

## Efecto de la criopreservación del semen de verraco sobre la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide

### Effect of boar semen cryopreservation on sperm plasma membrane functionality

Francisco Sevilla<sup>1,2</sup>, Ignacio Araya-Zúñiga<sup>2,3</sup>, Kenneth Matamoros<sup>2</sup>, Manuel Barrientos-Morales<sup>4</sup>, Ruth Ccalta<sup>5</sup>, Anthony Valverde<sup>2\*</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la funcionalidad de la membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de verraco en muestras con diferentes porcentajes de gametos viables. Se utilizaron 15 eyaculados en cuatro tratamientos con 100, 75, 50 y 25% de espermatozoides viables. Previo a la criopreservación los espermatozoides se incubaron durante 24 h. Cada tratamiento se diluyó en TRIS-Y (Tris con yema de huevo) y los espermatozoides se almacenaron a 5 °C. Luego, se utilizó TRIS-Y-G-E (Tris con yema de huevo-glicerol-Equex) para la dilución y se envasaron en pajillas de 0.5 mL. Se congelaron en forma manual en nitrógeno líquido en dos etapas de temperatura. La descongelación de las pajillas se hizo a 37 °C

<sup>1</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Alajuela, Costa Rica

<sup>2</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos, Alajuela, Costa Rica

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica, Área Académica del DOCINADE, Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad, Alajuela, Costa Rica

<sup>4</sup> Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Maestría en Ciencia Animal, Biología de la Reproducción, Veracruz, México

<sup>5</sup> Instituto Nacional de Innovación Agraria, Lima, Perú

\* Autor para correspondencia: Anthony Valverde; [anvalverde@tec.ac.cr](mailto:anvalverde@tec.ac.cr)

Recibido: 8 de octubre de 2024

Aceptado para publicación: 18 de mayo de 2025

Publicado: 30 de junio de 2025

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

durante 20 s. La funcionalidad espermática fue evaluada pos-descongelación (30 y 150 min), utilizando [Merocianina 540 (M540) y Yo-Pro-1] en muestras incubadas en un medio capacitado (37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>). La peroxidación lipídica fue medida mediante espectrofotometría e indirectamente a partir de la concentración de malonildialdehído (MDA) y la producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (ROS) en muestras incubadas durante 30 min. Las concentraciones de MDA aumentaron conforme disminuyó el porcentaje de espermatozoides viables. Se observó una correlación negativa entre MDA y la movilidad total (MT), la movilidad progresiva (MP), y la integridad de la membrana plasmática y acrosomal. Hubo un efecto del tratamiento de gametos viables y del tiempo pos-descongelación sobre la producción de ROS y la desestabilización de la membrana plasmática. El porcentaje de gametos viables del semen antes de la criopreservación condicionó la calidad espermática de las muestras criopreservadas.

**Palabras clave:** ciencia animal, reproducción, calidad del esperma, ganadería

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of plasma membrane functionality on cryopreserved boar sperm in samples with different percentages of viable gametes. Fifteen ejaculates were used in four treatments with 100, 75, 50, and 25% viable sperm. Prior to cryopreservation, sperm were incubated for 24 h. Each treatment was diluted in TRIS-Y (Tris with egg yolk), and sperm were stored at 5 °C. TRIS-Y-G-E (Tris with egg yolk-glycerol-Equex) was then used for dilution, and sperm were packaged in 0.5 mL straws. Freezing was performed manually in liquid nitrogen in two temperature stages. The straws were thawed at 37 °C for 20 s. Sperm functionality was assessed post-thawing (30 and 150 min) using [Merocyanine 540 (M540) and Yo-Pro-1] in samples incubated in capacitated medium (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>). Lipid peroxidation was measured spectrophotometrically and indirectly from malonyldialdehyde (MDA) concentrations and intracellular reactive oxygen species (ROS) production in samples incubated for 30 min. MDA concentrations increased as the percentage of viable sperm decreased. A negative correlation was observed between MDA and total motility (TM), progressive motility (PM), and plasma and acrosomal membrane integrity. There was an effect of viable gamete treatment and post-thawing time on ROS production and plasma membrane destabilization. The percentage of viable gametes in the semen before cryopreservation determined the sperm quality of the cryopreserved samples.

**Keywords:** animal science, reproduction, sperm quality, animal husbandry

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han realizado diversas investigaciones para evaluar los efectos que produce la criopreservación en los espermatozoides con el fin de proponer prácticas para reducir o minimizar los impactos en la función celular (Yeste, 2016; Ozimic *et al.*, 2023). El choque por frío, el estrés

osmótico y la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación y los procesos pos-descongelación inducen severas alteraciones en la estructura de las células espermáticas, favoreciendo la muerte celular (Khan *et al.*, 2021; Hai *et al.*, 2024). Estos daños provocan una disminución de los espermatozoides viables (Surai y Fisinin, 2015). Uno de los efectos más nocivos se produce sobre la membrana espermática,

donde su composición, estabilidad y distribución de los lípidos sufre alteraciones (Khan *et al.*, 2021; Ozimic *et al.*, 2023). Estos efectos son muy similares a los cambios que ocurren durante la capacitación del espermatozoide (Keller y Kerns, 2023).

El proceso de criopreservación *per se* produce una afectación física y química en la membrana espermática, reduciendo la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Kopeika *et al.*, 2015). La disminución de la temperatura se ha asociado con la generación de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) (Chatterjee y Gagnon, 2001), lo cual produce una alteración grave de la funcionalidad espermática debido a la peroxidación de los lípidos (Alahmar, 2019).

El daño oxidativo que sufren los espermatozoides ha sido estudiado ampliamente en el humano (Aitken y Krausz, 2001). Por otro lado, los espermatozoides de porcino presentan sensibilidad al daño peroxidativo debido a su contenido relativamente alto de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana plasmática (Cerolini *et al.*, 2000) y a la baja capacidad relativa antioxidante del plasma seminal (Brzezińska-Elebdzińska *et al.*, 1995). Se ha demostrado que muestras espermáticas con mayor viabilidad celular tras la congelación y descongelación se caracterizan por presentar una alta actividad enzimática (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa selenio-dependiente) antes de la criopreservación (Qamar *et al.*, 2023).

Las sustancias ROS se producen bajo condiciones aeróbicas en las células vivas, incluyendo los espermatozoides, donde favorecen los procesos de capacitación y reacción acrosómica (Du Plessis *et al.*, 2015). Se reporta una reducción en la movilidad y fertilidad de los espermatozoides criopreservados, ante un posible exceso o inadecuada formación de ROS (Guthrie y Welch, 2006). Además, un aumento en las ROS puede favorecer la peroxidación lipídica en los esperma-

tozoides aún funcionales, provocando el fenómeno de «envejecimiento prematuro» (Brouwers *et al.*, 2005; Zorov *et al.*, 2014; Davies *et al.*, 2017). Por esto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la funcionalidad de la membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de verraco en muestras con diferentes porcentajes de gametos viables.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio de Estudio y Animales

La investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC) de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica, conforme a las leyes y regulaciones nacionales para la experimentación con animales vivos, garantizando un manejo cuidadoso y evitando cualquier tipo de estrés innecesario. Además, se siguieron las pautas ARRIVE (<https://arriveguidelines.org/>) que garantizaron el acatamiento de los principios éticos y metodológicos en la investigación.

Se utilizaron cinco verracos adultos de las razas Duroc, Pietrain y Large White. Los verracos se alojaron en espacios individuales con temperatura controlada a  $23 \pm 2$  °C. La alimentación consistió en una mezcla comercial para animales reproductores que incluía maíz, mezcla de minerales, harina de soya y sal común para satisfacer sus necesidades nutricionales. El alimento (2.5 kg/día) se proporcionaba dos veces al día y se tenía acceso *ad libitum* al agua.

### Recolección del Semen

El semen fue colectado dos veces por semana, obteniéndose un total de 15 eyaculados. La extracción se hizo mediante el método manual, eliminando las fracciones pre y pos-espermáticas del eyaculado. La fracción rica en espermatozoides se colocó en un recipiente precalentado (37 °C), el cual se lle-

vó a baño maría a 37 °C. Se utilizó el medio de dilución Bestville Thawing Solution (BTS) (Minitube, GmbH, Alemania) para lograr una dilución 1:2 (vol/vol).

El semen se depositó en tubos Falcon de 50 mL, previamente calentados y cubiertos para la protección de los eyaculados de la luz directa, y fue llevado a 17 °C. Los eyaculados se trasladaron al laboratorio en cajas de poliestirén, con revisión constante de la temperatura interior (Miniature Data Logger, Gemini Data Loggers Ltd., UK). Las mezclas espermáticas se realizaron en un periodo no mayor a seis horas después de su recolección.

### Reactivos y Medios

Se utilizó una balanza de precisión (Gram Precision Serie ST Mod. ST-120, A.R.W.T, Barcelona, España) para el pesaje de los reactivos utilizados. Para la dilución se utilizó agua purificada y bidestilada Milli-Q® (Advantage A10® System, Millipore™, Concord Road, Billerica, MA, EE. UU.). Las diluciones fueron homogenizadas utilizando un agitador magnético (Mod. 234 P Agimatic, Selecta, Barcelona, España). Tras la preparación de cada medio, se verificó el pH (Mod. GLP 21, Crison, Barcelona, España) y osmolaridad (Mod. 5520, Vapro®, Vapor Pressure Osmometer, Wescor Inc., EE. UU.).

Se usó BTS como medio de dilución para una adecuada estimación de la calidad espermática pos-descongelación y para la estimación del malonaldehído (MDA). El medio BTS se preparó en una cámara de flujo laminar (Micro-R, España). Al finalizar se midió la osmolaridad y el pH para verificar que estuvieran dentro del rango especificado. Luego, se envasó en tubos Falcon de 15 y 50 mL según el volumen preparado, y se almacenó a 5 °C hasta su uso. Para la estimación de la viabilidad espermática se utilizó una solución de tampón fosfato salino (PBS), que sirvió para diluir los fluorocromos, tanto en muestras frescas como descongeladas.

### Diluyentes para la Criopreservación

Se utilizaron dos medios de dilución. El primer medio TRIS-Y (TRIS con yema de huevo) se añadió a 17 °C posterior al proceso de centrifugación de semen y la eliminación del sobrenadante. La yema de huevo se obtuvo de huevos frescos y bajo estrictas técnicas asépticas. Los procesos contemplaron la limpieza de la superficie de los huevos con etanol y la separación de la yema de la clara utilizando papel de filtro. Las yemas de huevo separadas se colocaron en una probeta estéril y se almacenaron a 4 °C. Con el medio TRIS-Y preparado, se centrifugó a 4300  $\times$  g durante 30 min a 5 °C. Luego de la centrifugación se descartó la primera y la tercera fracción, utilizando solo la fracción intermedia, que fue conservada en tubos Falcon estériles de 15 mL y a -20 °C.

El segundo diluyente fue TRIS-Y-G (TRIS-Yema de huevo-Glicerol), que se utilizó posterior al segundo descenso de temperatura (muestras a 5 °C). El medio fue preparado a partir del medio TRIS-Y, y se le añadió glicerol como crioprotector más un detergente (Equex STM, Nova Chemical Sales Inc., EE. UU.).

### Conservación Espermática

Se reevaluó la fracción rica en espermatozoides y se centrifugó a 2400  $\times$  g durante 3 min (17 °C) (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0R, Alemania). Se eliminó el sobrenadante y los espermatozoides sedimentados fueron diluidos nuevamente con el diluyente TRIS-Y para alcanzar una concentración de  $1.5 \times 10^9$  spz/mL y se almacenaron a 5 °C durante 150 min. Luego, se agregó el diluyente TRIS-Y-G para obtener una concentración final de  $1 \times 10^9$  spz/mL. Se utilizaron pajillas de 0.5 mL (Minitüb; Tiefenbach, Alemania) y se sellaron a 5 °C (Ultraseal 21™, Minitüb; Tiefenbach, Alemania).

La criopreservación se realizó en dos fases. Las pajillas en la primera fase fueron expuestas a 4 cm de los vapores de nitróge-

no líquido durante 20 min. Para esto, se utilizó una caja de poliestireno expandido que contenía una bandeja de acero inoxidable y un soporte de poliestireno que sostenía una bandeja perforada de aluminio para asegurar exposición uniforme a los vapores de nitrógeno líquido. En la segunda fase, las pajillas se sumergieron en nitrógeno líquido. Luego, las pajillas fueron almacenadas en tanques de nitrógeno líquido. Los procesos de descongelación se realizaron entre 7 y 15 días después, descongelándose tres pajillas por tratamiento.

### Fluorocromos

La tinción de Merocianina 540 (M540) y Yo-Pro-1 [(Quinolinium, 4-0(((3-methyl-2(3H)-benzoxazolyli- dene) methyl)-1-03-(trimethylammonio) propyl)-, di-iodide, YP1], fueron utilizadas para la estimación de la estabilidad de la membrana plasmática realizando una modificación del protocolo de Harrison *et al.* (1996). La solución madre de M540 (M24571, Invitrogen, Molecular Probes, EE. UU.) se preparó al disolver 100 mg en 1755  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), y se almacenó en alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. La solución de trabajo se preparó añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de PBS a una alícuota, obteniendo una concentración final de 1 mM de M540. La tinción de YP1 (Y3603, Invitrogen, Molecular Probes, EE. UU.) se realizó con una dilución 1:40 (vol/vol) de la solución madre en DMSO (5  $\mu\text{L}$  YP1 + 200  $\mu\text{L}$  de PBS) para lograr una concentración de 25  $\mu\text{M}$ . La solución final se conservó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante una semana.

La producción intracelular de sustancias oxígeno reactivas (ROS), se determinó utilizando el protocolo descrito por Guthrie y Welch (2006) empleando el fluorocromo  $\text{CMH}_2\text{DCFDA}$ [5-(y-6)-clormetil-2', 7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína, acetyl ester]. Las esterasas rompen la molécula del fluorocromo  $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$  (C6827, Invitrogen, Molecular Probes, EE. UU.) lo que deja libre la 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína ( $\text{H}_2\text{DCF}$ ), que se oxidada por

las sustancias ROS, y produce diclorofluoresceína (DCF) que emite además fluorescencia a 530 nm en respuesta a 488 nm de excitación (Carter *et al.*, 1994). La solución stock de  $\text{CM-H}_2\text{DCFDA}$  (50 mg) de 1 mM se preparó en DMSO (86.53  $\mu\text{L}$ ) y se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La producción de ROS en los espermatozoides se estimuló usando un peróxido lipídico análogo, denominado tert-butilhidroperóxido (TBHP, en 70 %  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_{10}\text{O}_2$ , B2633, Sigma Aldrich, EE. UU.). Por medio de la solución madre de 7.3 M de TBHP, se preparó la solución stock de 1 M con agua bidestilada y purificada. La solución inductora final fue de 1 mM (1  $\mu\text{L}$  de TBHP 1 M en 1000  $\mu\text{L}$  de muestra diluida).

### Soluciones del Kit MDA-586

Se preparó el medio de trabajo de MDA (20  $\mu\text{M}$ ) a partir de la dilución de 3  $\mu\text{L}$  del estándar de MDA en 1.5 mL de  $\text{ddH}_2\text{O}$  (dilución 1/500) y se refrigeró a  $0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para la solución de trabajo R1 se mezcló un volumen de metanol con tres volúmenes del reactivo R1 y refrigeró a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La solución muestra control se preparó al mezclar un volumen de metanol con tres volúmenes de acetonitrilo. Para la solución de  $\text{Fe}^{2+}$ /Ascorbato, se disolvió 11 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 40 mg de ascorbato de sodio en 10 mL de  $\text{ddH}_2\text{O}$  (4 mM  $\text{Fe}^{2+}$  y 20 mM ascorbato). Todas las soluciones se sellaron con papel parafilm adecuada y seguido de su preparación para evitar la evaporación. Se conservaron a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Malonilaldehído (MDA)

Para determinar el MDA en semen de porcino se realizó una modificación del protocolo original en la que se utilizó placas de 96 pocillos planos con capacidad de 200  $\mu\text{L}$  por pocillo y se utilizó una campana de flujo de gases (Micro-R, España). A partir de las muestras espermáticas descongeladas y diluidas 1:2 (vol/vol) con BTS con una concentración de  $500 \times 10^6$  spz se tomaron 60  $\mu\text{L}$  ( $30 \times 10^6$  spz) y se depositaron en un

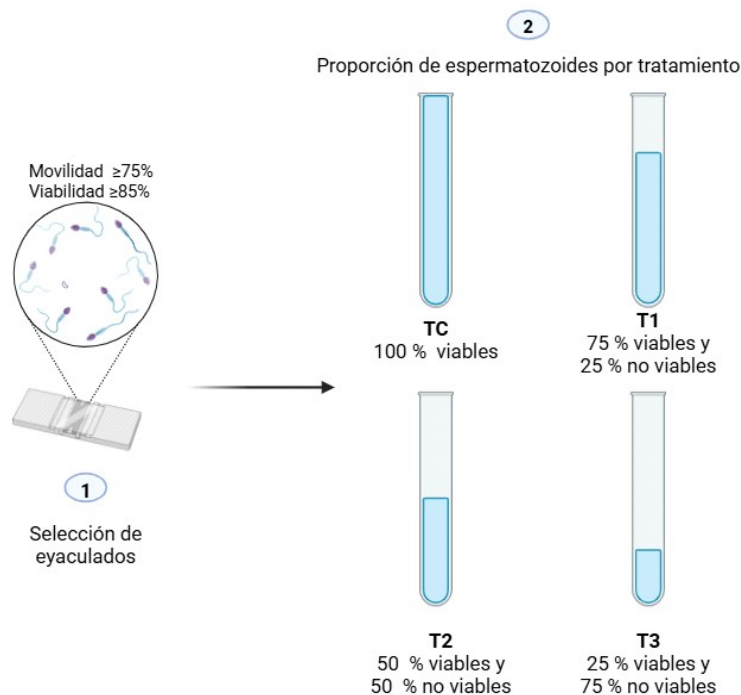


Figura 1. Distribución de los tratamientos de acuerdo con el porcentaje de espermatozoides viables y no viables de semen de verraco

tubo eppendorf que contenía 500  $\mu\text{L}$  de BTS a 37 °C. Posteriormente se llevó hasta un volumen de 1000  $\mu\text{L}$  con BTS. Por cada pajilla, se prepararon cuatro muestras para medir la concentración de MDA y dos como controles. A cada muestra se le agregó 100  $\mu\text{L}$  de semen. Se añadió primero el semen, luego se cerraron los controles y por último se agregó la solución  $\text{FE}^{2+}$ /ascorbato a razón de 1/100 (1  $\mu\text{L}$  de la solución en 100  $\mu\text{L}$  de muestra). Se incubaron las muestras en una gradilla de color oscuro durante 30 min a 37 °C en la oscuridad y se determinó la concentración de MDA a partir de un espectrofotómetro (Bio-Tek, Power Wave, EE. UU.) y con al menos tres mediciones de absorbancia a 590 nm.

### Diseño Experimental

Se seleccionaron eyaculados con una concentración de al menos  $200 \times 10^6$  spz/mL. El criterio de viabilidad para procesar los eyaculados fue del 85% o superior. Por lo tan-

to, la muestra de 100% de espermatozoides viables correspondía a un mínimo del 85% de espermatozoides viables (Figura 1)

### Muestras con Espermatozoides No Viables e Incubación 24 h

Se tomó 50 mL de la fracción rica en espermatozoides que se encontraba a 17 °C y se sumergió en nitrógeno líquido (-196 °C) durante un periodo de 9 min para causar un daño letal sobre las células espermáticas. Seguido, la muestra se colocó en un baño maría a 37 °C durante 3 min y fueron transferidas a un recipiente que contenía agua a 80 °C, que permitió descongelar la muestra por completo. La pérdida de la viabilidad y la funcionalidad de los espermatozoides se verificó utilizando fluorescencia en muestras diluidas en un medio capacitante e incubadas a 37 °C y 5 % de  $\text{CO}_2$ . Al confirmar la pérdida de viabilidad de la muestra, se procedió a realizar las proporciones descritas y se incubaron durante 24 horas antes de proceder con la criopreservación.

### Calidad Espermática Pos-descongelación

Se realizó el proceso de descongelación por medio de un baño termostático (Huber Polystat cc1) a 37 °C por 20 s. Se descongeló para cada análisis una pajilla por tratamiento, que luego se mezcló y diluyó en el medio BTS (1:2, vol/vol; 37 °C). Las muestras fueron incubadas en una estufa a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta los 150 min. La calidad espermática (movilidad e integridad de la membrana) se analizó a los 30 y 150 min de la descongelación.

### Análisis Estadístico

Se evaluó la homocedasticidad mediante la prueba de Levene para el conjunto de datos de todas las variables espermáticas. Para comprobar la distribución normal se utilizó papel probabilístico normal. El efecto de las diferentes fuentes de variación que afectaron las características de calidad seminal durante el proceso de congelación-descongelación se evaluó a través de análisis de variancia (ANOVA), utilizando modelos lineales fijos del tipo,  $y = X\beta + \varepsilon$ ; donde:  $y$  fue el vector de observaciones,  $\beta$  fue el vector de parámetros en el modelo estadístico utilizado para el análisis,  $X$  correspondió a la matriz de incidencia y  $\varepsilon$  fue el vector de errores experimentales. Se aplicó un ANOVA para evaluar las diferencias estadísticas entre los tratamientos para todas las variables cinemáticas.

Las diferencias entre verracos y entre tratamientos (porcentajes de espermatozoides funcionales y no funcionales) sobre las variables de calidad espermática durante el proceso de congelación-descongelación, la concentración de MDA, y la generación de ROS, así como en la desestabilización de la membrana plasmática sometida a un tratamiento de capacitación en las muestras seminales congeladas-descongeladas fueron evaluadas mediante modelos mixtos, en el que el efecto verraco y el tratamiento, así como la interacción verraco x tratamiento fueron los factores fijos.

La dosis de semen descongelado (tres por tratamiento, excepto en el caso de las sustancias ROS y la desestabilización de la membrana plasmática donde se descongelaron dos pajillas) se consideró como replicado en todos los análisis y constituyó el factor aleatorio. Se utilizó un nivel de significancia con un  $p < 0.05$ . Las comparaciones entre tratamientos se realizaron utilizando la prueba de Tukey-Kramer. Los resultados se presentan como media  $\pm$  error estándar de la media. Todos los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico IBM SPSS v. 23.0 para Windows (SPSS Inc., EE. UU.).

## RESULTADOS

La concentración de MDA en las muestras seminales congeladas-descongeladas que tenían el 100% de espermatozoides viables de cada verraco fue influenciada por la variable «verraco» ( $p < 0.05$ ) (Figura 2). Se puede observar que los verracos uno y cuatro tuvieron las concentraciones más bajas.

Se presentó un efecto del verraco y del tratamiento de funcionalidad espermática ( $p < 0.05$ ), sobre las concentraciones de MDA de acuerdo con el porcentaje de espermatozoides viables (Figura 3). No hubo un efecto de interacción verraco x tratamiento ( $p > 0.05$ ). Las concentraciones más bajas ( $10.5 \pm 0.8$  mmol/30x10<sup>6</sup> espermatozoides) se presentaron en el tratamiento control (100% viables). La concentración de MDA aumentó progresivamente en las muestras del 75 y 50%, alcanzando los valores más altos en las muestras del 25% ( $15.4 \pm 0,8$  mmol/30x10<sup>6</sup> espermatozoides).

La concentración de MDA tuvo una correlación negativa ( $p < 0.05$ ) con el porcentaje de MT (movilidad total), MP (movilidad progresiva) y la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, independiente del porcentaje de espermatozoides viables antes de la congelación (Cuadro 1).

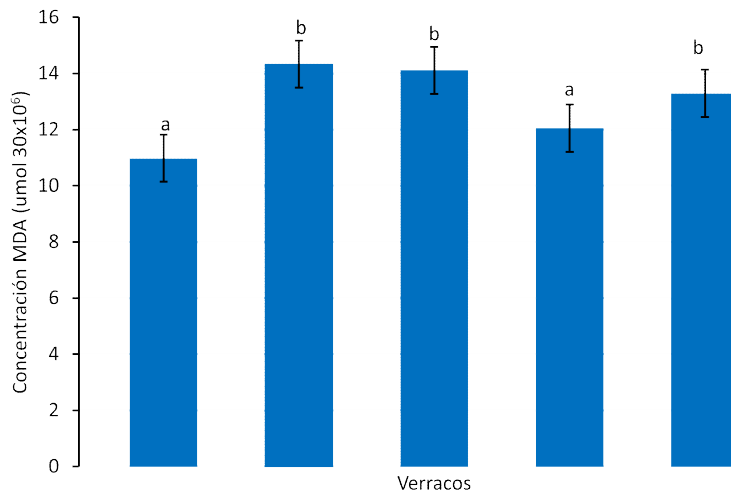


Figura 2. Concentración de Malonildialdehído ± error estándar de la media (MDA mmol / 30 x 10<sup>6</sup> espermatozoides) según verraco en las muestras congeladas y descongeladas control (100% espermatozoides viables). <sup>a,b</sup> Letras diferentes indican diferencias significativas entre verracos (p<0.05)

Las variables en estudio tuvieron influencia (p<0.05) sobre la producción intracelular de ROS, expresada como intensidad de fluorescencia inducida en las muestras congeladas-descongeladas e incubadas durante 30 y 150 min pos-descongelación (Figura 4). Se comprobó el efecto de interacción verraco x tratamiento y tratamiento x tiempo (p<0.001), pero no hubo interacción verraco x tiempo (p>0.05). La intensidad de fluorescencia

inducida aumentó conforme el porcentaje de espermatozoides viables disminuyó. En todos los verracos y en los dos tiempos de incubación, la intensidad menor se observó en las muestras del tratamiento control (100% de espermatozoides viables) y la intensidad mayor en las muestras del tratamiento 3 (25% de espermatozoides viables).

Cuadro 1. Coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de malonildialdehído (MDA)<sup>1</sup> y los parámetros de calidad seminal a la descongelación de semen de verraco

Parámetro (%)	Tiempo pos-descongelación (min)	
	30	150
Movilidad total	-0.5	-0.5
Movilidad progresiva	-0.5	-0.5
Integridad de membrana <sup>2</sup>	-0.4	-0.4

<sup>1</sup> (μmol/30x10<sup>6</sup> espermatozoides)

<sup>2</sup> Membrana plasmática y del acrosoma (p<0.05)

El grado de desestabilización de la membrana plasmática fue afectado (p<0.05) por las variables independientes del estudio, el cual fue expresado como porcentajes normalizados de espermatozoides positivos a M540 (Figura 5). La interacción verraco x tratamiento y verraco x tiempo fueron significativas (p<0.05). En los verracos 1, 3 y 5, el porcentaje de espermatozoides positivos a M540 a los 30 min pos-descongelación aumentó (p<0.05) a medida que disminuyó el porcentaje de espermatozoides viables en la muestra espermática. Este mismo patrón se evidenció a los 150 min pos-descongelación en el verraco 3. En contraste, en los verracos 2 y 4 para ambos tiempos de incubación y en el verraco 1 a los 150 min pos-descongelación no se presentaron diferencias (p>0.05) entre tratamientos.

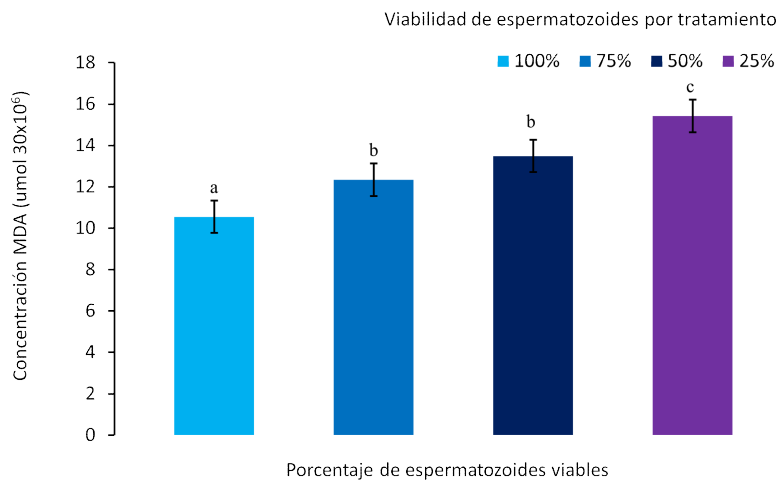


Figura 3. Concentración de Malonildialdehído  $\pm$  error estándar de la media (MDA mmol / 30 x 10<sup>6</sup> espermatozoides) en las muestras congeladas y descongeladas con diferentes porcentajes de espermatozoides viables previo a la congelación. <sup>a,b,c</sup> Letras distintas indican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0.01$ )

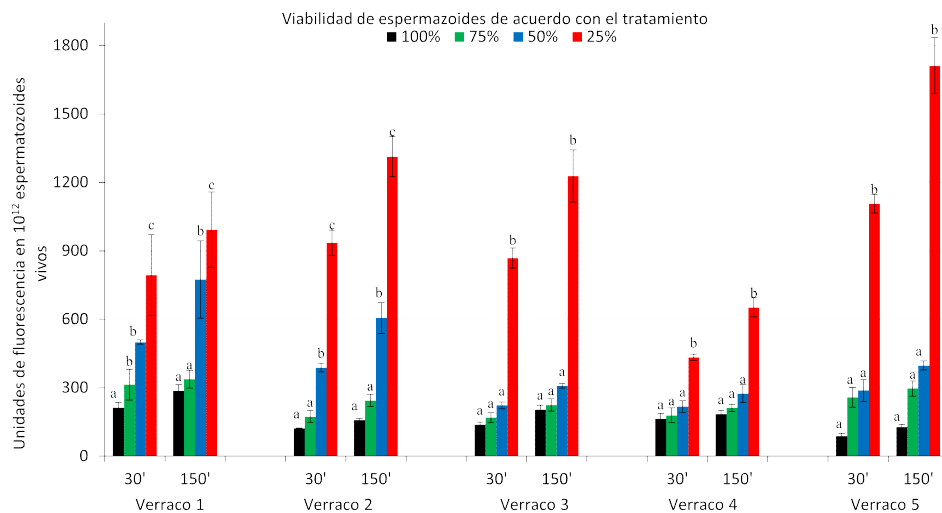


Figura 4. Producción intracelular de sustancias ROS expresada en unidades de fluorescencia en 10<sup>12</sup> espermatozoides vivos  $\pm$  error estándar de la media en muestras congeladas-descongeladas con diferentes porcentajes de espermatozoides viables previo a la congelación, representadas según verraco y tiempo de incubación post descongelación. <sup>a,b,c</sup> Letras distintas indican diferencias significativas para cada verraco y el tiempo de incubación ( $p < 0.05$ )

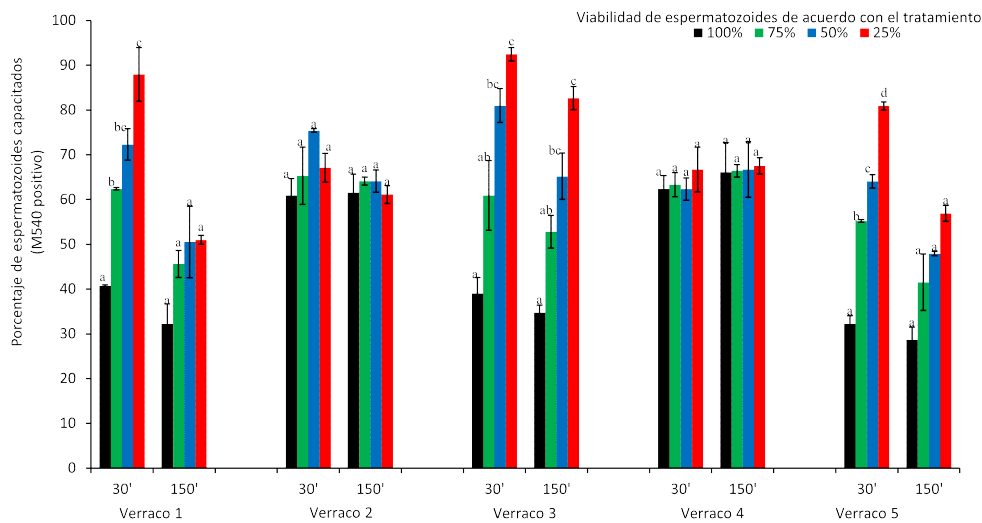


Figura 5. Grado de capacitación espermática expresada como porcentaje de espermatozoides positivos a Merocianina540 (M540)  $\pm$  error estándar de la media en muestras espermáticas congeladas-descongeladas de semen de verraco y sometidas a un proceso de capacitación espermática procedentes de muestras seminales con diferentes porcentajes de espermatozoides viables previo a la congelación. Los datos se representan según verraco y tiempo de incubación pos-descongelación. <sup>a,b,c</sup> Letras distintas indican diferencias significativas para cada verraco y el tiempo de incubación ( $p < 0.05$ )

## DISCUSIÓN

En la criopreservación del semen porcino se utiliza solamente la fracción rica en espermatozoides (Pavaneli *et al.*, 2019). El plasma seminal es reducido, y aunque no es precisamente rico en compuestos con capacidad antioxidante (Silvestre *et al.*, 2021), puede disminuir el impacto negativo de la criopreservación. El proceso de centrifugación predispone a dos circunstancias favorecedoras de la generación de sustancias ROS (Tamburrino *et al.*, 2023), la primera deriva de su propia función, es decir, la de concentrar las células espermáticas mediante el proceso físico *per se* y la segunda, el efecto traumático que supone todo proceso de centrifugación para las células espermáticas. Se ha demostrado que la centrifugación inducía una alta producción de MDA, utilizado como indicador indirecto del proceso de peroxidación lipídica, y que las sustancias

ROS más frecuentes eran los radicales alcóxilos (RO) e hidroperóxilos ( $\text{HO}_2$ ) (Gosalvez *et al.*, 2017; Gualtieri *et al.*, 2021; Endale *et al.*, 2023).

En el presente trabajo no se determinó el efecto de la centrifugación sobre la formación de sustancias ROS extracelulares, pero se sometieron todas las muestras a centrifugación previa antes de ser criopreservadas. Los resultados indican que conforme disminuyó el porcentaje de espermatozoides viables, se predispone a una mayor producción de MDA, lo que indica de forma indirecta, que existe una mayor peroxidación lipídica y como tal, los espermatozoides no viables ejercen un impacto negativo sobre los viables en la criopreservación. Estos hallazgos son similares a los obtenidos en semen bovino, donde se demostró que el centrifugado exacerbaba la peroxidación lipídica y que el plasma seminal era capaz de controlar esta peroxidación (Castiglioni *et al.*, 2021).

El efecto de la centrifugación y la eliminación del plasma seminal, al extraer las sustancias antioxidantes incrementa la sensibilidad del semen de porcino, dado que se pierde el entorno favorecedor del plasma seminal. Se puede generar una mayor producción extracelular de sustancias ROS al eliminar proteínas totales y enzimas intracelulares como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa (Feng *et al.*, 2020; Silvestre *et al.*, 2021). Otros trabajos han descrito una mayor resistencia al enfriamiento rápido en espermatozoides incubados 24 h en su propio plasma seminal (Torres *et al.*, 2019), sin embargo, esto favorece una mayor generación extracelular de sustancias ROS en el eyaculado, tal y como se ha observado en los resultados del presente trabajo al incrementarse proporcionalmente la cantidad de espermatozoides no viables.

Se ha establecido que la criopreservación induce la peroxidación lipídica en espermatozoides de mamíferos (Khan *et al.*, 2021), y se ha demostrado que el proceso de congelación y descongelación predispone a una mayor peroxidación de los lípidos de la membrana espermática de espermatozoides humanos (Alvarez y Storey, 1992), y los procesos de congelación y descongelación causan un aumento de la peroxidación lipídica en espermatozoides bovinos (Chatterjee *et al.*, 2001). Los peróxidos lipídicos derivados de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados son muy inestables y se descomponen para formar una serie compleja de compuestos. Estos incluyen compuestos carbonilo, de los cuales el más abundante es el MDA. Por lo tanto, la medición del MDA se utiliza ampliamente como un indicador de la peroxidación de lípidos en una variedad de tipos celulares, incluyendo espermatozoides (Sikka, 1996).

Las membranas de los espermatozoides de verraco presentan una particular composición lipídica ya que sus cadenas laterales son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Buhr *et al.*, 1994; Waterhouse *et al.*, 2006). Esta característica predispone a los esper-

matozoides de verraco al fenómeno de la peroxidación lipídica (White, 1993). La peroxidación lipídica conllevaba una metabolización de los ácidos grasos poliinsaturados y, consecuentemente, la pérdida de movilidad espermática (Brzezińska-Ćelebodzińska *et al.*, 1995). Los resultados del presente trabajo indican una mayor peroxidación lipídica durante la descongelación conforme disminuye el porcentaje de espermatozoides viables, probablemente debido a una menor integridad de las membranas plasmática y acrosomal.

En espermatozoides criopreservados de verraco, cuando la integridad de la membrana era baja tenían menores cantidades de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas que aquellos espermatozoides criopreservados procedentes de verracos con una integridad de membrana alta (Cerolini *et al.*, 2001). Esta pérdida de integridad membranal también se ha asociado con una disminución drástica en la movilidad espermática (Valverde *et al.*, 2021). Además, la concentración de MDA en las muestras espermáticas descongeladas está correlacionada de forma negativa, independientemente del porcentaje de espermatozoides viables antes de la congelación, con los porcentajes de movilidad total, progresiva y con la integridad de membranas plasmática y acrosomal. Estos resultados coinciden con estudios en la especie humana donde se observa una correlación negativa entre la movilidad y la peroxidación lipídica durante la criopreservación de espermatozoides (Alvarez y Storey, 1992).

La composición de los lípidos de las membranas espermáticas en la especie porcina junto con el proceso de criopreservación, provocan la generación intracelular de sustancias ROS y el fenómeno de peroxidación lipídica, también asociado a ROS extracelulares (Sanocka y Kurpisz, 2004). Estos fenómenos causan la pérdida de integridad de las membranas plasmática y acrosomal como se ha demostrado en el presente trabajo, así como baja fertilidad y

prolificidad de los espermatozoides criopreservados de porcino (Khan *et al.*, 2021; Ozimic *et al.*, 2023). En espermatozoides humanos, se ha descrito que la peroxidación lipídica favorece la fragmentación el ADN del núcleo del espermatozoide, lo que, aunque no impide la fecundación, imposibilita el desarrollar embriones viables (Gualtieri *et al.*, 2021). En este sentido, se sugiere realizar estudios en dónde se evalúe cómo la presencia de espermatozoides no viables afecta la capacidad de fecundación de los espermatozoides viables en un eyaculado.

Diversos trabajos han demostrado que la criopreservación induce la formación de ROS, tanto intracelular como extracelular, y que esto es una de las causas de la disminución en la calidad espermática a la descongelación (Juanpanich *et al.*, 2022; Hai *et al.*, 2024). La peroxidación induce alteraciones estructurales, pérdida rápida e irreversible de la movilidad, cambios en el metabolismo y un aumento en la tasa de liberación de componentes intracelulares (Ayala *et al.*, 2014). Esta pérdida de movilidad se exagera conforme menos espermatozoides viables estén presentes en el momento de la criopreservación como se confirma en el presente estudio, que muestra una correlación negativa significativa entre la concentración de MDA y la movilidad total.

El proceso de criopreservación, que induce un aumento en la producción de sustancias ROS intra y extracelulares, está ligado a una mayor presencia de espermatozoides alterados y no viables (Zorov *et al.*, 2014; Endale *et al.*, 2023). Esto indica que aunque se obtengan mejores porcentajes de integridad de membrana plasmática y acrosomal en los espermatozoides congelados-descongelados en el porcino, lo que implicaría partir de eyaculados con alto porcentaje de espermatozoides viables, el proceso de criopreservación *per se* provoca un incremento significativo de espermatozoides no viables que les impide fecundar (Bang *et al.* 2022; Delgado-Bermúdez, 2024). Se ha demostrado que los espermatozoides alterados y muertos

son una fuente importante de generación de sustancias ROS (Hai *et al.*, 2024). Estos resultados, si bien son en espermatozoides humanos, coinciden con los obtenidos en este trabajo y demuestran, que los espermatozoides no viables favorecen la generación de sustancias ROS extracelulares. En los protocolos de criopreservación esper-mática concurren una serie de etapas comunes que favorecen la producción de las sustancias ROS intracelulares; como la ausencia de plasma seminal, la centrifugación del semen previa a la dilución y congelación, y los procesos de criopreservación donde se presentan un mayor número de espermatozoides alterados, con morfoanomalías o con pérdida de la integridad de sus membranas plasmática y acrosomal (Zorov *et al.*, 2014).

Con base en los resultados del presente trabajo, la mayor generación intracelular de sustancias ROS podría explicarse por el hecho que aunque haya un menor número de células espermáticas viables, la actividad mitocondrial metabólica normal que se produce en estas células genera compuestos oxidativos y en presencia de cantidades reducidas de enzimas antioxidantes a nivel intracelular y de compuestos antioxidantes extracelulares, se predispone a una mayor generación intracelular de sustancias ROS porque estos no se pueden metabolizar rápidamente y debido a su naturaleza química inestable, buscan el equilibrio de su último orbital electrónico, reaccionan con compuestos cediendo o aceptando electrones, y de esta manera se desestabiliza la membrana al iniciarse reacciones en cadena con el fin de buscar la estabilidad química que resulta, en un detrimento de la función de la célula.

Otro factor importante es que, debido a la presencia de espermatozoides no viables, con pérdida de integridad de sus membranas, al haber salida de fluidos celulares al medio extracelular, se favorece la formación de sustancias ROS extracelulares que podrían estar implicadas y ser copartícipes del daño en las membranas de los espermatozoides viables, dado que estas también son afectadas

por las sustancias ROS intracelulares. Sin embargo, esta hipótesis está sujeta a ser confirmada en posteriores estudios de investigación. Se requiere de la presencia de ROS para que se puedan desarrollar actividades como la capacitación (Tienthai *et al.*, 2004; Keller y Kerns, 2023), la hiperactivación (Schmidt y Kamp, 2004), y la reacción acrosómica en condiciones fisiológicas normales (Tareq *et al.*, 2010). No obstante, una alta concentración de sustancias ROS intracelulares podría resultar perjudicial para la calidad espermática. En el presente trabajo, se demostró que una mayor generación de sustancias ROS intracelulares coincide con una presencia mayor de espermatozoides no viables en la muestra.

Está demostrado que un alto porcentaje de los espermatozoides congelados-descongelados sufren una desestabilización prematura de las membranas equivalente a la que se observa durante el proceso de capacitación y reacción acrosómica (Khan *et al.*, 2021). Esta desestabilización puede condicionar la fertilidad, y estar relacionada con modificaciones a nivel de la composición y dinámica de la bicapa fosfolipídica (Buhr *et al.*, 1994). En las condiciones experimentales de este trabajo, la alteración del orden lipídico se detectó con Merocianina 540. Las muestras con mayor porcentaje de espermatozoides viables presentaron un mayor porcentaje de células viables y con bajo desorden lipídico. En contraste, las muestras con menor proporción de espermatozoides viables presentaron un mayor grado de desestabilización de la membrana plasmática, resultando un mayor grado de espermatozoides con signos tempranos de capacitación como era de esperar y de acuerdo con los resultados obtenidos de generación intracelular de sustancias ROS. Esta alta predisposición a la capacitación de los espermatozoides viables haría que estos pierdan su capacidad fecundante antes de llegar al sitio de la fecundación. Sin embargo, esto debe ser estudiado con mayor precisión, debido a las variaciones individuales que podrían presentarse sobre los procesos de capacitación y

funcionalidad de los espermatozoides, tal y como se demostró en este estudio.

## CONCLUSIONES

- Hubo un efecto del verraco y del porcentaje de viabilidad espermática sobre la concentración de malonildialdehído en muestras seminales congeladas-descongeladas con 100% de espermatozoides viables. La concentración de MDA presentó una correlación negativa significativa con la movilidad total, progresiva y la integridad de la membrana plasmática y acrosomal.
- La producción intracelular de especies reactivas del oxígeno (ROS) fue influenciada por el verraco, el tratamiento de viabilidad espermática y el tiempo post-descongelación. La intensidad de fluorescencia inducida se incrementó al reducirse el porcentaje de espermatozoides viables, patrón que fue consistente en todos los verracos y tiempos de incubación evaluados.
- El grado de desestabilización de la membrana plasmática se vio afectado por el tratamiento porcentual de espermatozoides viables y el tiempo post-descongelación. Se debe considerar el porcentaje de viabilidad espermática del semen antes de la criopreservación porque condicionan la calidad espermática post descongelación, y la estabilidad de la membrana plasmática.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica por financiar el proyecto de investigación VIE-2151083, «Optimización de la conservación y búsqueda de parámetros de la fertilidad en espermatozoides de animales de interés productivo». Los dos primeros autores agradecen a la Dirección de Posgrados del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

El trabajo formó parte del proyecto de investigación VIE-2151083, «*Optimización de la conservación y búsqueda de parámetros de la fertilidad en espermatozoides de animales de interés productivo*» inscrito en la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

#### LITERATURA CITADA

1. **Aitken RJ, Krausz C. 2001.** Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122: 497-506. doi: 10.1530/REP.0.1220497
2. **Alahmar A. 2019.** Role of oxidative stress in male infertility: an updated review. *J Hum Reprod Sci* 12: 4-18. doi: 10.4103/JHRS.JHRS\_150\_18
3. **Alvarez JG, Storey BT. 1992.** Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13: 232-241. doi: 10.1002/J.1939-4640.1992.TB00306.X
4. **Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014.** Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 360438. doi: 10.1155/2014/360438
5. **Bang S, Tanga BM, Fang X, Seong G, Saadeldin IM, Qamar AY, Lee S, et al. 2022.** Cryopreservation of pig semen using a quercetin-supplemented freezing extender. *Life* 12: 1155. doi: 10.3390/LIFE12081155
6. **Brouwers JF, Silva PFN, Gadella BM. 2005.** New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*. 63: 458-469. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.09.046
7. **Brzezińska-Ćelebodzińska E, Ćelebodziński AB, Pietras B, Wieczorek G. 1995.** Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biol Trace Elem Res* 47: 69-74. doi: 10.1007/BF02790102
8. **Buhr MM, Curtis EF, Somnapan Kakuda N. 1994.** Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31: 224-238. doi: 10.1006/CRYO.1994.1028
9. **Carter WO, Naryanan PK, Robinson JP. 1994.** Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells. *J Leukoc Biol* 55: 253-258. doi: 10.1002/JLB.55.2.253
10. **Castiglioni VC, Perez Siqueira AF, de Cássia Bicudo L, de Almeida TG, dos Santos Hamilton TR, de Castro LS, Mendes CM, et al. 2021.** Lipid peroxidation in bull semen influences sperm traits and oxidative potential of Percoll®-selected sperm. *Zygote* 29: 476-483. doi: 10.1017/S0967199421-000228
11. **Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T. 2001.** Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* 121: 395-401. doi: 10.1530/REP.0.1210395
12. **Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. 2000.** Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 58: 99-111. doi: 10.1016/S0378-4320(99)00035-4
13. **Chatterjee S, Gagnon C. 2001.** Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 59: 451-458. doi: 10.1002/MRD.1052
14. **Chatterjee S, De Lamirande E, Gagnon C. 2001.** Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev* 60: 498-506. doi: 10.1002/MRD.1115
15. **Davies JMS, Cillard J, Friguet B, Cadenas E, Cadet J, Cayce R, Fishmann A, et al. 2017.** The oxygen paradox, the French paradox, and age-related diseases. *GeroScience* 39: 499-550. doi: 10.1007/S11357-017-0002-Y

16. **Delgado-Bermúdez A. 2024.** Insights into crucial molecules and protein channels involved in pig sperm cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 269: 107547. doi: 10.1016/J.ANIREPROS-CI.2024.107547
17. **Endale HT, Tesfaye W, Mengstie TA. 2023.** ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol* 11: 1226044. doi: 10.3389/FCELL.2023.1226044/BIBTEX
18. **Feng C, Zhu Z, Bai W, Li R, Zheng Y, Tian X, Wu D, et al. 2020.** Proline protects boar sperm against oxidative stress through proline dehydrogenase-mediated metabolism and the amine structure of pyrrolidine. *Animals* 10: 1549. doi:10.3390/ANI10091549
19. **Gosalvez J, Tvrda E, Agarwal A. 2017.** Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future. *J Assist Reprod Gen* 34: 697-707. doi: 10.1007/S10815-017-0912-8
20. **Gualtieri R, Kalthur G, Barbato V, Longobardi S, Di Rella F, Adiga SK, Talevi R. 2021.** Sperm oxidative stress during *in vitro* manipulation and its effects on sperm function and embryo development. *Antioxidants* 10: 1025. doi: 10.3390/ANTIOX10071025
21. **Guthrie HD, Welch GR. 2006.** Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 84: 2089-2100. doi: 10.2527/JAS.2005-766
22. **Hai E, Li B, Zhang Jian, Zhang Jiixin. 2024.** Sperm freezing damage: the role of regulated cell death. *Cell Death Discov* 10: 239. doi: 10.1038/s41420-024-02013-3
23. **Harrison RAP, Ashworth PJC, Miller NGA. 1996.** Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 45: 378-391. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795-(199611)-45:3<378::AID-MRD16>3.0.CO;2-V
24. **Juanpanich T, Suttirojattana T, Parnpai R, Vutyavanich T. 2022.** The relationship between reactive oxygen species, DNA fragmentation, and sperm parameters in human sperm using simplified sucrose vitrification with or without triple antioxidant supplementation. *Clin Exp Reprod Med* 49: 117-126. doi: 10.5653/CERM.2021.05120
25. **Keller A, Kerns K. 2023.** Sperm capacitation as a predictor of boar fertility. *Mol Reprod Dev* 90: 594-600. doi: 10.1002/MRD.23690
26. **Khan IM, Cao Z, Liu H, Khan A, Rahman SU, Khan MZ, Sathana-wongs A, Zhang Y. 2021.** Impact of cryopreservation on spermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. *Front Vet Sci* 8: 609180. doi: 10.3389/FVETS.2021.609180
27. **Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. 2015.** The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update* 21: 209-227. doi: 10.1093/HUMUPD/DMU063
28. **Ozimic S, Ban-Franzez H, Stimpfel M. 2023.** Sperm cryopreservation today: approaches, efficiency, and pitfalls. *Curr Issues Mol Biol* 45: 4716. doi:10.3390/CIMB45060300
29. **Pavaneli APP, Passarelli MS, de Freitas FV, Ravagnani GM, Torres MA, Martins SMMK, Yeste M, et al. 2019.** Removal of seminal plasma prior to liquid storage of boar spermatozoa: a practice that can improve their fertilizing ability. *Theriogenology* 125: 79-86. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.-2018.10.020
30. **Du Plessis SS, Agarwal A, Halabi J, Tvrda E. 2015.** Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Gen* 32: 509-520. doi: 10.1007/S10815-014-0425-7

31. **Qamar AY, Naveed MI, Raza S, Fang X, Roy PK, Bang S, Tanga BM, et al. 2023.** Role of antioxidants in fertility preservation of sperm - a narrative review. *Anim Biosci* 36: 385-403. doi:10.5713/AB.22.0325
32. **Sanocka D, Kurpisz M. 2004.** Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrin* 2: 12. doi: 10.1186/1477-7827-2-12
33. **Schmidt H, Kamp G. 2004.** Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128: 171-179. doi: 10.1530/rep.1.00153
34. **Sikka SC. 1996.** Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* 1: e78-e86. doi: 10.2741/A146
35. **Silvestre MA, Yániz JL, Peña FJ, Santolaria P, Castelló-Ruiz M. 2021.** Role of antioxidants in cooled liquid storage of mammal spermatozoa. *Antioxidants* 10: 1096. doi: 10.3390/ANTIOX10071096
36. **Surai PF, Fisinin VI. 2015.** Selenium in pig nutrition and reproduction: boars and semen quality - a review. *Asian Austral J Anim* 28: 730-736. doi: 10.5713/AJAS.14.0593
37. **Tamburrino L, Traini G, Marcellini A, Vignozzi L, Baldi E, Marchiani S. 2023.** Cryopreservation of human spermatozoa: functional, molecular and clinical aspects. *Int J Mol Sci* 24: 4656. doi: 10.3390/IJMS24054656
38. **Tareq KMA, Akter QS, Takagi Y, Hamano KI, Sawada T, Tsujii H. 2010.** Effect of selenium and vitamin E on acrosome reaction in porcine spermatozoa. *Reprod Med Biol* 9: 73-81. doi: 10.1007/s12522-009-0041-x
39. **Tienthai P, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. 2004.** Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci* 80: 131-146. doi: 10.1016/S0378-4320(03)00134-9
40. **Torres MA, Monteiro MS, Passarelli MS, Papa FO, Dell'Aqua JA, Alvarenga MA, Martins SMMK, de Andrade AFC. 2019.** The ideal holding time for boar semen is 24/ h at 17/ °C prior to short-cryopreservation protocols. *Cryobiology* 86: 58-64. doi: 10.1016/J.CRYOBIOL.2018.12.004
41. **Valverde A, Barquero V, Carvajal V. 2021.** Applied biotechnology to the study of the boar semen motility. *Agron Mesoam* 32: 662-680. doi:10.15517/AM.V32I2.40628
42. **Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR. 2006.** Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 131: 887-894. doi:10.1530/REP.1.01049
43. **White IG. 1993.** Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fert Develop* 5: 639-658. doi: 10.1071/RD9930639
44. **Yeste M. 2016.** Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85: 47-64. doi: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.-2015.09.047
45. **Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. 2014.** Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 94: 909-950. doi: 10.1152/physrev.00026.2013