

Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos (Sperm cryopreservation in domestic and wild species: a review of recent advances)

Julián Santiago-Moreno¹; Diego A. Galarza Lucero^{1,2}

¹**Departamento de Reproducción Animal, INIA, 28040, Madrid, España. Correo electrónico del autor para correspondencia:** moreno@inia.es

²**Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, EC010205, Cuenca, Ecuador. Email:** andres.galarza@ucuenca.edu.ec

Resumen

Durante las últimas décadas, los avances en las biotecnologías reproductivas contribuyeron a mejorar la eficiencia de la gestión de los recursos genéticos y al desarrollo de los bancos de germoplasma, aumentando la capacidad de preservar la diversidad genética en aquellas situaciones que sean necesarias. Sin embargo, la eficiencia de las metodologías de criopreservación aplicadas a los espermatozoides es extremadamente variable dependiendo de la especie/raza y, en muchos casos, de los propios individuos. Las habituales bajas tasas de fertilidad con espermatozoides congelados-descongelados de algunas especies, como los pequeños rumiantes domésticos y silvestres, determina que debe realizarse un nuevo enfoque en el ámbito de la criobiología espermática, que permitan conocer mejor los cambios fisiológicos en el esperma y el sistema reproductor masculino durante el ciclo reproductivo anual y su relación con la crio-resistencia espermática. Además, el desarrollo de nuevos protocolos de enfriamiento, uso de nuevos aditivos en los diluyentes y la combinación de crioprotectores, debe ser una prioridad en los laboratorios de espermatología, para conseguir una mejor protección de la membrana plasmática y los compartimentos celulares de los espermatozoides, permitiendo obtener resultados de fertilización más altos y menos variables.

Palabras clave: Semen, congelación, crio-resistencia, diluyentes, biocongelador

Abstract

During the last decades, developments in reproductive biotechnologies contributed to an improved efficiency of the management of genetic resources and to the development of cryobanking, increasing the capacity of restoring breeds' genetic diversity when needed. However the efficiency of the conservation methodologies applied to sperm is extremely variable depending on the species/breeds and in many cases individuals. The usual low fertility rates in many species, like wild and domestic small ruminants, using frozen-thawed sperm, determines that a new sperm cryobiology approach should be made to know the physiological changes in sperm and male reproductive system during the annual reproductive cycle, and their relationship with sperm cryoresistance. In addition, the develop of new cooling protocols and additive supplies, and combinations of cryoprotectants, should be a priority in the spermatology laboratories in order to better protect the plasma membrane and cellular compartments of sperm and to get higher and less variable results of fertilizing ability.

Keywords: Semen, freezing, cryoresistance, extender, biological freezer

Introducción

Desde el descubrimiento del papel crioprotector del glicerol por Polge et al., (1949), han sido numerosos los avances en la criobiología de diferentes células y tejidos. Entre ellos, los espermatozoides representan el tipo celular en el que se ha centrado gran parte de la investigación para el desarrollo de bancos de germoplasma, dado la mayor facilidad de obtención respecto a otras células y embriones, y la posibilidad de uso mediante técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial (IA), la fecundación in vitro (FIV) o la inyección intra-citoplasmática (ICSI). Si bien los primeros estudios de criopreservación se realizaban con nieve carbónica, a temperatura de -79°C , el uso generalizado del nitrógeno líquido a partir de la década de los 50' del siglo pasado, lo sitúa como elemento de elección para la criogenización y almacenamiento, a -196°C , del material genético.

La criopreservación de espermatozoides tiene un interés tanto desde el punto de vista de la conservación de especies y razas amenazadas, como para uso del material criopreservado en programas de mejora genética en razas productivas. En países Andinos como Ecuador, las políticas gubernamentales han considerado una prioridad la implementación de programas de conservación de material genético autóctono (espermatozoides y ovocitos)

mediante el uso de biotecnologías reproductivas para la implementación de bancos de germoplasma. Para nuestro mejor conocimiento, el desarrollo de biotecnologías de criopreservación de espermatozoides de bovinos autóctonos del altiplano Andino Ecuatoriano ha permitido almacenar este material genético con fines investigativos. Una reciente investigación sugirió que las muestras de semen de toros colectadas por electroeyaculación o vagina artificial y diluidas con Triladyl (Tris-yh) parecen ser la mejor opción para preservar los gametos de toros criollos criados en las tierras altas de los Andes ecuatorianos (Argudo et al., 2019). La recuperación post mortem de espermatozoides del bovinos de la región amazónica Ecuatoriana, ha sugerido almacenar los epidídimos a 5°C con mejores respuestas a la congelabilidad (Galarza et al., 2016). Asimismo, a pesar de los avances y mejoras de la tasas de fertilidad con espermatozoides congelados-descongelados aplicados mediante IA, en algunas especies domésticas como la ovina y especies aviares (gallinas, pavos), la congelación de espermatozoides sigue suponiendo un hándicap tecnológico, dado las variables y, frecuentemente, bajas tasas de fertilidad que se obtienen.

En especies silvestres, esta situación es más marcada debido, en parte, a la poca información que se suele disponer de su biología reproductiva y las dificultades de acceso a material espermático para el desarrollo de nuevos protocolos de criopreservación.

Los procedimientos de criopreservación se orientan a intentar minimizar los daños celulares que se producen durante la congelación y descongelación celular. Estos incluyen, principalmente, daños a nivel de la membrana plasmática (ej. rotura de la membrana, desnaturalización y desplazamiento de las proteínas de membrana), membrana mitocondrial y acrosoma (reacción acrosómica). Igualmente, los procesos de congelación-descongelación determinan una desestructuración de los microtúbulos que conforman el flagelo del espermatozoide. Las alteraciones de membrana y de microtúbulos están determinadas por el daño osmótico que se produce durante el proceso de congelación-descongelación. El estrés osmótico también determina variaciones en las variables morfométricas de la cabeza del espermatozoide (O'Brien et al., 2019). Por otro lado, la producción de especies de oxígeno reactivo, generados principalmente a nivel mitocondrial durante la criopreservación, va a determinar la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide. Estos radicales libres van a propiciar, a su vez, el desencadenamiento de procesos apoptóticos que se reflejan alteración del potencial de

membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$), fragmentación del ADN, inversión en la membrana de la fosfatidilserina y activación de caspasas (Santiago-Moreno et al., 2013). Las caspasas activan endonucleasas citoplasmáticas que degradan material nuclear y proteasas que degradan proteínas nucleares y citoesqueletos (ej. microtúbulos flagelares). Este conjunto de alteraciones celulares merman la viabilidad, actividad cinética y la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados.

La optimización de los procesos de criopreservación intenta reducir estas alteraciones del espermatozoide y se concreta en varias líneas de investigación: rampas de enfriamiento; crioprotectores permeables, aditivos; temperaturas de descongelación; métodos alternativos (ej. vitrificación espermática).

Factores determinantes de la crio-resistencia espermática

La crio-resistencia de los espermatozoides está influenciada por diferentes factores, siendo un componente clave a este respecto la composición de las membranas celulares, principalmente en lo que se refiere a constitución lipídica. Las especies con elevadas proporciones de colesterol/fosfolípidos son las que mejor resisten los procesos de enfriamiento (ej. conejo) (Darin-Bennett & White, 1977). Igualmente la composición del plasma seminal influye directamente en la respuesta espermática a los procesos de congelación. En este sentido se han identificado proteínas relacionadas con una mejor congelabilidad y otras que parecen predisponer a un mayor daño (Caballero et al., 2012). La exposición durante largo tiempo a las proteínas originadas en las vesículas seminales del toro, que se denominan genéricamente como BSP (*major proteins of bovine seminal plasma*), predisponen a un mayor daño celular. Las BSP incluyen: BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, BSP-30-kDa. Las BSP determinan un eflujo de colesterol y fosfolípidos de la membrana del espermatozoide de toro, haciéndola más sensible a los procesos de criopreservación. Incluso el perfil de aminoácidos del plasma seminal puede contribuir a variaciones en la crio-resistencia, pudiendo estar influida la variación de dicho perfil por un componente genético (racial). En gallos se ha apuntado que las razas que contienen mayor cantidad del aminoácido valina en el plasma seminal, resisten mejor los daños del ADN conferidos durante la congelación-descongelación (Santiago-Moreno et al., 2019). El origen de los espermatozoides también determina variaciones en la resistencia al choque frío, tal que los espermatozoides eyaculados son más susceptibles al choque frío que los espermatozoides epididimarios (O'Brien et al., 2019).

El estatus endocrino en el momento de la obtención de espermatozoides (ej. niveles circulantes de testosterona, prolactina, etc.), generalmente determinado por la estación de año en especies con actividad reproductiva estacional, también puede conferir modificaciones morfo-funcionales en el espermatozoide que lo hagan más o menos sensible a criopreservación (Martínez-Fresneda et al., 2017).

Recientes investigaciones ponen de manifiesto la importancia de diferentes proteínas de membrana relacionadas con la difusión del agua, denominadas acuaporinas (AQPs), en la respuesta celular a los procesos de congelación y descongelación. Las AQPs (identificadas en número de 13 en mamíferos: AQP0-12) se dividen en tres familias, según su funcionalidad: una familia incluye AQP1, AQP2, AQP4, AQP5 y AQP8 que transportan selectivamente agua; otra (las acuagliceroporinas) incluye AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10, que transportan agua y glicerol (Wang et al., 2006) que hace de sustrato energético durante la maduración y almacenamiento espermático (Yeung, 2010); finalmente, las superacuaporinas que incluyen AQP11 y AQP12 (Ishibashi et al., 2014). El número de AQPs identificadas en los espermatozoides, hasta la fecha, varía según la especie; por ejemplo en espermatozoides humanos se han identificado cuatro (AQP3, AQP7, AQP8, AQP11; Laforenza et al., 2017). En la criopreservación espermática se ha sugerido que el flujo de agua y de los crioprotectores, a través del espermatozoide durante el proceso de congelación y descongelación, está regulado, en gran medida, por las acuagliceroporinas. En espermatozoides porcinos, el estrés de membrana inducido durante la descongelación determina una redistribución de la AQP7 en las diferentes estructuras del espermatozoide (cabeza, porción intermedia y cola) (Vicente-Carrillo et al., 2016), sugiriendo un papel de los cambios osmóticos en el medio extracelular en dicha redistribución de la AQP7, así como una función primordial en la regulación de la difusión de agua y glicerol durante el proceso de congelación-descongelación. El papel de las AQPs en la regulación de la motilidad en espermatozoides de mamíferos no es bien conocido, pero es razonable que estén involucradas en la activación de los espermatozoides durante el estrés hipotónico una vez que son liberados desde el epidídimo y entran en contacto con el plasma seminal (Boj et al., 2015a). En espermatozoides humanos, se ha observado una correlación entre la baja expresión de AQP7 y la alteración en los parámetros cinéticos (Yeung et al., 2009); en espermatozoides porcinos, el contenido de AQP11 parece correlacionado con la motilidad y la integridad de membrana (Prieto-Martínez et al., 2016). El control de la expresión de AQPs en el espermatozoide es un proceso complejo en el que interviene una regulación andrógeno dependiente o directamente por la LH (Boj et al., 2015b). Ha sido

referido que los andrógenos pueden regular la expresión de la AQP9 en los conductos eferentes y epidídimo de la rata (Pastor-Soler et al., 2002), siendo este hecho de gran trascendencia en la función espermática, considerando que a nivel de dichos conductos se produce una gran absorción de agua para concentrar el esperma, permitiendo una mayor interacción de los espermatozoides con los productos de la secreción del epitelio epididimario (Hess, 2002). La reabsorción de agua se incrementa a nivel del epidídimo, en donde hay una expresión de AQPs variable según las especies, aumentando la concentración de espermatozoides y proteínas y desarrollándose un microambiente hipertónico requerido para la maduración. A nivel renal, hay evidencias de una relación entre las hormonas tiroideas y la expresión de ciertas AQPs, como la AQP1, AQP2, AQP3 y AQP4, las cuales estarían incrementadas en situaciones de hipotiroidismo (Chen et al., 2005). En la actualidad se están realizando estudios que relacionen las hormonas tiroideas con la expresión de AQPs en el espermatozoide o en el tejido epididimario (Santiago-Moreno et al., datos no publicados). Por otro lado, se ha barajado la hipótesis que diferencias en su expresión en la membrana del espermatozoide, incluso acontecidas a nivel individual, podrían estar detrás de una mejor o peor respuesta observada en ejemplares de animales denominados como buenos o malos congeladores.

Rampas de enfriamiento y temperaturas de descongelación

Las rampas de congelación suponen uno de los elementos claves para conseguir una criopreservación exitosa de los espermatozoides. Tanto las rampas de enfriamiento extremadamente rápidas ó lentas tienen un efecto deletéreo sobre el espermatozoide. Mientras que velocidades de enfriamiento muy rápidas podrían inducir la formación de hielo intracelular (Holt & Penfold, 2014), curvas demasiado lentas pueden causar una excesiva deshidratación de la célula que determina alteraciones de las proteínas y lípidos de membrana y la generación de especies reactivas de oxígeno, con la consecuente peroxidación de la membrana lipídica (Katkov & Bolu, 2012). De las rampas de enfriamiento dependen las características y formas de los cristales de hielo, principalmente extracelulares, que son una de las principales causas de daño celular durante el proceso de congelación. Trabajos recientes ponen de manifiesto que más que por un daño traumático del cristal de hielo, las alteraciones celulares son debidas, principalmente, a daños osmóticos relacionados con las trabéculas entre cristales donde se concentran los solutos que se excluyen del cristal de hielo durante la congelación, y donde se disponen los

espermatozoides, que responden perdiendo agua (deshidratación celular) para equilibrarse osmóticamente con este medio externo hiperosmótico; las características de estas trabéculas y las concentraciones de dichos solutos son dependientes de las características y tamaños de los cristales de hielo. Velocidades más altas de enfriamiento determinan cristales de tamaño más pequeño (Bóveda et al., 2018).

En toros, una de las rampas de congelación convencional más utilizada, con buenos resultados, consiste en una disminución de 4°C a -10°C a 10°C/min, luego de -10°C a -150°C a 40°C/min (Gil et al., 2000). En machos cabríos ha dado buenos resultados un tipo de rampa trifásica: 4 a -5°C (4°C/min), -5 a -110°C (25°C/min), -110 a -140°C (35°C/min); una vez alcanzada la temperatura de -140°C las pajuelas se sumergen en nitrógeno líquido (-196°C) (Purdy, 2006). En carneros, la aplicación de diversas rampas de congelación han dado resultados variables. Recientemente, Galarza et al. (2019b) en unos trabajos preliminares, han propuesto una rampa bifásica [de 5 a -10 °C (5 °C/min), de -10 a -130 °C (60 °C/min)] que permite una buena preservación de las variables cinéticas, así como de la integridad de las membranas plasmáticas, mitocondrial y acrosomal.

El macho montés (*Capra pyrenaica*) ha sido ampliamente utilizado como modelo de rumiantes silvestres para la evaluación de diferentes rampas de congelación. Los mejores resultados se obtienen con rampas que van incrementando la velocidad de enfriamiento (ej. la anteriormente mencionada de Purdy para machos cabríos: 4°C/min - 25°C/min - 35°C/min), que aquellas con rampas que van de más a menos velocidad, y que coincidirían con las que se obtienen mediante congelación convencional en vapores de nitrógeno en cajas de poliestireno: de 5 a -35 °C (40 °C/min), de -35 a -65 °C (17 °C/min), de -65 a -85 °C (3 °C/min) (Esteso et al., 2018). En todos los casos, tanto en especies domésticas como en silvestres, hay que destacar que los mejores resultados se obtienen con rampas que van incrementando la velocidad de enfriamiento, a diferencia de las que se inician con altas velocidades seguidas de rampas decrecientes (ej. las obtenidas con el método convencional en vapores de nitrógeno).

Recientemente se han estudiado nuevos procedimientos de criopreservación basados en rampas de enfriamiento ultrarrápidas que permitirían una vitrificación del medio intracelular. A diferencia de los embriones y ovocitos, los espermatozoides son extremadamente sensibles al efecto osmótico letal de las altas concentraciones de crioprotectores utilizadas

en las soluciones de vitrificación (ej. 40% glicerol) (Fahy et al., 1987). Los primeros trabajos sobre vitrificación espermática reportados por Polge et al. (1949) ya indicaban la necesidad de altas concentraciones de glicerol para conseguir un estado de vitrificación de espermatozoides de gallo, pero a dichas concentraciones, los espermatozoides perdían toda su capacidad móvil en la desvitrificación. En espermatozoides humanos, la aplicación de la vitrificación clásica, con altas concentraciones de crioprotectores, también ha resultado en unos índices de viabilidad espermática extremadamente bajos o nulos. Como alternativa, se han diseñado protocolos de vitrificación basados en el hecho físico de que una velocidad de enfriamiento extremadamente rápida determina un incremento de la viscosidad de los fluidos intra- y extracelulares, lo que previene todo tipo de difusión molecular, que se traduce en la disminución o incapacidad de formación de hielo (Bagchi et al., 2008). A diferencia de la vitrificación convencional de embriones u ovocitos, las experiencias en vitrificación espermática humana, mediante aplicación de velocidades de enfriamiento extremadamente rápidas (ej. $\sim 10000-719000$ °C/min), permiten disminuir o incluso prescindir de la adición de agentes crioprotectores permeables, evitándose, por tanto, el efecto tóxico sobre el espermatozoide (Isachenko et al., 2003; 2004). Este tipo de criopreservación se ha denominado vitrificación cinética. El pequeño tamaño de la cabeza espermática, en relación con los ovocitos o embriones, así como la existencia de macromoléculas y polímeros en el citosol, determinan una situación favorable para la inducción de la vitrificación. Tras los primeros trabajos realizados por Luyet & Hodapp (1938) en espermatozoides de rana, y Polge et al. (1949) en el gallo, no es hasta los últimos 15 años donde los trabajos sobre vitrificación espermática empiezan a adquirir cierta relevancia, pero orientada, principalmente, a la medicina y reproducción asistida humana. En animales esta técnica tiene resultados variables según la especie, destacándose los obtenidos en espermatozoides de gacela dama (*Gazella dama*), oso pardo (*Ursus arctos*) o jirafa (*Giraffa camelopardalis*). En el macho montés se ha podido obtener una exitosa capacidad fecundante de espermatozoides vitrificados, tanto eyaculados como epididimarios obtenidos postmortem (Pradiee et al., 2015; 2018). En estas últimas especies la criopreservación se realiza por inmersión directa de los espermatozoides diluidos (diluyente a base de Tris, ácido cítrico, glucosa y sucrosa) en gotas de 50 μ L directamente en nitrógeno líquido, que permite una velocidad de enfriamiento >2000 °C/min. Esta técnica no evita la formación de cristales extracelulares, aunque estos son de menor tamaño. Este hecho ha determinado controversias en cuanto a la denominación de la técnica, sugiriendo

algunos autores una denominación de congelación ultrarrápida en vez de vitrificación cinética.

La velocidad de descongelación adecuada sería de 226°C/min, la cual es fácilmente obtenida sumergiendo las pajuelas o pellets en un baño de agua a 37°C durante 30 segundos. En algunos laboratorios se utiliza, con buenos resultados, la descongelación de las pajuelas a 50°C durante 9 segundos. En el caso de la congelación ultrarrápida, se recomienda una descongelación de los pellets a 60°C/min en 1-2 segundos, usándose para tal efecto dispositivos que permiten la descongelación inmediata sin sobrecalentamiento de la muestra (ej. DDP-70®, INIA).

Crioprotectores

Los daños celulares originados durante el proceso de congelación-descongelación están amortiguados mediante la incorporación al diluyente de agentes crioprotectores. Entre ellos, los más utilizados son el glicerol (Meryman, 1971) y la yema de huevo, si bien este último está encuadrado en el grupo de los crioprotectores no penetrantes e incluso algunos autores consideran mejor incluirlo en el grupo general de aditivos. Otros crioprotectores permeables son el dimetilsulfoxido, dimetilacetamida, dimetilformamida, o el etilenglicol. A diferencia de otras especies, como en aves, en los espermatozoides de mamíferos ninguno de estos crioprotectores permite una capacidad de criopreservación superior al glicerol. El glicerol penetra en el interior de la célula y previene la formación del hielo intracelular. Además diluye la alta concentración de electrolitos intracelulares previniendo el efecto solución; en este sentido hay que tener en cuenta que la alta concentración de los electrolitos en las últimas etapas de la deshidratación celular representa uno de los principales mecanismos causantes de la muerte celular. Además, el glicerol puede proporcionar una fuente extra de energía metabolizable (Mohri & Masaki, 1967). No obstante, dado que el glicerol es osmóticamente activo, un exceso de dicho crioprotector puede generar un estrés osmótico y acelerar la capacitación espermática. Generalmente el glicerol se utiliza a unas concentraciones de 0.5-1.5 M (~4-10% v/v) (Watson & Fuller, 2001). Concentraciones superiores son citotóxicas para los espermatozoides, con efectos negativos en la integridad de membrana (Yotov, 2015). Las alteraciones parecen debidas tanto a una toxicidad química, como al choque osmótico que inducen. Los efectos del glicerol sobre la supervivencia espermática también pueden estar relacionados con la temperatura a la que adicionan al diluyente. Algunos trabajos han reportado un efecto

deletéreo en el espermatozoide de carnero cuando se adiciona 30°C (Colas, 1975) mientras otros no han apreciado ningún efecto entre adicionarlo a temperatura de laboratorio (-23°C) y a 5°C en caprinos silvestres (Coloma et al., 2010a)

Otro aspecto importante lo representa el tiempo total durante el cual los espermatozoides permanecen en contacto con los crioprotectores antes de la congelación, y que clásicamente se ha llamado “periodo de equilibrado”. Este periodo debe permitir una correcta estabilización de la membrana espermática y es variable en función de la especie así como del origen del espermatozoide (eyaculado, epididimario postmortem). En espermatozoides epididimarios de macho montés el tiempo de equilibrado con el crioprotector se puede acortar hasta los 15 minutos (Pradiee et al., 2014), habiéndose aplicado este tiempo tan corto a diferentes especies silvestres con buenos resultados (O’Brien et al., 2019). A diferencia de los espermatozoides epididimarios, los espermatozoides eyaculados requieren de tiempos de equilibrado más amplios, que varían de forma significativa según la especie, desde las 2 hasta 4 horas (O’Brien et al., 2019).

Entre los crioprotectores no penetrantes más utilizados en mamíferos, cabe destacar la sucrosa, la lactosa, la polivinilpirrolidona. Son sustancias de alto peso molecular, que son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación (congelación ultrarrápida, vitrificación) (Pradiee et al., 2015). El tamaño de estas moléculas es muy superior a los crioprotectores penetrantes, como el glicerol. No penetran en la célula sino que ejercen su acción crioprotectora favoreciendo la rápida deshidratación celular, y promoviendo la viscosidad, disminuyendo así la formación de cristales. Los crioprotectores no penetrantes suelen usarse, también, asociados a los agentes penetrantes.

Aditivos utilizados en los diluyentes espermáticos

Los diluyentes espermáticos deben cumplir unos requisitos de pH (próximo a la neutralidad) y osmolaridad. La mayoría de los diluyentes suelen ser hipertónicos con respecto al plasma seminal, los cuales producen menos lesiones que los isotónicos, ya que inducen una mayor deshidratación celular y por tanto reducen la formación de cristales durante la congelación. De forma específica, los diluyentes utilizados deben de contener los siguientes componentes: sustancia orgánica que actúe como crioprotector externo y que proteja a las células contra el shock frío, que se produce al enfriar desde 30°C a 5°C (yema de huevo,

leche descremada, proteína de soja); fuente de energía (glucosa o fructosa); componente tampón (citrato sódico, Tes, Tris, Hepes, Pipes, Mes, Tricine); y antibiótico (penicilina, estreptomicina). A diferencia de las especies domésticas, en las que los componentes y cantidades de los diferentes aditivos suelen estar bien establecidos, en las especies silvestres se requiere de la evaluación experimental de los diferentes aditivos, mediante técnicas *in vitro* e *in vivo*, para obtener buenos resultados de calidad espermática y de capacidad fecundante tras los procesos de congelación-descongelación.

Para la criopreservación de células espermáticas de bóvidos silvestres (macho montés, rebeco (*Rupicapra pyrenaica*), muflón (*Ovis musimon*), arrui (*Ammotragus lervia*) se han evaluado distintos diluyentes, con diferentes aditivos en su composición. La yema de huevo representa uno de los aditivos que aporta mayores beneficios para la congelación espermática, ya que protege a la célula del shock frío y confiere una cierta protección durante el proceso de congelación-descongelación. Entre otras acciones, la yema de huevo previene la pérdida de colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática mediante captación de las proteínas del plasma seminal BSP, disminuyendo su cantidad disponible para unirse a la membrana y por tanto amortiguando su efecto deletéreo en la salida del colesterol y fosfolípidos (Manjunath et al., 2002). Esta propiedad crioprotectora también se ha identificado en la caseína de la leche descremada. Además, las lipoproteínas de la yema de huevo se unen a la membrana plasmática confiriendo una protección al choque de frío durante la refrigeración y congelación. La sustitución de la yema de huevo por otros aditivos como la lactosa, determina un descenso significativo de la motilidad de espermatozoides de macho montés después de la descongelación (Santiago-Moreno et al., 2007). Por otro lado, el uso de altas concentraciones de yema de huevo (12-20%) puede afectar negativamente a los índices de fertilidad en la cabra montés (Santiago-Moreno et al., 2006), por lo que se ha recomendado la utilización de diluyentes conteniendo bajas concentraciones de yema de huevo (6%). En espermatozoides epididimarios de muflón, la integridad de membrana plasmática y las diferentes variables cinéticas espermáticas se preservan mejor con un porcentaje de yema de huevo del 6% que del 12% (Martínez-Fresneda et al., 2018). Cuando se utilizan diluyentes basados en yema de huevo, el plasma seminal del macho montés ejerce un efecto deletéreo en la preservación de material espermático, debido a la presencia de una fosfolipasa de origen bulbouretral. Para evitar estos efectos negativos del plasma seminal, se recomienda la retirada del mismo mediante centrifugación (Coloma et al., 2010b) o purificación espermática mediante técnicas basadas en centrifugación de gradientes de densidad o *swim-up*.

Para semen de muflón, tanto obtenido por eyaculación natural, mediante uso de vagina artificial, como para el recolectado por electroeyaculación, se han obtenido buenos resultados de criopreservación espermática y viabilidad-capacidad fertilizante post-descongelación, con el uso de diluyentes basados en Tris, ácido cítrico, yema de huevo y glicerol (TCG-yh) ó en Tes, Tris, yema de huevo y glicerol (TTG-yh). Existe una interacción entre el tiempo de equilibrado con el crioprotector y el tipo de diluyente, en diferentes parámetros de calidad espermática post-descongelación, habiéndose obtenido los mejores resultados, en términos de mayor motilidad, viabilidad e integridad del acrosoma en semen electroeyaculado, cuando se utiliza el diluyente TTG-yh y un tiempo de equilibrado a 5°C de 3 h, frente a las 2 h clásicamente utilizadas en esta especie (Pradiee et al., 2017). En el caso del arruí, al igual que lo indicado en muflón y otras especies ovinas, el uso del agente zwitteriónico TES (diluyentes TEST) determina un efecto favorable en la criopreservación de espermatozoides (Santiago-Moreno et al., 2013).

Un tipo de aditivos que ha sido objeto de estudio en los últimos años lo representan los antioxidantes. Han sido numerosos los tipos de antioxidantes que se han evaluado como protectores frente al estrés oxidativo que se produce durante el proceso de congelación. La vitamina C, el α -tocoferol, la superóxido dismutasa, así como diversos carotenoides y polifenoles son algunos de los más utilizados (Aitken & Clarkson, 1988; Fernandez-Santos et al., 2007). La evaluación empírica de estos aditivos requiere, además del análisis *in vitro* de las variables espermáticas, del análisis de la fertilidad, ya que la total eliminación de producción de especies reactivas de oxígeno también puede afectar de forma negativa a la funcionalidad del espermatozoide. En este sentido, hay que destacar que algunos procesos fisiológicos, como la fosforilación de la tirosina dependen de la formación de estos radicales libres (Aitken & Bennetts, 2006). Un exceso de antioxidantes puede inhibir la hiperactivación espermática y la reacción acrosómica. Por tanto, es fundamental el establecimiento de unas concentraciones adecuadas que eviten los procesos de estrés oxidativo de la membrana plasmática, pero que no interfiera con la reacción acrosómica. En relación a lo apuntado anteriormente, la utilización de 200 UI/mL de catalasa en diluyentes para espermatozoides de macho montés afectaba negativamente a la capacidad fecundante (López-Saucedo et al., 2014). Mención especial merece la L-carnitina, que ha sido objeto de estudio en trabajos recientes. Este aminoácido se encuentra concentrado dentro del epidídimo y espermatozoides así como en el fluido seminal del eyaculado (Bøhmer et al., 1978). Varios

estudios *in vitro* han evidenciado que potencia la motilidad de espermatozoides humanos y además posee un efecto crioprotector. Por otro lado, reportes previos realizados en humanos y animales (por ejemplo, toro, caballo y cerdo) han sugerido que la L-carnitina desempeña un papel protector contra las especies reactivas de oxígeno, al poseer propiedades antioxidantes. Estudios en condiciones de refrigeración (5°C) durante periodos de hasta 96 horas muestran que la suplementación del diluyente con L-carnitina a una concentración de 5mM proporciona un mantenimiento adecuado de la actividad cinética espermática (Galarza et al., 2019a), posiblemente debido a que la L-carnitina desempeña un importante papel en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias para la β -oxidación que produce la energía (ATP) necesaria para que las células funcionen correctamente.

Conclusiones

A pesar del esfuerzo en la optimización de la criopreservación espermática, ésta sigue teniendo unos rendimientos de efectividad, en términos de fertilidad, demasiado bajos y variables en algunas especies, tales como los pequeños rumiantes domésticos y la mayor parte de las especies silvestres en las que se ha trabajado. Para intentar paliar este bajo rendimiento de las técnicas de criopreservación, se debe realizar un mayor esfuerzo de investigación en diferentes aspectos, como la optimización de las rampas de enfriamiento, los tiempos de equilibrado con crioprotectores permeables, el estudio de nuevos aditivos y el desarrollo de nuevos procedimientos alternativos de criopreservación adaptados a cada especie o, incluso, a cada raza. Con el objeto de identificar las causas que limitan la efectividad de las técnicas de criopreservación, también es necesario un abordaje de la problemática desde una perspectiva nueva, basada en el análisis de los cambios fisiológicos del espermatozoide en el medio donde se desarrolla (plasma epididimario, plasma seminal), y en la influencia de los cambios estacionales de determinadas hormonas en la crio-resistencia de la célula espermática.

Agradecimientos

Este trabajo presenta resultados obtenidos en el proyecto IMAGE N°677353 del programa H2020 de Investigación e Innovación de la Unión Europea, y en el proyecto AGL2017-85753-R del MINECO AEI/FEDER UIE-Agencia Estatal Investigación. Diego Galarza fue financiado por una beca SENESCYT-Ecuador (ARSEQ-BEC-008856-2016).

Referencias bibliográficas

- Aitken, R., & Bennetts, L. (2006). Reactive oxygen species: friend or foe. In C. De Jonge, C. Barrat (Eds.), *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, Cambridge University Press, UK, 2006. pp. 170–196. Retrieved from [http://www.tuleoffice.com/images/editor/File/pdf/book/INFERTILITY/book/1\(18\).pdf#page=183](http://www.tuleoffice.com/images/editor/File/pdf/book/INFERTILITY/book/1(18).pdf#page=183)
- Aitken, R. J., & Clarkson, J. S. (1988). Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Defining the Efficacy of Sperm Preparation Techniques. *Journal of Andrology*, 9(6), 367–376. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1988.tb01067.x>
- Argudo, D. E., Galarza, D. A., Bueno, P., Iñiguez, C. U., Méndez, S., Soria, M. E., ... Alberio, R. H. (2019). Methods of collection, extender type, and freezability of semen collected from creole bulls raised in the tropical highlands of Ecuador. *Tropical Animal Health and Production*, *En prensa*. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01877-3>
- Bagchi, A., Woods, E. J., & Critser, J. K. (2008). Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. *Expert Review of Medical Devices*, 5(3), 359–370. <https://doi.org/10.1586/17434440.5.3.359>
- Bøhmer, T., Hoel, P., Purvis, K., & Hansson, V. (1978). Carnitine Levels in Human Accessory Sex Organs. *Archives of Andrology*, 1(1), 53–59. <https://doi.org/10.3109/01485017808988318>
- Boj, M., Chauvigné, F., & Cerdà, J. (2015). Aquaporin biology of spermatogenesis and sperm physiology in mammals and teleosts. *The Biological Bulletin*, 229(1), 93–108. <https://doi.org/10.1086/BBLv229n1p93>
- Boj, M., Chauvigné, F., Zapater, C., & Cerdà, J. (2015). Gonadotropin-Activated Androgen-Dependent and Independent Pathways Regulate Aquaporin Expression during Teleost (*Sparus aurata*) Spermatogenesis. *PLoS ONE*, 10(11), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142512>
- Bóveda, P., Toledano, A., Castaño, C., Estesó, M., López-Sebastián, A., Rizos, D., ... Santiago-Moreno, J. (2018). Cryo-scanning and conventional electron microscopy of

Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) sperm cryopreserved using slow and ultra-rapid cooling protocols. *Reproduction in Domestic Animals.*, 53(Suppl. 2), 113.

Caballero, I., Parrilla, I., Almiñana, C., del Olmo, D., Roca, J., Martínez, E., & Vázquez, J. (2012). Seminal Plasma Proteins as Modulators of the Sperm Function and Their Application in Sperm Biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(Suppl. 3), 12–21. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02028.x>

Chen, Y. C., Cadnapaphornchai, M. A., Yang, J., Summer, S. N., Falk, S., Li, C., ... Schrier, R. W. (2005). Nonosmotic release of vasopressin and renal aquaporins in impaired urinary dilution in hypothyroidism. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(4), F672–F678. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00384.2004>

Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 42(2), 277–285. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0420277>

Coloma, M A, Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2010). The influence of washing Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. *Theriogenology*, 73(7), 900–908. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.11.014>

Coloma, Miguel. A., Gómez-Brunet, A., Velázquez, R., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2010). Freezability of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa according to the glycerolization temperature and plasma testosterone concentration. *Cryobiology*, 61(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2010.07.005>

Darin-Bennett, A., & White, I. G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4), 466–470. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90008-6)

Esteso, M. C., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Pradiee, J., Lopez-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2018). Effect of two cooling protocols on the post-thaw characteristics of Iberian ibex sperms. *Cryobiology*, 80,12–17. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.003>

- Fahy, G. M., Levy, D. I., & Ali, S. E. (1987). Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology*, 24(3), 196–213. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(87\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0011-2240(87)90023-X)
- Fernandez-Santos, M. R., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Estesó, M. C., Soler, A. J., Paz, P., ... Garde, J. J. (2007). Sperm Characteristics and DNA Integrity of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal Spermatozoa Frozen in the Presence of Enzymatic and Nonenzymatic Antioxidants. *Journal of Andrology*, 28(2), 294–305. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000935>
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2019a). Efecto de la L-carnitina en un diluyente a base de leche desnatada en la preservación de membranas y de la actividad cinética de espermatozoides de morueco en condiciones de refrigeración. In AIDA, XVIII Jornadas sobre Producción Animal. Suplemento ITEA. pp. 364–366.
- Galarza, D. A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2019b). Two-step accelerating cooling protocol a better motility, membranes integrity and DNA integrity of thawed Ram sperm than three-steps cooling protocols. In 15^o Congreso Internacional de la Asociación Española de Reproducción Animal. Toledo, España. 7-9 Septiembre 2019. Toledo, España.
- Galarza, D. A., Valverde, E. E., Soria, M. E., Argudo, D. E., Bueno, H. P., Méndez, M. S., ... Alberio, R. H. (2016). Effect of storage temperatures of epididymis from slaughter bulls on sperm quality and freezability. *Animal Reproduction*, 14(1), 302. Retrieved from <http://cba.org.br/portal/publicacoes/ar/2017/arjm2017.html>
- Gil, J., Januskauskas, A., Haard, Mc., Haard, M., Johanisson, A., Soderquist, L., & Rodriguez-Martinez, H. (2000). Functional Sperm Parameters and Fertility of Bull Semen Extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reproduction in Domestic Animals*, 35(2), 69–77. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2000.00197.x>
- Hess, R. A. (2002). The Efferent Ductules: Structure and Functions. In *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*. Boston, MA: Springer US. pp. 49–80 https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0679-9_4
- Holt, W. V., & Penfold, L. M. (2014). Animal andrology : theories and applications. In *Animal*

Andrology: Theories and Applications. pp. 78–81. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=hv6dAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA76&dq=Size+and+form+and+pockets+ice+in+extracellular+during+slow+freezing+of+stallion+sperm+as+determined+by+fourier+transform+infrared+spectroscopy&ots=DB3GA6vqhp&sig=wP54qKtz74HLu5sOb4g>

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessolet, S., & Nawroth, F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), 191–200. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61710-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61710-5)

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Rahimi, G., Schöndorf, T., Mallmann, P., ... Nawroth, F. (2004). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction*, 19(4), 932–939. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh194>

Ishibashi, K., Tanaka, Y., & Morishita, Y. (2014). The role of mammalian superaquaporins inside the cell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(5), 1507–1512. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.10.039>

Katkov, I. I., & Bolu. (2012). Kinetic Vitrification of Spermatozoa of Vertebrates: What Can We Learn from Nature? In I. Katkov (Ed.), *Current frontiers in cryobiology*. Rijeka, Croatia: InTech. pp. 1–19

Laforenza, U., Pellavio, G., Marchetti, A., Omes, C., Todaro, F., Gastaldi, G., ... Gastaldi, G. (2017). Aquaporin-Mediated Water and Hydrogen Peroxide Transport Is Involved in Normal Human Spermatozoa Functioning. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 66. <https://doi.org/10.3390/ijms18010066>

López-Saucedo, J., Paramio, M. T., Fierro, R., Izquierdo, D., Catalá, M. G., Coloma, M. A., ... Santiago-Moreno, J. (2014). Sperm characteristics and heterologous in vitro fertilisation capacity of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal sperm, frozen in the presence of the enzymatic antioxidant catalase. *Cryobiology*, 68(3), 389–394. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2014.03.009>

Luyet, B. J., & Hodapp, E. L. (1938). Revival of Frog's Spermatozoa Vitrified in Liquid Air.

Experimental Biology and Medicine, 39(3), 433–434. <https://doi.org/10.3181/00379727-39-10229P>

Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., & Ménard, M. (2002). Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. *Biology of Reproduction*, 67(4), 1250–1258. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1250>

Martínez-Fresneda, L., Bóveda, P., Velázquez, R., Castaño, C., Tesfaye, D., Schellander, K., ... Santiago-Moreno, J. (2017). Mouflon (*Ovis musimon*) sperm cryosurvival is better at the end of the rutting season coinciding with low plasma testosterone concentrations. (Bath, Ed.). UK. Retrieved from <https://www.aete.eu/previous-meetings/>

Martínez-Fresneda, L., Estes, M. C., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Velázquez, R., López-Sebastián, A., ... Santiago-Moreno, J. (2018). The percentage of egg yolk in the freezing media affects mouflon (*Ovis musimon*) epididymal sperm cryosurvival. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(3), 1–4. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018163-13268>

Meryman, H. T. (1971). Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*, 8(5), 489–500. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(71\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0011-2240(71)90040-X)

Mohri, H., & Masaki, J. (1967). Glycerokinase and its possible role in glycerol metabolism of cull spermatozoa. *Reproduction*, 14, 179–194. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0140179>

O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., ... Santiago-Moreno, J. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, 129, 160–167. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.02.024>

Pastor-Soler, N., Isnard-Bagnis, C., Herak-Kramberger, C., Sabolic, I., Van Hoek, A., Brown, D., & Breton, S. (2002). Expression of Aquaporin 9 in the Adult Rat Epididymal Epithelium Is Modulated by Androgens. *Biology of Reproduction*, 66, 1716–1722. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1716>

Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification

and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164(4172), 666.
<https://doi.org/10.1038/164666a0>

Pradiee, J., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Lopez-Sebastián, A., Guerra, R., & Santiago-Moreno, J. (2017). Conventional slow freezing cryopreserves mouflon spermatozoa better than vitrification. *Andrologia*, 49(3), e12629.
<https://doi.org/10.1111/and.12629>

Pradiee, J., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2014). Cryopreservation of epididymal sperm from ibex (*Capra pyrenaica*) using short equilibration time with glycerol. *Theriogenology*, 82(3), 525–528.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.05.012>

Pradiee, J., Estes, M. C., Lopez-Sebastián, A., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Carrizosa, J. A., ... Santiago-Moreno, J. (2015). Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, 84(9), 1513–1522.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.07.036>

Pradiee, J., Sánchez-Calabuig, M. J., Castaño, C., O'Brien, E., Estes, M. C., Beltrán-Breña, P., ... Rizo, D. (2018). Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology*, 108, 314–320.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.11.021>

Prieto-Martínez, N., Vilagran, I., Morató, R., Rodríguez-Gil, J. E., Yeste, M., & Bonet, S. (2016). Aquaporins 7 and 11 in boar spermatozoa: detection, localisation and relationship with sperm quality. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(6), 663–772. <https://doi.org/10.1071/RD14237>

Purdy, P. H. (2006). A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63(3), 215–225. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2005.02.015>

Santiago-Moreno, J., Bernal, B., Pérez-Cerezales, S., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M. C., ... Blesbois, E. (2019). Seminal plasma amino acid profile in different breeds of chicken: Role of seminal plasma on sperm cryoresistance. *PLoS ONE*, 14(1), e0209910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209910>

- Santiago-Moreno, J, Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M. ., López-Sebastián, A., Guerra, R., ... Hildebrandt, T. . (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology*, 79(2), 383–391. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2012.10.011>
- Santiago-Moreno, J, Toledano-Díaz, A., Pulido-Pastor, A., Dorado, J., Gómez-Brunet, A., & López-Sebastián, A. (2006). Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 66(5), 1219–1226. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.03.031>
- Santiago-Moreno, Julián, Toledano-Díaz, A., Dorado, J., Pulido-Pastor, A., Coloma, M. A., & López-Sebastián, A. (2007). Recovery and Cryopreservation of Spanish Ibex Epididymal Spermatozoa. *Archives of Andrology*, 53(6), 309–316. <https://doi.org/10.1080/01485010701730674>
- Vicente-Carrillo, A., Ekwall, H., Álvarez-Rodríguez, M., & Rodríguez-Martínez, H. (2016). Membrane Stress During Thawing Elicits Redistribution of Aquaporin 7 But Not of Aquaporin 9 in Boar Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 665–679. <https://doi.org/10.1111/rda.12728>
- Wang, F., Feng, X., Li, Y., Yang, H., & MA, T. (2006). Aquaporins as potential drug targets1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27(4), 395–401. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00318.x>
- Watson, P., & Fuller, B. (2001). Principles of cryopreservation of gametes and embryos. In 'Cryobanking the Genetic Resource: Wildlife Conservation for the Future?' Watson, P.F., & Holt, W.V. Eds. Taylor & Francis, London and New York. pp. 23–46.
- Yeung, C.-H. (2010). Aquaporins in spermatozoa and testicular germ cells: identification and potential role. *Asian Journal of Andrology*, 12(4), 490–499. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.40>
- Yeung, C.-H., Callies, C., Rojek, A., Nielsen, S., & Cooper, T. G. (2009). Aquaporin Isoforms Involved in Physiological Volume Regulation of Murine Spermatozoa1. *Biology of Reproduction*, 80(2), 350–357. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071928>

Yotov, S. (2015). Effect of TFC-based extenders with soybean lecithin and / or low concentration of glycerol on the quality of goat chilled-stored semen. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(3), 752–761