

# Cryopreservation of boar semen: progress and perspectives\*

*Criopreservação de sêmen suíno: avanços tecnológicos e perspectivas*

*Criopreservación de semen de verraco: avances y perspectivas tecnológicas*

Tainã Figueiredo Cardoso<sup>1\*</sup>, Biot.; Estela Fernandes e Silva<sup>2</sup>, Biot.; Carine Dahl Corcini<sup>3</sup>, MV, Dr.

\* Autor para correspondência: Tainã Figueiredo Cardoso. Av. Italia Km.8  
Carreiros, Rio Grande/Rs. E-mail: tainafcardoso@gmail.com

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande.

<sup>3</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

(Recibido: 9 de septiembre, 2013; aceptado: 18 de octubre, 2013)

## Abstract

Biotechnology of boar semen cryopreservation has not succeeded due to the high sensitivity of swine sperm to the freezing and thawing process. However, its use is highly desirable for genetic improvement and maintenance of biosecurity. This review aims to highlight some limitations of the process and point out important advances obtained in recent years, including the improvement of existing techniques, such as protein characterization of the ejaculate, adjustments in the removal of seminal plasma, and use of adjuvants in the manufacture of diluents; all of which will make cryopreservation commercially available in the near future.

## Key words

*antioxidants, cryopreservation, diluents, freezing, sperm.*

## Resumen

La criopreservación del semen de porcino es una técnica aún no consolidada debido a la alta sensibilidad del espermatozoide de esta especie al proceso de congelación y descongelación, aun así, el uso de semen criopreservado es altamente deseable para el intercambio genético y el mantenimiento de la bioseguridad. Esta revisión tiene por

\*Para citar este artículo: Figueiredo Cardoso T, Fernandes e Silva E, Dahl Corcini C. Criopreservação de sêmen suíno: avanços tecnológicos e perspectivas. Rev CES Med Zootec. Vol 8(2): 132-140.

objeto poner de relieve algunos factores limitantes del proceso y señalar las importantes avances desarrollados en los últimos años, debido principalmente al mejoramiento de las técnicas existentes, entre ellas, la caracterización de las proteínas de la eyaculación, los ajustes de extracción del plasma seminal y el uso de adyuvantes en la producción de los diluyentes. Todas estas técnicas harán que la criopreservación del semen de porcino sea más aplicable en los próximos años, para ser finalmente una técnica de uso comercial.

## Palabras clave

*antioxidantes, congelamiento, criopreservación, diluyentes, espermatozoide.*

## Resumo

A criopreservação de sêmen suíno é uma técnica ainda não consolidada devido à alta sensibilidade do espermatozoide da espécie ao processo de congelamento e descongelamento. Ainda assim, a utilização do sêmen criopreservado é altamente desejável para o intercâmbio genético e manutenção da biossegurança. Esta revisão tem como objetivo ressaltar alguns fatores limitantes do processo e apontar os consideráveis avanços desenvolvidos nos últimos anos, principalmente devido ao aperfeiçoamento das técnicas já existentes, como caracterização das proteínas do ejaculado, ajustes na remoção do plasma seminal e uso de adjuvantes na confecção dos diluentes. Todas estas técnicas tornarão a criopreservação do sêmen suíno mais aplicável nos próximos anos para que possa ser finalmente uma técnica de uso comercial.

## Palavras-chave

*antioxidantes, congelamento, criopreservação, diluentes, espermatozóiide.*

## Introdução

A criopreservação de sêmen é uma biotécnica reprodutiva consolidada e difundida desde 1975<sup>(19)</sup>. Contudo, com relação à espécie suína, ainda existem muitas dificuldades no processo de criopreservação do sêmen, devido à notória sensibilidade dos espermatozoides ao processo de congelamento/descongelamento.

Melhorar a fertilidade do sêmen congelado/descongelado tem sido um dos objetivos da comunidade científica e da indústria suína, pois a utilização do sêmen suíno criopreservado é altamente desejável, principalmente para a internacionalização de mercados da espécie, para a manutenção de germoplasma, preservação e dispersão da diversidade genética, e o controle da transmissão de patógenos, impedindo a disseminação de patologias, como a Síndrome Multissistêmica Pós-Desmame e a Síndrome Respiratória.

Contudo, esta tecnologia ainda não é suficiente para reproduzir índices de fertilidade satisfatórios após a inseminação artificial (IA) quando comparada ao sêmen resfriado<sup>(27)</sup>, devido à perda da capacidade fertilizante e da não sobrevivência de 40-50% dos espermatozoides durante o processo de criopreservação. Fato que resulta em uma diminuição das taxas de parição, em cerca de 20 - 30% e do tamanho da leitegada de 2 - 3 leitões<sup>(40)</sup>.

A biotécnica de criopreservação compreende todo o processo de manipulação do ejaculado, correspondendo à diluição, resfriamento, crioproteção, congelamento, armazenamento a - 196 °C e descongelamento<sup>(20)</sup>. Sendo dependente das interações de fatores internos (características inerentes dos espermatozoides e das diferenças entre machos e ejaculados) e fatores externos (composição de diluentes, tipo e concentração de agentes

crioprotetores, taxas de diluição e de refrigeração, do congelamento e do descongelamento). A relação destes fatores é capaz de influenciar a capacidade do espermatozoide em sobreviver e manter suas qualidades fertilizantes ao final do processo e, portanto, determinante para o sucesso da técnica.

Desta forma, a presente revisão, tem como objetivo ressaltar alguns fatores limitantes do processo de criopreservação de sêmen suíno, apontando as adaptações realizadas até o presente momento nas distintas etapas do processo e suas perspectivas.

## Características da célula espermática suína

De modo geral, o processo de criopreservação causa inúmeros danos à célula espermática, reduzindo a proporção de espermatozoides viáveis, bem como sua capacidade funcional. As lesões ocasionadas têm sido atribuídas à variação de temperatura - resultando na formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares, danos oxidativos, alterações de membrana e DNA - além da toxicidade de crioprotetores e estresse osmótico <sup>(49)</sup>.

Em nível celular, os danos ocasionados levam ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática, inibição da atividade enzimática e alteração do balanço bioenergético celular <sup>(15)</sup>, contudo cada espécie possui um potencial de crioproteção distinto, devido a características intrínsecas de suas células <sup>(29)</sup>.

Um dos grandes desafios para a criopreservação de sêmen suíno são as particularidades de sua célula espermática quando comparada com a de outras espécies. O espermatozoide suíno possui uma menor porcentagem de moléculas de colesterol em sua membrana plasmática, distribuídas de forma assimétrica, com maior disposição na monocamada interna <sup>(49)</sup>. Essas diferenças estruturais contribuem para a grande sensibilidade ao choque térmico, caracterizado por uma redução da motilidade e danos funcionais de membrana e acrossoma <sup>(22, 45)</sup>.

Outra peculiaridade é a grande concentração de ácidos graxos insaturados nos fosfolípidos presentes na

membrana plasmática, com poucas ligações duplas do tipo *cis* <sup>(10)</sup>, tornando esta célula suscetível à peroxidação lipídica, devido ao estresse oxidativo produzido pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção excessiva e desequilibrada EROs resulta em numerosos eventos indesejáveis como danos da membrana plasmática, inibição da respiração e vazamento de enzimas intracelulares <sup>(47)</sup>. Este fato ainda é agravado pela baixa capacidade antioxidante do plasma seminal suíno <sup>(7)</sup>.

Além disso, existe uma grande variação entre raças e, inclusive, entre ejaculados de um mesmo indivíduo <sup>(11,30)</sup>. Isto demonstra uma possível relação genética no processo de criopreservação, capaz de influenciar em uma expressão proteica ou de lipídeos da composição da membrana diferentes, ou ainda em alterações na composição do plasma seminal ou funcionalidade das glândulas acessórias <sup>(23)</sup>. Contudo essas variabilidades são determinadas por vários fatores, alguns desconhecidos, e outros ainda pouco estudados.

Desta forma, estudos que visem compreender os processos bioquímicos e fisiológicos associados com a estrutura e atividade fisiológica do espermatozoide, principalmente as relacionadas ao processo de crioproteção, são cruciais para agregar conhecimento e direcionar estudos que aperfeiçoem esta biotécnica.

## Manipulações no sêmen para congelamento e descongelamento

Como citado anteriormente, a tolerância ao congelamento é influenciado por características individuais do macho e ejaculado, ou até mesmo entre as porções coletadas de um mesmo ejaculado <sup>(44)</sup>.

Os primeiros 10mL do ejaculado são considerados como “esperma rico”, apresentando uma maior tolerância à criopreservação, pois se acredita que esta porção possui uma quantidade substancial de fluido da cauda do epidídimo, incluindo proteínas relevantes como a prostaglandina sintase, com peso molecular de 10,56 kDa <sup>(46)</sup> e outras com 18, 19, 44, 65, 80 e 100 kDa <sup>(10)</sup>.

relacionadas com melhores resultados na criopreservação, devendo-se priorizar esta porção para o processo.

Após a coleta, uma das etapas primordiais para o congelamento, é a remoção do plasma seminal, geralmente utilizada para melhorar a motilidade do esperma congelado/descongelado e a fertilidade *in vitro*. Esta etapa é recomendada principalmente para machos considerados maus congeladores<sup>(36)</sup>. Uma pré-incubação com o plasma seminal ainda é bastante controversa. Alguns autores indicam uma pré-incubação de pelo menos 24 h a 15°C de todo ejaculado, visto que este tempo de estabilização melhora sua congelabilidade, enquanto, há relatos do efeito prejudicial do plasma seminal, especialmente em espermatozoides armazenados por pelo menos 6h antes da criopreservação<sup>(35)</sup>.

Para a remoção do plasma seminal e concentração dos espermatozoides de modo que eles possam ser rediluídos com extensores de congelamento, é necessário o uso de centrifugações, sendo o tempo de centrifugação considerado mais crítico do que a força G aplicada para a indução de danos espermáticos<sup>(39)</sup>. Carvajal *et al.*<sup>(9)</sup> testou diferentes forças e tempo de centrifugação, analisando a recuperação espermática com acrossoma íntegros e sobrevivida celular, indicando um curto prazo de centrifugação com uma força centrípeta relativamente alta (2400×g durante 3 min) para a minimização de danos após criopreservação.

Uma alternativa para o processo de centrifugação seria a realização de diálise, removendo componentes de baixo peso molecular, como íons livres e metabólitos, que poderiam ter um efeito negativo na função do esperma, mas sem perder proteínas ou componentes de interação presentes no plasma seminal capazes de promover uma melhor sustentação a criopreservação<sup>(16)</sup>, contudo a diálise ainda é pouco utilizada.

Após a remoção do plasma seminal, o *pellet* de espermatozoides concentrados devido à centrifugação é resuspenso em diluentes de resfriamento e congelamento, ajustando desta forma a concentração de células espermáticas de 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> espermatozoides/mL, além de

fornecer nutrientes para a sustentação do metabolismo celular e componentes que irão auxiliar na crioproteção.

Devido aos problemas inerentes do processo, a criopreservação de sêmen suíno é realizada em duas etapas, primeiramente é realizado um resfriamento, considerado um dos principais pontos, pois a faixa crítica de temperatura durante o processo de resfriamento varia de +15 a 5°C, a qual ocorre à solidificação dos lipídios de membrana. Nesta etapa é indicado um resfriamento lento (em torno de 4 a 30°C/min)<sup>(76)</sup> até a temperatura de 5°C, na qual é adicionado os crioprotetores internos e realizado o congelamento.

Com relação à velocidade de congelamento, com objetivo de diminuir os danos tóxicos dos diluentes internos utilizados, os sistemas convencionais preveem curvas rápidas de congelamento, sendo o recomendado ser -30 °C/min e a velocidade de descongelamento de 1200°C/min<sup>(27)</sup>. O envase para criopreservação deve ser efetuado em palhetas de 0,5 mL ou menores, pois os resultados são superiores a pellets, antiga forma de congelamento<sup>(27)</sup>.

Após o descongelamento, Larsson *et al.*<sup>(30)</sup> demonstrou que a adição de 10% de plasma seminal na solução de descongelamento é uma alternativa interessante, pois restauraria a competência da fertilização *in vivo*. Estando relacionado à capacidade do plasma seminal em regular diretamente funções uterinas, como a supressão de células do sistema imunológico, levando à diminuição da inflamação uterina<sup>(41, 42)</sup>.

Neste âmbito, fica evidente que modificações em protocolos de congelamento/descongelamento são necessárias para trazer novas perspectivas, tal como o uso de recipientes criogênicos, que estão sendo desenvolvidos com o objetivo de uniformizar o resfriamento e descongelamento, alcançando resultados similares aos obtidos com o congelamento em palhetas de 0,5 mL em qualidade seminal, mas com taxas de parição e total de leitões vivos similares com as IA utilizando sêmen resfriado<sup>(14)</sup>.

## Diluentes para resfriamento e congelamento

Nas duas etapas dos protocolos de rotina para criopreservação de sêmen suíno – resfriamento e congelamento, é utilizando a gema de ovo como diluente básico. Primeiramente o sêmen é resfriado em diluente a base de gema de ovo até a temperatura de 5°C, e posteriormente dilui-se com um extensor contendo crioprotetor interno. Essa metodologia é aplicada com o objetivo de diminuir o tempo de exposição da célula espermática ao crioprotetor interno, reduzindo a toxicidade deste (34).

Os ingredientes básicos para a confecção dos diluentes são os mesmos que os utilizados há 35 anos, incluindo açúcares, glicerol e a gema de ovo (2). Os açúcares são substâncias de grande importância na criopreservação, pois além de atuarem como substrato energético para as células (33), criam uma pressão osmótica externa, induzindo a desidratação celular e diminuindo a formação de gelo intracelular, preservando a membrana plasmática (17).

A lactose é o açúcar mais utilizado para criopreservação de sêmen suíno, devido aos bons resultados relatados (13,43). No entanto, outros estudos mostram que dissacarídeos de forma geral, que incorporam glicose na sua composição (lactose, sacarose, trealose e melobiose) têm efeito crioprotetor maior do que monossacarídeos (glucose e frutose) (13,33), evidenciando que esses tipos de açúcares adaptam-se melhor com a célula espermática suína, mantendo a integridade estrutural e propriedades de permeabilidade das bicamadas lipídicas.

Com relação ao crioprotetor interno, ou seja, permeável à membrana plasmática, o glicerol é o mais utilizado, desidratando e reduzindo o ponto crioscópico do interior das células, dificultando a formação de cristais de gelo intracelular (49). O glicerol é utilizado em concentrações baixas (inferiores a 4%), pois apresenta uma potencial ação de toxicidade ao ser metabolizado como fonte de açúcar pela célula, sendo responsável pela produção de metilglioxal, por exemplo - mediador da ativação de fosfolípases e proteases provocando irreversíveis danos na célula (1).

Contudo, Buhr et al. (8) mostraram que nenhuma concentração de glicerol maximiza os parâmetros funcionais do esperma criopreservado. Desta forma busca-se encontrar crioprotetores para a substituição do glicerol, a exemplo disso, a trealose (25) e a dimetilacetamida (5) mostram resultados promissores, sugerindo desta forma sua utilização.

A gema de ovo é o crioprotetor externo mais utilizado em protocolos de congelamento de forma geral, fornecendo proteção contra choque frio para os espermatozoides especialmente abaixo de 15 °C (51), devido a sua constituição de lipoproteínas de baixas densidades capazes de associar-se a membrana plasmática, diminuindo a perda de fosfolípidios e colesterol (3). O seu efeito protetor pode ser melhorado pela adição de Orvus Es Past (OEP), também conhecido como Stm Equex (Nova Chemical, Scituate, MA), detergente sintético baseado em sódio e laurilsulfato de trietanolamina. Tem sido sugerido que a OEP dá proteção, pois modifica os constituintes da gema de ovo no diluente (38).

No entanto, por ser a gema de ovo produto de origem animal, é propensa a uma variação em sua composição dependente do animal, origem e nutrição (24). Muitos estudos buscam o preparo de meios quimicamente definidos para sua substituição, a exemplo das lecitinas de soja (21), trealose e glicina (48) ou ainda da própria lipoproteína de baixa densidade purificada (26), contudo nenhum dos materiais testados demonstrou melhores resultados do que o obtido com a gema de ovo.

## Antioxidantes

A célula espermática suína está propensa à ação de agentes oxidantes devido a sua estrutura rica em ácidos graxos poliinsaturados. A geração excessiva dessas substâncias acarreta em mudanças nas características do esperma e causa danos proteicos e estruturais <sup>(12)</sup>. Devido ao baixo poder antioxidante do plasma seminal suíno torna interessante compor diluentes utilizando antioxidantes externos <sup>(52)</sup>.

Bilodeau *et al.*<sup>(6)</sup> sugeriram que um fator importante para a sobrevivência e funcionalidade da célula espermática, durante todo processo de congelamento e descongelamento é o balanço entre a produção de EROs e sua desintoxicação, fato que exerce influência direta sobre a fertilidade.

Assim, nos últimos anos, a investigação sobre a aplicação de antioxidantes para melhorar a criopreservação do esperma suíno e melhorar a qualidade pós-resfriamento e pós-descongelamento tem sido desenvolvida. Dentre os antioxidantes já relatados, podemos citar alguns

compostos como a glutathiona, ácido ascórbico e L-cisteína.

E também o uso de antioxidantes naturais, dada à sinergia dos compostos ativos presentes - tais como o ácido rosmáinico, flavonóides e polifenóis, extrato de Rhodiola (planta da família *Crassulaceae* encontrada em regiões frias) e de Alecrim (planta da família *Baccharis*). Essas substâncias foram capazes de incrementar a qualidade espermática pós-descongelamento, como podem ser vistos na tabela 1.

**Tabla 1.** Antioxidantes utilizados na criopreservação de sêmen suínos e seu incremento na qualidade espermática pós-descongelamento.

<i>Substância</i>	<i>Incremento</i>	<i>Autores</i>
Glutathiona reduzida	Aumento significativo na capacidade de fertilização dos espermatozoides quando utilizada no extensor de descongelamento.	Gadea J. <i>et al.</i> <sup>(18)</sup>
Extrato de Sacra rosea (Rhodiola)	Aumento da concentração de glutathiona, da atividade mitocondrial, e diminuição da concentração de malondialdeído (MDA).	Zhao HW <i>et al.</i> <sup>(52)</sup>
Extrato de Rosmarinus officinalis (Alecrim)	Diminuição na produção de MDA e aumento na viabilidade após 2 horas de incubação. Eficaz no sistema de fertilização in vitro.	Malo C <i>et al.</i> <sup>(31,32)</sup>
Vitamina E Trolox	Aumento na motilidade e elevação da atividade mitocondrial.	Peña FJ <i>et al.</i> <sup>(37)</sup>
L-cisteína	Aumento da motilidade progressiva, na viabilidade e na integridade acrosomal.	Kaeoket K <i>et al.</i> <sup>(28)</sup>

## Conclusões e perspectivas

Devido aos baixos índices de concepção, resultantes de inseminações artificiais com doses criopreservadas, o uso do sêmen suíno congelado ainda não é uma realidade comercialmente. Mas os recentes avanços acerca de conhecimentos bioquímicos e fisiológicos da célula espermática têm possibilitado adaptações em diluentes e a adição de adjuvantes como antioxidantes

de forma promissora. Desse modo, acredita-se que essa tecnologia se tornará comercialmente viável em pouco tempo, aumentando a produtividade do rebanho comercial, auxiliando na manutenção de biossegurança e incentivando o intercâmbio internacional de material genético.

## Referências

1. Arjones, Chantril LA, Cokinakis A. Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa, *J Reprod Fertil* 1992; 94(1): 129–134.
2. Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 2009; 10(1): 49–62.
3. Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 2004; 70(3): 708-717.
4. Bhur M, Fiser P, Bailey J, Curtis EF. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J Androl* 2001; 22(6): 61–96.
5. Bianchi I, Calderam K, Maschio ÉF, Madeira EM, da Rosa Ulguim R, *et al.* Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 2007; 69(5): 632-638.
6. Bilodeau JF, Suvro-Chatterjee, Sirard MA. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000; 55(3): 282-288.
7. Brezezinska-Slebozinska E, Slebozinski AB, Pietras B, Wieczorek E. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Elem Res* 1995; 47: 69–74.
8. Buhr MM, Fiser P, Bailey JL, Curtis EF. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J Androl* 2001; 22(6): 961–969.
9. Carvajal G, Cuello C, Vazquez JM, Martínez EA, Roca J, *et al.* Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryopreservation. *J Androl* 2004; 25(3): 389–396.
10. Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 2000; 58 (1-2): 99–111.
11. Corcini CD, Varela AS, Pigozzo R, Rambo G, Goularte KL *et al.* Pre-freezing and post-thawing quality of boar sperm for distinct portions of the ejaculate and as a function of protein bands present in seminal plasma. *Livest Sci* 2012; 145(1): 28-33.
12. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals I. General aspects. *J Chem Biol* 1987; 262(20): 9895–9990.
13. De Mercado E, Rodríguez A, Gómez E, Sanz E.. Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thaw sperm quality. *Anim Reprod Sci* 2010; 118(1): 54–61.
14. Eriksson BM, Rodriguez-Martinez. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim Reprod Sci* 2000; 63 (3-4): 205–220.
15. Fahy, GM. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 1996; 23(1): 1-13.
16. Fraser L, Dziekońska A, Strzeżek R, Strzeżek J. Dialysis of boar semen prior to freezing–thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology* 2007; 15(5): 994–1003.
17. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 2004; 25(6): 375–388.
18. Gadea J, Sells E, Marco MA, Coy P, Matás C *et al.* Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extends. *Theriogenology* 2004; 62 (3-4): 690–701.
19. Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell WM *et al.* New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 2008; 70(8): 1225–1233.

20. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11(1): 73–88.
21. Hiwasa M, Kohno H, Togari T, Okabe K, Fukui Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *J Reprod Dev* 2009; 55(1): 50-54.
22. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62 (1-3): 3–22.
23. Holt, WV, Medrano A, Thurston LM, Watson PF. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 2005; 63(2): 370–382.
24. Houpalathi R, López-Fandiño R, Anton M. Bioactive egg compounds. New York: Springer- Verlag 2007; 296.
25. Hu JH, Li QW, Li G, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS, *et al.* The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sci* 2009; 112(4): 107–118.
26. Jiang ZL, Li QW, Hu JH, Li WY, Zhao HW, *et al.* Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprotein in diluents. *Cryobiology* 2007; 3(3): 301-304.
27. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM.. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 62 (1-3): 143-172.
28. Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M.. Supplemental effect of varying l-cysteine concentration on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian J Androl* 2010; 12(5): 760–765.
29. Ladha, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol* 1998; 165(1): 1-10.
30. Larsson K. Fertility of deep frozen boar spermatozoa at various intervals between insemination and induced ovulation: influence of boars and thawing diluents. *Acta Vet Scand* 1976; 17(1): 63–73.
31. Malo C, Gil L, Cano R, Galé I. Antioxidant effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology* 2011; 75(9): 1735–1741.
32. Malo C, Gil L, Gonzalez N, Cano R, de Blas I. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology* 2010; 61(1): 142–147.
33. Malo C, Gil L, Gonzalez N, de Blas I, Espinosa E. Comparing sugar type supplementation for cryopreservation of boar semen in egg yolk based extender. *Cryobiology* 2010; 61(1): 17–21.
34. Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 2002; 57(1): 327-344.
35. Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 63(1): 2372-2381.
36. Okazaki T, Abe S, Yoshid S, Shimada M.. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology* 2009; 71(3): 491–498.
37. Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 2003; 78 (1-2): 85–98.
38. Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen–thawed boar sperm. *J Anim Sci* 1978; 47(1): 198–202.
39. Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. Effect of centrifugation on *in vivo* survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 2002; 57(6): 1669–1681.



40. Romero C, Alba C, Martinez PC, Pascual MAH. Situação atual de novas tecnologias na reprodução de suínos. *Suín Cia* 2004; 2 (6): 28-33.
41. Rozeboom KJ, Rocha-Chavez G, Troedsson MH. Inhibition of neutrophil chemotaxis by pig seminal plasma *in vitro*: a potential method for modulating post-breeding inflammation in sows. *Reproduction* 2001; 121(4): 567-72.
42. Rozeboom KJ, Troedsson MH, Moritor TW, Crabo BG. The effect of spermatozoa and seminal plasma on leukocyte migration into the uterus of gilts. *J Anim Sci* 1999; 77(8): 2201-2206.
43. Sancho S, Casas I, Ekwall H, Saravia F, Rodriguez-Martinez H, et al. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction* 2007(1); 134: 111-121.
44. Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Calvete JJ, Sanz L, et al. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology* 2009; 71(4): 662-675.
45. Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology* 2005; 63(5): 1320-1333.
46. Siqueira AP, Wallgren M, Hossain MS, Johannisson A, Sanz L et al. Quality of boar spermatozoa from the sperm-peak portion of the ejaculate after simplified freezing in Mini- Flatpacks compared to the remaining spermatozoa of the sperm-rich fraction. *Theriogenology* 2011; 75(7): 1175-1184.
47. Tavilani H, Goodarzi MT, Doosti M, Vaisi-Raygani A, Hassanzadeh T et al. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2008; 16(5): 649-656.
48. Valente SS, Pereira RM, Baptista MC, et al. *In vitro* and *in vivo* fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Anim Reprod Sci* 2010; 117 (1-2): 74-77.
49. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing functions. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(4): 871-891.
50. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60/61: 481-492.
51. Westendorf P, Richter L, Treu H. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und besamungsergebnisse mit dem hülsenberger pailletten-verfahren. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1975; 82(1): 261-267.
52. Zhao HW, Li QW, Ning GZ, et al. *Rhodiola sacra* aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 2009; 5(5): 849-857.