C o -196°C (Kwon *et al.* 2004; Abdalla *et al.* 2009). Se ha observado que la conservación a 25°C reduce la tasa de división y se asocia a un mayor número de aberraciones cromosómicas y una mayor incidencia de daño en el ADN que el mantenimiento a 4°C o a -196°C (Hochi *et al.* 2008).

En la mayoría de los trabajos realizados, la conservación se realiza a 4°C de acuerdo con los estudios realizados por Kusakabe *et al.* (2001). Wakayama y Yanagimachi (1998) indicaron que el almacenamiento a 4 o 25°C hasta 3 meses no afectó a la capacidad de los espermatozoides de ratón para participar en el desarrollo embrionario. Sin embargo, Kwon *et al.* (2004) observaron en porcino, que al emplear semen liofilizado almacenado a 25°C se desarrolló un número de embriones significativamente menor, que al emplear semen almacenado a 4°C. Además, sólo los ovocitos microinyectados con semen almacenado a 4°C se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto (Kawase *et al.* 2005).

Kaneko y Nakagata (2005) informaron que la integridad de los espermatozoides de ratón liofilizados y almacenados a 24°C se mantuvo adecuadamente durante un mes, pero a continuación comenzó a disminuir gradualmente. Estudios similares con espermatozoides de rata almacenados durante un año a 25°C mostraron mayor porcentaje de anomalías cromosómicas que los almacenados a 4°C (Hochi *et al.* 2008). Finalmente, Kaneko y Serikawa (2012) consiguieron obtener descendencia a partir de ovocitos microinyectados con espermatozoides de ratón liofilizados que habían sido conservados a 4°C durante 3 años.

Los tiempos de almacenamientos de semen liofilizado pueden ser muy largos, oscilando desde días hasta años. Además, es posible el transporte o la conservación durante un corto periodo a temperatura ambiente. A este respecto, Kaneko y Serikawa (2012) no hallaron diferencias significativas entre la tasa de desarrollo embrionario producido a partir de espermatozoides liofilizados y almacenados durante 3 años, respecto a aquellos almacenados durante un corto periodo de tiempo.

### **3.-Rehidratación y evaluación del daño**

La muestra se rehidrata con agua de alta calidad (agua milliQ) observándose que los espermatozoides están inmóviles y presentan un elevado número de cabezas sueltas, colas dobladas o con aspecto fragmentado.

Se deben evaluar los posibles daños del ADN así como las alteraciones de los cromosomas. Aunque las estructuras generales del espermatozoide se pueden dañar por la liofilización, el ADN y los factores intracelulares que activan al ovocito se pueden preservar (Ward *et al.* 2003). Se sugirió que las endonucleasas están entre las causas de fragmentación del ADN en los espermatozoides (Kusakabe *et al.* 2001) o bien por estrés oxidativo (Twigg *et al.* 1998). Las endonucleasas pueden aparecer por daño en la membrana espermática durante la liofilización o en la congelación previa sin crioprotectores, siendo activadas por cationes divalentes como son Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Sotolongo *et al.* 2005), como se ha mencionado. Algunos autores indican que la fragmentación del ADN espermático no se produce de manera inmediata por acción de las endonucleasas mediada por un receptor, sino que sería inducida de manera secundaria como resultado de la formación de daño oxidativo en el ADN (de Lullis *et al.* 2009).

Para evaluar el grado de fragmentación del ADN se han utilizado distintas técnicas como TUNNEL Assay (Martins *et al.* 2007; Nakay *et al.* 2007) observándose un daño del ADN inferior al 5% en los espermatozoides liofilizados; Alkaline Comet Assay (Kawase *et al.* 2009; Hara *et al.* 2011) no observando diferencias significativas entre semen fresco y liofilizado, Analisis de

Birefringencia (Gianaroli *et al.* 2012) que permite determinar el estado del acrosoma; Halomax Kit, donde el tamaño de los halos indica el nivel más acelerado de la fragmentación del ADN (Men *et al.* 2013); Acridine Orange test (AOT) para observar la estabilidad de la cromatina, técnica menos específica y que da valores inferiores con respecto a las diferentes técnicas utilizadas con este objetivo (Martins *et al.* 2007; García Campos 2011).

#### 4.-Inyección espermática intracitoplasmática (ICSI)

La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) es la introducción directa de un espermatozoide en el ovocito después de atravesar la zona pelúcida y la membrana plasmática (Devroey y Van Steirteghem 2004). La primera vez que se aplicó la ICSI, se hizo microinyectando espermatozoides de erizos de mar en huevos de la misma especie (Hiramoto 1962). Posteriormente Uehara y Yanahimachi (1976), al trabajar con hámster, se les atribuye la primera experiencia de ICSI en mamíferos.

No fue hasta 1988 cuando se obtuvo por primera vez descendencia viva como producto de la ICSI en conejos (Iritani *et al.* 1988) y dos años más tarde se consiguió el nacimiento de terneros vivos (Goto *et al.* 1990).

Cuando se somete a una liofilización a los espermatozoides, únicamente se puede utilizar esta técnica, dado que estos están alterados y sin movilidad. Todos los trabajos aplican esta técnica y se basan en la descrita por Kimura y Yanagimachi (1998) con pequeñas modificaciones según la especie animal.

Los espermatozoides rehidratados tras una centrifugación son resuspendidos en el medio para realizar la microinyección. Realizada la maduración ovocitaria, los ovocitos son microinyectados con un sólo espermatozoide.

La posición del corpúsculo polar (CP) sirve como referente para evitar dañar la placa metafásica. Algunos estudios han demostrado que la posición del CP durante la inyección afecta a la fertilización y/o al desarrollo embrionario (Nagy *et al.* 1995; Blake *et al.* 2000).

En la mayoría de los mamíferos, para que se lleve a cabo la descondensación nuclear del espermatozoide y la formación de pronúcleos se necesita la activación del ovocito, sin embargo existen diferencias entre especies (Keskintepe y Brackett 2000). Durante la fertilización *in vivo*, la activación es iniciada por el espermatozoide y es acompañada por aumentos transitorios en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , los cuales son esenciales para una adecuada activación. Se ha demostrado que los espermatozoides liofilizados son capaces de movilizar el  $Ca^{2+}$  (Liu *et al.* 2005; Abdalla *et al.* 2009) por lo que el proceso de fecundación está garantizado. Los distintos métodos que se han empleado para la activación ovocitaria han sido: mecánicos, químicos o por estimulación eléctrica, dando como resultado un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Gomez *et al.* 1998).

Mientras que en bovino y porcino es necesario activar el ovocito tras el proceso de inyección (Keskintepe y Brackett 2000), Catt y Rhode (1995) observaron que los ovocitos de ovinos pueden ser activados por el propio proceso de inyección. En este sentido, Gómez (1997, 1998) comprobó que los ovocitos de oveja madurados *in vitro* podían ser activados por el

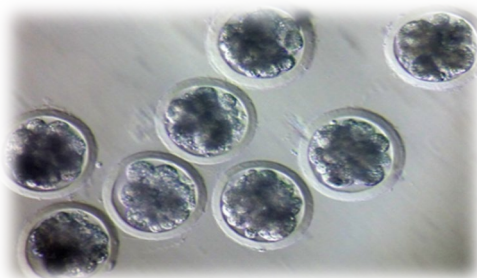
estímulo mecánico de la inyección, pero que la manipulación por sí misma no es suficiente para conseguir una activación ovocitaria correcta. Dado que el calcio y el ionóforo de calcio pueden inducir la activación del ovocito, Gómez *et al.* (1998) evaluaron el efecto de la concentración de calcio sobre la fertilización y activación de ovocitos inyectados por ICSI. En este estudio no encontraron diferencias en los porcentajes de fertilización tras la ICSI cuando los ovocitos se cultivaron *in vitro* en medio con cloruro de calcio o ionóforo de calcio, pero la tasa de fertilización fue inferior cuando los ovocitos se cultivaron en medio sin calcio. Shirazi *et al.* (2008) determinaron la necesidad de la activación tras la ICSI en ovinos. Observaron que el porcentaje de desarrollo embrionario fue mayor en el caso de cigotos derivados de ICSI con posterior activación en comparación con aquellos obtenidos sin activación. Por lo tanto, ni el espermatozoide por sí solo, ni la activación mecánica son suficientes para conseguir la activación y formación de pronúcleos. Por lo tanto, tras la ICSI en ovocitos de ovino, la activación química es esencial para activar (formación de pronúcleos femeninos) y formar cigotos con pronúcleos masculino y femenino (2PN) (Olaciregui *et al.*, 2017).

Estimulaciones eléctricas, iomycine sola o en combinación con 6- (dimetilamino) purina (6-DMAP) e ionóforo de calcio A23187 han permitido provocar la activación cuando se utilizan espermatozoides liofilizados. En équidos, Choi *et al.* (2011) utilizaron para la activación extracto citoplasmico de semen, obteniendo el primer potro nacido procedente de semen liofilizado.

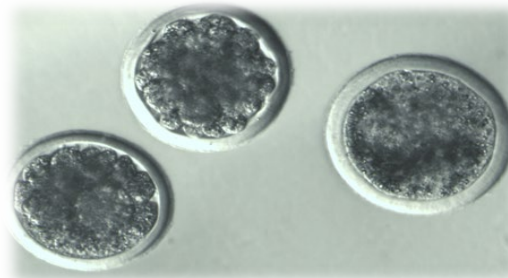
### 3.- RESULTADOS PRESENTES Y FUTUROS DE LA LIOFILIZACIÓN

---

Se ha conseguido desarrollo embrionario mediante ICSI con semen liofilizado en humanos (Katayose *et al.* 1992; Kusakabe *et al.* 2008), hamsters (Katayose *et al.* 1992), vacuno (Keskintepe *et al.* 2002; Martins *et al.* 2007 a, b), cerdos (Kwon *et al.* 2004; Olaciregui *et al.* 2017a), ovinos (Olaciregui *et al.* 2017b) macacos (Sanchez-Partida *et al.* 2008) y gatos (Moisan *et al.* 2005; Ringleb *et al.* 2011). Descendencia viva se ha logrado en ratones (Wakayama y Yanagimanchi 1998; Kaneko *et al.* 2003, Ward *et al.* 2003), hamster (Muneto y Horiuchi 2011), rata (Hirabayashi *et al.* 2005; Hochi *et al.* 2008) y conejo (Liu *et al.* 2004).



Embriones porcinos



Embriones ovinos

**Imagen 3:** Embriones procedentes de espermatozoides liofilizados mediante ICSI (Olaciregui *et al.*, 2017)

Sin embargo, en grandes especies domésticas, excepto en los équidos, sólo se ha alcanzado el estadio de blastocisto a partir de ovocitos microinyectados con espermatozoides liofilizados (**Imagen 3**). Choi en 2011, comunico la primera producción de descendencia viva a partir de semen liofilizado en una especie no laboratorial. En este estudio se realizó ICSI con semen de caballo liofilizado y se consiguió el desarrollo de blastocistos, una preñez normal y el nacimiento de un potro sano.

La ausencia de cría viva, procedente de espermatozoides liofilizados, en las especies ganaderas, excepto en el caso de la especie equina, hace que las ventajas que supondría implantar su uso provoquen un cierto rechazo, no obstante se hace necesario seguir investigando para determinar que factor o factores inciden directamente en el proceso de liofilización, que factores impiden la obtención de desarrollo embrionario, posterior gestación y parto normal. No obstante, la tecnología de liofilización espermática está muy estandarizada y se podría aprovechar, a pesar de existir zonas oscuras, para liofilizar espermatozoides de especies en peligro de extinción y crear biobancos para su utilización o conservación de forma indefinida, en el momento en que se conozca cómo mejorar y obtener éxito de la misma forma que se ha obtenido en las técnicas convencionales de reproducción asistida

## BIBLIOGRAFÍA

---

Abdalla H, Hirabayashi M, Hochi S: The ability of freeze-dried bull spermatozoa to induce calcium oscillations and resumption of meiosis. *Theriogenology* 2009; 71: 54

Aitken RJ, Baker MA: Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 2004; 16(5):581-588. Review

Alvarado JD: Ensayos de almacenamiento y estudio de un mecanismo de secado a temperaturas bajas en papa (*Solanum tuberosum*). Tesis para optar por el título de magister científica. CESNA-INCAP. Universidad de San Carlos de Guatemala. 1979; 68 y anexos.

Alvarado JD: Principios de ingeniería aplicada a alimentos. Ed. Radio comunicaciones OEA, 1996; Quito Ecuador.

Amann R P, Almquist J O: Freezing of bovine semen. II. Effect of milk solids level, glycerol level and fructose on freezability of bull spermatozoa in milk diluents. *J Dairy Sci* 1957; 40:1542.

Anel L, Kaabi M, Abroug B, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, de la Fuente LF, de Paz P: Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology* 2005; 63(4):1235-1247

Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C: Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 1996; 46:791-797.



- Bag, S., A. Joshi, S. M. K. Naqvi and J. P. Mittal. Effect of post-thaw incubation on sperm kinematics and acrosomal integrity of ram spermatozoa cryopreserved in medium-sized French straws. *Theriogenology* 2004; 62:415-424
- Beckman KB, Ames BN: The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews* 1998; 78: 547-581
- Benedict, M: The determination of water in foods and physiological preparations *Am J Physiol.* 1905; 13: 309-329.
- Bernstein, AD, Petropavlovski, VV: Influence of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Buletten experimental noi biologii i medicini* 1937; III: 17-28
- Bialy G, Smith VR: Freeze-drying of bovine spermatozoa. *J Dairy Sci* 1957; 40: 739-745.
- Blake M, Garrisi J, Tomkin G, Cohen J: Sperm deposition site during ICSI affects fertilization and development. *Fertil Steril* 2000; 73(1): 31-37.
- Catt JW, Rhodes SL: Comparative intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in human and domestic species. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7:161-166.
- Chatterjee S, Gagnon C: Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev.* 2001; 59(4):451-458
- Choi YH, Varner D, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K: Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction* 2011; 142: 529-538.
- Crowe LM, Crowe JH: Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv Space* 1992; 12: 239-247
- De Lamirande E, Gagnon C: Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology* 1992; 13: 368-378
- Devroey P, Van Steirteghem A: A review of ten years experience of ICSI. *Res Hum Reprod Update* 2004; 10(1):19-28
- DeFullis GN, Newey RJ, King BV, Aitken RJ: Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro. *PLoS One* 2009; 4 (7): 6446
- Díez Sainz J: Liofilización espermática en la especie ovina: Una alternativa a la conservación de material genético. 2015; TFM UZ
- Domingo P, Olaciregui M, González N, De Blas I, Gil L. Long-term preservation of freeze-dried rabbit sperm by adding rosmarinic acid and different chelating agents. *Cryobiology*, 2018; 81, 174-177.

Fiser PS, Fairfull RW: Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology* 1986; 25(3):473-84

Fiser PS, Marcus GJ: Continuous live-dead discrimination of ram sperm during freezing. *Gamete Res.* 1989; 22(3):301-305

Flosdorf EW, Mudd S: Procedure and apparatus for preservation in "liophile" form of serum and other biological substances. *J Immunol* 1935; 29: 389-425

Flosdorf EW, Kimball AC: Studies with h. Pertussis: Maintenance of cultures in phase I. Department of Bacteriology, 1939: University of Pennsylvania Medical School.

Fraser AF: A Technique for Freezing Goat Semen and Results of a Small Breeding Trial. *The Canadian Veterinary Journal.* La revue veterinaire canadienne 1962; 3: 133-144

Fraser L, Strzezek J: Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? *Theriogenology* 2007;68 248-257

Freund M, Wiederman J: Controlling and recording rates of freezing and defrosting of human semen. *J Applied Physiology* 1963; 18: 407-409

García Campos A: Nueva técnica de preservación espermática: liofilización de espermatozoides en la especie porcina. 2011; TFM UZ

García Campos A, Gil L, Malo C, Martínez F, de Blas I: Effect of different mono disaccharides on the freeze-dried boar spermatozoa: a preliminary study. *CryoLetters* 2014; 35(4)277-285

Gianaroli L, Magli MC, Stanghellini I, Crippa A, Crivello AM, Pescatori ES, Ferraretti AP: DNA integrity is maintained after freeze-drying of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 2012; 97, nº 5

Gibb Z, Aitken R: The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model.

*Biomed Res Int* 2016; 2016: 9380609. Review

Gil L, Olaciregui M, Luño M, Malo C, González N, Martínez F: Current Status of Freeze-Drying Technology to Preserve Domestic Animals Sperm. *Reprod Dom Anim* 2014; 49:72-81

Gómez E, Perez Cano I, Martínez MC, Amorocho B, Ballesteros A, Rubio MC, Gil Salom M, Remohi J, Pellicer A: Sperm morphology and ICSI: a morphometric study. *Human Reprod* 1997; 12(1):22

Gómez MC, Catt JW, Evans G, Maxwell WM: Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 1998; 10:197-205

Goto K, Kinoshita, Takuma, Ogawa K: Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet Record* 1990; 127: 517-520

Hara H, Abdalla H, Morita H, Kuwayana M, Hirabayashi M and Hochi S: Procedure for bovine ICSI, not Sperm Freez-drying, Impairs the Function of the microtubule-organizing center. *Journal Reproduction and Development* 2011; vol. 57, nº 3

Hörndler Gil, L: Efecto de la temperatura de conservación y del medio de rehidratación en los espermatozoides de ovino liofilizado. 2015; TFG UZ

Hammer BW: A note on the vacuum desiccation of bacteria. *J. Med. Research* 1911; 24:527-530

Hammerstedt, R. H: Maintenance bioenergetic balances in sperm a prevention of lipid peroxidation: a review off the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 675-690

Hirabayashi M, Kato M, Ito J, Hochi S: Viable offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote* 2005; 13:79-85

Hochi S, Watanabe K, Kato M, Hirabayashi M: Live rats resulting from injection of oocytes with spermatozoa freeze-dried and stored for one year. *Mol Reprod Dev* 2008; 70:1776-1781

Hochi S, Abdalla H, Hara H, Hirabayashi M. Challenging endeavour for preservation of freeze-dried mammalian spermatozoa. *J Reprod Dev* 2011, 57, 557-563

Holt W: Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62:3-22.

Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Li WY: Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology* 2008; 57: 257-262

Iritani A, Utsumi K, Miyake M, Hosoi Y, Saeki K: In vitro fertilization by a routine method and by micromanipulation. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 541:583-90

Jennings TA: Lyophilization. In: *Introduction and Basic Principles* (ed) 2002; Interpharm CRC, New York.

Kaneko T, Whittingham DG, Overstreet JW, Yanagimachi R: Tolerance of the mouse sperm nuclei to freeze-drying depends on their disulfide status. *Biol Reprod* 2003; 69(6):1859-1862

Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R: Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 2003; 68(1):136-139

Kaneko T, Nakagata N: Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse spermatozoa. *Comp Med* 2005; 5:140-144

Kaneko T, Nakagata N: Improvement in the long-term stability of freeze-dried Mouse spermatozoa by adding of a chelating agent. *Cryobiology* 2006; 53: 279-282

Kaneko T, Serikawa T: Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Cryobiology* 2012; 64:211-214

Kawase Y, Araya H, Kamada N, Jishage K, Suzuki H: Possibility of Long-term preservation of freeze-dried mouse sperm reproduction ability and preservation potential. *Reproduction* 2005; 133: 841-846

Kawase Y, Hani T, Kamada N, Jishage K, Suzuki H: Effect of pressure at primary drying of freeze-drying mouse sperm reproduction ability and preservation potential. *Reproduction* 2007; 133: 841-846

Kawase Y, Wada NA, Jishage K: Evaluation of DNA fragmentation of freeze-dried mouse sperm using a modified sperm chromatin structure assay. *Theriogenology* 2009; 72:1047-1053

Keskintepe L, Brackett BG: Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2000; 53:1041-1052

Keskintepe L, Pacholczyk G, Machinicka A, Norris K, Curuk MA, Khan L, Brackett BG: Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol.Reprod* 2002; 67: 409-15

Khalloufi S: La temperature de transition vitreuse: une nouvelle approche pour optimiser la lyophilisation. *Thèse de Doctorat* 2001. Université Laval, Quebec

Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry AC, Yanagimachi H: Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol Reprod* 1998; 58: 1407-1415.

Krokida MK, Karathanos VT, Maroulis ZB: Effect of freeze-drying conditions on shrinkage and porosity of dehydrated agricultural products. *J Food Engineering* 1998; 35(4):369-380

Kusakabe H, Szczygiel MA, Whittingham DG, Yanagimachi R: Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24):13501-13506

Kwon IK, Park KE, Niwa K: Activation, pronuclear formation, and development in vitro of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol. Reprod* 2004; 71:1430-1436

Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X: Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol. Reprod* 2004; 70:1776-1781

Liu QC, Chena T, Huang XY, Suna FZ: Mammalian freeze-dried sperm can maintain their calcium oscillation-inducing ability when microinjected into mouse eggs. *Bioch Biophys Res* 2005; 328: 824–830

- Loi P, Matsukawa K, Ptak G, Clinton M, Fulka J, Nathan Y, Arav A,: Freeze- Dried Somatic Cells Direct Embryonic Development after nuclear Transfer. *PLoS ONE* 2008; 8:1-6
- Luño V, Gil L, Olarcegui M, Gonzalez N, Jerez R A, Blas I: Rosmarinic acid improves function and in vitro fertilizing ability of boar sperm after cryopreservation. *Cryobiology* 2014; 69: 157-162
- Mantegazza P: Sullo sperma umano. *Rc. Inst. Lomb. Sci.Lett* 1866; 13: 183-196
- Marco MA, Gadea J: Evaluation of membrane sulfhydryl status of boar spermatozoa after cold shock. 5th Int. Confer. on Boar Semen Preservation. Doorwerth. The Netherlands. 2003
- Martins CF, Bão SN, Dodea MN, Correa GA, Rumpf R: Effects of freeze drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology* 2007a; 67:1307-1315
- Martins CF, Dode MN, Bão SN, Rumpf R: The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res* 2007b; 6: 94-104
- Mascaro F, Gil L, Malo C, Gonzales N, Martinez F, de Blas I: Effect of pasteurized egg and *Rosmarinus officinalis* supplementation on quality of cryopreserved ram semen. *CryoLetters* 2013; 34(4):422-431
- Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I, Espinosa E: Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology* 2010; 61(1):142-147
- Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247: 125-142.
- McGinnis LK, Zhu L, Lawitts JA, Bhowmick S, Toner M, Biggers JD: Mouse Sperm Desiccated and Stored in Trehalose Medium Without Freezing. *Biol. Reprod* 2005; 73: 627-633
- Men NT, Kikuchi K, Nakai N, Fukuda A, Tanihara F, Noguchi J, Kaneko H, Linh NV, Nguyen BS, Nagai T, Tajima A: Effect of trehalose on DNA integrity of freeze-dried boar sperm, fertilization, and embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2013; 80: 1033-1044
- Moisan AE, Leibo SP, Lynn JW, Gómez MC, Pope CE, Dresser BL, Godke RA: Embryonic development of felid oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Cryobiology* 2005; 51:373
- Monteiro, G. A: Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Arq Bras Med Vet. Zootec* 2013; 65(3): 681-686
- Morris GJ, Watson PF: Cold shock injury a comprehensive bibliography. *CryoLett* 1984; 5: 352-372

Muneto T, Horiuchi T: Full-term development of hamster embryos produced by injecting freeze-dried spermatozoa into oocytes. *J Mamm Ova Res* 2011; 28: 32-39

Nagy Zp, Liu J, Joris H, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC: The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on fertilization and embryo development rates. IXth World congress on in vitro fertilization and alternate assisted reproduction (Vienna). *J Assisted Reprod and Genetics* 1995; 12:6

Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K: Effects of chelating agents during freeze-drying of boar spermatozoa on DNA fragmentation and on developmental ability *in vitro* and *in vivo* after intracytoplasmic sperm head injection. *Zygote* 2007; 15(1): 15-24

Olaciregui M, Luño V, Gonzalez N, De Blas I, Gil L: Freeze-dried dog sperm: Dynamics of DNA integrity. *Cryobiology*. 2015; 71(2):286-90

Olaciregui M, Luño V, Martí JI, Aramayona J, Gil L: Freeze-dried stallion spermatozoa: evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays. *Andrologia* 2016; 48(9):900-906

Olaciregui M, Gil L. Freeze-dried spermatozoa: A future tool. *Reprod Domest Anim*. 2016 Oct 18

Olaciregui, M.; Luño, V.; González, N.; Domingo, P.; De Blas, I.; Gil, L. Chelating agents in combination with rosmarinic acid for boar sperm freeze-drying. *Reprod Biol*. 2017 Sep;17(3):193-198.

Olaciregui, Maite; Luño, Victoria; González, Noelia; Gil, Lydia. In vitro developmental ability of ovine oocytes following intracytoplasmic injection with freeze-dried spermatozoa. *Scientific Reports* 2017; 7, pp. 1096 [8 pp.]. 2017.

Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biol of Reprod* 2004; 71: 1828-1837

Polge C, Smith AU, Parkes AS: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. 1949; 164: 666-667

Ringleb J, Waurich R, Wibbelt G, Streich WJ, Jewgenow K: Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilize in vitro matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 818-825.

Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, García EM, Cuello C, Vázquez JM, Martínez EA Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *Journal of Andrology* 2005; 26: 15-24

Rogers LA: The preparation of dried cultures. *J Infect Dis* 1914; 14: 100-123



- Rostand J: Glycerine et resistance du sperme aux basses températures. Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances. Academie des Sciences, Paris 1946; 222: 1524 -1525
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC: Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reproductive Biomedicine online* 2003; 7: 428-432
- Shackell LF: An improved method of dessication, with some application to biological problems. *Ann J Physiol* 1909; 20:325 340
- Sherman JK: Freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1954; 5:357-371
- Shirazi A, Ostad-Hosseini S, Ahmadi S, Heidari B, Shams N: In vitro developmental competence of ICSI-derived activated ovine embryos. *Theriogenology* 2008; 71:342-348
- Sotolongo B, Huang TTF, Isenberger E, Ward WS: An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *J Androl* 2005; 26:272-280
- Smith AU, Polge C: Survival of Spermatozoa at Low Temperatures. *Nature* 1950; 166: 668 - 669
- Spallanzani, L: Osservazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermatici dell'hommo degli animali. Opuscoli di Fisica Animali e Vegetabile. II. 1776
- Storey, B. T: Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 203-213
- Swift HF: Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. *J Exp Med* 1921; 33: 69-75.
- Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ: Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod* 1998; 13:1864-1871
- Uehara T, Yanagimachi R: Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976; 15(4):467-470
- Vishwanath R, Shannon P: Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9: 321-332
- Valcarce, DG, Cárton-García F, Riesco MF, Herráez MP, Roble V: Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology* 2013; 1:723-730
- Wakayama T, Yanagimachi R: Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotechnol* 1998; 16(7):639-641

Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG, Yanagimachi R: Long- term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol. Reprod* 2003; 69:2100-2108

Watanabe H, Asano T, Abe Y, Fukui Y, Suzuki H: Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26(9-10):531-536.

Waterhouse KE, Gjeldnes A, Tverdal A, De Angelis PM, Farstad W, Haard M , Kommisrud E: Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. *Animal Reproduction Science* 2009

Watson PF, Duncan AE: 1988 Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology* 1988; 25: 131-142

Watson PF: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(4):871-891.

Watson PF: The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 2:60-61:481-492

Wolf D.E: Lipid domains in sperm plasma membranes. *Mol Memb Biol*, 1995; 12:101-104

Yoshida, M: Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci* 2000; 60-61:349-355.