

Consejo Directivo  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

RESOLUCIÓN N° 034/2018

GENERAL PICO, 15 de Marzo de 2018.-

**VISTO:**

La evaluación positiva enviada por integrantes del Comité Científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias, respecto del Proyecto de Investigación: *"Efecto de la Proteína Anticongelante Antifreeze Protein Tipo III sobre la calidad del semen porcino criopreservado"* y,

**CONSIDERANDO:**

Que su Directora es la Dra. Mónica BOERIS y Co-Directora la Dra. Lic. María Guillermina BILBAO (Investigadora CONICET y adscripta Cátedra Fca. Biológica) contando con la participación, en carácter de Investigadores, de la M.V. María Lorena MARENGO, la M.V. Luisina CHAPERO, la Lic. Marta ANCONETANI, el M.V. César SCHWINDT, el M.V. Miguel BARBARÁ, la MSc. Claudia TORTONE, la MSc. Liliana ROSSETTO, la Ing. Sandra CURA, la M.V. María Florencia FARCEY, el M.V. Luis ZAPATA, el M.V. Sebastián RAMOS, la Dra. María Inés MOLEJÓN (INCITAP-CONICET) y la Lic. Gisela WEIZ (INCITAP-CONICET); en carácter de Asistentes de Investigación los estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria Ivo AIMAR CHIESA y Felipe FERNANDEZ y en carácter de Asesores el Dr. Julián BARTOLOMÉ y el Dr. Javier BRECCIA (INCITAP-CONICET).

Que tendrá una duración de treinta y seis (36) meses, a partir del 01 de Enero de 2018 y hasta el 31 de Diciembre de 2020.

Que de acuerdo a la presentación el citado proyecto es de Investigación Aplicada.

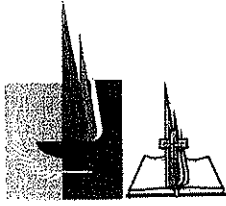
Que participan en su desarrollo las Cátedras de Física Biológica, de Reproducción Animal, de Patología General y Anatomía Patológica, el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) y el Centro de Reproducción La Pampa (CERALAP) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que el citado proyecto ha sido presentado de acuerdo con las normas vigentes y aprobado por el Comité Científico de la Facultad.

Que el Artículo 5° Anexo I de la Resolución N° 100/99 y su modificatoria N° 88/02 del Consejo Superior, estipula que: *"Todo Programa y todo Proyecto de Investigación que obtenga dos (2) evaluaciones externas favorables será acreditado mediante resolución del Consejo Directivo de cada Facultad a la que pertenezca"*.

Que cuenta con dos (2) evaluaciones externas satisfactorias, de acuerdo con lo previsto en la Resolución N° 100/99 del Consejo Superior de la Universidad Nacional de La Pampa.

Que las evaluaciones fueron realizadas por el Dr. Claudio BARBEITO (UBA) y el Dr. Humberto CISALE (UBA).



Consejo Directivo  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
Universidad Nacional de La Pampa

Corresponde a Resolución N° 034/2018

//2.-

Que en Sesión Ordinaria del Consejo Directivo del día 15 de Marzo de 2018, puesto el Proyecto de Investigación a consideración de los Sres. Consejeros, es aprobado por unanimidad.

POR ELLO:

**EL CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**RESUELVE:**

**ARTICULO 1º:** Acreditar como Proyecto de Investigación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, el proyecto denominado: "Efecto de la Proteína Anticongelante Antifreeze Protein Tipo III sobre la calidad del semen porcino criopreservado" dirigido por la Dra. Mónica BOERIS y co-dirigido por la Dra. Lic. María Guillermina BILBAO (Investigadora CONICET y adscripta Cátedra Fca. Biológica) contando con la participación, en carácter de Investigadores, de la M.V. María Lorena MARENGO, la M.V. Luisina CHAPERO, la Lic. Marta ANCONETANI, el M.V. César SCHWINDT, el M.V. Miguel BARBARÁ, la MSc. Claudia TORTONE, la MSc. Liliana ROSSETTO, la Ing. Sandra CURA, la M.V. María Florencia FARCEY, el M.V. Luis ZAPATA, el M.V. Sebastián RAMOS, la Dra. María Inés MOLEJÓN (INCITAP-CONICET) y la Lic. Gisela WEIZ (INCITAP-CONICET); en carácter de Asistentes de Investigación los estudiantes de la carrera Medicina Veterinaria Ivo AIMAR CHIESA y Felipe FERNANDEZ y en carácter de Asesores el Dr. Julián BARTOLOMÉ y el Dr. Javier BRECCIA (INCITAP-CONICET), el cual tiene doce (12) folios y que se adjunta como Anexo I de la presente Resolución.

**ARTICULO 2º:** El Proyecto de Investigación tendrá una duración de treinta y seis (36) meses a partir del 01 de Enero de 2018 hasta 31 de Diciembre de 2020.

**ARTICULO 3º:** Justificar los gastos que se produzcan de pasajes, viáticos, combustibles, aparatos, material de laboratorio, etc., del citado proyecto.

**ARTÍCULO 4º:** Regístrese, comuníquese, tomen conocimiento los interesados, Secretaría de Ciencia, Técnica, Investigación y Posgrado. Cumplido, archívese.



*Dr. José María Romero*  
Dr. JOSÉ MARÍA ROMERO  
PRESIDENTE CONSEJO DIRECTIVO  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
UNLPam



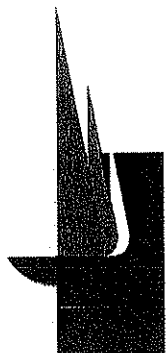
**TITULO: EFECTO DE LA PROTEÍNA ANTICONGELANTE  
ANTI-FREEZE PROTEIN TIPO III SOBRE LA CALIDAD DEL  
SEMEN PORCINO CRIOPRESERVADO.**

**INTEGRANTES**

BOERIS, MÓNICA  
CURA, SANDRA  
MARENGO, LORENA  
ANCONETANI, MARTA  
SCHWINDT, CÉSAR  
BARBARÁ, MIGUEL  
TORTONE, CLAUDIA  
CHIAPPERO, LUISINA  
RAMOS, SEBASTIÁN  
BILBAO, MARÍA GUILLERMINA  
FARCEY, MARÍA FLORENCIA  
ROSSETTO, LILIANA  
ZAPATA, LUIS OSCAR  
BARTOLOMÉ, JULIÁN ALBERTO  
FERNÁNDEZ, FELIPE  
AIMAR, IVO  
MOLEJÓN, MARÍA INÉS  
WEIZ, GISELA  
BRECCIA, JAVIER

**FIRMA**

*[Handwritten signatures and names corresponding to the list of integrants]*  
S. Cura  
Lorena Marengo  
César Schwindt  
Miguel Barbará  
Claudia Tortone  
Luisina Chiappero  
Sebastián Ramos  
María Guillermina Bilbao  
María Florencia Farcey  
Liliana Rossetto  
Luis Oscar Zapata  
Julián Alberto Bartolomé  
Felipe Fernández  
Ivo Aimar  
María Inés Molejón  
Gisela Weiz  
Javier Breccia



Número de Proyecto: .....

Año: .....

(No llenar)

## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

## Facultad de Ciencias Veterinarias

**1. IDENTIFICACIÓN del PROYECTO**

**1.1. TÍTULO del PROYECTO: EFECTO DE LA PROTEÍNA ANTICONGELANTE ANTI-FREEZE PROTEIN TIPO III SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN PORCINO CRIOPRESERVADO.**.....

**1.2. TIPO de INVESTIGACIÓN: Aplicada**

**BÁSICA:** Consiste en trabajos experimentales o teóricos que se emprenden principalmente para obtener nuevos conocimientos acerca de los fundamentos de fenómenos y hechos observables, sin prever en darles ninguna aplicación o utilización determinada o específica.

**APLICADA:** Consiste también en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos, pero fundamentalmente dirigidos hacia un objetivo práctico específico.

**DESARROLLO EXPERIMENTAL:** Consiste en trabajos sistemáticos basados en los conocimientos existentes, derivados de la investigación y/o la experiencia práctica, dirigidos a la producción de nuevos materiales, productos y dispositivos; al establecimiento de nuevos procesos, sistemas y servicios, o a la mejora substancial de los ya existentes, es decir, producir una tecnología.

**1.3. CAMPO de APLICACIÓN PRINCIPAL: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)**.....

**1.4. CAMPOS de APLICACIÓN POSIBLES: (Ver Códigos en Planilla Adjunta)**.....

**2. INSTITUCIONES y PERSONAL que INTERVIENEN en el PROYECTO**

**2.1. AREAS, DEPARTAMENTOS y/o INSTITUTOS:** Cátedra de Física Biológica, Cátedra de Reproducción Animal, Cátedra de Patología, Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) y Centro de Reproducción La Pampa (CERELAP), de la FCV-UNLPam.-.....

**2.2. OTRAS INSTITUCIONES:** Instituto de Ciencias de la Tierra y Ambientales de la Pampa (INCITAP), CONICET-UNLPam.-.....

**2.3. EQUIPO de TRABAJO: (En el caso de tratarse de un Plan de Tesis Doctoral o Tesis de Maestría, complete solamente el cuadro 2.3.5.)**

**2.3.1 . INTEGRANTES**

Apellido y Nombre	Título Académico	Categ. Invest.	Responsabilidad	Cátedra o Institución	Cargo y Dedicación	Tiempo dedicac. Hs./Sem
Boeris, Mónica	Dra.	3	D	Física biológica	Asociada E	10 h
Bilbao, María Guillermina	Dra.	4	CD	CONICET/Fca. Biol.	Inv. Asist. E	10 h
Marengo, Lorena	M.V.	5	I	Física biológica	JTP SE	5 h
Chapero, Luisina	M.V.	-	I	Patología gral	Ay 1° S	10 h
Anconetani, Marta	Lic.	-	I	Física biológica	JTP SE	2 h
Schwindt, César	M.V.	-	I	Física biológica	Ay 1° S	2 h
Barbará, Miguel	M.V.	-	I	Física biológica	Ay 1° SE	2 h
Tortone, Claudia	Lic.	-	I	Física biológica	Ay 1° SE	2 h
Rossetto, Liliana	M.Sc.	-	I	Reproducción	Ay 1° SE	2 h
Cura, Sandra	Ing. Qca.	4	I	Física Biológica	Adj. SE	5 h

Farcey, María Florencia	M.V.	-	I	Reproducción	Adscripta	5 h
Zapata, Luis Oscar	M.V.	5	I	Reproducción	Ay 1° S	2 h
Bartolomé, Julián Alberto	Dr.	2	A	Reproducción	Titular E	3 h
Ramos, Sebastián	M.V.	-	I	CERELAP	Ay 1° S	5 h
Aimar Chiesa, Ivo	Est.	-	AI	Fisiología Animal	Ay 2°	5 h
Fernández, Felipe	Est.	-	AI	Física Biológica	Adscripto	5 h
Molejón, María Inés	Dra.	-	I	INCITAP	Invest. Ast E	3 h
Weiz, Gisela	Lic.	-	I	INCITAP	Becaria E	3 h
Breccia, Javier	Dr.	1	A	INCITAP	Invest. Ind. E	3 h

(I) D: Director, CD: Co-Director, A: Asesor, I: Investigador, AI: Asistente de Investigación.

### 2.3.1. BECARIOS:

Apellido y Nombre	Organismo que Financia	Tipo de Beca	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
---				

### 2.3.2. TESISTAS:

Apellido y Nombre	Título Académico al que Aspira	Título Proyecto de Tesis	Organismo	Director	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.

### 2.3.3. PERSONAL de APOYO:

Apellido y Nombre	Categoría (Adm., Lab., Campo, etc.)	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
----		

### 2.3.4. INVESTIGADORES en PLAN de TESIS:

Apellido y Nombre	Función	Título Proyecto de Tesis	Tiempo de Dedicac. Hs./Sem.
---	Director Co-Director Tesisista		

## 3. DURACIÓN ESTIMADA del PROYECTO: (de 1 a 5 años con una sola prorrogas)

3.1. FECHA de INICIO: 01 / 01 / 2018 FINALIZACIÓN: 31 / 12 / 2020

## 4. RESUMEN del PROYECTO: (Máximo 200 palabras)

Dado que la criopreservación del semen porcino es un cuello de botella para el alcance del mérito genético a zonas remotas, y que los beneficios de suplementar el medio de congelación con la proteína anticongelante AFP III no han sido testeados en esta especie, nos proponemos trabajar en este aspecto bajo la hipótesis de que la presencia de AFP III en el medio de criopreservación reduce el daño por estrés oxidativo en las membranas de los espermatozoides y disminuye la injuria producida por las bajas temperaturas durante el proceso de congelado-descongelado, lo que se traduce en una disminución de la pérdida de calidad seminal posdescongelado. Para ello, se evaluará el efecto de diferentes concentraciones de AFP III (0, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) sobre la calidad del semen posdescongelado, en términos de concentración, motilidad, % de espermatozoides vivos, morfología normal, integridad del acrosoma y de la membrana plasmática flagelar, actividades antioxidantes (SOD, GSH-Px y Cat) y niveles de peroxidación lipídica. Una vez hallada la concentración de AFP III más efectiva en mejorar la calidad del semen criopreservado, se evaluarán variaciones en las curvas de congelado y descongelado.

#### 4.1 Palabras claves: (de 4 a 6)

Semen porcino / AFP III / Criopreservación / Calidad seminal posdescongelado/ Actividad antioxidante / Peroxidación lipídica / HOS Test

#### 4.2 Abstract en Inglés: (Máximo 200 palabras) Res.N° 097-CS-12.

Since boar semen cryopreservation is a bottleneck for delivering genetic merit into remote areas, and that the benefits of supplementing the freezing medium with the antifreeze protein (AFP) III remains unevaluated, we hypothesize that AFP III in the cryopreservation medium reduces oxidative damage on boar spermatozoa membranes and reduces injuries produced by low temperatures during the freezing-thawing process, which translates in a decrease in post-frozen semen quality. For this purpose, the effect of different concentrations of AFP III (0, 0.1 µg / ml, 1 µg / ml, 10 µg / ml, 100 µg / ml) on post-thaw boar spermatozoa quality, in terms of concentration, motility, % live sperm, normal morphology, integrity of the acrosome and flagellar plasma membrane, antioxidant activities (SOD, GSH-Px and Cat) and levels of lipid peroxidation will be evaluated. Once the concentration of AFP III is found to be most effective on improving cryopreserved semen quality, variations in freezing and thawing rates will be evaluated.

#### 4.3. Key words: (de 4 a 6)

Boar semen / AFP III / criopreservación / post-thaw semen quality / antioxidant activities / HOS Test

### 5. INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

#### 5.1. INTRODUCCIÓN, MANEJO DE FUENTES BIBLIOGRÁFICAS y DESCRIPCIÓN de la SITUACIÓN ACTUAL del PROBLEMA

La producción porcina en la Argentina se encuentra en un constante crecimiento, lo cual queda en evidencia al observar el incremento en el número de cabezas registrado por SENASA en 2009 y en 2014 (3.047.554 cabezas contra 4.745.47, respectivamente). Según este mismo informe (2014), la Provincia de La Pampa califica en el segundo grupo de productoras, al integrar junto a Salta, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Santiago del Estero y San Luis, el conjunto de provincias que albergan el 23 % de las existencias de porcinos (1.086.436 de cabezas). Por tal motivo, el Ministerio Provincial de la Producción impulsa el crecimiento del mencionado sector a través del "Plan Provincial de Activación Porcina", que propone, entre sus objetivos, *incrementar la producción de carne de alta calidad a través de la transferencia de herramientas que permiten una mejor utilización de los reproductores con mayor mérito genético*. En ese aspecto, las herramientas tecnológicas aplicadas a la reproducción son de fundamental importancia práctica, siendo la inseminación artificial (IA) una de las que se ha incrementado notablemente en las últimas décadas ya que, al compararla con el servicio natural, reporta un gran beneficio económico (1). Más del 99 % de las IA se realizan con semen refrigerado (15 - 20 °C) por 0 a 5 días, ya que las tasas de concepción alcanzadas con semen congelado son muy bajas debido a la injuria a nivel celular que produce el proceso de congelado-descongelado (2). El semen congelado tiene una durabilidad mucho mayor que el semen refrigerado, al tiempo que es más fácil su traslado, favoreciendo la mejora genética en regiones remotas. Sin embargo, la criopreservación aún es costosa, no ostenta la practicidad de la refrigeración y exhibe menor fertilidad y prolificidad (1)(2).

De acuerdo a los conceptos revisados por Yeste en 2016, el principal inconveniente del proceso de congelado y descongelado es el daño causado por el cambio de estado del agua presente en el medio intra y extracelular. Si bien, una alta velocidad de congelación puede favorecer la formación de cristales intracelulares indeseables, una velocidad de congelación lenta permite que el agua escape de la célula, aumentando la concentración relativa de solutos y la concomitante desnaturalización de proteínas y macromoléculas (3)(4). A su vez, la criopreservación puede ser fuente de generación de especies reactivas del oxígeno (ERO), capaces de causar injuria celular por estrés oxidativo cuando las defensas antioxidantes son superadas (5)(6). El conocimiento de los aspectos físicos y biológicos que gobiernan el proceso de congelado-descongelado permite diseñar estrategias para sobrellevarlo con el menor impacto sobre la fertilidad. Hasta el momento, se han comparado diversos diluyentes (7)(8), con el agregado de agentes anticongelantes que atraviesan la membrana plasmática como glicerol(9), dimetilsulfoxido, etilenglicol, metanol, propilenglicol, y dimetilacetamida (10) o combinaciones de glicerol y dimetilacetamida (11); con

agentes anticongelantes que no atraviesan la membrana plasmática, como ácido hialurónico (12), polivinilpirrolidona, polietilenglicol y dextrano, solos o en combinación con los anteriores (10); con antioxidantes, como alginato (13),  $\alpha$ -tocoferol (14) o su análogo hidrosoluble Trolox (15), glutatión (16), hidroxitolueno butilado (BHT), catalasa, superóxido dismutasa (SOD) (6) y combinaciones de ambas (15), o ácido  $\alpha$ -lipoico (17); o cambios en las curvas de descongelado (7)(18). Incluso, se han testeado polisacáridos extraídos de plantas utilizadas en la medicina tradicional china con la premisa de encontrar crioprotectores y/o antioxidantes efectivos (19)(20)(12). En general, los resultados alcanzados con estos agentes dan cuenta de la modificación de pocos parámetros estudiados mientras que otros se mantienen invariables respecto del efecto del agente adicionado al diluyente.

Dado que la criopreservación es una técnica que se aplica a varios tipos celulares, son muchos los trabajos que estudian la suplementación del medio con diversos agentes, como proteínas anticongelantes o péptidos, que han reportado beneficios frente a las injurias por bajas temperaturas. Por ejemplo, el compuesto polimérico poli L-lisina carboxilada empleado en la criopreservación de células somáticas bovinas, ha demostrado ser superior al dimetilsulfoxido (DMSO), con la ventaja adicional de que no es necesario removerlo del medio al cultivar las células (21). La glicoproteína 8 anticongelante (AGFP8) suplementada durante la vitrificación de oocitos bovinos (22), o la adición de proteína anticongelante anti-freeze protein (AFP) III al medio en el proceso de vitrificación de oocitos murinos, han exhibido efectos protectores frente al estrés oxidativo y la apoptosis (23)(24)(25). Los efectos de AFP III frente a la congelación de embriones de conejos, en la concentración adecuada, favoreció el desarrollo embrionario (26).

En materia de criopreservación de semen de diversas especies, la incorporación de proteínas con funciones anticongelantes y/o antioxidantes ha resultado beneficiosa. Por nombrar algunos ejemplos, la regulacina, una proteína de unión al calcio, fue evaluada como agente crioprotector en semen de búfalo con un diluyente a base de Tris, ácido cítrico, fructosa, yema de huevo y glicerol, resultando efectiva en favorecer la motilidad progresiva de los espermatozoides, la integridad del acrosoma, y la capacidad fecundante respecto de los controles (27). La AFP III adicionada al diluyente en semen de esa misma especie, aumentó la motilidad progresiva y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides congelados y descongelados (28). Utilizada para criopreservar semen de conejo, esta proteína incrementó la cantidad de espermatozoides móviles después del proceso de congelado-descongelado (26).

## 5.2. RESULTADOS ALCANZADOS POR el (los) INTEGRANTE(S) del PROYECTO DENTRO del ÁREA de CONOCIMIENTO del MISMO: (Publicados, enviados o aceptados para publicar, o inéditos)

## 5.3. TRABAJOS de INVESTIGACIÓN de los INTEGRANTES del EQUIPO, EN ESTA U OTRA INSTITUCIÓN, RELACIONADOS al PROYECTO:

## 6. DESCRIPCIÓN del PROYECTO

### 6.1. PROBLEMA CIENTÍFICO, OBJETIVOS, HIPÓTESIS y RESULTADOS ESPERADOS del PROYECTO

Dado que la criopreservación de semen de cerdo es un cuello de botella para el alcance del mérito genético a zonas remotas, y que los beneficios de suplementar el medio de congelación con AFP III no han sido testeados en esta especie, nos proponemos trabajar en este aspecto bajo la hipótesis de que *la presencia de proteína anticongelante AFP III agregada al diluyente convencional para la criopreservación del semen porcino reduce el daño por estrés oxidativo en las membranas de los espermatozoides y disminuye la injuria producida por las bajas temperaturas durante el proceso de congelado-descongelado, lo que se traduce en una disminución de la pérdida de calidad seminal posdescongelado*

Nuestro objetivo general es investigar el efecto de AFP III sobre la calidad del semen porcino posdescongelado.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Determinar la concentración a la cuál AFP III resulta más efectiva en mejorar la calidad del semen porcino criopreservado, en términos de motilidad espermática, % espermatozoides vivos, % espermatozoides con morfología normal e integridad de la membrana espermática flagelar.
2. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de AFP III sobre las actividades antioxidantes y la peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas, en semen porcino criopreservado.
3. Hallar una combinación de curvas de temperatura en el proceso de congelado-descongelado que, al combinarlo con la suplementación de AFP III, permita obtener los mejores resultados respecto de la calidad del semen porcino criopreservado.

Con este proyecto se espera hallar una estrategia alternativa a las existentes que permita almacenar el semen porcino por un tiempo mayor a los 5 días que se mantiene en condiciones refrigeradas sin que la disminución en la calidad seminal comprometa significativamente su potencial fertilizante.

## 6.2. METODOLOGÍA, MODELOS y TÉCNICAS.

### Diseño experimental

Se evaluará el efecto de diferentes concentraciones de AFP III (0, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) en el diluyente comúnmente utilizado para la congelación de semen porcino, manteniendo las demás variables de trabajo constantes (diluyente estándar, curvas de congelado y de descongelado).

Una vez hallada la concentración de AFP III más efectiva en mejorar la calidad del semen criopreservado, se evaluarán variaciones en las curvas de congelado y descongelado. Se modificará un parámetro en la curva de congelado y se ensayarán dos estrategias de descongelado.

Se utilizarán 10 eyaculados por verraco. Los eyaculados a utilizar deberán cumplir con lo estipulado en criterios de exclusión.

### 1) Reactivos y medios

Se utilizará como diluyente básico la solución de Beltsville (Beltsville Thawing Solution), compuesta por Glucosa 205 mM, NaCl 20,39 mM, KCl 5,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 15,01 mM, y EDTA 3,35 mM (29) a la cual se le agregará sulfato de kanamicina (50 mg/mL) (30)(18).

Para la refrigeración, se preparará una solución a base de lactosa y yema de huevo, comúnmente denominado diluyente LEY, por las siglas en inglés *lactose egg yolk*, conteniendo β-lactosa 310 mM, 80% (v/v), yema de huevo 20 % (v/v) sulfato de kanamicina 100 µg/mL, a pH = 6,2 y 330 ± 5 mOsm/kg, de acuerdo a lo descrito por Tomás y col. (2014). Como diluyente para la criopreservación, se adicionará glicerol y Orvus Es Paste al diluyente LEY, (LEYGO) en las siguientes concentraciones: LEY 92,5 %, Equex STM 1,5 %, glicerol 6 % (v/v), a pH = 6,2 y 1650 ± 15 mOsm/kg (30)(18). Las distintas soluciones de AFP III a ser evaluadas como refrigerantes se prepararán adicionando AFP III al diluyente LEYGO para lograr concentraciones finales de 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL y 100 µg/mL (19).

### 2) Recolección de semen

Todos los procedimientos experimentales se realizarán conforme a las normas establecidas por la Resolución 247/11 del Comité de Ética en Investigación en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam) y de acuerdo a "Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching" (31). Los verracos (n = 4), de 2 y 6 años, sexualmente maduros, se alojarán en corrales contiguos (2 x 2,5 m) con piso slat, en iguales condiciones de manejo. Serán alimentados únicamente por la mañana con una ración de 2-3 kg/día de alimento balanceado con 19 % de proteína y tendrán libre acceso a fuentes de agua. La recolección de semen se realizará una vez a la semana, mediante la técnica de la mano enguantada (32) en un recipiente de 500 mL, previamente atemperado, y protegido en su boca por cuatro capas de gaza de algodón esterilizada que actúa como filtro para remover las partículas de gel, y luego se transferirá a un recipiente estéril. Se identificarán tres fracciones durante cada eyaculado: i) fracción prespermática; ii) fracción rica en espermatozoides, y iii) fracción posespermática. Se descartarán las fracciones i y iii, utilizando solo la fracción rica en espermatozoides de cada eyaculado para realizar las evaluaciones ulteriores.

Luego de la recolección del semen, la fracción rica en espermatozoides de cada eyaculado se dividirá al azar en al menos 5 tubos de 15 mL y se diluirá con solución de Beltsville (BTS) a 15 °C en relación de volumen 1:1.

### 3) Evaluación macroscópica del semen

En la fracción rica en espermatozoides de cada eyaculado, se registrará: a) temperatura; b) volumen; c) color; d) densidad; e) pH; f) conductancia.

### 4) Evaluación microscópica del semen



Las muestras de semen se colocarán en un portaobjetos con un cubreobjetos y se registrará la concentración espermática (33)(34), el porcentaje (%) de espermatozoides con motilidad progresiva en microscopio de contraste de fases (400 x) equipado con platina térmica a 37 °C; el % de espermatozoides vivos por el método de eosina-nigrosina, en microscopio de contraste de fase (1000 x) con platina térmica. La presencia de anomalías se confirmará por el método de tinción húmeda en buffer salino formolado (BSF) utilizando un microscopio con contraste de fases DIC - Nomarski a 1000 x. Para evaluar la integridad del acrosoma se fijará una gota de semen en 1 mL de glutaraldehído al 2,5 % (v/v). Un total de 200 espermatozoides observarán en microscopio de contraste de fases (33). Como parte de la evaluación microscópica, se registrará la concentración de leucocitos seminales por Tinción 15 (34).

#### 5) Criterios de exclusión

Serán excluidos de este ensayo verracos que presenten sintomatología que comprometa su salud.

Los eyaculados a utilizar deberán satisfacer los estándares de calidad para la preparación de dosis inseminantes: de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL, más de 75% de espermatozoides móviles y más de 85% células morfológicamente normales (18).

#### 6) Criopreservación y descongelado del semen:

Para la criopreservación se seguirán pasos previamente publicados (35)(36)(18). Una vez diluida la fracción rica en espermatozoides en relación de volumen 1:1 en solución de Beltsville (BTS), se incubarán a 15 °C por 1 h, se centrifuga a 2400 x g por 3 min a 15 °C (30) y se descarta el sobrenadante. El pellet proveniente de cada fracción se resuspenderá en diluyente LEY a 15 °C hasta una concentración de  $1,5 \times 10^9$  espermatozoides/mL, y se enfriará lentamente hasta alcanzar los 5 °C por 2 h. Luego se llevará a una concentración final de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/mL con diluyente LEYGO con las diferentes concentraciones de AFP III a testear (0 y 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente). Las muestras se aspirarán en pajuelas de PVC de 0,25 mL empleando una envasadora y selladora automática. Para la criopreservación, se utilizará una congeladora programable, con la siguiente curva: 1) De 5 °C a -5 °C, a una tasa de 6 °C/min; 2) De -5 °C a -80 °C, a una tasa de 40 °C/min; 3) Incubación a -80 °C por 30 s; 4) De -80 °C a -150 °C, a una tasa de 70 °C/min, y se sumergirán en N<sub>2</sub> para su almacenamiento por al menos 2 semanas. El proceso de descongelado se realizará a 37 °C por 45 s en baño y el semen se diluirá lentamente a T ambiente con 4,75 mL de BTS para ulteriores determinaciones (19).

#### 7) Evaluación microscópica del semen posdescongelado

De acuerdo a trabajos previos (19), para evaluar el efecto de AFP III o cambios en la curva de congelado y descongelado, se realizarán las siguientes evaluaciones:

a) Concentración espermática, % de espermatozoides con motilidad progresiva; % de espermatozoides vivos; presencia de anomalías e integridad del acrosoma (ib ídem).

b) Determinación de la integridad de la membrana plasmática flagelar: La respuesta de la membrana al medio hipoosmótico se evaluará a partir de la incubación de 50 µL de semen con 1 mL de solución hipoosmótica (7,35 g Citrato de sodio, 13,51 g fructosa en 1 L de agua destilada) a 37 °C por 30 min. Luego de la incubación, 15 µL de la muestra se evaluará a 400 x microscopio con platina térmica a 37 °C. Los espermatozoides con membrana intacta tendrán una cola enrollada (37)(38)(20).

#### c) Parámetros enzimáticos:

Como se describió previamente (19), una alícuota de semen (120 µL) sin diluir en BTS se centrifugará a  $1600 \times g$  a 25 °C por 5 min. El precipitado se extraerá en Tritón X-100 (1%; 360 µL) por 20 min y se centrifugará a  $4000 \times g$  a 25 °C por 30 min. El sobrenadante se usará como extracto crudo para las determinaciones de enzimas presentes en el semen:

i) Actividad de Superóxido dismutasa (SOD): Se realizará una dilución 1:5 del extracto crudo con PBS (50 mM, pH = 7) y se mezclará con la solución de ensayo que contiene 0,1 mM xantina, 0,025 mM nitroblue tetrazolium, 0,1 mM EDTA y xantina oxidasa en buffer carbonato de sodio (50 mM, pH = 10). La actividad SOD se medirá a 560 nm en espectrofotómetro. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir al nitroblue tetrazolium y se expresará como nmol/mL (39).

ii) Actividad de Glutathion peroxidasa (GSH-Px): La actividad GSH-Px se determinará según el método descrito por Lawrence and Burk (2012) (39). La mezcla de reacción consiste en 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide, 0,2 mM NADPH, 1 EU/mL Glutathion reductasa oxidada, 1 mM GSH y 0,25 mM peróxido de hidrógeno en buffer fosfato salino (PBS) 50 mM (pH = 7). La fuente de la enzima (0,1 mL) se agrega a 0,8 mL de la mencionada mezcla de reacción, se incuba a 25 °C por 5 min y se leerá la absorbancia a 412 nm cada 1 min durante 5 min. La pendiente de la curva de oxidación de NADPH por minutos corresponde a la actividad de GSH-Px expresada en nmol/L.

iii) Actividad de Catalasa (CAT): Se determinará agregando 0,3 mL de semen a 1,7 mL de sustrato (65  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS 50 mM a pH 7.0) e incubando a 37,5 °C por 60 s. La reacción enzimática se frenará por el agregado de 1 mL de molibdato de amonio 32,4 mM. La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se determinará espectrofotométricamente a 405 nm contra el blanco de reacción conteniendo el sustrato excepto la enzima. La actividad de CAT se expresa en nmol/mL(19).

d) Cuantificación de la peroxidación lipídica: Los niveles de MDA, como indicador de peroxidación lipídica en la membrana plasmática, se determinarán de acuerdo al método de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBA). Para ello, una alícuota de semen diluido en BTS (3 x 10<sup>6</sup>; 1 mL) se mezclará con 1 mL de ácido tricloroacético frío (20 %, v/v). La mezcla se centrifugará a 1600 x g por 10 min. El sobrenadante se mezclará con 1 mL de TBA (0,67 %, v/v), se incubará a 100 °C por 10 min y se colocará en hielo para frenar la reacción. Se determinará la absorbancia a 534 nm en espectrofotómetro para determinar los niveles de MDA (19)(12).

#### 8) Análisis estadístico

Se analizarán un total de 40 eyaculados, 10 por cada verraco. Las variables independientes serán la concentración de AFP III en el diluyente convencional (0, 0,1  $\mu$ g/mL, 1  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL y 100  $\mu$ g/mL) y las variaciones de T en la curva de congelado y descongelado. Las variables respuesta serán: i) concentración espermática; ii) % de espermatozoides con motilidad progresiva; iii) % de espermatozoides vivos; iv) espermatozoides con morfología normal; v) integridad del acrosoma; vi) integridad de la membrana plasmática flagelar; vii) actividad de SOD; viii) actividad de GSH-Px; ix) actividad de Cat; x) niveles de peroxidación lipídica.

Los datos se presentarán como media  $\pm$  error estándar (SEM). Si se cumplen los supuestos de una distribución normal, los datos se analizarán mediante la prueba paramétrica de ANOVA de un factor, seguido por el postest de Duncan. Si los mencionados supuestos no se cumplen incluso luego de una transformación normal, se recurrirá a la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se considerarán diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ .

### 6.3. CONTRIBUCIÓN al CONOCIMIENTO CIENTÍFICO y/o TECNOLÓGICO y a la RESOLUCIÓN de los PROBLEMAS

Dado que hasta el momento no se han hallado estrategias eficientes en la criopreservación de semen porcino, y que pese a que se han testeado una gran variedad de agentes crioprotectores, no se han evaluado proteínas anticongelantes de la familia AFP, por lo que el presente proyecto tiene como objetivo general investigar el efecto de AFP III sobre la calidad del semen porcino posdescongelado. Para ello, se intentará determinar la concentración a la cuál AFP III resulta más efectiva en aumentar la motilidad espermática, % espermatozoides vivos, % espermatozoides con morfología normal, integridad del acrosoma y de la membrana espermática flagelar; aumentar la actividades enzimáticas antioxidantes y disminuir la peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas, en semen porcino criopreservado. A su vez, se pretende hallar una combinación de curvas de temperatura en el proceso de congelado-descongelado que, al combinarlo con la suplementación de AFP III, permita obtener los mejores resultados respecto de la calidad del semen porcino criopreservado

### 6.4. CRONOGRAMA ANUAL de ACTIVIDADES

Año 1 / Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Actividades												
Extracción de semen	X	X			X	X			X	X		
Evaluación macroscópica	X	X			X	X			X	X		
Evaluación microscópica	X	X			X	X			X	X		
Criopreservación y descongelado	X	X			X	X			X	X		
Evaluación microscópica del semen posdescongelado.		X	X			X	X			X	X	
Análisis de resultados				X				X				X
Comunicación parcial de resultados												X
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Año 2 / Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Actividades												
Extracción de semen	X	X			X	X			X	X		
Evaluación macroscópica	X	X			X	X			X	X		
Evaluación microscópica	X	X			X	X			X	X		
Criopreservación y descongelado	X	X			X	X			X	X		
Evaluación microscópica del semen posdescongelado.		X	X			X	X			X	X	
Evaluación del semen posdescongelado: actividades enzimáticas y peroxidación lipídica.		X	X			X	X			X	X	
Análisis de resultados				X				X				X
Comunicación parcial de resultados												X
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Año 3 / Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Actividades												
Extracción de semen	X	X			X	X			X	X		
Evaluación macroscópica	X	X			X	X			X	X		
Evaluación microscópica	X	X			X	X			X	X		
Variaciones en la curva de criopreservación y descongelado	X	X			X	X			X	X		
Evaluación microscópica del semen posdescongelado.		X	X			X	X			X	X	
Evaluación del semen posdescongelado: actividades enzimáticas y peroxidación lipídica.		X	X			X	X			X	X	
Análisis de resultados				X				X				X
Revisión bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Publicación de resultados												X

## 7. INFRAESTRUCTURA y PRESUPUESTO

### 7.1. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES REQUERIDOS por el PROYECTO YA EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN:

La extracción de semen se realizará en el CERELAP. Para el análisis de semen se requerirá de equipamiento perteneciente a la Cátedra de Física Biológica, Cátedra de Reproducción y CIDEF. Para el llenado de pajuelas y la criopreservación y almacenamiento de semen se utilizará equipamiento del CERELAP.-

### 7.2. INFRAESTRUCTURA, EQUIPAMIENTO, SERVICIOS y OTROS BIENES NECESARIOS para el PROYECTO y NO DISPONIBLES en esta FACULTAD

Para la criopreservación de semen, se debe realizar una centrifugación previa a 15 °C (18)(30) (36)(40), para lo que es necesario disponer de una centrífuga refrigerada para tubos de 15 mL o más.-

### 7.3. JUSTIFICACIÓN de la ADQUISICIÓN o FACTIBILIDAD de ACCESO en CONDICIONES de PRESTAMO o USO de los BIENES NO EXISTENTES en esta INSTITUCIÓN

--

### 7.4. ESPECIFICAR otras FUENTES de FINANCIACIÓN:

Por el momento, no se disponen de otras fuentes de financiación.

**7.5. PRESUPUESTO ESTIMADO para el PROYECTO PRESENTADO (Total y Anual)****Año 1:**

Equipamiento e Infraestructura .....	\$ .....
Bienes de Consumo .....	\$ 15000.-
Descartables (Bolsas de recolección, gaza de algodón esterilizada, portaobjetos, cubreobjetos, tips blancos, amarillos y azules, tubos de 15 mL, tubos tipo Eppendorf 1,5 mL, pajuelas de PVC de 0,25 mL), reactivos (Glucosa, NaCl, KCl, NaHCO <sub>3</sub> , EDTA, sulfato de kanamicina, β-lactosa, yema de huevo, Equex STM, Glicerol, AFP III, formaldehído, glutaraldehído, Citrato de sodio, fructosa, agua destilada) y tinciones (eosina-nigrosina, tinción 15).	
Bibliografía .....	\$ .....
Viajes .....	\$ .....
Personal de Apoyo .....	\$ .....
Otros (especifique) .....	\$ .....
<b>Total Año 1:</b> .....	<b>\$ 15000.-</b>

**Año 2:**

Equipamiento e Infraestructura .....	\$ 7000.-
Cubetas y microcubetas de cuarzo.	
Bienes de Consumo .....	\$ 10000.-
Material de vidrio (tubos de vidrio resistentes a altas temperaturas) (Tritón X-100, PBS, Xantina, nitroblue tetrazolium, xantina oxidasa, sodium azide, NADPH, Glutation reductasa, GSH, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , molibdato de amonio, malón dialdehído, ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético)	
Bibliografía .....	\$ .....
Viajes .....	\$ .....
Personal de Apoyo .....	\$ .....
Otros (especifique) .....	\$ .....
<b>Total Año 2:</b> .....	<b>\$ 17000.-</b>

**Año 3:**

Equipamiento e Infraestructura .....	\$ .....
Bienes de Consumo .....	\$ .....
Bibliografía .....	\$ .....
Viajes .....	\$ 4000.-
Presentación de resultados en congresos especializados.	
Personal de Apoyo .....	\$ .....
Otros (especifique) .....	\$ .....
<b>Total Año 3:</b> .....	<b>\$ 4000.-</b>

**Total:**..... **\$ 36000.-**

\* El Consejo Directivo adjudicará presupuesto a cada Proyecto de acuerdo a su Presupuesto de Ciencia y Técnica anual, tomando en cuenta normas y criterios que el mismo determine.

**8.1. BIBLIOGRAFÍA**

1. Zhang Y, Dai D, Chang Y, Li Y, Zhang M, et al. 2017. Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression. *Cryobiology*. 76:24–33
2. Khalifa T, Rekkas C, Samartzi F, Lymberopoulos A, Kousenidis K, Dovenski T. 2014. Highlights on Artificial Insemination (AI) Technology in the Pigs. *Maced. Vet. Rev.* 37(1):5–34
3. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp. Cell Res.* 71(2):345–55
4. Yeste M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 85(1):47–64
5. Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21(1):1,7

6. Großfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WMC, Rath D. 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*. 70(8):1225–33
7. Knox RV, Ringwelski JM, McNamara KA, Aardsma M, Bojko M. 2015. The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on in vitro fertility measures of frozen-thawed boar sperm. *Theriogenology*. 84(3):407–12
8. Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, et al. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology*. 63(2):411–21
9. Fraser L, Strzeżek J. 2007. Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 99(3–4):317–29
10. Gao D, Critser JK. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J.* 41(4):187–96
11. Yang C-H, Wu T-W, Cheng F-P, Wang J-H, Wu J-T. 2016. Effects of different cryoprotectants and freezing methods on post-thaw boar semen quality. *Reprod. Biol.* 16(1):41–46
12. Qian L, Yu S, Zhou Y. 2016. Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. *Int. J. Biol. Macromol.* 87:287–89
13. Hu J, Geng G, Li Q, Sun X, Cao H, Liu Y. 2014. Effects of alginate on frozen-thawed boar spermatozoa quality, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities. *Anim. Reprod. Sci.* 147(3–4):112–18
14. Jeong Y-J, Kim M-K, Song H-J, Kang E-J, Ock S-A, et al. 2009. Effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*. 58(2):181–89
15. Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, et al. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl.* 26(1):15–24
16. Estrada E, Rivera del Álamo MM, Rodríguez-Gil JE, Yeste M. 2017. The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*, pp. 1–9
17. Shen T, Jiang Z-L, Li C-J, Hu X-C, Li Q-W. 2016. Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing–thawing. *Zygote*. 24(2):259–65
18. Tomás C, Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, De Mercado E. 2014. Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 144(3–4):115–21
19. Hu JH, Sun XZ, Li QW, Zhang T, Hu XC, et al. 2013. The effect of Laminaria japonica polysaccharide on sperm characteristics and biochemical parameters in cryopreserved boar sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 139(1–4):95–100
20. Shen T, Jiang ZL, Liu H, Li QW. 2015. Effect of Salvia miltiorrhiza polysaccharides on boar spermatozoa during freezing-thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 159:25–30
21. Fujikawa T, Ando T, Gen Y, Hyon S-H, Kubota C. 2017. Cryopreservation of bovine somatic cells using antifreeze polyamino-acid (carboxylated poly-L-lysine). *Cryobiology*. 76:140–45
22. Liang S, Yuan B, Kwon J-W, Ahn M, Cui X-S, et al. 2016. Effect of antifreeze glycoprotein 8 supplementation during vitrification on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. 86(2):485–494.e1
23. Jo JW, Jee BC, Lee JR, Suh CS. 2011. Effect of antifreeze protein supplementation in vitrification medium on mouse oocyte developmental competence. *Fertil. Steril.* 96(5):1239–45
24. Wen Y, Zhao S, Chao L, Yu H, Song C, et al. 2014. The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocytes in vitrification. *Cryobiology*. 69(3):394–401

25. Jo JW, Jee BC, Suh CS, Kim SH. 2012. The beneficial effects of antifreeze proteins in the vitrification of immature mouse Oocytes. *PLoS One*. 7(5):e37043
26. Nishijima K, Tanaka M, Sakai Y, Koshimoto C, Morimoto M, et al. 2014. Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. *Cryobiology*. 69(1):22–25
27. Pillai H, Parmar MS, Shende AM, Thomas J, S. H, et al. 2017. Effect of supplementation of recombinant Regucalcin in extender on cryopreservation of spermatozoa of water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Mol. Reprod. Dev.*
28. Qadeer S, Khan MA, Ansari MS, Rakha BA, Ejaz R, et al. 2014. Evaluation of antifreeze protein III for cryopreservation of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) buffalo bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 148(1–2):26–31
29. Johnson LA, Aalbers JG, Grooten HG. 1988. Artificial Insemination of Swine: Fecundity of Boar Semen Stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM), or MR□A and Inseminated on One, Three and Four Days After Collection. *Reprod. Domest. Anim.* 23(2):49–55
30. Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vázquez JMMM, Martínez EA, et al. 2004. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.* 25(3):389–96
31. Mcglone J, Ford SS, Mitloehner F, Grandin T, Ruegg P, et al. 2010. *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*
32. Hancock, J. and Hovell G. 1959. The Collection of Boar Semen. *he Vet. Rec.* 71:664–665.
33. Veterinarias C, Naturales C, San P, Bosco J, Esquel S. 2013. Boar semen□: complementary techniques for its evaluation Técnicas complementarias para la evaluación de semen porcino. . 15(1):37–46
34. Yadav SB, Suryakar AN, Huddedar AD, Shukla PS. 2006. Effect of antioxidants and antibiotics on levels of seminal oxidative stress in leukocytospermic infertile men. *Indian J. Clin. Biochem.* 21(1):152–56
35. Westendorf P, Richter L, Treu H. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-Verfahren. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr*
36. Thurston LM, Watson PF, Mileham a J, Holt W V. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22(3):382–94
37. Buckett WM, Farquharson RG, Luckas MJM, Kingsland CR, Aird IA, Lewis-Jones DI. 1997. The hypo-osmotic swelling test in recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.* 68(3):506–9
38. Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36(1–2):77–86
39. Flohé L, Otting F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* 105:93–104
40. Thurston LM, Holt W V, Watson PF. 2003. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology.* 60(1):101–13