



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Impacto del tiempo de almacenamiento sobre el metabolismo de espermatozoides bovinos criopreservados

Luis Andrés Rueda Amador

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal
Medellín, Colombia

2023

Impacto del tiempo de almacenamiento sobre el metabolismo de espermatozoides bovinos criopreservados

Luis Andrés Rueda Amador

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Director (a):
Ph.D., Giovanni Restrepo Betancur

Línea de Investigación: Reproducción Animal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal
Medellín, Colombia
2023

Primeramente a Dios todo poderoso por darme la vida y hacer cumplir mis más anhelados sueños, a mi familia y amigos que con ardua labor han sido mi sustento en cada etapa de mi vida motivándome cada día a ser mejor persona y mejor profesional.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Luis Andrés Rueda Amador

Fecha 11/08/2022

Agradecimientos

A mi familia y amigos, por el apoyo tanto financiero como moral durante toda mi vida ayudándome a vencer los obstáculos y así poder cumplir mis metas.

A mi asesor de tesis Ph. D. Giovanni Restrepo Betancur por el conocimiento impartido durante 2 años en el área de la reproducción animal.

A la Universidad Nacional de Colombia y al Laboratorio de Reproducción Animal, por el apoyo durante el tiempo transcurrido en la maestría.

A Kelly Zapata, por haberme ayudado en el procesamiento de las muestras en el laboratorio y lectura de los resultados.

Resumen

Impacto del tiempo de almacenamiento sobre el metabolismo de espermatozoides bovinos criopreservados

Se ha observado que el almacenamiento del semen en condiciones de criopreservación afecta la viabilidad de los espermatozoides. Sin embargo, no está claro como el tiempo de almacenamiento afecta la calidad seminal. Algunas investigaciones han mostrado cambios en la cinética espermática a mayor tiempo de almacenamiento, mientras otros estudios no han mostrado efecto por periodos largos de almacenamiento. Sin embargo, las investigaciones diseñadas para identificar una disminución en el rendimiento del semen crioconservado en función del tiempo de almacenamiento son escasas. Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue evaluar aspectos relacionados con el metabolismo y la integridad de espermatozoides bovinos criopreservados con diferentes tiempos de almacenamiento en nitrógeno líquido. Se evaluó la movilidad y cinética espermática con un sistema CASA-IVOS, la funcionalidad de la membrana mediante la prueba Host, la morfología con la tinción con eosina-nigrosina, la estabilidad de membrana con Merocianina 540, la actividad mitocondrial con DiOC6, el contenido de calcio intracelular con el indicador fluorescente Fura-2AM y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) con DHR123 mediante citometría de flujo (FORTESSA LSR, BD Biosciences, EE. UU.). Para el análisis estadístico los datos se agruparon en tres periodos de almacenamiento (0-10, 11-20 y 21-30 años), se realizó el ajuste de modelos mixtos y se compararon las medias mediante la prueba de Tukey. Mediante un análisis de regresión se determinó la relación entre las variables dependientes y el tiempo de almacenamiento. No se encontraron diferencias en motilidad total y cinética espermática en relación con los grupos por tiempo de almacenamiento ($p > 0.05$), mientras que, la motilidad progresiva fue mayor en el grupo de 11-20 años, en comparación con 0-10 años ($p < 0.05$). Sin embargo, el análisis de regresión mostró la reducción de diferentes parámetros de movilidad y

cinética, que fueron altamente dependientes del toro de proveniencia de las muestras seminales ($p>0.05$). Para HOST se observó que el grupo de 21-30 años tuvo la menor funcionalidad de la membrana ($p<0.05$). Se observó que la morfología de la cabeza fue diferente entre los grupos de 0-10 y 11-20 años ($p<0.05$), mientras que se observó mayor proporción de anomalías totales y de la pieza media para el grupo de 21-30 años ($p>0.05$). Se encontró mayor proporción de espermatozoides M540-bajo en los grupos de 11-20 y 21-30 años de almacenamiento, siendo este último grupo, el que tuvo mayor proporción de células con alto flujo de calcio (Fura-Alto). La población de células con alto potencial de membrana mitocondrial (DiOC-Alto) fue mayor para el grupo de 11-20 años en relación con el grupo de 0-10 años ($p>0.05$). En conclusión, largos periodos de almacenamiento del semen bovino criopreservado pueden afectar negativamente la movilidad, cinética, integridad funcional de la membrana y morfología de los espermatozoides, sin embargo, lo anterior está condicionado por el efecto diferencial del individuo (toro). La estabilidad de la membrana plasmática, el flujo de calcio intracelular y la actividad mitocondrial de los espermatozoides sufren modificaciones atribuibles al efecto de largos periodos de almacenamiento en nitrógeno líquido.

Palabras clave: Evaluación, metabolismo, espermatozoides, criopreservación, tiempo de almacenamiento, bovino.

Abstract

Impact of storage time on the metabolism of cryopreserved bovine spermatozoa

Storage of semen under cryopreservation conditions has been observed to affect sperm viability. However, it is not clear how storage time affects semen quality. Some research has shown changes in sperm kinetics with longer storage times, while other studies have shown no effect for long storage periods; however, research designed to identify a decrease in the performance of cryopreserved semen as a function of storage time are scarce. Therefore, the objective of the research was to evaluate aspects related to the metabolism and integrity of cryopreserved bovine spermatozoa with different storage times in liquid nitrogen. Sperm motility and kinetics were evaluated with a CASA-IVOS system, membrane functionality using the Host test, morphology with eosin-nigrosin staining, membrane stability with Merocyanine 540, content of intracellular calcium with the fluorescent indicator Fura-2AM, mitochondrial activity with DiOC6 and the production of reactive oxygen species (ROS) with DHR123, were assessed by flow cytometry. For the statistical analysis, the data were grouped into three storage periods (0-10, 11-20 and 21-30 years), the adjustment of mixed models was carried out and the means were compared using the Tukey test. Using a regression analysis, the relationship between the dependent variables and storage time was determined. No differences were found in total motility and sperm kinetics in relation to the groups by storage time ($p>0.05$), while progressive motility was higher in the group of 11-20 years, compared to 0-10 years ($p<0.05$). However, the regression analysis showed the reduction of different motility and kinetic parameters, which were highly dependent on the bull from which the semen samples were obtained ($p>0.05$). For HOST, it was observed that the group of 21-30 years had the lowest membrane functionality ($p<0.05$). It was observed that head morphology was different between the groups of 0-10 and 11-20 years ($p<0.05$), and a higher proportion of total and midpiece abnormalities was observed for the 21-30 years group ($p>0.05$). A higher proportion of M540-low spermatozoa was found in the groups of 11-20 and 21-30 years of storage, being

this last group, the one that had the highest proportion of cells with high calcium flow (Fura-High). The population of cells with high mitochondrial membrane potential (DiOC-High) was higher for the group of 11-20 years, compared to the group of 0-10 years ($p>0.05$). In conclusion, long periods of storage of cryopreserved bovine semen can negatively affect the motility, kinetics, functional integrity of the membrane and morphology of the sperm, however, this is conditioned by the differential effect of the individual (sire). The stability of the plasmatic membrane, the intracellular calcium flux and the mitochondrial activity of the sperm suffer modifications attributable to the effect of long periods of storage in liquid nitrogen.

Keywords: Evaluation, metabolism, spermatozoa, cryopreservation, storage time, bovine.

Contenido

Resumen.....	IX
Lista de figuras	XV
Lista de tablas.....	XVI
Lista de Abreviaturas	XVII
Introducción	1
Hipótesis.....	5
Objetivos	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
1 Marco Teórico	8
1.1 Criopreservación de semen bovino.....	8
1.2 Tasa de congelación / descongelación.....	11
1.3 Metabolismo espermático.....	12
1.4 Efectos de la congelación sobre los espermatozoides	15
1.4.1 Efecto de la congelación sobre el metabolismo espermático.....	15
1.4.2 Alteración en la motilidad	17
1.4.3 Daños en la membrana plasmática	20
1.4.4 Daños en la membrana mitocondrial	24
1.4.5 Estrés osmótico	27
1.4.6 Daños en la morfología espermática	28
1.4.7 Estrés oxidativo.....	29
2 Materiales y métodos	33
2.1 Materiales y equipos:	33
2.2 Diseño experimental:	34
2.3 Procedimientos.....	34
2.4 Análisis estadístico	36
3 Resultados y discusión.....	39
3.1. Motilidad y cinética espermática.....	39
3.2. Integridad funcional de la membrana plasmática	44
3.3. Morfología espermática	46
3.4 Estabilidad de la membrana plasmática.....	49
3.5 Concentración de calcio intracelular.....	51
3.6 Actividad mitocondrial	54

3.7 Viabilidad espermática.....	57
3.8 Producción de especies reactivas de oxígeno.....	59
3.9 Análisis de regresión por parámetro según el tiempo de almacenamiento y regresión por parámetro y toro según el tiempo de almacenamiento	62
4 Conclusiones y recomendaciones	67
Conclusiones	67
Recomendaciones.....	68
5 Bibliografía.....	69

Lista de figuras

Figura 3-1. Porcentaje de espermatozoides bovinos de raza Holstein con motilidad total y progresiva según su tiempo de almacenamiento.....	40
Figura 3-2. Porcentaje de células espermáticas de toro que reaccionaron a la prueba HOST según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.	45
Figura 3-3. Porcentaje de células espermáticas de toro con alteración morfológica según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.	48
Figura 3-4. Porcentaje de células espermáticas de toro con alteración en la estabilidad de la membrana plasmática según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.	50
Figura 3-5. Ejemplo de la distribución de la población de células teñidas con Merocianina 540 en citometría de flujo.....	51
Figura 3-6. Concentración intracelular de calcio en células espermáticas de toro según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.	53
Figura 3-7. Ejemplo de la distribución de la población de células que reaccionan con Fura-2 AM en citometría de flujo.....	54
Figura 3-8. Porcentaje de células espermáticas de toro con actividad mitocondrial según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.	55
Figura 3-9. Ejemplo de la distribución de actividad mitocondrial en citometría de flujo.	56
Figura 3-10. Porcentaje de células espermáticas de toro vivas o muerta según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.	58
Figura 3-11. Ejemplo de la distribución de células vivas y muertas en citometría de flujo.	59
Figura 3-12. Producción de especies reactivas de oxígeno en células espermáticas de toro según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.	60
Figura 3-13. Ejemplo de la distribución de células según la producción de EROs en citometría de flujo.....	61

Lista de tablas

Tabla 3-1. Parámetros de cinética espermática de pajuelas de eyaculados bovinos Holstein con diferentes tiempos de almacenamiento en nitrógeno líquido.....	433
Tabla 3-2. Análisis de regresión por parámetro según el tiempo de almacenamiento	61
Tabla 3-3. Análisis de regresión por parámetro y toro según el tiempo de almacenamiento	63

Lista de Abreviaturas

Abreviatura Término

<i>AC</i>	Adenil ciclasa
<i>ADP</i>	Difosfato de adenosina
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ALH</i>	Movimiento lateral de la cabeza
<i>AMP_c</i>	Adenosín monofosfato cíclico
<i>ATP</i>	Adenosín trifosfato
<i>BCF</i>	Frecuencia de batido de la cola
<i>BSP</i>	Proteínas del plasma seminal
<i>Ca²⁺</i>	Calcio
<i>CASA</i>	Análisis de espermatozoides asistido por computadora
<i>CO₂</i>	Dióxido de carbono
<i>CPAs</i>	Crioprotectores
<i>EROs</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>ETC</i>	Cadena transportadora de electrones
<i>Host</i>	Prueba hipoosmótica
<i>H₂O₂</i>	Peróxido de hidrógeno
<i>IP</i>	Yoduro de propidio
<i>OH</i>	Radical hidroxilo
<i>OXP_{HOS}</i>	Fosforilación oxidativa
<i>O₂</i>	Anión superóxido
<i>PTP</i>	Fosforilación de proteína tirosina
<i>QTL</i>	Locus de rasgo cualitativo
$\Delta\psi$	Potencial de membrana mitocondrial
<i>VAP</i>	Velocidad media
<i>VCL</i>	Velocidad curvilínea
<i>VSL</i>	Velocidad lineal

Introducción

Es generalmente conocido que el proceso de crioconservación provoca una disminución de aproximadamente un 50% en la viabilidad de los espermatozoides debido a la temperatura y efectos osmóticos (Thomas et al., 1998). La congelación durante la criopreservación se realiza principalmente para detener los procesos metabólicos de los espermatozoides, lo que permite el almacenamiento indefinido para un futuro uso o para el transporte a lugares distantes (Curry, 2000). Se sabe que estos procesos dañan los espermatozoides debido a cambios durante el proceso biotecnológico, el estrés tóxico y osmótico representado por la exposición a crioprotectores y la formación y disolución de cristales de hielo extracelulares (Januskauskas et al., 2003; Watson, 2000). La extensión del daño de la membrana puede variar desde cambios en la organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica de la bicapa de la membrana hasta la ruptura total de la membrana (Thomas et al., 1998; Watson, 1981). Se ha demostrado que los espermatozoides de diferentes especies pueden mantener su capacidad fertilizante incluso después de décadas de almacenamiento en nitrógeno líquido (Feldschuh et al., 2005), aunque existe una disminución de la viabilidad del espermatozoide que conlleva a una disminución de la capacidad fertilizante (Watson, 2000), cuando el semen se almacena durante largos períodos de tiempo, y esto puede estar asociado con la mortalidad embrionaria (Salisbury, 1967).

Durante la capacitación espermática ocurren dos eventos relevantes; la elevación del calcio intracelular y activación de la adenilciclase que provoca la activación de la proteinquinasa A la cual fosforila un serie de proteínas (Breitbart, 2002). Sin embargo, durante la criopreservación, los espermatozoides no logran moderar adecuadamente los niveles normales de calcio interno. Se cree que las membranas reestructuradas y las asociaciones de proteínas lipídicas distorsionadas favorecen una mayor entrada de iones

de calcio en la criopreservación (Lemma, 2011). Durante este proceso (criopreservación) las proteínas de membrana y la organización de los lípidos cambian drásticamente (Gadella et al., 2008). La crioconservación puede inducir e imitar la desestabilización de los mismos lípidos, lo que explica las diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Albrizio et al., 2015; Gualtieri et al., 2021).

Las modificaciones de las proteínas mitocondriales y glucolíticas durante la crioconservación podrían ser en parte responsables de la movilidad reducida de los espermatozoides congelados y descongelados debido a la falta de producción de ATP (Peris et al., 2020). Además, otra proteína (HSP90) localizada en el flagelo y relacionada con la estructura del esperma y el metabolismo del ATP también disminuye en abundancia durante la criopreservación (Zhang et al., 2015).

La generación de EROs en las células somáticas es el resultado de la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial durante la respiración celular, y se estima que el 2 % del oxígeno consumido se convierte en anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a través de esta ruta (Boveris & Chance, 1973). Este estrés oxidativo del semen de los mamíferos durante el enfriamiento puede causar daño estructural y funcional a los espermatozoides (Baumber et al., 2005) a través de la peroxidación de lípidos, estos efectos nocivos incluyen la pérdida de capacidad para regular las concentraciones de iones intracelulares involucrados en la funcionalidad y viabilidad de los espermatozoides (Wang et al., 1997).

La elevación de la concentración de calcio intracelular durante el proceso de enfriamiento contribuye a iniciar cambios de hiperactivación y desarrollo de eventos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. Como consecuencia de lo anterior, cabe esperar una disminución de la capacidad fertilizante del semen (J. L. Bailey et al., 2000; Watson, 2000). Cada alteración de la fluidez de la membrana espermática durante el proceso de criopreservación puede cambiar la integridad de la membrana espermática (De Leeuw et al., 1993, Yildiz et al., 2015). Los dos factores principales que afectan la fluidez son las concentraciones relativas de fosfolípidos y colesterol, de manera que una mayor concentración de fosfolípidos da como resultado una membrana más fluida (Lemma, 2011). A medida que las membranas se enfrían, los lípidos pasan de un estado fluido normal a un estado cristalino líquido, en el que las cadenas de ácidos grasos se desordenan (Medeiros et al., 2002). La codificación de fosfolípidos (es decir, el colapso de

la distribución transversal asimétrica) se asocia con una mala configuración de proteínas y lípidos; cambios morfológicos en la organización, fluidez, permeabilidad de las membranas espermáticas y disrupción de las interacciones proteína-lípido (Gadella & Harrison, 2002) alterando la actividad fisiológica espermática (Medeiros et al., 2002). La criopreservación también puede afectar la expresión de genes como los genes que codifican las inhibinas α y β , que son candidatos potenciales como marcadores de fertilidad porque ambos están significativamente asociados con la integridad y motilidad de los espermatozoides ((Mishra et al., 2013).

En general, el daño producido por el choque por frío se manifiesta como disminución del metabolismo celular, alteración de la permeabilidad de la membrana, pérdida irreversible de la motilidad y aumento del número de espermatozoides muertos (Lemma, 2011). Los parámetros de calidad del espermatozoides evaluados en laboratorio incluyen la motilidad, además de la evaluación de la integridad de diversas estructuras, como la membrana celular y las mitocondrias (Nazari et al., 2021). En cualquier caso, la presunción de no daño a los espermatozoides durante la criopreservación está condicionada a que el semen se almacene intacto en nitrógeno líquido (Haugan et al., 2007).

No obstante, uno de los aspectos importantes respecto al almacenamiento del semen en condiciones de criopreservación, está en el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la calidad y potencial fertilizante de los espermatozoides posdescongelados; y a pesar de que algunos estudios han abordado este aspecto de forma experimental, aún persisten muchos vacíos de su impacto sobre diferentes aspectos de la función y el metabolismo del espermatozoide. En un estudio de Malik et al., 2015 se utilizaron cuatro toros Holstein-Friesian y evaluaron el semen almacenado durante uno a seis años en nitrógeno líquido; la viabilidad de los espermatozoides descongelados no disminuyó significativamente entre el almacenamiento de 1 a 2 años, mientras que la viabilidad fue significativamente menor a mayor tiempo de almacenamiento a los 3, 4, 5 y 6 años. En un estudio de Akyol et al., 2018, se evaluó semen de toro de la raza Pardo Suizo con 2 y 30 años de almacenamiento en nitrógeno líquido, en los resultados no se observaron diferencias en términos de motilidad total y progresiva, mientras el estrés oxidativo fue mayor en espermatozoides almacenados a largo plazo. Igualmente en un estudio de Ramírez et al., 2016, donde se analizaron cinco grupos de dosis de semen de la raza Holstein con intervalos de 1, 10, 25, 40 y 45 años de almacenamiento a -196°C , el análisis comparativo de la motilidad total no mostró

diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento analizados. Sin embargo, los valores de VAP ($85.8 \pm 1.57\%$ vs $99.03 \pm 4.27\%$) y VCL ($145.41 \pm 3.34\%$ vs $179.71 \pm 8.09\%$) fueron más bajos en espermatozoides congelados a largo plazo. Estudios de Salisbury & Hart (1970), sugirieron que los espermatozoides congelados de bovinos tienen un bajo nivel de fertilidad y promueven un aumento de la mortalidad embrionaria después de 18 meses de almacenamiento a -196°C . Prihantoko et al., 2020, realizaron estudios sobre el efecto del tiempo de almacenamiento sobre motilidad, viabilidad, integridad de la membrana y actividad mitocondrial con 3 años de almacenamiento a -196°C . La motilidad y la viabilidad de los espermatozoides no se vieron afectadas hasta el sexto mes de almacenamiento, mientras que la integridad de la membrana comenzó a disminuir en el tercer mes y la actividad de las mitocondrias disminuyó durante los 9 meses. Por lo tanto, la motilidad, la viabilidad y la integridad de la membrana posteriores a la descongelación de los espermatozoides de toros comenzaron a disminuir a los 6 meses de almacenamiento.

En consecuencia con todo lo anterior y con la intención de profundizar en la evaluación del impacto del tiempo de almacenamiento del semen bovino criopreservado, en aspectos convencionales y otros con escasos reportes como la actividad mitocondrial, la captación celular de Ca^{2+} , la estabilidad de membrana y la producción de especies reactivas de oxígeno, se planteó como objetivo de esta investigación, evaluar aspectos relacionados con el metabolismo y la integridad de espermatozoides bovinos criopreservados con diferentes tiempos de almacenamiento en nitrógeno líquido.

Hipótesis

- Hipótesis alternativa: El almacenamiento a largo plazo de semen bovino en nitrógeno líquido genera alteraciones estructurales y funcionales de los espermatozoides que pueden comprometer su calidad posdescogelación.
- Hipótesis nula: El almacenamiento a largo plazo de semen bovino en nitrógeno líquido NO genera alteraciones estructurales y funcionales de los espermatozoides que pueden comprometer su calidad posdescongelacion.

Objetivos

Objetivo General.

Evaluar aspectos relacionados con el metabolismo y la integridad de espermatozoides bovinos criopreservados con diferentes tiempos de almacenamiento en nitrógeno líquido.

Objetivos Específicos.

Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido de semen bovino sobre la movilidad y cinética espermática.

Determinar el efecto del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido de semen bovino sobre la estabilidad de la membrana plasmática y la actividad mitocondrial de los espermatozoides.

Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido de semen bovino sobre la viabilidad y la producción de especies reactivas de oxígeno.

1 Marco Teórico

1.1 Criopreservación de semen bovino

El objetivo de congelar células espermáticas es la producción de un banco de las mismas, teniendo a disposición un material sin plazo de vencimiento, potencializando la eficiencia de la reproducción animal (Amirat et al., 2004; Haugan et al., 2007), igualmente conserva la fertilidad masculina para técnicas de reproducción asistida u otras evaluaciones (Ezzati et al., 2020). Los espermatozoides son únicos entre las células en su forma y función. El método estándar para evaluar la fertilidad de machos reproductores, aparte de su capacidad para causar una preñez, es el examen del semen (Hafez & Hafez, 2000). Los primeros estudios de criopreservación se realizaban con nieve carbónica, a temperatura de -79°C , el uso 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 del material genético a -196°C (Moreno & Galarza, 2019). Sin embargo los espermatozoides pueden dañarse durante la congelación-descongelación y, como resultado, su calidad, función y capacidad de fertilización pueden verse afectadas (Adamkovicova et al., 2016; Díaz et al., 2019). En general, entre el 40 % y el 50 % de la población de espermatozoides no sobrevive al proceso de criopreservación, incluso cuando se utilizan protocolos de enfriamiento/descongelación "optimizados" (Holt, 2000; Watson, 2000). Para el éxito de la criopreservación, es necesario que los espermatozoides se conserven por largos períodos sin dañar su capacidad de fecundación (Malik et al., 2015).

En la actualidad se ha masificado la utilización de semen congelado para la inseminación artificial del ganado bovino, dado el incremento de la productividad en esta especie por el uso de machos de alta calidad genética; sin embargo, las tasas de concepción al primer servicio son todavía relativamente bajas (Cabrera & Pantoja, 2012). Es importante considerar que en la evaluación de semen congelado se evalúan varios parámetros básicos postdescongelación: la viabilidad, la morfología y el porcentaje de espermatozoides con velocidad curvilínea, rectilínea y media por dosis

inseminante (Catena, 1999), lo cual restringe el alcance y profundidad de la evaluación laboratorial del semen congelado bovino, representando un componente fundamental de los programas de reproducción animal (Crespilho et al., 2009).

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 (Moreno & Galarza, 2019). Además, la criopreservación facilita la distribución del semen a distancia, lo que ha contribuido en gran medida a la expansión de tecnologías reproductivas como la inseminación artificial y la fertilización *in vitro* en todo el mundo (Kumar et al., 2019). En ausencia de agentes crioprotectores y en menor medida con agentes crioprotectores, el choque frío y la inducción de la formación de cristales de hielo pueden conducir a la destrucción de orgánulos en los espermatozoides (Abdelhafez et al., 2009; Curry, 2000).

En respuesta, la comunidad científica ha incrementado sus esfuerzos para comprender las diferentes tensiones que experimentan los espermatozoides de semental durante la congelación y descongelación, de modo que se puedan minimizar los daños derivados de la criopreservación (Peña et al., 2011).

Un factor clave en la criobiología de los espermatozoides es que son células pequeñas con una gran superficie, estas características afectan la viscosidad y la temperatura de transición vítrea del citosol intracelular en los espermatozoides, lo que los hace menos susceptibles a posibles daños (Isachenko et al., 2003; Morris, et al., 2006) sin embargo están sujetos a una serie de alteraciones en su estructura, tales como dilatación y rompimiento a nivel de la membrana, con cambios de permeabilidad en la misma (Stradaioli et al., 2007). Los ácidos grasos, a su vez, están implicados en la organización estructural de las membranas de los espermatozoides, el metabolismo energético y las moléculas de señalización (Wood et al., 2016).

Es conocido que los espermatozoides de los mamíferos son sensibles al proceso de criopreservación, debido a múltiples pasos como la adición del crioprotector, el proceso

de enfriamiento, el almacenamiento en nitrógeno líquido y la descongelación, viéndose reflejado en una disminución de la motilidad individual y viabilidad cuando se evalúa el semen descongelado (Rubio et al., 2009). El principal mecanismo que busca proteger la calidad del semen durante la criopreservación es evitar la formación de EROs para reducir el estrés oxidativo, durante el cual están involucrados fosfolípidos del espermatozoide, principalmente de la membrana interna del acrosoma, de la pieza media (región mitocondrial) y la cola (Stradaoli et al., 2007). Las EROs producen peroxidación lipídica conduciendo a daños en el ADN, roturas de cadenas de cromatina, y también daña la membrana plasmática, lo que explica la función defectuosa de los espermatozoides observada en una alta proporción de pacientes infértiles, lo que da como resultado la apoptosis celular (Raad et al., 2021). En el espermatozoide de ratón, se analizó el papel y la interacción de los metabolitos glucolíticos con la fosforilación de tirosina, mientras que el resultado de esta interacción es la producción de energía, que es vital para la viabilidad y la motilidad del espermatozoide congelado-descongelado (Goodson et al., 2012).

Debido a su composición rica en colesterol y fosfolípidos e interacciones como cambios de temperatura y osmolaridad del medio, la membrana plasmática de los espermatozoides es el principal sitio donde ocurren las alteraciones cuando el semen sufre cambios en el proceso de criopreservación (Hernandez et al., 2017), en la cual, los daños causados son lesiones pequeñas, tanto en la membrana como en el citosol al final del proceso de criopreservación-calentamiento alterando su capacidad de fecundar (Nicolas et al., 2012). Por ende, existe una disminución de la viabilidad del espermatozoide que conlleva a una disminución de la capacidad fertilizante (Watson, 2000).

Los daños celulares originados durante el proceso de congelación-descongelación están amortiguados mediante la incorporación al diluyente de agentes crioprotectores (CPAs) (Meryman, 197; Bergeron & Manjunath, 2006). Estos agentes se pueden dividir en no permeables (azúcares, proteínas y lipoproteínas, que se adicionan mediante el uso de productos naturales como la yema de huevo y la leche descremada) (Bergeron & Manjunath, 2006). La rafinosa, sacarosa, albúmina, polietilenglicol y la

polivinilpirrolidona se agrupan como no permeables porque no pueden atravesar el plasma membrana. (Di Santo et al., 2012), La yema de huevo está encuadrado en el grupo de los crioprotectores no penetrantes. Los crioprotectores permeables son el dimetilsulfoxido, dimetilacetamida, dimetilformamida, etilenglicol o glicerol (Moreno & Galarza, 2019) , entre ellos, los más utilizados son el glicerol (Bergeron & Manjunath, 2006).

Con respecto al factor de tiempo de almacenamiento, los estudios de la motilidad de los espermatozoides han indicado un descenso en la viabilidad de los espermatozoides después del almacenamiento (Buch et al., 1956; Dunn & Hafs, 1953). Ashwood-Smith & Friedmann, 1979 establecieron que el límite superior para el almacenamiento en nitrógeno líquido se ha estimado en al menos 200 años. Sin embargo, el éxito de la criopreservación de esperma también depende de factores como el tipo de medios de congelación y tensiones mecánicas involucradas en el procesamiento del semen, como pipeteo, dilución, mezcla, embalaje, almacenamiento y transporte (Arav, 1999).

1.2 Tasa de congelación / descongelación

Los procedimientos de criopreservación se orientan a intentar minimizar los daños celulares que se producen durante la congelación y descongelación celular, estos incluyen, rotura de la membrana plasmática, desnaturalización y desplazamiento de las proteínas de membrana, membrana mitocondrial y acrosoma (Moreno & Galarza, 2019). Los protocolos de congelación están diseñados para minimizar estas agresiones mediante la adición de crioprotectores y el uso de tasas de congelación y descongelación adecuadas, y se espera que maximicen la supervivencia de los espermatozoides (Peña et al., 2011).

Durante el procedimiento de crioconservación estándar, se involucran diferentes pasos, a saber, dilución del semen a 37°C con los diluyentes y CPAs seguido de enfriamiento a 4°C y equilibrado. Luego se realiza una congelación rápida para evitar la cristalización. Tampoco está claro cómo cada paso de procesamiento contribuye al daño general observado después de la descongelación (Khalil et al., 2018). Bratton et al., 1955 sugirieron

usar tasas de congelación de 1 a 2°C min entre 5 y -15°C y de 4 a 5°C min entre -15 y -79°C para criopreservación de semen de toro. El rango en el que los espermatozoides son más susceptibles al choque por frío inducido por la rápida velocidad de enfriamiento es de 19 a 8°C. Los espermatozoides se pueden enfriar rápidamente (-0.7°C min) de 37 a 19°C sin incurrir en daños por choque frío. Sin embargo, durante el rango de sensibilidad al choque frío, el enfriamiento debe proceder a un tasa lenta (-0.05°C min) para evitar efectos nocivos sobre motilidad de los espermatozoides (Forero-Gonzalez et al., 2012).

El retorno a las condiciones fisiológicas es crítico para la supervivencia celular, y los pasos involucrados en la descongelación exigen máximo cuidado con el tiempo, la temperatura y la manipulación de la pajilla; así por ejemplo, la descongelación de pajillas por más de 30 segundos en temperaturas mayores a los 37°C redundará en mayor número de alteraciones espermáticas (Rodríguez et al., 1975; Villa Duque et al., 2016). Por lo general, la tasa de descongelación se realiza a 37 °C durante 30 segundos (entre 45 y 60 segundos) (Kumar et al., 2019).

1.3 Metabolismo espermático

Varios componentes del plasma seminal, incluidas diversas proteínas, interactúan con el esperma y se adhieren a la superficie de los espermatozoides después de la eyacuación, protegiendo la membrana del criodañó (Muiño-Blanco et al., 2008). En toro, las proteínas del plasma seminal (BSP) son proteínas de unión a fosfolípidos que promueven la capacitación de los espermatozoides y tienen un papel beneficioso en la función espermática, pero al mismo tiempo, estimulan la salida del colesterol y los fosfolípidos de la membrana plasmática disminuyendo la resistencia a la congelación de los espermatozoides, lo que va en detrimento de la post-descongelación del esperma (Manjunath et al., 2007).

Durante la capacitación se producen alteraciones bioquímicas y ultraestructurales que modifican la fluidez de la membrana plasmática, la concentración de calcio intracelular, la

fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, la actividad de proteína quinasas A, C y tirosina quinasa y los patrones de motilidad, eventos dependientes de la carga energética de esta célula haploide (Naresh & Atreja, 2015; Yanagimachi, 1994). El primer evento en la capacitación es la elevación del calcio y bicarbonato intracelular para activar la adenil ciclasa (AC) para producir AMP cíclico, que activa la proteína quinasa A para fosforilar ciertas proteínas, también hay un aumento en la polimerización de actina y en la fosfolipasa C unida a la membrana. La proteína quinasa C abre un canal de calcio en la membrana plasmática (Breitbart, 2002; Pommer et al., 2003).

El flujo de calcio (Ca^{2+}) dentro del espermatozoide es fundamental para procesos como la capacitación espermática, reacción acrosómica y posterior fertilización del oocito (Florman et al., 1998; Triphan et al., 2007; Gualtieri et al., 2021), por lo tanto, cualquier daño celular que se refleje en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular tiene un efecto perjudicial potencial sobre el rendimiento reproductivo del sujeto (Albrizio et al., 2015). Por ende los espermatozoides criopreservados exhiben un comportamiento similar al de la capacitación y parecen estar en un estado parcialmente capacitado debido a los cambios de membrana inducidas por la crioconservación que hacen que las células sean más activas en su entorno (Lemma, 2011).

Los espermatozoides se componen de varios compartimentos encerrados dentro del citoplasma y las membranas mitocondriales. Estas membranas deben permanecer intactas y funcionales para permitir la competencia celular (O'Connell et al., 2002). Dos áreas principales de investigación han sido las mitocondrias y el metabolismo de los espermatozoides, ambas tienen amplias implicaciones en el campo de las biotecnologías del espermatozoide, al mismo tiempo, las mitocondrias son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (Martín et al., 2020). En los rumiantes, hay dos vías metabólicas principales, la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la glucólisis, ambas producen la energía requerida para mantener la motilidad de los espermatozoides en forma de ATP (Losano et al., 2017). El ATP generado por OXPHOS en la membrana mitocondrial interna se transfiere a los microtúbulos para impulsar la motilidad (Zamboni, 1987).

La fosforilación oxidativa produce mayor cantidad de ATP por molécula de glucosa; sin embargo, los espermatozoides de diferentes especies muestran variaciones en cuanto a

la dependencia en el metabolismo mitocondrial (Van et al., 1977), tal es el caso del espermatozoide de los bovinos que requieren del metabolismo mitocondrial para obtener movilidad (O'Connell et al., 2002; Storey, 2008). Las mitocondrias se envuelven estratégicamente alrededor de la pieza intermedia para proporcionar energía accesible a los filamentos de la cola, lo que facilita la propulsión eficiente de los espermatozoides tanto para llegar al ovocito como para penetrar en su zona pelúcida (O'Connell et al., 2002).

Una molécula esencial para todos los organismos aeróbicos es el oxígeno, dado que es el principal recurso de energía, sin embargo el consumo de oxígeno genera diversos derivados, formas activas de metabolitos del oxígeno y moléculas peroxidadas, todas ellas conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs) (Chabory et al., 2010).

En principio se consideraba que la producción de EROs era perjudicial para los espermatozoides, pues se pensaba que las EROs podían causar oxidación sin restricciones de varios componentes celulares, posteriormente, se logró determinar que las EROs no son necesariamente tóxicas para la célula, pues su toxicidad depende de su concentración y del contexto en el que se producen (de Lamirande et al., 1997; Said et al., 2010)(de Lamirande et al., 1997). Cuando las EROs exceden a los sistemas de defensa, se provoca un estado que se denomina estrés oxidativo. El estrés oxidativo se produce al generarse una cascada de eventos intracelulares que puede resultar en la adaptación o en el daño celular, el cual se puede regular por parte del sistema de defensa antioxidante, o puede provocar daños o incluso la muerte celular (Arenas et al., 2014).

El espermatozoide requiere de un metabolismo energético que genere suficiente energía libre para la movilidad flagelar, que ocurre de manera más eficiente en condiciones aeróbicas, principalmente por OXPHOS a nivel de las mitocondrias que se encuentran en la pieza intermedia del flagelo (Flores, 2015; Kamp et al., 1996), incrementando la frecuencia de batido flagelar y ayudando a mover la gameta a través del oviducto o salir del reservorio oviductal en el bovino (Garrett et al., 2008). Así, se ha confirmado que la producción de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por los espermatozoides, depende en gran medida de la actividad mitocondrial (Ford, 2004).

1.4 Efectos de la congelación sobre los espermatozoides

1.4.1 Efecto de la congelación sobre el metabolismo espermático

Hayashi & Isobe, 2005 informaron que la calidad del semen congelado y descongelado, incluida la viabilidad, la motilidad y las anomalías, es un factor crucial para una IA exitosa. Sin embargo, los espermatozoides están sujetos a cambios drásticos de temperatura, formación de cristales de hielo y diversos tipos de estrés (físico, osmótico y oxidativo) durante el proceso de criopreservación, que comprometen gravemente la calidad y la fertilidad del esperma (Ezzati et al., 2020; Watson, 1995). Ha habido un interés creciente por comprender los efectos del almacenamiento de semen a largo plazo en nitrógeno líquido sobre la supervivencia de los espermatozoides después de la descongelación (Haugan et al., 2007; Salisbury & Hart, 1970).

Los primeros ensayos de campo demostraron que el semen bovino congelado a -79°C y empaquetado en hielo seco aún podía producir una alta fertilidad (Bratton et al., 1955). La mortalidad de los espermatozoides y la motilidad reducida no pueden explicar completamente la fertilidad reducida del semen crioconservado. Puede estar involucrado un mecanismo molecular más complicado, incluida la pérdida de proteínas de la superficie del esperma que son necesarias para la fertilización (Li et al., 2016). Thurston et al., 1999 observaron variaciones tanto individuales como de raza en la calidad del semen en respuesta a la criopreservación en verracos.

Las funciones celulares que disminuyen después de la congelación incluyen la viabilidad de los espermatozoides, el potencial de la membrana mitocondrial y la motilidad (Darr et al., 2016). La capacitación implica principalmente cambios de pH citosólicos y niveles crecientes de Ca^{2+} (Tanga et al., 2021). Los espermatozoides frescos, durante el proceso de capacitación fisiológica la membrana plasmática pierde colesterol para alcanzar un estado de desestabilización necesario para mejorar la permeabilidad de los iones de calcio

(Lin & Kan, 1996). Las mitocondrias son responsables de satisfacer las demandas de energía celular y el Ca^{2+} es necesario para la actividad de los intermediarios metabólicos (Albrizio et al., 2015). La criopreservación modifica la estructura del espermatozoide y función de la membrana para favorecer la entrada de Ca^{2+} (Bailey et al., 2003), es por ello que los espermatozoides criopreservados exhiben un comportamiento similar al de la capacitación (Lemma, 2011). La maduración y capacitación de los espermatozoides son requisitos previos para una fertilización exitosa y a la vez están reguladas por la fosforilación de proteínas (Baker et al., 2012), entrada de iones de Ca^{2+} a las regiones perinucleares y el flagelo, igualmente la generación de cantidades controladas de EROs (Graham, 2001).

Los extensores de yema de huevo, glicerol y el enfriamiento imitan efectivamente la capacitación volviendo frágil la membrana plasmática del espermatozoide capacitado, viéndose restringida la vida fértil y la fertilidad de toda la población peligraría por la proporción de espermatozoides criocapitados presente en la dosis de inseminación (Bailey et al., 2003), estos autores concluyeron que los niveles de calcio intracelular aumentaban durante el enfriamiento y la congelación-descongelación que después de los pasos de dilución, estos espermatozoides pueden estar experimentando etapas de capacitación inducida por enfriamiento.

En el estudio de Sun et al., 2020 la criopreservación durante 24 horas tuvo un efecto negativo sobre la morfología acrosómica, la motilidad y actividad enzimática acrosómica en el espermatozoide de bovinos, caprinos y ovinos, en bovinos la motilidad fue de 68% en semen fresco frente a 44.6% poscongelación. También demostró que la tasa de integridad del acrosoma disminuyó significativamente después de la criopreservación de 98% a 94% respectivamente.

En caballos si la IA debe realizarse dentro de las 12 h posteriores a la recolección de semen, los espermatozoides generalmente se dejan a temperatura ambiente. Si la longevidad de los espermatozoides debe mantenerse durante períodos más prolongados, los espermatozoides se enfrían (hasta 72 h) o se criopreservan (indefinido) para restringir la tasa metabólica de los espermatozoides. Esta restricción inducida por la temperatura

reduce la tasas de producción de EROs y de acidificación del semen a través de la acumulación de ácido láctico y CO₂ de la glucólisis y OXPHOS, respectivamente, sin embargo, los espermatozoides de sementales, y de hecho de los hombres, no toleran los factores estresantes asociados con el enfriamiento o la criopreservación (Brinsko et al., 2000; Nallella et al., 2004).

Estas células diferenciadas terminalmente son particularmente vulnerables a tal estrés oxidativo durante la criopreservación porque su espacio citoplásmico limitado impone restricciones tanto a la concentración como a la distribución de enzimas antioxidantes intracelulares que protegen a la mayoría de los tipos de células del daño mediado por radicales libres (Jones et al., 1979; Rubio et al., 2009)(Jones et al., 1979). Así mismo el metabolismo intrínseco de los espermatozoides de mamíferos puede resultar en la generación de EROs como consecuencia de la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Koppers et al., 2008).

La proporción de células que sobreviven al protocolo de crioconservación está determinada por la sensibilidad al estrés osmótico durante la adición y eliminación del crioconservador, y durante el enfriamiento y el recalentamiento (Watson, 2000). En cambio Holt & North, (1994) han demostrado que los signos de estrés manifestado por los espermatozoides luego de la descongelación no se relacionan solo con el estrés osmótico sufrido en el descongelado sino también con el estrés sufrido durante el congelado.

1.4.2 Alteración en la motilidad

La motilidad de los espermatozoides es una de las características más importantes asociadas con la capacidad de fertilización del semen y durante muchos años se ha reconocido como esencial para el transporte de los espermatozoides en el tracto reproductivo femenino y su capacidad de fecundar (Leite et al., 2010). El transporte al lugar de la fertilización puede requerir una capacidad mínima de motilidad hacia adelante, que puede verse comprometida en la mayoría de los espermatozoides criopreservados (Watson, 2000). La categorización de las proteínas del espermatozoide muestra que el

26% de las proteínas están relacionadas con el metabolismo y la producción de energía, el 11% de las proteínas están relacionadas con la estructura y motilidad de la cola de los espermatozoides, y el 24% de las proteínas están asociadas con el metabolismo de los lípidos (Amaral et al., 2013).

Malik et al., (2015) mostraron que la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides descongelados almacenados en nitrógeno líquido durante 6 años fueron menores que el almacenamiento de 1 a 2 años, pero otros estudios no han podido confirmarlo, como el ensayo de campo de Lee et al., 1977 con 100.000 inseminaciones y utilizando semen congelado almacenado a -196°C durante 5 años, se evidenció una tasa de fertilidad normal. Sin embargo, hay pocos estudios diseñados para detectar una disminución en el rendimiento reproductivo del semen criopreservado con relación al tiempo de almacenamiento. Coulter & Foote, (1973) informaron en bovinos que la motilidad fue reducida desde 41,5% previo a la congelación en pajuelas al 28,2% después de la descongelación, sin embargo en el estudio de Ramírez et al., 2016 donde se analizaron 5 grupos de dosis de semen de la raza Holstein con intervalos de 1, 10, 25, 40 y 45 años de almacenamiento a -196°C , el análisis comparativo de la motilidad total de los espermatozoides no mostró diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento analizados. Específicamente, todos los valores mostrados están por encima del 60%, oscilando entre $60 \pm 2,4\%$ y $66 \pm 3,2\%$, consistentemente los valores más bajos de hiperactivación, ALH y BCF se observaron en el semen almacenado durante 40 años.

En el estudio de Bean et al., 1963 se demostró que la motilidad de muestras extendidas en leche fue significativamente más alta en un día y un mes cuando se almacena a -92°C y -196°C que cuando se almacena a -79°C . Sin embargo, después de tres meses de almacenamiento, las muestras almacenadas en -79°C y -92°C fueron significativamente más bajas que los almacenados a -196°C . Mientras que en el estudio de Prihantoko et al., 2020 se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la motilidad con 3 años de almacenamiento a -196°C , los resultados mostraron que la motilidad de los espermatozoides el primer mes fue 53,80 %. Después de 3 años de almacenamiento, el valor fue 39,52 %. La motilidad de los espermatozoides no se vio afectada hasta el sexto mes de almacenamiento. Macpherson, (1960) no observó diferencias marcadas en la

motilidad de espermatozoides bovinos entre -87°C y -196°C de temperatura en 3 meses de almacenamiento.

En el estudio de Akyol et al., 2018, se evaluó semen de toro de la raza pardo suizo con 2 y 30 años de almacenamiento en nitrógeno líquido. En los resultados no se observaron diferencias en términos de motilidad total $62.40 \pm 2.66\%$ vs. $62.28 \pm 4.11\%$ y progresiva $24.9 \pm 1.61\%$ vs. $20.72 \pm 2.11\%$ entre los espermatozoides congelados a largo y corto plazo. Sin embargo, valores de VAP ($85.8 \pm 1.57\%$ vs. $99.03 \pm 4.27\%$) y VCL ($145.41\% \pm 3.34\%$ vs. $179.71 \pm 8.09\%$) fueron más bajos en esperma congelado a largo plazo comparado. En el estudio de Malik et al., 2015 se utilizaron cuatro toros Holstein Friesian donde se evaluaron un total de 140 pajillas, se almacenaron durante uno hasta seis años en nitrógeno líquido y se encontró que la motilidad de los espermatozoides descongelados no disminuyó significativamente en el almacenamiento de 1, 2 y 3 años. Mientras que la motilidad fue significativamente diferente con el almacenamiento a los 4, 5 y 6 años con $44.59 \pm 0.37\%$, $43.75 \pm 0.41\%$ y $42.08 \pm 0.13\%$, respectivamente. En el estudio de Chrenek et al., 2017 se evaluó la motilidad del semen de toros pinzgau que se almacenaron en nitrógeno líquido durante diferentes períodos: menos de 8 años (grupo 1), 8 a 13 años (grupo 2) y 14 a 18 años (grupo 3). La motilidad media de los espermatozoides después de la descongelación en todos los grupos examinados fue superior al 40 %. No se observó influencia significativa de la duración del almacenamiento sobre la motilidad espermática total y el movimiento progresivo de los espermatozoides. En el estudio de Sullivan & Mixner en 1963, se evaluó la motilidad espermática de 11 toros de la raza Holstein y Guernsey almacenados a -196°C durante 18 meses. Los valores previos a la congelación correspondientes para la motilidad, fueron 72.5%. En forma lineal, la motilidad del semen disminuyó 1.33 unidades porcentuales por cada tres meses de almacenamiento a -196°C .

Por otro lado en el estudio de Fraser et al., 2014 evaluaron el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la motilidad de espermatozoides de verraco donde utilizaron el semen de 10 verracos con un periodo de almacenamiento de 1 año en nitrógeno líquido. Se encontró que los verracos 1, 4, 7, 9 y 10 mostraron una motilidad de los espermatozoides significativamente más baja luego del almacenamiento del semen en nitrógeno líquido, obteniendo valores de 40.7% vs 24.5% para el verraco 1, 29% vs 21% para el verraco 4, 38% vs 28% para el verraco 7, 31.3% vs 20% para el verraco 9 y 32% vs 25% para el verraco 10.

1.4.3 Daños en la membrana plasmática

La membrana espermática participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio en que se encuentra, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Hernandez & Carrillo, 2015). Los principales constituyentes de la membrana espermática son los lípidos, que son responsables de la fluidez de la bicapa lipídica (Lenzi et al., 1996). La composición lipídica de la membrana está relacionada con la integridad de la misma, la estabilidad estructural y la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Mansour et al., 2011; Yildiz et al., 2015). Las membranas de los espermatozoides afectados por la criopreservación incluyen la membrana plasmática, la membrana acrosómica externa y las membranas mitocondriales (C. A. Thomas et al., 1998). La capacidad de la membrana plasmática para resistir el daño estructural durante la crioconservación puede estar relacionada con el colesterol y los ácidos grasos, junto con la fuerza de los enlaces entre los componentes de la membrana (Hammerstedt et al., 1990). Si estas fuerzas superan la resistencia física de la célula, podrían ocurrir lesiones en la membrana y producir alteraciones irreversibles en su permeabilidad, pérdida de lípidos, entre otras alteraciones (Grötter et al., 2019), ocasionando daños como hinchamiento y disrupción, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio, composición lipídica y cambios en la actividad enzimática, viéndose afectada la fertilidad de los toros en IA (Rubio et al., 2009; Watson, 1981).

La concentración de colesterol en la membrana celular determina la transición de fase de los lípidos, debido a que el colesterol aumenta o disminuye la fluidez de las membranas en respuesta a las variaciones de temperatura (Yildiz et al., 2015)(Yildiz et al., 2015). A medida que las membranas se enfrían, los lípidos pasan de un estado fluido normal a un estado cristalino líquido, en el que las cadenas de ácidos grasos se desordenan causando una estructura delicada para lesión (Hammerstedt et al., 1990; Medeiros et al., 2002). Cada alteración de la fluidez de la membrana espermática durante el proceso de criopreservación puede cambiar la integridad de la membrana espermática (De Leeuw et al., 1993). Este fenómeno introduce una serie de implicaciones para el almacenamiento *in vitro* de espermatozoides de sementales, desde la generación prolongada de EROs, que

conducirá a un daño oxidativo irreversible y deteriorará el ADN de los espermatozoides (Gibb & Aitken, 2016).

La capacitación espermática se desarrolla cuando se producen cambios, como un aumento de la fluidez de la membrana debido a modificaciones de los lípidos, entrada de calcio en las regiones perinucleares, cuello y el flagelo, generación de cantidades controladas de EROs, así como como la fosforilación de residuos proteicos, ocurren de manera concertada (Tulsiani et al., 2007). EROs son funcionalmente importantes para impulsar las cascadas de fosforilación de tirosina asociadas con la capacitación de los espermatozoides. Sin embargo, cuando la producción de EROs excede los límites, se induce un estado de estrés oxidativo, caracterizado por daño peroxidativo a la membrana plasmática (Guthrie & Welch, 2012). Treulen et al., 2018 sugieren que el daño en la membrana plasmática causado por la criopreservación de esperma bovino está asociado con un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que desencadena la captación de grandes cantidades de Ca^{2+} por parte de las mitocondrias.

En rumiantes, la membrana plasmática del espermatozoide contiene altos niveles de ácidos grasos insaturados y bajos niveles de colesterol, la composición, particularmente el menor contenido de colesterol, disminuye la resistencia de los espermatozoides al proceso de congelación-descongelación (Darin & White, 1977). Las alteraciones en las estructuras de la membrana pueden estar asociadas con la desregulación de los lípidos, lo que resulta en estrés oxidativo (Karunakaran & Devanathan, 2017). La proporción más alta de ácidos grasos insaturados a saturados en la membrana plasmática hace que sea más susceptible al daño y la peroxidación relacionados con la crioconservación (Halliwell et al., n.d.).

Un estudio anterior comparó los niveles de proteína en los espermatozoides antes y después de la descongelación, descubrió que las variaciones en las proteínas identificadas afectaban la calidad de los espermatozoides congelados y descongelados, lo que probablemente disminuía la capacidad de fertilización en los cerdos (Chen et al., 2014). Los espermatozoides de diferentes individuos/razas pueden variar en su capacidad para expresa la proteína de choque térmico 90 (HS90), lo que influye en el éxito de la criopreservación (Thurston et al., 2002).

Se ha identificado una gran cantidad de proteínas en la cresta apical de los espermatozoides. P47 es una proteína asociada a la membrana plasmática del espermatozoide (Ensslin et al., 1998). Otra proteína de unión a la zona pelúcida es la fertilina B, que es una proteína transmembrana localizada en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (Evans et al., 1997). La criopreservación provoca cambios en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y aumento de la F-actina por su polimerización, los cuales son similares a la capacitación fisiológica, pero que pueden llevar al fracaso de la fertilización (Naresh & Atreja, 2015). Añadido a esto, la actina y la tubulina A son las principales proteínas del citoesqueleto responsables de la regulación del volumen celular (Gadella et al., 2008). De otro lado, el estrés osmótico también determina variaciones morfológicas de la cabeza del espermatozoide, que puede estar relacionado a cambios en el citoesqueleto por polimerización de la actina F (Hernández et al., 2018). La resistencia de los espermatozoides al estrés osmótico asociado con el cambio de temperatura podría depender de la flexibilidad y la fuerza de las interacciones entre las proteínas del citoesqueleto y los lípidos de membrana (Holt & North, 1991). Los cambios en la localización de las proteínas del citoesqueleto hacen que los espermatozoides sean más susceptibles a la criolesión, una idea apoyada por Duru et al., (2001) quienes asociaron el proceso de congelación y descongelación con cambios en la membrana espermática, como lo revela la translocación de fosfatidilserina.

La criopreservación de alguna manera precozmente desencadena la vía de transducción de señales que conduce a la capacitación, y esa criocapacitación es en parte responsable de la reducción de la fertilidad del semen descongelado, la capacitación fisiológica está regulada por vías de señalización intracelular que dan como resultado la fosforilación de proteína tirosina (PTP) (Bailey et al., 2003). La entrada de calcio es crucial para el inicio de PTP (Hossain et al., 2011), el cual es uno de los eventos de señalización intracelular que regulan la función espermática y es un indicador significativo de la capacitación. Los diferentes factores que afectan a la PTP son la salida de colesterol, aumento de Ca^{2+} intracelular, AMPc y EROs (Naresh & Atreja, 2015). El daño al proteoma se traduce en la interrupción de la cascada de fosforilación y activación enzimática afectando el movimiento flagelar y la capacidad fecundante de el espermatozoide (Figueroa et al., 2017).

Luego de la congelación, los espermatozoides obtenidos del epidídimo de toros, independiente del método de congelación, sufrieron lesiones en la membrana espermática, comprobadas por el test de fluorescencia con la carboxifluoresceína y yoduro de propidio (Ribeiro et al., 2014). En el estudio de Ramírez et al., (2016) los resultados mostraron que la integridad de la membrana plasmática no se ve alterada por el almacenamiento a largo plazo a -196°C . En el estudio de Prihantoko et al., 2020 se realizaron estudios sobre el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la integridad de la membrana con 3 años de almacenamiento, el primer mes fue 76,35%, el tercer mes fue 74,55%, al primer año fue 61,72% y luego de 3 años el resultado fue 48,25% por ende este parámetro comenzó a disminuir en el tercer mes.

Hay una hipótesis que establece que las células enfriadas demasiado rápido mueren por la formación de hielo intracelular, provocando daños sobre la membrana espermática y las células enfriadas demasiado lento pueden morir por una exposición prolongada a soluciones de alta concentración de solutos resultantes de la conversión progresiva de agua en hielo (Peña et al., 2011). La hipertonidad induce una rápida despolimerización y remodelación de la actina F en el citoesqueleto de los espermatozoides. Los espermatozoides sometidos a osmorregulación, incluso sin cambios de temperatura, solo pueden soportar desviaciones de aproximadamente 100 mOsm/kg de las condiciones isosmolales (aproximadamente 300 mOsm/kg para los espermatozoides) sin efectos significativos sobre la viabilidad y la motilidad (Schober et al., 2007). Además del daño plasmático y mitocondrial que ocurre con el choque osmótico, se ha demostrado que la producción de superóxido también aumenta en las soluciones hiperosmolales, lo que indica aún más el daño que deben soportar los espermatozoides antes y durante la congelación y descongelación (Córdova et al., 2014). Por lo tanto, la alteración de la membrana plasmática de los espermatozoides, debido a la criopreservación, afecta inevitablemente los eventos biológicos naturales de la célula y disminuye la probabilidad de éxito de la fertilización (Grötter et al., 2019).

1.4.4 Daños en la membrana mitocondrial

La función mitocondrial es esencial para la viabilidad de los espermatozoides, no solo desde la perspectiva del metabolismo de los espermatozoides, sino también para mejorar el almacenamiento de espermatozoides en estado líquido y congelado (Peris-Frau et al., 2020). Dentro de la célula hay compartimentos delimitados por membranas, como las mitocondrias y el acrosoma, cuyas actividades funcionales probablemente son sensibles a las condiciones de criopreservación (Sieme et al., 2008). Las mitocondrias están delimitadas por una membrana mitocondrial externa que es más permeable debido a la presencia de porinas y una interna que representa el sitio de la cadena transportadora de electrones (ETC), fundamental en la síntesis de ATP, y son responsable de la generación de EROs, la homeostasis de los iones de Ca^{2+} y la necrosis celular y apoptosis (Shoshan et al., 2018). Existe una fuerte correlación entre el porcentaje de espermatozoides inmóviles y los defectos mitocondriales después de la descongelación (Ozkavukcu et al., 2008). La apoptosis puede desencadenarse a través de la liberación de citocromo c mitocondrial, se reconoció que está involucrado en los efectos perjudiciales de la crioconservación (Gille & Nohl, 2001). El citocromo c oxidasa es la enzima terminal de la cadena respiratoria en las células eucariotas que media en la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno molecular (Karu, 2010).

La crioconservación daña los espermatozoides de diversas maneras, como daño estructural y daños que fomentan el estrés oxidativo y osmótico, que modifican la configuración de lípidos y proteínas, disminuyen la motilidad y la viabilidad, provocan lesiones en las mitocondrias y la cola de los espermatozoides (Khan et al., 2021). De muchos estudios se sabe que la disfunción mitocondrial puede resultar en la formación de EROs (Gravance et al., 2000). Sin embargo, durante el almacenamiento de espermatozoides, se sugirió que las EROs promueven la **capacitación** impulsando las cascadas de fosforilación de tirosina, lo que resulta en una disminución de la fertilidad (Gürler et al., 2015; Pagl et al., 2006). Durante el proceso de crioconservación, la mitocondria es uno de los orgánulos más dañados debido al choque por frío, al choque osmótico y al estrés oxidativo que conduce a cambios de tipo apoptótico (Pommer et al., 2002)(Pommer et al., 2002). Este proceso de congelación-descongelación seminal afecta

considerablemente la integridad estructural y funcional de los dominios de estas membranas, produciéndose un efecto deletéreo que altera los resultados de la valoración de motilidad, vitalidad y viabilidad espermática postdescongelación (Rubio et al., 2009).

La integridad del ADN es una preocupación durante la congelación celular porque la crioconservación cambia fácilmente propiedades de la membrana mitocondrial y aumenta la producción de EROs, que posteriormente puede resultar en la oxidación de ADN, produciendo roturas de sus cadenas, esto porque elevan el potencial de la membrana mitocondrial e inducen la liberación de EROs que a su vez, causan daño en el ADN lo que conduce a roturas de ADN de cadena simple o doble (Said et al., 2010, Upadhyay et al., 2021), alterando los procesos bioquímicos involucrados en la producción de ATP y, en última instancia, reduciendo la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides congelados y descongelados (Figuroa et al., 2017). El daño al genoma dificultaría la replicación y transcripción de genes diana mitocondriales o nucleares y en consecuencia, perjudicaría la síntesis eficiente de proteínas clave para la producción de energía (Yildiz et al., 2015).

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la producción de ATP a través de fosforilación oxidativa (Devenish et al., 2008). Sin embargo, este proceso también está relacionado con el estrés oxidativo producido por una variedad de EROs (Figuroa et al., 2017), igualmente están activamente involucradas en otros procesos como señalización de calcio (Guthrie & Welch, 2012). Las mitocondrias son un sitio importante de formación de EROs intracelulares, lo que resulta en una interrupción del transporte de electrones, el acoplamiento del transporte de electrones a la fosforilación oxidativa mantiene un alto $\Delta\Psi_M$ requerido para la producción de ATP mitocondrial en las células somáticas (López et al., 2008). El acoplamiento del transporte de electrones con la fosforilación oxidativa en los espermatozoides podría verse interrumpido por la formación de EROs y disminuir la cantidad de espermatozoides que mantienen un $\Delta\Psi_M$ alto necesarios para la producción de ATP (Guthrie & Welch, 2012). El potencial de membrana mitocondrial y consumo de oxígeno dependen de la cadena transportadora de electrones y de la ATP sintasa (ambas constituyen el sistema OXPHOS) (Ruiz et al., 2007). En las células aeróbicas, las fuentes más importantes de O^2 son las cadenas de transporte de electrones de las mitocondrias (Lenzi et al., 1996).

La mayoría de las células son capaces tanto de glucólisis como OXPHOS y son el principal proveedor de ATP de acuerdo con las entradas externas como el suministro de oxígeno, otra vía bioquímica importante es el ciclo de Krebs para el metabolismo celular (Ruiz et al., 2007), la glucólisis da lugar a acetil-CoA; luego comprende el ciclo del ácido cítrico, que depende de la formación de acetil-CoA; y la otra etapa es la de fosforilación oxidativa, en la que el poder reductor del NADH y el FADH₂ generado se utiliza para la síntesis de ATP (Brown, 2008). Es bien sabido que las mitocondrias de los espermatozoides compensan la disminución de la producción de energía aumentando la producción de lactato en condiciones de hipoxia, una mayor abundancia de lactato en toros de alta fertilidad sugiere que estos animales utilizan la glucólisis anaeróbica de manera más eficiente que toros de baja fertilidad (Darr et al., 2016). La restricción inducida por la baja temperatura reduce la tasas de producción de EROs y de acidificación del semen a través de la acumulación de ácido láctico de la glucólisis y CO₂ de OXPHOS (Nallella et al., 2004). Los sustratos glicolizables llegan a OXPHOS a través de la glucólisis, sin embargo, para la producción de ATP, la glucólisis anaeróbica no es muy eficiente y por ello se utiliza principalmente en condiciones de hipoxia o cuando los sustratos glucolíticos son muy abundantes. Cuando el oxígeno no es limitante y la disponibilidad de glucosa está restringida, las células confían en OXPHOS para cubrir las demandas de ATP (Ruiz et al., 2007).

Las mitocondrias de los espermatozoides, que se encuentran en la pieza intermedia, deben producir ATP para impulsar el movimiento flagelar que mueve los espermatozoides al sitio de la fertilización (Agarwal et al., 2004)(Agarwall et al., 2004), por ende las mitocondrias espermáticas son la principal fuente y destino de EROs (Koppers et al., 2008), como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el anion superóxido (O²⁻) y el radical hidroxilo (OH[·]), los cuales pueden inducir apoptosis, peroxidación de lípidos de la membrana, alteración de las mitocondrias y daño del ADN conduciendo a una menor fertilidad (Bollwein et al., 2008; Di Santo et al., 2012). La vía mitocondrial de la apoptosis parece ser un factor importante involucrado en el daño subletal que experimentan los espermatozoides equinos después de la congelación y descongelación (Ferrusola et al., 2010).

Las razones por las que las EROs mitocondriales pueden producirse cuando los espermatozoides se incuban durante períodos prolongados *in vitro* es que el medio de

cultivo carece de la combinación adecuada de factores de supervivencia que preservan la función de los espermatozoides *in vivo* y evitan que estas células pasen por defecto a la apoptosis (Aitken et al., 2012). Estudios recientes sobre esperma de toro criopreservado confirmaron que la disfunción mitocondrial se debe a la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial en respuesta a los aumentos de Ca^{2+} intracelular y esto se asoció con disminución del contenido de ATP, aumento de los niveles de EROs, y deterioro de la integridad de la membrana plasmática (Treulen et al., 2018), y por lo tanto, en la motilidad de los espermatozoides (Jones et al., 1979). En el estudio de Prihantoko et al., 2020 evaluaron la actividad mitocondrial la cual fue 64,24% en el primer mes y 49,12% luego de 3 años de almacenamiento siendo diferentes. La actividad de las mitocondrias disminuyó durante los 9 meses. En el estudio de Thomas et al., 1998 evaluaron los efectos de la criopreservación sobre la función mitocondrial de eyaculados de 12 toros de la raza Holstein con 24 horas de almacenamiento a 5°C, donde después de la crioconservación, la proporción de agregados de JC-1 fue inferior al 1,0%, lo que indica un potencial de membrana de bajo a moderado en todos los espermatozoides, el rango del total de espermatozoides teñidos con JC-1 en este estudio fue del 26% al 64%. El colorante de JC-1, marca las mitocondrias con alto potencial de membrana de color naranja y las mitocondrias con bajo potencial de membrana de color verde (Gravance et al., 2000). Cuando la tinción se difunde en la célula se acumula en las mitocondrias (Mohamed et al., 1993), lo que permite la detección del daño mitocondrial, según la cantidad de fluorescencia, e indica la proporción de mitocondrias en funcionamiento (Hossain et al., 2011).

1.4.5 Estrés osmótico

El choque osmótico es uno de los procesos más dañinos para la función de los espermatozoides (Darr et al., 2016). La lesión osmótica ocurre cuando los espermatozoides criopreservados se diluyen en un medio isoosmótico. La lesión se debe a la hiperosmolaridad de los extensores, los cambios en la concentración relativa de soluto durante la congelación/descongelación (Sieme et al., 2008). Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua

pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta (Stornelli et al., 2005).

Durante el enfriamiento por debajo de 0°C, comienzan a formarse cristales de hielo extracelulares, este cambio de fase provoca un gran aumento en la osmolaridad (mas hipertónica) de cualquier líquido remanente al que estén expuestos los espermatozoides conduciendo a la pérdida de agua intracelular que, a su vez, depende de la velocidad de enfriamiento (Mazur & Cole, 1989; Pegg & Diaper, 1989; Peña et al., 2011). El cristal de hielo intracelular altera el citoesqueleto, mientras que el cristal de hielo extracelular aumenta la concentración de solutos y aumenta la osmolaridad, lo que provoca la pérdida de agua de las células (Holt et al., 2014). Estos cambios osmóticos pueden causar daño a la membrana lipídica, lo que lleva a cambios de tensión en las proteínas del canal de agua y fugas iónicas en las membranas plasmáticas y resulta en cambios morfológicos (Sa-Ardrit et al., 2006). Se ha informado que un mecanismo osmótico aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial que permite una rápida difusión de EROs, que activa el mecanismo celular similar a la vía intrínseca de la apoptosis (Ferrusola et al., 2010). Cabe destacar que la membrana plasmática del espermatozoide está en contacto casi directo con las diversas estructuras subyacentes, membranas o estructuras del citoesqueleto, que están altamente organizadas de una manera muy polar (Gadella et al., 2008). Morris, 2006; propuso un mecanismo alternativo en el que el daño celular que se produce después de velocidades de enfriamiento rápidas es causado por un desequilibrio osmótico encontrado durante la descongelación, no por la formación de hielo intracelular. El estrés osmótico también determina variaciones en las variables morfométricas de la cabeza del espermatozoide (O'Brien et al., 2019).

1.4.6 Daños en la morfología espermática

Se ha informado que la crioconservación provoca cambios en la morfología de los espermatozoides, incluidos daños en las mitocondrias, el acrosoma y la cola del espermatozoide (Woolley & Richardson, 1978), ya que un influjo incontrolado de líquido en

los espermatozoides puede cambiar la osmolaridad celular y deformar la estructura de la membrana, alterando en consecuencia la morfología del esperma. La fluidez y flexibilidad de las membranas celulares son principalmente dependiendo de su constitución lipídica (Lenzi et al., 1996). Los defectos de la cabeza y la cola, como colas enrolladas y sueltas, se observan con frecuencia después de la congelación de los espermatozoides (Hezavehei et al., 2018). En el estudio de Malik et al., 2015 la anomalía de los espermatozoides descongelados no fue significativamente mayor en el almacenamiento de 1, 2 y 3 años. Mientras que la anomalía aumentó con el almacenamiento a los 4, 5 y 6 años con $17.63 \pm 0.19\%$, $19.38 \pm 0.24\%$ y $22.50 \pm 0.32\%$, aumentó gradualmente durante el almacenamiento a largo plazo del semen en nitrógeno líquido. En el estudio de Chrenek et al., 2017 se evaluó la morfología del semen de toros pinzgau que se almacenaron en nitrógeno líquido durante diferentes períodos: menos de 8 años (grupo 1), 8 a 13 años (grupo 2) y 14 a 18 años (grupo 3), lo cual en cada grupo probado, la tasa promedio de espermatozoides malformados no superó el 20%.

Goshme et al., 2021 estudiaron las anomalías morfológicas de bovinos utilizando portaobjetos teñidos con tinción de eosina-nigrosina, la cual fue de 5.4% de espermatozoides anormales con 214 días de almacenamiento. En otro orden de ideas, se ha descrito que el daño criogénico sobre la cabeza y el flagelo espermático pueden ocurrir independientemente uno del otro (Zhu & Liu, 2000).

1.4.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo surge debido a un desequilibrio entre la producción de EROs y la capacidad del sistema biológico para desintoxicarlo, es decir, cuando los oxidantes exceden los antioxidantes (Du Plessis et al., 2008; Gürler et al., 2015). Durante el proceso de congelación y descongelación, el semen está expuesto a oxígeno atmosférico, que a su vez aumenta la producción de EROs y la peroxidación lipídica (Bucak et al., 2008; Chabory et al., 2009). Las EROs se consideran convencionalmente como subproductos perjudiciales del metabolismo celular o de la exposición a xenobióticos, que generan un estado de estrés oxidativo en las células susceptibles (Stohs, 1995). La producción de

EROs a baja concentración es favorable para la capacitación espermática y la reacción del acrosoma en bovinos (O'Flaherty et al., 2005), así como en la motilidad de los espermatozoides, la capacitación, hiperactivación, adhesión transitoria del espermatozoide al oviducto (De Lamirande & Gagnon, 1995). Las dos fuentes principales de EROs intracelulares son la NADPH oxidasa de la membrana plasmática y los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial (Complejo NADH y coenzima Q reductasa) (Collin, 2019).

En general, se ha informado que la criopreservación de espermatozoides induce un aumento de permeabilidad de la membrana plasmática, sobreproducción de EROs, reducción y deterioro del potencial de la membrana mitocondrial, acrosomal y menor motilidad de los espermatozoides en toros, se ha demostrado en espermatozoides de ovinos (Peris et al., 2007) y bovinos (Bilodeau et al., 2000) que los niveles de EROs aumentan significativamente durante el proceso de criopreservación, ya que la exposición prolongada al oxígeno no puede evitarse por completo durante el enfriamiento o la congelación (Gonçalves et al., 2010). Estos niveles elevados de EROs podrían tener un rol importante en la disminución de la función espermática durante el proceso de criopreservación (Kim et al., 2010), a través de la peroxidación de lípidos, luego, causando apoptosis debido a la falta de ATP (Moustafa et al., 2004). Las únicas reacciones que pueden ocurrir en sistemas acuosos congelados a -196°C son eventos físicos como la formación de EROs y la producción de roturas en macromoléculas, estos eventos favorecen el daño del material de ADN espermático (Khan et al., 2021). Las mitocondrias en la pieza media proporcionan energía accesible a los filamentos de la cola ocasionando mayor producción de EROs (O'Connell et al., 2002). En términos generales, los radicales libre se definen como moléculas con un electrón desapareado que reaccionan rápidamente con otros radicales libres o no radicales (Pryor, 1976), Las EROs están representadas por radicales como el ion hidroxilo, superóxido, óxido nítrico, ion peróxido y no radicales como peroxinitrato, ozono, oxígeno naciente y peróxido de hidrógeno (Bansal & Bilaspuri, 2011). Estos no pueden ser clasificados como radicales libres porque todavía contienen un par de electrones en el orbital exterior (Lenzi et al., 1996).

El plasma seminal contiene antioxidantes enzimáticos (Glutación peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa) (Van Overveld et al., 2000) y no enzimáticos (piruvato, ácido ascórbico, α -tocoferol, taurina e hipotaurina); sin embargo, su efecto protector contra el estrés oxidativo disminuye significativamente cuando el semen se diluye en el medio de congelación antes de la crioconservación (Yoon et al., 2016). Todos los componentes celulares, incluyendo lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y azúcares son potenciales blancos del estrés oxidativo (Agarwal et al., 2008). El ataque peroxidativo a los ácidos grasos poliinsaturados provoca daño tanto estructural como funcional, la membrana se vuelve frágil y se pierde su propiedad semipermeable que conduce a la lixiviación de la membrana, salida de colesterol, entrada de calcio, capacitación que reduce la viabilidad y la fertilidad de los espermatozoides (Medeiros et al., 2002).

En el estudio de Akyol et al., 2018, se evaluó semen de toro de la raza pardo suizo con 2 y 30 años de almacenamiento en nitrógeno líquido, el aspecto oxidativo evaluado por citometría de flujo fue mayor en esperma a largo plazo en comparación con el corto plazo de almacenamiento ($7.45 \pm 0.09\%$ vs. $1.34 \pm 0.10\%$). Los espermatozoides con un elevado metabolismo energético de sementales muy fértiles exhiben niveles más altos de actividad OXPHOS, luego del almacenamiento presenta niveles elevados de EROs y peroxidación de lípidos (Aitken & Clarkson, 1987; Jones et al., 1979; Upadhyay et al., 2021) .

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales y equipos:

En la presente investigación se utilizaron los siguientes materiales: 24 eyaculados de semen provenientes de 8 toros (3 eyaculados por toro) del banco de semen del Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional de Colombia de los cuales se evaluaron cuatro pajillas por eyaculado en los diferentes procedimientos laboratoriales, cabe destacar que debido al tiempo de almacenamiento hubo dos toros que se evaluaron en dos grupos de análisis. Se estudiaron los cambios en el metabolismo de los espermatozoides bovinos provocados por el daño criobiológico, principalmente en su motilidad, funcionalidad de la membrana plasmática, morfología, estabilidad de la membrana plasmática, actividad mitocondrial, viabilidad, producción de calcio y especies reactivas de oxígeno resultado de diferentes tiempos de almacenamiento. El semen fue seleccionado según su tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido (entre 0 a 10, 11 a 20 y 21 a 30 años). Se utilizaron portaobjetos, cubreobjetos, tubos eppendorf, pipetas de laboratorio, tinción eosina-nigrosina, solución para test hiposmótico (Host), sondas fluorescentes: merocianina-540, yoduro de propidio (IP), DiOC6, Dihidrorodamina 123, Fura 2AM y solución buffer fosfato (PBS). Entre los equipos se utilizó el programa de análisis de semen asistido por computadora (CASA IVOS, Hamilton-Thorne, EEUU), microscopio óptico, platina térmica, incubadora y citómetro de flujo (FORTESSA LSR, BD Biosciences, EE. UU.).

2.2 Diseño experimental:

Se utilizó un diseño de bloques al azar, donde el bloque estuvo constituido por los eyaculados almacenados en los diferentes periodos de tiempo. Para la evaluación de las variables dependientes se ajustaron los modelos mixtos con los efectos aleatorios del toro y el eyaculado, y el efecto fijo del tiempo de almacenamiento. Para cada parámetro se evaluaron cuatro replicas por eyaculado.

2.3 Procedimientos

La movilidad y la velocidad de los espermatozoides se evaluaron mediante el programa de análisis de semen asistido por computadora (CASA IVOS, Hamilton-Thorne, EEUU). Se colocó una gota de semen congelado-descongelado (7 μ L) en un portaobjetos de vidrio precalentado (37°C), y se cubrió con un cubreobjetos. Se analizaron un mínimo de 500 espermatozoides (Microscopio, Eclipse E200, Nikon Inc., EE. UU.) Se determinaron la motilidad total (MT, %), la motilidad progresiva (MP, %), la velocidad media (VAP, μ m/s), la velocidad de línea recta (VSL, μ m/s), la velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μ m) y la frecuencia de batido (BCF, Hz).

La funcionalidad de la membrana plasmática o integridad celular se evaluó mediante la técnica del Host (Jeyendran et al., 1984), el semen se incubó durante 30 minutos en solución de fructosa hipoosmótica a 100 mOsm/L en baño maría termoestable a 36°C. Para el análisis se realizó un frotis colocando 10 μ L de la muestra, se observaron 100 espermatozoides utilizando un microscopio óptico. Los espermatozoides con cola enrollada total o parcialmente se consideraron con membrana íntegra (reaccionados) y el resultado final se expresó porcentualmente.

Para la tinción con Eosina-Nigrosina se utilizó el método de Cabrera V. & Pantoja A., 2012, el semen se descongeló y se colocó en tubos eppendorf los cuales ya estaban incubados a 36°C, para el frotis se aspiraron 5 μ L de Eosina y Nigrosina y 5 μ L de semen, se colocó

sobre la lámina portaobjeto en la parte media de uno de los extremos y con ayuda de un tip se mezclaron los dos elementos, con ayuda de otra lamina con una ligera inclinación se distribuyó a lo ancho de la lámina para luego extender la muestra. Para el secado se colocó la lámina portaobjetos en una platina térmica a 36°C durante 15 min con el fin de secar rápidamente el frotis. Posteriormente el análisis se realizó contabilizando 100 células espermáticas. El conteo se hizo en distintos campos escogidos al azar con un microscopio óptico con aceite de inmersión a 100 X de aumento, la evaluación morfológica se realizó según clasificación de (Galloway, 1992), quien describe que los espermatozoides anormales se clasifican de acuerdo con la morfología, incluidos defectos en la cabeza como microcefalia, macrocefalia, cabeza piriforme, cabeza desprendida y/o rugosa, anomalías en la parte media como presencia de gota citoplasmática proximal o distal y colas dobladas o enrolladas.

La estabilidad de la membrana plasmática o la alteración de la arquitectura de la membrana lipídica (asociada con la capacitación de los espermatozoides) se evaluó utilizando el protocolo adaptado de (Thomas et al., 2006), utilizando sondas fluorescentes Merocianina 540 (Molecular Probes Inc, Oregon, EE. UU). Se añadió 10 µL de semen diluido en medio DMSO a una concentración de 1×10^6 / ml. Por último, se agregó la sonda en concentraciones finales de 0.34 µL de Merocianina 540. Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego, las muestras se evaluaron usando un citómetro de flujo (FORTESSA LSR, BD Biosciences, EE. UU.) en un rango de emisión entre 580-620 nm para sonda Merocianina 540. La merocianina 540 es un tinte hidrofóbico que puede monitorear la integridad de la membrana, especialmente la codificación de fosfolípidos cuya fluorescencia observada por citometria de flujo depende del grado de trastorno lipídico (Rodriguez-Martinez et al., 2001).

Para evaluar el incremento del contenido de calcio intracelular, la concentración de calcio libre se evaluó utilizando el indicador de calcio fluorescente Fura-2AM siguiendo el protocolo de (Grynkiewicz et al., 1985). Las muestras se incubaron en 1 µL de Fura-2AM (F0888; Sigma-Aldrich) a 37°C durante 10 min. Luego, las muestras se evaluaron usando un citómetro de flujo (FORTESSA LSR, BD Biosciences, EE. UU.) en un rango de emisión entre 340-500 nm para la sonda Fura-2AM (Grynkiewicz *et al*, 1985 ; Brewis *et al*, 2000). Los datos fueron analizados con el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA). El fura-2 es un indicador de Ca²⁺ que contiene restos aromáticos, los cuales le confieren sus

propiedades fluorescentes. Se trata de una molécula polar, y por ende, incapaz de atravesar las membranas celulares, por lo que es incluido en las células en forma de su derivado acetoximetiléster (fura-2/AM), el cual, gracias a su carácter hidrófobo atraviesa las membranas celulares mediante transporte pasivo (Grynkiewicz et al., 1985).

Para la evaluación de la actividad mitocondrial, 10 μL de semen descongelado se incubaron en una solución con 300 μL de PBS, 0.5 μL de DiOC6 (0.1 μM) y 1 μL de yoduro de propidio por 15 min. El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{M}$) fue medido a través de citometría de flujo y analizado con el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA). Para teñir las mitocondrias, cualquier sonda tiene que entrar en la célula y llegar a los orgánulos. Su acumulación citoplasmática es un evento crucial, ya que se requiere una concentración intracelular crítica para obtener una señal de fluorescencia adecuada, obviamente, para moléculas catiónicas lipófilas, dicha acumulación depende principalmente del potencial de membrana plasmática (Salvioli et al., 1997).

La evaluación de la producción de EROs se realizó mediante la metodología del potencial de dihidrorodamina 123 (DHR123) (Kiani et al., 2012). Cada muestra se incubó con 1 μL de DHR123 a 37 °C durante 10 min. Luego, las muestras se evaluaron usando un citómetro de flujo (FORTESSA LSR, BD Biosciences, EE. UU.) en un rango de emisión entre 340-500 nm para la sonda DHR123. Los datos fueron analizados con el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA). El tinte no fluorescente DHR123 es un derivado de la rodamina 123 (R123). Esta sonda entra pasivamente en las células y es oxidada por ROS para formar R123. R123 es un tinte fluorescente verde catiónico que puede acumularse y localizarse en las mitocondrias, Por lo tanto, DHR123 puede evaluar simultáneamente la presencia de producción de ROS en células con actividad mitocondrial (O'Connell et al., 2002).

2.4 Análisis estadístico

Se realizó el ajuste de modelos mixtos en los cuales se incluyó el efecto aleatorio del eyaculado anidado dentro del toro y el efecto fijo del tiempo de almacenamiento (Grupo).

Las medias fueron ajustadas mediante el procedimiento LSMEANS y se compararon mediante la prueba de Tukey. Se realizó transformación Arcoseno para las variables expresadas en términos porcentuales, y se utilizaron transformaciones logarítmicas para garantizar la normalidad de los datos para las variables que lo requirieron. Mediante un análisis de regresión se determinó la asociación entre las variables dependientes y el tiempo de almacenamiento. Las diferencias con un valor de p inferior a 0,05 se consideraron significativas. El procesamiento de los datos y los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo mediante el software SAS 9.2 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3 Resultados y discusión

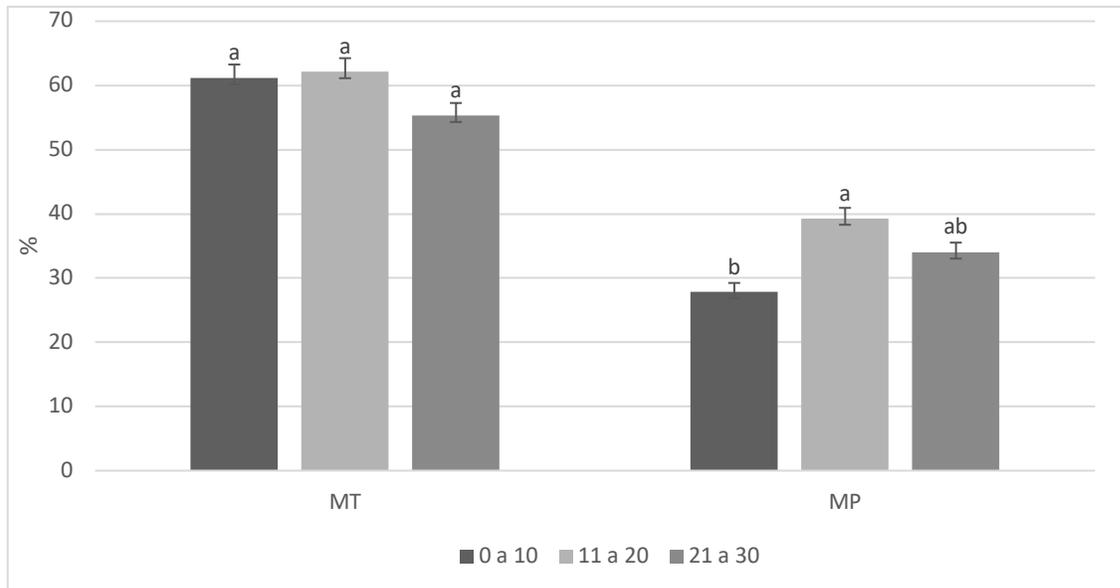
3.1. Motilidad y cinética espermática

La figura 3-1 muestra la población de espermatozoides con motilidad total y motilidad progresiva según los grupos para el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido. No existió diferencia significativa en el parámetro de motilidad total con respecto al tiempo de almacenamiento ($p>0.05$). En cuanto al parámetro de motilidad progresiva, existió diferencia entre el grupo de 0 a 10 y 11 a 20 años de almacenamiento ($p<0.05$).

Durante el enfriamiento, los espermatozoides están predispuestos a numerosos efectos perjudiciales, incluidos el desequilibrio iónico, el desacoplamiento metabólico, la acidosis celular, la activación de proteasas, la transición de fase de la membrana, la privación de energía, la desestabilización del citoesqueleto y la producción de EROs (Khalil et al., 2018). Pickett et al., (1961) demostraron que el almacenamiento de semen bovino a -196°C proporcionara resultados de motilidad y fertilidad significativamente más altos que los -79°C . Fraser et al., 2014 demostraron que el almacenamiento prolongado tiene efectos sobre la motilidad de los espermatozoides, la función mitocondrial y la integridad de la membrana plasmática en semen de verraco. Se han vuelto mas sofisticadas las tecnologías para estudiar las características y funciones de espermatozoides individuales dentro de un eyaculado y ha quedado claro que existe una considerable heterogeneidad (Davis & Gravance, 1994). La combinación de un efecto individual y de raza construye un fuerte argumento para la opinión de que la variación en la capacidad de congelación de los espermatozoides está a cierta medida determinada genéticamente (Thurston et al., 2002). La evidencia directa de un vínculo genético con la congelabilidad del semen la proporciona un estudio sobre toros gemelos monocigóticos (Braun et al., 1990) en el que se evaluó la viabilidad espermática en función de la motilidad progresiva en 6 pares de

toros gemelos antes y después de la congelación, se observó variación en la motilidad después de la descongelación entre pares de gemelos, pero no entre individuos del mismo par.

Figura 3-1. Porcentaje de espermatozoides bovinos de raza Holstein con motilidad total y progresiva según su tiempo de almacenamiento.



Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Letras diferentes en las filas indican diferencia estadística para cada parámetro ($p < 0,05$). MT: motilidad total. MP: motilidad progresiva.

El estado mitocondrial de los espermatozoides es fundamental debido a su relación con el estado energético y la motilidad de la célula y, en consecuencia, se ha relacionado con la fertilidad (Peter Mazur et al., 2000). Las mitocondrias de los espermatozoides, que se encuentran en la pieza intermedia, deben producir energía para impulsar el movimiento flagelar que mueve los espermatozoides al sitio de la fertilización (Benchaib et al., 2003). El daño de la membrana provoca la pérdida de ATP, proteínas y enzimas esenciales, que conducen a la reducción de la motilidad de los espermatozoides congelados y descongelados (Pereira et al., 2017). La motilidad de los espermatozoides se pierde como consecuencia de la peroxidación lipídica, no solo debido al ataque de EROs (Shimizu & Johnson, 1983), sino también debido a el agotamiento concomitante de ATP (de Lamirande

et al., 1997) que compromete innumerables funciones dependientes de ATP interrumpiendo la homeostasis y acelerando la muerte celular (Kamp et al., 1996).

Caso similar a esta investigación es el estudio de Ramírez et al., 2016 donde analizaron 5 grupos de dosis de semen de la raza Holstein con intervalos de 1, 10, 25, 40 y 45 años de almacenamiento a -196°C , donde el análisis comparativo de la motilidad total de los espermatozoides no mostró diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento analizados. Específicamente, todos los valores mostrados están por encima del 60%, oscilando entre $60 \pm 2,4\%$ y $66 \pm 3,2\%$. Otro estudio similar es el de Sun et al., 2020, informaron que las tasas de motilidad de los espermatozoides bovinos, ovinos y caprinos antes y después de la crioconservación durante 24 horas fueron del 68,08% frente al 44,58% para bovinos, del 63,82% frente al 40,29% para ovinos, del 67,69% frente al 38,77% para caprinos, de manera que la tasa de motilidad de los espermatozoides después la crioconservación disminuyó significativamente en las tres especies. Resultados similares al presente estudio fue el estudio de Akyol et al., 2018, evaluaron semen de toro de la raza pardo suizo con 2 y 30 años de almacenamiento en nitrógeno líquido. En los resultados no se observaron diferencias en términos de motilidad total $62.40 \pm 2.66\%$ vs $62.28 \pm 4.11\%$ y progresiva $24.9 \pm 1.61\%$ vs $20.72 \pm 2.11\%$.

Caso contrario es el de Prihantoko et al., 2020, en el cual se analizó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la motilidad de los espermatozoides con 3 años de almacenamiento a -196°C , los resultados mostraron que la motilidad el primer mes fue 53,80 %, y después de 3 años fue 39,52%. La motilidad no se vio afectada hasta el sexto mes de almacenamiento. Contrario al presente estudio fue el de Chrenek et al., 2017, donde se evaluó la motilidad del semen de toros Pinzgau que se almacenaron en nitrógeno líquido durante diferentes períodos: menos de 8 años (grupo 1), 8 a 13 años (grupo 2) y 14 a 18 años (grupo 3), la motilidad media de los espermatozoides después de la descongelación en todos los grupos examinados fue superior al 40 %; no se observó influencia significativa de la duración del almacenamiento sobre la motilidad espermática total y el movimiento progresivo de los espermatozoides. Mismo reporte se halló en el estudio de Malik et al., 2015, donde se utilizaron 140 pajillas de cuatro toros Holstein-Friesian, que se almacenaron entre uno y seis años en nitrógeno líquido. La motilidad de los espermatozoides descongelados no disminuyó significativamente en el

almacenamiento de 1, 2 y 3 años, mientras que la motilidad fue significativamente diferente con el almacenamiento a los 4, 5 y 6 años disminuyendo su motilidad en cada año. En el estudio de Ahmed et al., 2019 evaluaron el efecto de la criopreservación durante 24 horas sobre espermatozoides de búfalo, encontrando que la motilidad total de los espermatozoides se redujo significativamente ($94,0 \pm 0,7\%$ vs $73,4 \pm 2,9\%$) al igual que la motilidad progresiva ($67,8 \pm 1,0\%$ vs $28,5 \pm 0,9\%$).

En la Tabla 3-1 se muestran los parámetros cinéticos espermáticos de semen congelado con diferentes tiempos de almacenamiento pertenecientes a toros de la raza Holstein. VCL analiza la velocidad de la cabeza de un espermatozoide en función del tiempo promedio a lo largo de su trayectoria curvilínea real. VSL mide la velocidad de la cabeza de un espermatozoide en un promedio de tiempo a lo largo de la línea recta entre su primera y última posición detectada. VAP mide la velocidad de la cabeza de un espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio sobre una base de tiempo promedio. Esta ruta se calcula suavizando la ruta real de acuerdo con los algoritmos del instrumento CASA. ALH mide la magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza de un espermatozoide sobre su trayectoria media (Larsen et al., 2000). En cuanto al primer parámetro, velocidad curvilínea (VCL) hubo diferencia significativa entre el grupo de 0 a 10 años de almacenamiento con el grupo de 21 a 30 años ($p < 0.05$), para el parámetro de velocidad promedio (VAP) se encontró diferencia entre el grupo de 0 a 10 y 11 a 20 años ($p < 0.05$), para el parámetro de velocidad lineal (VSL) hubo diferencia significativa en el grupo de 0 a 10 con 11 a 20 y 21 a 30 años ($p < 0.05$), para el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) y por último, para el parámetro de frecuencia de batido (BCF) hubo diferencia significativa entre el grupo de 0 a 10 y 11 a 20 años ($p < 0.05$).

Tabla 3-1. Parámetros de cinética espermática de pajuelas de eyaculados bovinos Holstein con diferentes tiempos de almacenamiento en nitrógeno líquido.

	0 a 10 años	11 a 20 años	21 a 30 años
VCL	119.94 ± 4.76 ^b	127.36 ± 3.53 ^a	123.09 ± 3.94 ^{ab}
VAP	69.43 ± 3.13 ^b	75.28 ± 1.63 ^a	73.04 ± 1.86 ^{ab}
VSL	52.85 ± 1.01 ^b	60.92 ± 1.17 ^a	59.39 ± 1.14 ^a
ALH	6.48 ± 0.17 ^a	6.21 ± 0.18 ^a	6.05 ± 0.18 ^a
BCF	21.6 ± 0.44 ^b	25.47 ± 0.71 ^a	23.96 ± 0.66 ^{ab}

Los resultados se presentan como media ± error estándar de la media (SEM). Letras diferentes en las filas indican diferencia estadística para cada parámetro ($p < 0,05$). VCL: Velocidad curvilínea, VAP: Velocidad media, VSL: Velocidad rectilínea, ALH: Desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: Frecuencia de batido.

La estimación de la motilidad es un paso esencial en la evaluación de la fertilidad en el macho y puede considerarse una prueba funcional debido a su relación con el estado energético de los espermatozoides de mamíferos (Roldan, 1998). En la crioconservación prolonga de los espermatozoides la criolesión asociada puede provocar la pérdida de la motilidad de los espermatozoides e inducir daño acrosomal, despolarización de la membrana mitocondrial, criocapacitación y alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática (J. L. Bailey et al., 2000).

Ramírez et al., 2016 encontró consistentemente los valores más bajos de hiperactivación, ALH y BCF en el semen almacenado durante 40 años, siendo así similar a esta investigación con los parámetros ALH y BCF en el grupo de mayor tiempo de criopreservación. En el estudio de Akyol et al., 2018, evaluaron semen de toro de la raza Pardo Suizo con 2 y 30 años de almacenamiento. Sin embargo, los valores de VAP ($99.03 \pm 4.27\%$ vs $85.8 \pm 1.57\%$) y VCL ($179.71 \pm 8.09\%$ vs $145.41 \pm 3.34\%$) fueron más bajos en esperma congelado a largo plazo, siendo contrario a este estudio ya que a largo plazo no hubo diferencia significativa en estos parámetros. Otro estudio que arrojó resultados opuestos fue el de Arbaiza & Cabrera, 2021, donde se observó la disminución de los valores con diferencias significativas en los parámetros seminales motilidad, motilidad progresiva, al igual que para los parámetros cinéticos VCL, VSL, VAP, ALH, BCF, después de la criopreservación. Otro caso diferente estuvo en los resultados de Ahmed et al., 2019

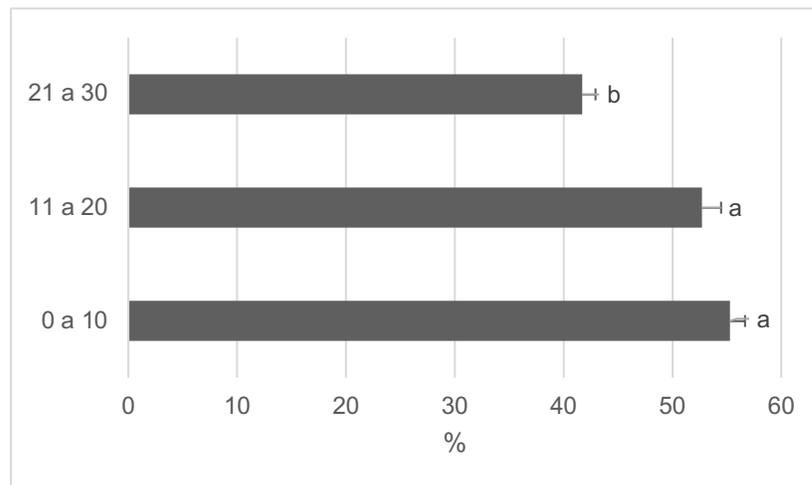
donde evaluaron el semen fresco y el efecto de la criopreservación durante 24 horas sobre espermatozoides de búfalo, encontrando una reducción significativa de VAP (127% frente a 75%), VSL (115% frente a 64%), VCL (167% frente a 114%) y BCF (39% frente a 31%).

Algunos parámetros como la motilidad progresiva y los cinéticos se observan con menor calidad en el primer grupo de almacenamiento, una explicación tangible pueden ser las variables que no podemos controlar como raza, edad, medio ambiente (temperatura y humedad), individuo y manejo (Barkawi et al., 2006), así como el proceso de congelación, el semen de ciertos individuos congelará mal, lo que resulta en mala motilidad y daño en la membrana plasmática, esta es una clara indicación de que los espermatozoides con ventaja de fertilidad antes de la congelación no serán necesariamente los mejores adaptados para sobrevivir a la criopreservación (Thurston et al., 2002).

3.2. Integridad funcional de la membrana plasmática

Los espermatozoides se caracterizan por la fluidez de la membrana plasmática y el bajo contenido de agua que los hacen más resistentes al daño criogénico en comparación con otros tipos de células (Agca et al., 2002). El porcentaje de espermatozoides reaccionados a la prueba Host disminuyó significativamente ($p > 0.05$), cuando el tiempo de almacenamiento fue mayor (Figura 3-2). Se observó que el grupo de 21-30 años fue significativamente menor en comparación con los demás grupos ($p < 0.05$). La frecuencia de espermatozoides reaccionados fue de $55.28 \pm 1.39\%$, $52.69 \pm 1.78\%$ y $41.71 \pm 1.22\%$ para el rango de almacenamiento de 0-10, 11-20 y 21-30 respectivamente.

Figura 3-2. Porcentaje de células espermáticas de toro que reaccionaron a la prueba HOST según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.



Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Letras diferentes en las filas indican diferencia estadística para cada parámetro ($p < 0,05$).

El proceso de congelación-descongelación cambia la fisiología y deforma la estructura de los espermatozoides debido a cambios en el equilibrio osmótico, generación de oxidantes reactivos excesivos y formación de cristales de hielo intracelulares (Kumar et al., 2019; Ugur et al., 2019). Mencionan Carmody & Cotter, 2001 que la apoptosis y las alteraciones de la membrana plasmática pueden ser inducidas por las especies reactivas de oxígeno.

Es así como en el experimento de Rubio et al., 2009, los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas (71,85% vs 50,82%) entre los eyaculados frescos y las muestras descongeladas de 4 toros con una semana de almacenamiento a -196°C . La integridad estructural de la membrana plasmática se vio notablemente afectada por la criopreservación al comparar las muestras frescas y descongeladas. En un estudio similar, Prihantoko et al., 2020, evaluaron el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la integridad de la membrana con 3 años de almacenamiento, los resultados encontrados fueron para primer mes un 76,35% y después de 3 años un 48,25%, por lo que se consideró que la integridad de la membrana comenzó a disminuir en el tercer mes. Caso contrario a la presente investigación donde solo hubo diferencia significativa en el grupo de 21-30 años. Similar resultado aunque con menor rango de almacenamiento fue en el estudio de Ghareeb et al., 2017, quienes evaluaron el eyaculado de 3 toros raza Brangus- Hereford

con 1 y 2 semanas de criopreservación mediante prueba Host, la reacción de la membrana plasmática fue 56.87% y 55.48% para las semanas 1 y 2 respectivamente.

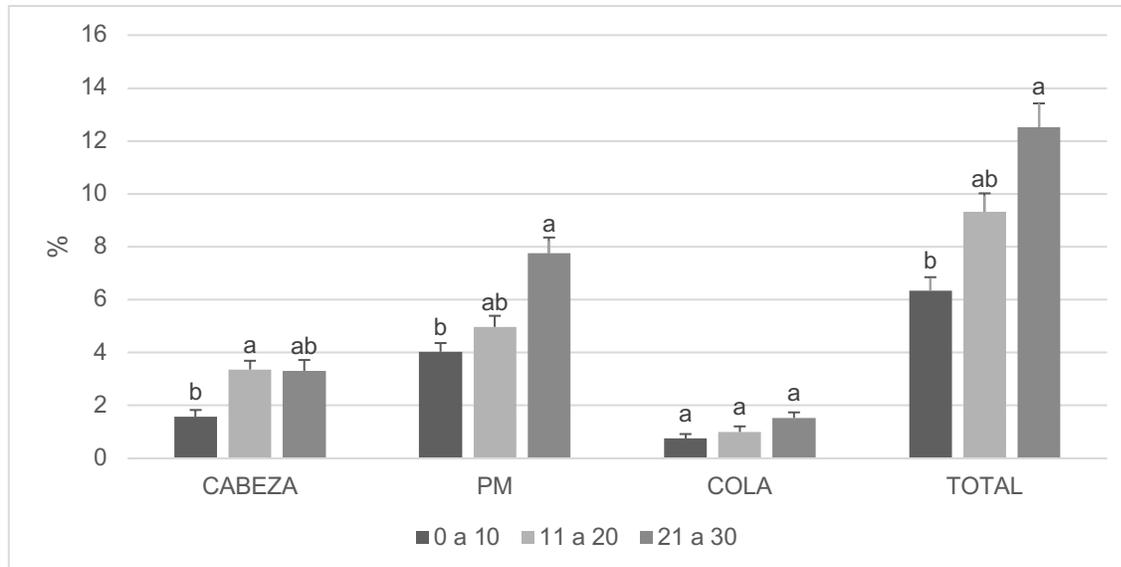
Temperaturas bajo cero dan como resultado que las células se deshidraten para compensar la mayor concentración de sal extracelular debido a la formación de hielo. En consecuencia, la concentración de sal intracelular aumenta y se produce un choque osmótico (efecto de solución) (Anzar et al., 2011). La reducción de la fertilidad del espermatozoide luego de la criopreservación es atribuida en gran parte a la alteración de la función y de la estructura de su membrana (Medeiros et al., 2002; Parks & Graham, 1992). Los daños causados son lesiones pequeñas que pueden ser acumulativas, resultando en importantes cambios, tanto en la membrana como en el citosol al final del proceso (Nicolas et al., 2012). Las alteraciones en el contenido y la ubicación de las proteínas, como los canales iónicos, son otra posible causa de deterioro de la función de la membrana después de la criopreservación (Hezavehei et al., 2018). Las diferencias se atribuyen a la sensibilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides a los flujos osmóticos que acompañan a la adición y eliminación de un crioprotector (Lisa M. Thurston et al., 2002). La temperatura y los efectos osmóticos tanto en la congelación como en la descongelación alteran el volumen de agua de los espermatozoides y los exponen a una alta concentración de sal, lo que les confiere un estrés mecánico considerable y es responsable de la asimetría en la integridad de la membrana plasmática (Noiles et al., 1995).

3.3. Morfología espermática

En la figura 3-3 se observa la morfología de los espermatozoides según su tiempo de almacenamiento. En la forma de la cabeza solo hubo diferencia significativa entre el grupo de 0-10 y 11-20 años ($p < 0.05$), en cuanto a la pieza media del espermatozoide hubo diferencia significativa entre el grupo de 0-10 y 21-30 años ($p < 0.05$), habiendo así mayor defecto cuando el tiempo de almacenamiento fue más prolongado. Con respecto a la cola no hubo diferencia significativa en los tres grupos ($p > 0.05$). Respecto a las alteraciones morfológicas totales, el grupo 1 resultó con menos alteraciones, luego el grupo 2 y por

último el 3, siendo evidente un efecto acumulativo de alteraciones morfológicas a mayor tiempo de almacenamiento. El proceso de congelación también causa criodañó morfológico, incluida una marcada hinchazón de la pieza intermedia del esperma rica en mitocondrias asociada con el desacoplamiento del metabolismo oxidativo, aumento de la producción de EROs y aumento de los cambios de tipo apoptótico (Salazar et al., 2011). Hay evidencia de que a largos periodos de almacenamiento puede resultar en una pérdida de proteínas de la superficie del esperma (Lessard et al., 2000). Los cambios osmóticos durante la criopreservación pueden causar daño a la membrana lipídica y fugas iónicas en las membranas plasmáticas resultando en cambios morfológicos (Sa-Ardrit et al., 2006). Una entrada de líquido no controlada en los espermatozoides pueden cambiar la osmolalidad celular y deformar la estructura de la membrana, alterando en consecuencia la morfología de los espermatozoides (O'Connell et al., 2002; Ozkavukcu et al., 2008). Los resultados del experimento de Rubio et al., 2009 demuestran que el proceso de congelación-descongelación afecta la integridad de las membranas, tanto a lo referente a morfología como funcionalidad. Sin embargo, se pudo demostrar como los espermatozoides de los diferentes toros evaluados, resisten de manera distinta los efectos detrimentales de la criopreservación. Así mismo, el estudio confirma que el daño criogénico puede ocurrir indistintamente sobre la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática.

Figura 3-3. Porcentaje de células espermáticas de toro con alteración morfológica según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.



Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Letras diferentes en las filas indican diferencia estadística para cada parámetro ($p < 0,05$). PM: Parte media.

En un estudio de Goshme et al., 2021, las anomalías morfológicas fueron del 5.4%, siendo similar al total de espermatozoides anormales del grupo de 0-10 años de almacenamiento en la presente investigación. En otro orden de ideas, se ha descrito que el daño criogénico sobre la cabeza y el flagelo espermático pueden ocurrir independientemente uno del otro (Zhu & Liu, 2000). Otro caso similar fue el estudio de Malik et al., 2015 donde utilizaron toros Holstein, para los cuales la anomalía de los espermatozoides descongelados no fue significativamente mayor en el almacenamiento durante 1, 2 y 3 años. Mientras que las anomalías aumentaron significativamente con el almacenamiento a los 4, 5 y 6 años con $17.63 \pm 0.19\%$, $19.38 \pm 0.24\%$ y $22.50 \pm 0.32\%$ respectivamente.

Caso contrario fue el estudio de Chrenek et al., 2017, donde se evaluó la morfología del semen de toros Pinzgau que se almacenaron en nitrógeno líquido durante diferentes períodos: menos de 8 años (grupo 1), 8 a 13 años (grupo 2) y 14 a 18 años (grupo 3). En cada grupo probado, la tasa promedio de espermatozoides malformados no superó el 20%. Otro caso donde no hubo diferencias fue en el estudio de Ghareeb et al., 2017, quienes evaluaron tres toros raza Brangus- Hereford con 1 y 2 semanas de criopreservación, y se

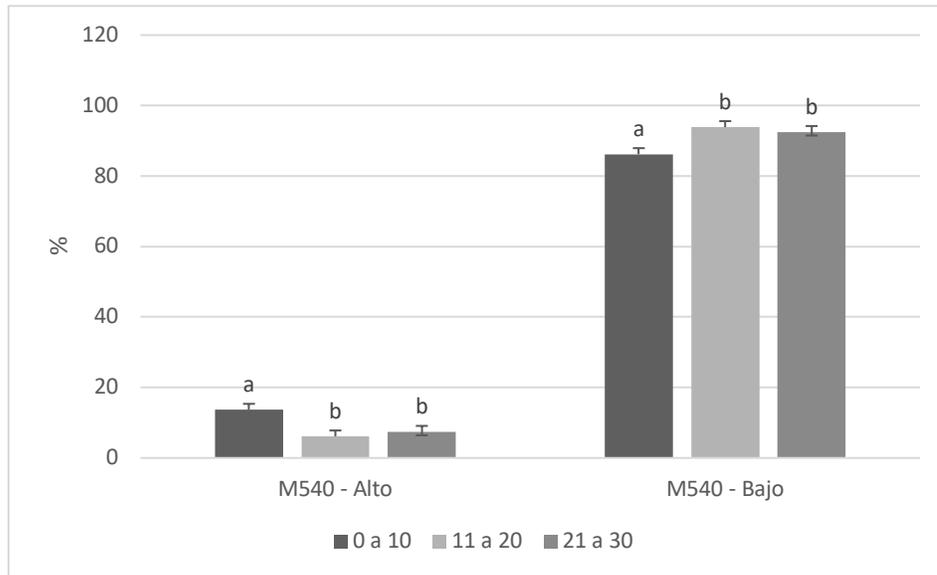
encontró que la apariencia morfológica anormal fue 11.61% y 11.97% para las semanas 1 y 2, respectivamente, sin ser significativamente diferentes. Además, en el estudio de Ahmed et al., 2019, con espermatozoides de búfalo frescos comparados con aquellos almacenados durante 24 horas, se encontraron anomalías de la cabeza de 3.50% vs 4.77% y anomalías en la cola 2.15% vs 3.71%, siendo significativo el aumento de las anomalías debido al proceso de congelación-descongelación.

Ha quedado claro que existe una amplia heterogeneidad de morfología no solo entre individuos sino entre espermatozoides del mismo eyaculado (Thurston et al., 1999). Cohen, 1973, sugirió que la variación en la morfología de los espermatozoides era el resultado de errores posteriores a la segregación en la meiosis, como la formación de quiasmas. Sin embargo la justificación fisiológica de porque ciertas subpoblaciones de espermatozoides con distintos tipos de morfología deberían correlacionarse con el resultado del protocolo de criopreservación (Thurston et al., 2002).

3.4 Estabilidad de la membrana plasmática

Para la población de espermatozoides con mayor desestabilización de la membrana plasmática (Merocianina 540 - Alto), se observó mayor porcentaje en el grupo de 0-10 años de almacenamiento. Igualmente, para la población de espermatozoides con menor desestabilización de la membrana plasmática (Merocianina 540 - Bajo), (por ejemplo podemos observar la distribución de Merocianina 540 en citometría de flujo en la figura 3.5), solo el primer grupo (0-10 años) fue diferente a los demás grupos de almacenamiento ($p < 0.05$) (Figura 3-4). De acuerdo con lo anterior, la desestabilización de la membrana como indicador de la capacitación espermática estaría indicando una posible alteración o cambio en el proceso de capacitación a causa del proceso de criopreservación o descongelación.

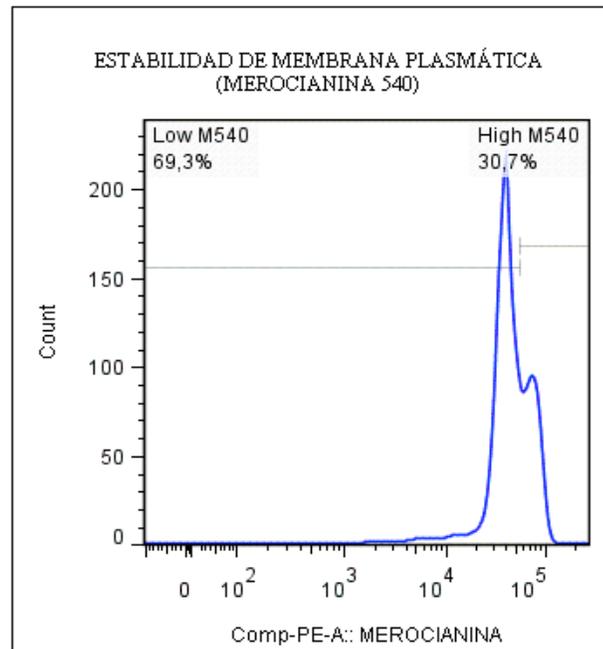
Figura 3-4. Porcentaje de células espermáticas de toro con alteración en la estabilidad de la membrana plasmática según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.



Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Letras diferentes en las filas indican diferencia estadística para cada parámetro ($p < 0,05$).

La citometría de flujo ofrece la posibilidad de medir objetivamente miles de células para múltiples características en poco tiempo con una preparación mínima (Graham et al., 1990). Durante la congelación convencional, se forma hielo a partir de la cristalización del agua y, a menudo, provoca daños en los tejidos y actúa sobre las estructuras celulares (Isachenko et al., 2003). Es probable que un deterioro tan drástico en la resistencia osmótica de la membrana espermática sea un factor que podría limitar la capacidad de fertilización de los espermatozoides congelados y descongelados después de un almacenamiento criogénico prolongado (Fraser et al., 2014). Dode & Rumpf, 2002 mencionan que las técnicas de reproducción asistida donde se evalúa la capacidad fecundante son, la inseminación artificial, transferencia de embriones, fecundación *in vitro* e inyección intra-citoplasmática de espermatozoides.

Figura 3-5. Ejemplo de la distribución de la población de células teñidas con Merocianina 540 en citometría de flujo.



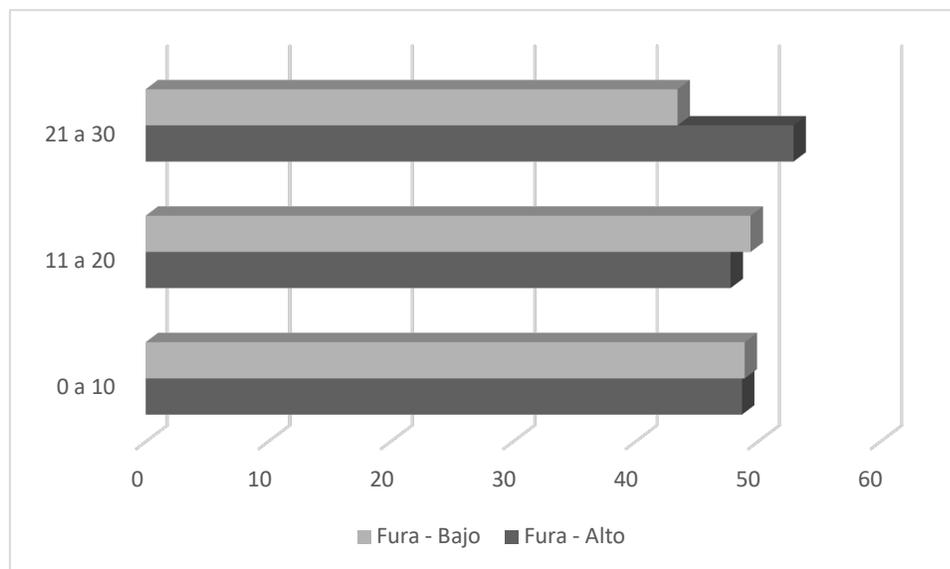
Los posibles daños a los espermatozoides después de varios años de almacenamiento a -196°C que se han sugerido son: daños genéticos, por ejemplo, anomalías en el ADN; producción de especies reactivas de oxígeno durante la congelación, lo que puede causar una reducción en la fluidez de la membrana del espermatozoide y disminuir la función del espermatozoide después de la crioconservación (Chatterjee & Gagnon, 2001); y pérdida de proteínas de la superficie del espermatozoide, que son necesarias para la fertilización, y podría ser el resultado de períodos largos y cortos de almacenamiento (Haugan et al., 2007).

3.5 Concentración de calcio intracelular

En la capacitación bovina el flujo inicial de calcio se utiliza para llenar un depósito de calcio intracelular ubicado en el acrosoma (Parrish et al., 1999), esta distribución diferencial de calcio intracelular puede ser responsable de los diferentes patrones de fosforilación de tirosina en la inducción de la capacitación bovina (Satorre & Córdoba, 2010), regulando la motilidad e hiperactividad de los espermatozoides (Ho & Suarez, 2001). En la figura 3-6 se

observa la fluorescencia de Fura-2 AM, donde no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$), para las poblaciones con bajo flujo de calcio (Fura-Bajo) y alto flujo de calcio (Fura-Alto) (cuyo ejemplo de distribución se puede observar en la figura 3.7), entre los grupos establecidos para el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, se observó una tendencia hacia la reducción de Fura-Bajo y el incremento de Fura-Alto de los espermatozoides, cuando hubo mayor tiempo de almacenamiento (21-30 años). Lo anterior, podría estar asociado con los efectos del almacenamiento sobre la integridad de la membrana plasmática y por ende del flujo de calcio a través de la membrana, al igual que sobre las rutas de capacitación espermática. Tras la incubación de las células con Fura-2/AM, molécula liposoluble, una vez alcanzado el interior celular, las esterasas hidrolizan dicha molécula a su forma hidrosoluble (FURA-2), la cual, al unirse al Ca^{2+} provoca la emisión de fluorescencia proporcional al Ca^{2+} , y permite su monitorización en tiempo real (Grynkiewicz et al., 1985).

Figura 3-6. Concentración intracelular de calcio en células espermáticas de toro según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.

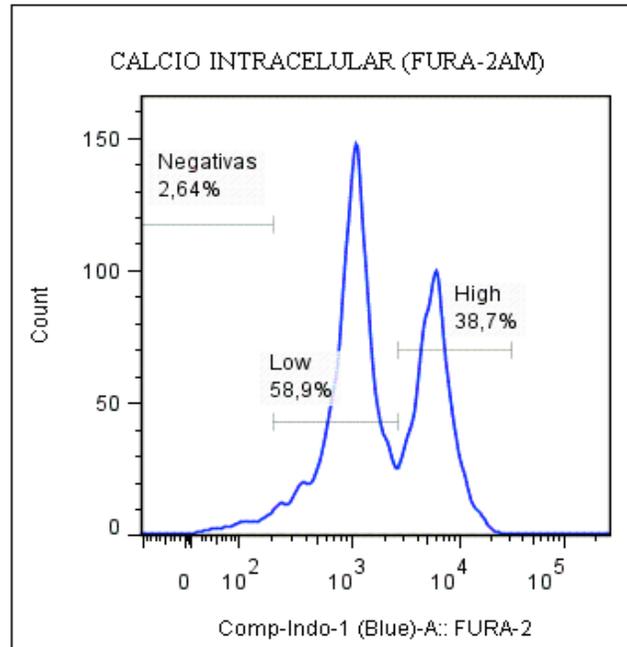


Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Ausencia de letras en las filas indican que no hay diferencia estadística para cada parámetro ($p < 0,05$).

En varias especies de mamíferos hay un aumento de la concentración de calcio intracelular durante la capacitación espermática, pero todos los mecanismos de regulación no han sido completamente dilucidado todavía (Satorre & Córdoba, 2010). Según datos de Satorre & Córdoba, 2010, la variación del calcio intracelular puede ser un punto crucial relacionado con la fosforilación de tirosina, el metabolismo y señales de apoptosis para permitir la inducción de la capacitación.

El choque frío altera la permeabilidad selectiva de la membrana espermática al calcio elevando el nivel de calcio intracelular durante la capacitación y la hiperactivación (Parrish et al., 1999), provocado por la adenil ciclasa y la proteína quinasa que son activadas por EROs, el producto de esta enzima es cAMP intracelular lo suficiente como para desencadenar los mecanismos involucrados en la capacitación de los espermatozoides (Breitbart, 2002; Pommer et al., 2003). Los cambios similares a la capacitación en los espermatozoides se inducen debido a la pérdida de colesterol de la membrana (Neild et al., 2003).

Figura 3-7. Ejemplo de la distribución de la población de células que reaccionan con Fura-2 AM en citometría de flujo.

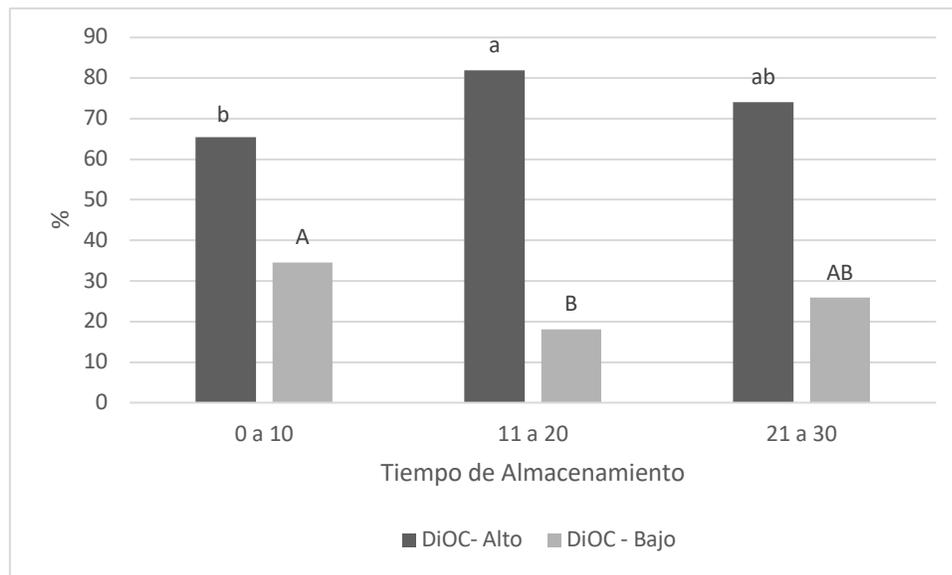


3.6 Actividad mitocondrial

Durante la crioconservación se interrumpen las interacciones lípido-proteína y, por tanto, las proteínas ya no actúan eficientemente como enzimas, receptores o canales iónicos (Lemma, 2011). Investigadores demostraron que las proteínas axonémicas, como las dineínas, las tubulinas y las proteínas de choque térmico, así como las proteínas mitocondriales, como la succinato deshidrogenasa y las ATP sintasas, son objetivos comunes de los peróxidos lipídicos, lo que afecta negativamente a la actividad de la cadena de transporte de electrones (R. Aitken et al., 2015). La cadena de transporte de electrones es un componente esencial de la fosforilación oxidativa mitocondrial involucrada en la producción de ATP (Peris-Frau et al., 2020). En los resultados del presente estudio (figura 3-8), se encontró que para la población de espermatozoides con actividad mitocondrial alta (DiOC-Alto), el grupo de almacenamiento de 11-20 años fue mayor respecto al grupo de 0-10 años ($p < 0.05$), pero sin diferencia estadística con el grupo de 21-30 años ($p > 0.05$).

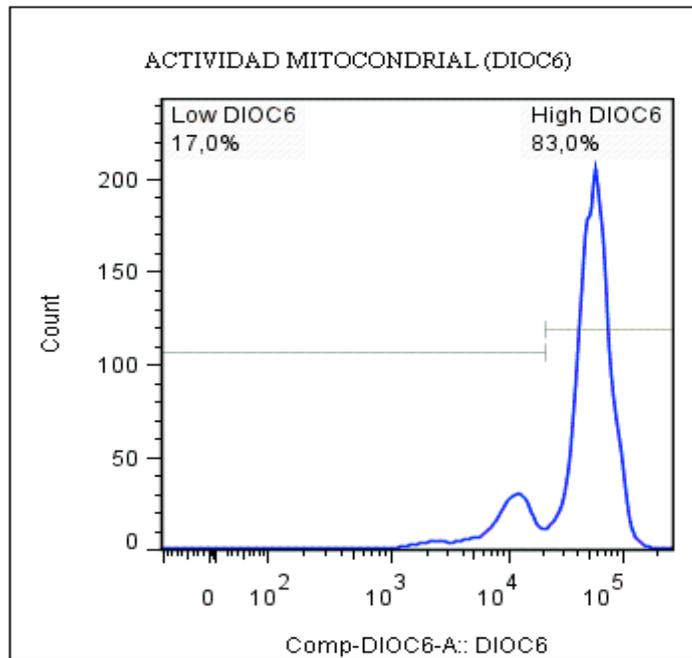
En cambio, para la población de espermatozoides con actividad mitocondrial baja (DiOC-Bajo), el grupo de 0-10 años no fue diferente al grupo de 21-30 años ($p > 0.05$), pero fue mayor al grupo 11-20 años ($p < 0.05$). DiOC es un colorante fluorescente verde, lipofílico, que detecta el potencial de membrana mitocondrial mediante la acumulación en la matriz mitocondrial debido a su potencial negativo de membrana (Chang et al., 2013).

Figura 3-8. Porcentaje de células espermáticas de toro con alta o baja actividad mitocondrial según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.



Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Letras diferentes (a, b) indican diferencia estadística para DiOC-Alto ($p < 0,05$). Letras diferentes (A, B) indican diferencia estadística para DiOC-Bajo ($p < 0,05$).

Figura 3-9. Ejemplo de la distribución de actividad mitocondrial por citometría de flujo.



En un estudio Ahmed et al., 2019, evaluaron el efecto de la criopreservación durante 24 horas sobre el potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides de búfalo, con valores de $80,5 \pm 1.3\%$ vs $44.9 \pm 0.7\%$ (evaluado con el colorante JC-1) entre el semen fresco y el criopreservado, siendo similar a los resultados de la presente investigación, donde hubo diferencias entre los grupo de 0-10 y 11-20 años. Igualmente en un estudio de Prihantoko et al., 2020, se encontró un valor significativamente diferente para la actividad mitocondrial de 64,24% para el primer mes y 49,12% luego de 3 años de almacenamiento. Se ha sugerido, que la motilidad, la integridad de la membrana y la función mitocondrial se ven afectadas de manera similar por la crioconservación (Henry et al., 1993).

En presencia de un alto potencial $\Delta\Psi$, JC-1 forma los llamados agregados que están asociados con un gran cambio en la emisión (590 nm) (Reers et al., 1991). Este método citofluorimétrico es tanto cualitativo como cuantitativo; permite la identificación de poblaciones con diferente contenido de mitocondrias; ya se ha utilizado para estudiar el comportamiento de estos orgánulos en una variedad de condiciones, incluida la apoptosis. Thomas et al., 1998, evaluaron los efectos de la criopreservación sobre la función

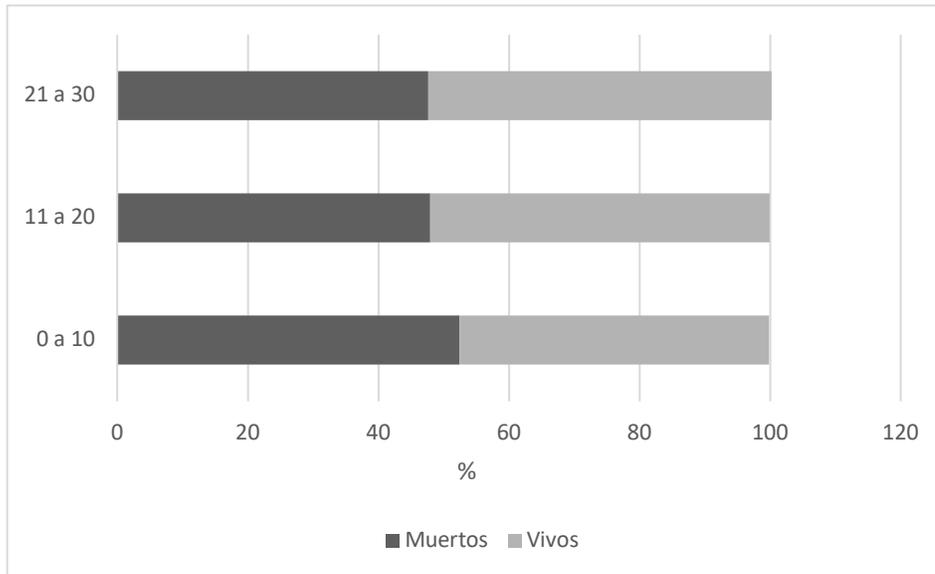
mitocondrial de eyaculados de 12 toros de la raza Holstein con 24 horas de almacenamiento, los porcentajes medios de agregados de JC-1 para los toros 6, 7 y 8 fueron 12,9 %, 30,9 % y 58,6 %, respectivamente. Después de la crioconservación, estos valores se redujeron a 0,5%, 1,3% y 0,9%, respectivamente.

Las principales características apoptóticas de los espermatozoides son la disminución del potencial de la membrana mitocondrial, la activación de la caspasa, la reducción del volumen celular, la fragmentación del ADN y el aumento de la permeabilidad de la membrana (Di Santo et al., 2012).

3.7 Viabilidad espermática

En cuanto a la viabilidad de los espermatozoides se observa en la figura 3-10 que no existió una relación clara del tiempo de almacenamiento con la proporción de espermatozoides vivos, al no encontrarse diferencias significativas ($p>0.05$).

Figura 3-10. Porcentaje de células espermáticas de toro vivas o muertas según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.

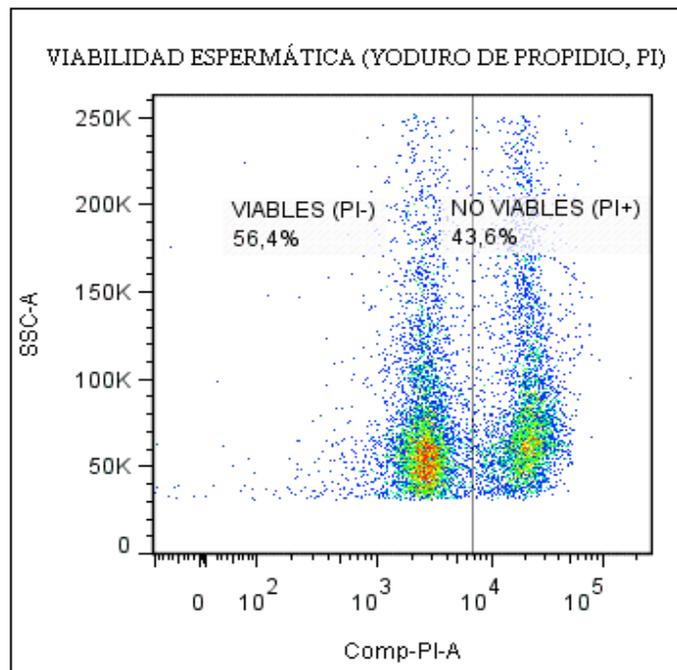


Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Ausencia de letras en las filas indican que no hay diferencia estadística para cada parámetro ($p > 0,05$).

El daño a la membrana plasmática durante los procesos de congelación y descongelación es causado por la peroxidación lipídica en los espermatozoides que han estado almacenados por mucho tiempo, disminuyendo la viabilidad y afectando la conservación del semen para la inseminación artificial (Prihantoko et al., 2020). Estos mismos autores realizaron un estudio sobre el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la viabilidad del semen sometido 3 años a -196°C ; encontrando un valor de 62,75% para primer mes, con una reducción hasta el 41,56% después de 3 años. Crister et al., (1987) observaron que los espermatozoides descongelados motiles, con membranas intactas no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco. James et al., 2002 evaluaron la viabilidad de los espermatozoides después del almacenamiento del epidídimo de los caballos a 5°C durante un máximo de 96 horas. En este estudio, no hubo diferencia en el porcentaje de motilidad progresiva e integridad de la membrana después del almacenamiento a 5°C , similar a los presentes resultados. En el estudio de Malik et al., 2015 la viabilidad de los espermatozoides descongelados no disminuyó significativamente entre el almacenamiento de 1 año y 2 años con 80.63% y 75.88% respectivamente. Mientras que la viabilidad fue significativamente diferente con el

almacenamiento a los 3, 4, 5 y 6 años con 72.88%, 70.25%, 68.88% y 64.50%, siendo diferente con los resultados de esta investigación.

Figura 3-11. Ejemplo de la distribución de células vivas y muertas en citometría de flujo.



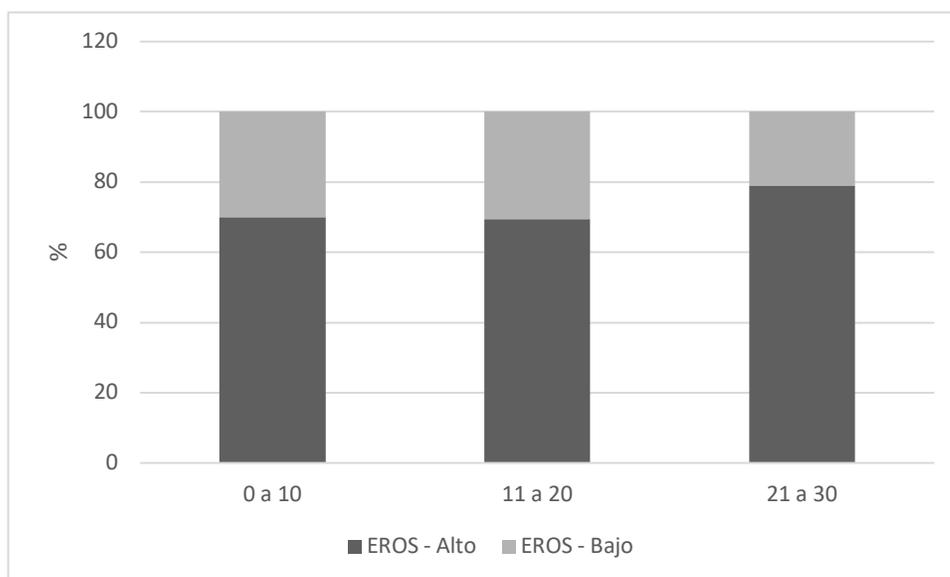
Las sustancias potencialmente tóxicas liberadas por los espermatozoides muertos, los neutrófilos y los macrófagos afectan a los espermatozoides que sobreviven criogénicamente, aumentando aún más su nivel y, finalmente, conducen a una disfunción espermática (Gomez et al., 1998).

3.8 Producción de especies reactivas de oxígeno

En general, se ha informado que la criopreservación de espermatozoides induce un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, sobreproducción de EROs, reducción y deterioro del potencial de la membrana mitocondrial, daño acrosomal y menor motilidad de los espermatozoides de los toros (Khalil et al., 2018; Yoon et al., 2015). Así mismo, se ha demostrado en espermatozoides de ovinos (Peris et al., 2007) y bovinos

(Bilodeau et al., 2000), que los niveles de EROs aumentan significativamente durante el proceso de criopreservación. Estos niveles elevados podrían tener un rol importante en la disminución de la función espermática durante el proceso de criopreservación (Kim et al., 2010; Lone et al., 2017), a través de la peroxidación de lípidos, y luego, mediante apoptosis y muerte celular (Moustafa et al., 2004). En esta investigación, no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos de almacenamiento ($p > 0.05$) (figura 3-12), aunque el grupo de 21-30 años de almacenamiento, mostró una tendencia numérica hacia una mayor proporción de células con alta producción de EROs (cercana a un 10% superior), respecto a los demás grupos.

Figura 3-12. Producción de especies reactivas de oxígeno en células espermáticas de toro según el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido.

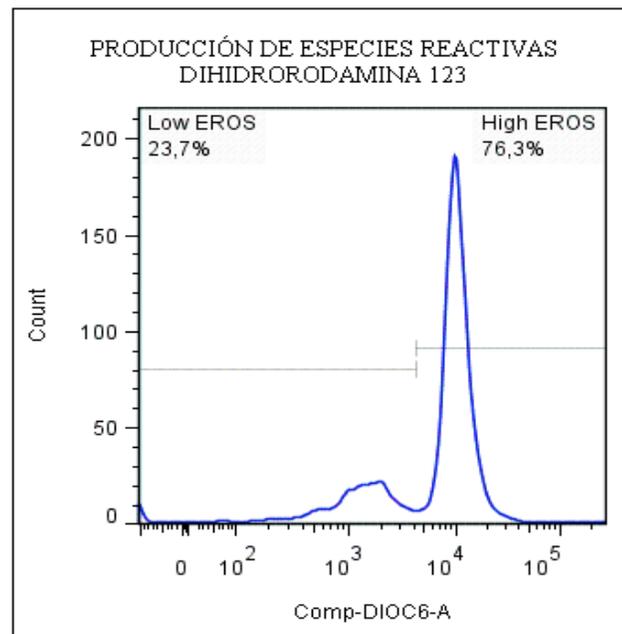


Los resultados se presentan como media \pm error estándar de la media (SEM). Ausencia de letras en las filas indican que no hay diferencia estadística para cada parámetro ($p < 0,05$).

En un estudio de Akyol et al., 2018, se evaluó semen de toro de la raza Pardo Suizo con 2 y 30 años de almacenamiento en nitrógeno líquido, con resultados en el aspecto oxidativo que mostraron mayor proporción de células alteradas a largo plazo en comparación con el de corto plazo (7.45% vs 1.34%).

Heinrich & Bittner, 2018 examinaron el semen congelado-descongelado de nueve toros Holstein-Friesian y detectaron diferencias de la capacidad antioxidante total en plasma seminal entre los toros. La incorporación de antioxidantes en el medio de criopreservación podría ser una forma de investigación para mejorar la eficiencia de la criopreservación de espermatozoides bovinos (Martin et al., 2007).

Figura 3-13. Ejemplo de la distribución de células según la producción de EROs por citometría de flujo.



3.9 Análisis de regresión por parámetro según el tiempo de almacenamiento y regresión por parámetro y toro según el tiempo de almacenamiento

Tabla 3-2. Análisis de regresión por parámetro según el tiempo de almacenamiento

Parámetro	$\beta 0$	$\beta 1$	R^2	p
MT	73.34	-0.76	0.090	0.010
MP	44.85	-0.43	0.050	0.048
VCL	124.77	-0.04	0.000	0.941
VAP	69.90	0.17	0.004	0.566
VSL	60.65	-0.04	0.000	0.804
ALH	6.06	0.002	0.000	0.919
BCF	25.38	-0.04	0.002	0.651
HOST	59.02	-0.63	0.090	0.009
CAB	2.50	0.04	0.009	0.426
PM	0.78	0.29	0.190	0.000
COLA	0.13	0.05	0.050	0.054
MA	3.51	0.38	0.150	0.000

$\beta 0$: Intercepto. $\beta 1$: coeficiente de regresión. R^2 : Coeficiente de determinación del modelo de regresión. p: valor P. Los resultados con valores p menores a 0.05 indican significancia estadística. MT: movilidad total. MP: movilidad progresiva. VCL: Velocidad curvilínea, VAP: Velocidad media, VSL: Velocidad rectilínea, ALH: Desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: Frecuencia de batido. HOST: integridad funcional de membrana. CAB: anomalías de la cabeza. PM: anomalías de la pieza media. COLA: anomalías de la cola. MA: espermatozoides anormales totales.

El análisis de regresión arrojó coeficientes de regresión significativos y negativos para los parámetros MT, MP y HOST ($p < 0.05$), lo cual indica una reducción en la magnitud estimada en cada parámetro por efecto de cada año de almacenamiento en nitrógeno líquido. Por otro lado, se hallaron coeficientes de regresión significativos y positivos para PM, MA ($p < 0.05$), mostrando un incremento en las alteraciones morfológicas en general y de la pieza media con el incremento del tiempo de almacenamiento. Como menciona Nicolas et al., 2012, estos daños son lesiones pequeñas que pueden ser acumulativas con el tiempo tanto en la membrana como en el citosol desencadenando pérdida de su función al final del proceso. El presente estudio lo podemos relacionar con la investigación de Sullivan & Mixner, 1963, donde la motilidad previa a la congelación fue del 72.5% y mostró una disminución lineal de 1.33 unidades porcentuales por cada tres meses de almacenamiento a -196°C .

De acuerdo con el análisis de regresión, los parámetros de VCL, VAP, VSL, ALH, BCF, CAB y COLA no presentaron alteraciones significativas por tiempo de almacenamiento ($p > 0.05$). Se ha descrito que el daño criogénico sobre la cabeza y la cola del espermático pueden ocurrir independientemente uno del otro (Zhu & Liu, 2000).

Tabla 3-3. Análisis de regresión por parámetro y toro según el tiempo de almacenamiento

Parámetro	Toro 1				Toro 2				Toro 3			
	$\beta 0$	$\beta 1$	R ²	p	$\beta 0$	$\beta 1$	R ²	p	$\beta 0$	$\beta 1$	R ²	p
MT	6.00	4.68	0.32	0.050	109.62	-2.18	0.03	0.560	130.72	-3.64	0.14	0.150
MP	-12.91	4.43	0.60	0.002	34.75	0.00	0.00	1.000	57.96	-1.09	0.01	0.650
VCL	186.93	-3.87	0.37	0.033	-1.01	5.24	0.16	0.180	282.43	-8.22	0.17	0.102
VAP	97.46	-1.33	0.29	0.060	-19.16	3.84	0.28	0.070	132.19	-3.11	0.09	0.230
VSL	63.96	0.05	0.0005	0.942	-15.51	3.09	0.30	0.065	66.34	-0.41	0.003	0.828
ALH	8.60	-0.17	0.72	0.000	2.28	0.15	0.07	0.400	17.23	-0.55	0.37	0.011
BCF	20.33	0.55	0.11	0.270	-9.00	1.36	0.15	0.201	-0.06	1.25	0.09	0.250
HOST	-14.33	6.00	0.67	0.001	77.25	-1.37	0.04	0.530	216.34	-8.61	0.60	0.0004
CAB	8.50	-0.31	0.05	0.480	-30.62	1.43	0.29	0.065	8.76	-0.30	0.09	0.253
PM	6.16	0.06	0.002	0.876	-25.87	1.43	0.31	0.050	26.02	-1.10	0.31	0.022
COLA	-2.83	0.37	0.15	0.202	-1.25	0.12	0.01	0.711	4.48	-0.19	0.04	0.415
MA	11.83	0.12	0.01	0.710	-54.75	2.87	0.46	0.014	39.27	-1.60	0.29	0.020

Parámetro	Toro 4				Toro 5			
	$\beta 0$	$\beta 1$	R ²	p	$\beta 0$	$\beta 1$	R ²	p
MT	-11.5	3.25	0.12	0.110	68.03	0.10	0.001	0.960
MP	25.96	0.38	0.003	0.804	22.67	1.66	0.09	0.320
VCL	-20.23	6.83	0.11	0.150	-17.21	11.56	0.66	0.001
VAP	58.84	0.64	0.005	0.750	-34.72	8.79	0.34	0.045
VSL	99.78	-1.98	0.13	0.104	26.22	2.71	0.40	0.026
ALH	-7.14	0.63	0.32	0.008	1.73	0.35	0.56	0.004
BCF	84.22	-2.95	0.63	0.0001	16.72	0.53	0.16	0.188
HOST	37.26	0.28	0.004	0.777	86.42	-3.58	0.55	0.005
CAB	7.90	-0.27	0.046	0.360	-2.25	0.37	0.10	0.314
PM	-10.55	0.84	0.10	0.169	3.07	-0.03	0.002	0.890
COLA	-1.12	0.12	0.01	0.590	-1.28	0.14	0.14	0.220
MA	-3.35	0.67	0.04	0.390	-0.46	0.48	0.09	0.331

B0: Intercepto. $\beta 1$: coeficiente de regresión. R²: Coeficiente de determinación del modelo de regresión. p: valor P. Los resultados con valores p menores a 0.05 indican significancia estadística.
 $\beta 0$: Intercepto. $\beta 1$: coeficiente de regresión. R²: Coeficiente de determinación del modelo de regresión. p: valor P. Los resultados con valores p menores a 0.05 indican significancia estadística.
 MT: movilidad total. MP: movilidad progresiva. VCL: Velocidad curvilínea, VAP: Velocidad media, VSL: Velocidad rectilínea, ALH: Desplazamiento lateral de la cabeza, BCF: Frecuencia de batido. HOST: integridad funcional de membrana. CAB: anomalías de la cabeza. PM: anomalías de la pieza media. COLA: anomalías de la cola. MA: espermatozoides anormales totales.

En el análisis de regresión por individuo vale la pena resaltar el hallazgo de la alteración significativa con el tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$) en algunos parámetros cinéticos no observados en el análisis de regresión global, como el caso de la reducción observada (coeficientes de regresión negativos) para VCL, VAP y ALH del toro 1, ALH en el toro 3 y BCF del toro 4; mientras que otros individuos mostraron incluso un incremento significativo de algunos parámetros cinéticos ($p > 0.05$), como ALH para el toro 4 y VCL, VSL, VAP y ALH para el toro 5. Por otro lado, mientras los toros 2, 3 y 4 mostraron una alteración de la morfología espermática más consistente para los diferentes parámetros evaluados ($P < 0.05$), los toros 1 y 5 no mostraron alteraciones morfológicas significativas ($P > 0.05$). Para el parámetro HOST igualmente se observó un comportamiento diferencial por individuo. Por lo tanto, puede considerarse que el efecto del individuo es bastante relevante en la tolerancia de los espermatozoides al tiempo de almacenamiento.

Ramírez et al., 2016, analizaron dosis de semen de la raza Holstein con intervalos de 1, 10, 25, 40 y 45 años de almacenamiento, y en su caso, el análisis comparativo de la motilidad total de los espermatozoides no mostró diferencias significativas entre los tiempos de almacenamiento analizados, mientras que los valores más bajos de hiperactivación, ALH y BCF se observaron en el semen almacenado durante 40 años.

4 Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

La movilidad y la cinética de los espermatozoides bovinos está influenciada por los largos periodos de almacenamiento en nitrógeno líquido, con una tendencia global hacia la reducción de algunos parámetros específicos, pero con una respuesta altamente dependiente del individuo del cual provienen las muestras seminales.

La funcionalidad de la membrana plasmática se ve afectada por los largos periodos de almacenamiento del semen bovino en condiciones de criopreservación. Así mismo, a mayor tiempo de almacenamiento del semen bovino en nitrógeno líquido, mayor es el daño provocado en la morfología de los espermatozoides, siendo la cabeza y la pieza media, las estructuras que presentan mayor grado de alteraciones.

La estabilidad de la membrana plasmática, el flujo de calcio intracelular y la actividad mitocondrial de los espermatozoides como indicadores asociados a la capacitación y el metabolismo espermático, sufren modificaciones atribuibles al efecto de largos periodos de almacenamiento en nitrógeno líquido.

La viabilidad y la producción de EROs de los espermatozoides bovinos no muestran una asociación significativa con el tiempo de almacenamiento de los espermatozoides en condiciones de criopreservación, no obstante, se observa un incremento aparente de las EROs del semen almacenado por periodos superiores a 20 años en nitrógeno líquido.

Recomendaciones

Se recomienda una evaluación exhaustiva de los diferentes aspectos de la crioconservación, como las variables criogénicas tales como la temperatura de almacenamiento o uso de los diferentes crioprotectores, los protocolos de congelación, los determinantes biológicos como la edad del animal, condición nutricional o el uso de diluyentes a base de yema de huevo ya que puede afectar la viabilidad espermática y genéticos como la raza junto con la aplicación de una metodología avanzada de pruebas para identificar y contrarrestar dicho deterioro.

Realizar más estudios relacionados con el tiempo de almacenamiento a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ sobre el metabolismo de los espermatozoides bovinos y como este puede afectar su función. Existe una serie de técnicas avanzadas de detección del genoma que podrían aplicarse para investigar la influencia de la variación genética en la capacidad de congelación del semen, como un locus de rasgo cualitativo (QTL) para identificar genes que podrían desempeñar un papel en la capacidad de los espermatozoides para sobrevivir a la criopreservación. O bien la identificación de varios marcadores de congelabilidad y proteínas específicas que podrían agregarse a los diluyentes de semen antes de la crioconservación para mejorar la criosupervivencia de los espermatozoides.

5 Bibliografía

- Abdelhafez, F., Bedaiwy, M., El-Nashar, S. A., Sabanegh, E., & Desai, N. (2009). Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: A systematic review. *Human Reproduction Update*, *15*(2), 153–164. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn061>
- Adamkovicova, M., Toman, R., Martiniakova, M., Omelka, R., Babosova, R., Krajcovicova, V., Grosskopf, B., & Massanyi, P. (2016). Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0177-6>
- Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. In *American Journal of Reproductive Immunology* (Vol. 59, Issue 1, pp. 2–11). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x>
- Agarwal, A., Nallella, K. P., Allamaneni, S. S. R., & Said, T. M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: An overview of the literature. In *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 8, Issue 6, pp. 616–627). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61641-0](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61641-0)
- Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, E. J., Liu, J., & Critser, J. K. (2002). Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biology of Reproduction*, *67*(5), 1493–1501. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005579>
- Ahmed, H., Andrabi, S. M. H., Shah, S. A. H., & Jahan, S. (2019). Effect of Cryopreservation on Casa Characteristics, Mitochondrial Transmembrane Potential, Plasma and Acrosome Integrities, Morphology and in vivo Fertility of Buffalo Bull Spermatozoa. *Cryo Letters*, *40*(3), 173–180. <https://www.researchgate.net/publication/334139982>
- Aitken, R., Baker, M., & Nixon, B. (2015). Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian Journal of Andrology*, *17*(4), 633. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153850>
- Aitken, R. J., & Clarkson, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Reproduction*, *81*(2), 459–469. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810459>

- Aitken, R. John, Gibb, Z., Mitchell, L. A., Lambourne, S. R., Connaughton, H. S., & De Iuliis, G. N. (2012). Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biology of Reproduction*, *87*(5), 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102020>
- Akyol, N., Varisli, O., & Kızıl, S. (2018). Effects of long-term storage on some spermatological parameters in cryopreserved bull semen. *Cryo-Letters*, *39*, 354–358.
- Albrizio, M., Moramarco, A. M., Nicassio, M., Micera, E., Zarrilli, A., & Lacalandra, G. M. (2015). Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. *Theriogenology*, *83*(3), 421–429. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.005>
- Amaral, A., Castillo, J., Estanyol, J. M., Balleca, J. L., Ramalho-Santos, J., & Oliva, R. (2013). Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Molecular and Cellular Proteomics*, *12*(2), 330–342. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.020552>
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, *61*(5), 895–907. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00259-0)
- Anzar, M., Kroetsch, T., & Boswall, L. (2011). Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. *Animal Reproduction Science*, *126*(1–2), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.04.018>
- Arav, A. (1999). *Device and methods for multigradient directional cooling and warming of biological samples*.
- Arbaiza-Barnechea, M. D., & Cabrera-Villanueva, P. C. (2021). Efecto de la criopreservación espermática en la fragmentación del ADN, viabilidad, y parámetros cinéticos en toros Brown Swiss. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, *13*(1), e787. <https://doi.org/10.24188/recia.v13.n1.2021.787>
- Arenas Ríos, E., Rodríguez Tobón, A., López Trinidad, B. P., Retana Sandoval, F. M., Rodríguez Tobón, E., Jimenez Salazar, J. E., & León-Galván, M. A. (2014). Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, *1*(7), 73–81.
- Ashwood-Smith, M. J., & Friedmann, G. B. (1979). Lethal and chromosomal effects of freezing, thawing, storage time, and x-irradiation on mammalian cells preserved at -196 ° in dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, *16*(2), 132–140. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(79\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(79)90023-3)
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Minireview: Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. In *Journal of Andrology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 1–7). <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>

- Bailey, J., Morrier, A., & Cormier, N. (2003). Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. In *Canadian Journal of Animal Science* (Vol. 83, Issue 3, pp. 393–401). <https://doi.org/10.4141/A03-024>
- Baker, M. A., Nixon, B., Naumovski, N., & Aitken, R. J. (2012). Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. In *Systems Biology in Reproductive Medicine* (Vol. 58, Issue 4, pp. 211–217). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.639844>
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. In *Veterinary Medicine International* (Vol. 2011). <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
- Barkawi, A. H., Elsayed, E. H., Ashour, G., & Shehata, E. (2006). Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Ruminant Research*, 66(1–3), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.09.007>
- Baumber, J., Ball, B. A., & Linfor, J. J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, 66(5), 772–779. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.772>
- Bean, B. H., Pickett, B. W., & Martig, R. C. (1963). Influence of Freezing Methods, Extenders, and Storage Temperatures on Motility and pH of Frozen Bovine Semen. *Journal of Dairy Science*, 46(2), 145–149. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(63\)88990-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(63)88990-0)
- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., & Guérin, J. F. (2003). Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, 18(5), 1023–1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg228>
- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338–1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- Bilodeau, J.-F., Chatterjee, S., Sirard, M.-A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3), 282–288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7)
- Bollwein, H, Fuchs, I., & Koess, C. (2008). Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2), 189–195. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00876.x>
- Bollwein, Heinrich, & Bittner, L. (2018). Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. *Animal Reproduction*, 15(Irrs), 703–710. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0041>
- Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.

- General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134(3), 707–716. <https://doi.org/10.1042/bj1340707>
- Bratton, R. W., Foote, R. H., & Cruthers, J. C. (1955). Preliminary Fertility Results with Frozen Bovine Spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 38(1), 40–46. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(55\)94935-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(55)94935-3)
- Braun, J., Schams, D., & Brem, G. (1990). Zur Fortpflanzungsfunktion bei experimentell erzeugten monozygoten Zwillingsbullen. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 103(6), 213–217. <https://europepmc.org/article/med/2383230>
- Breitbart, H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00704-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00704-3)
- Brinsko, S. P., Crockett, E. C., & Squires, E. I. (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, 54, 129–138.
- Brown, K. H. (2008). Fish mitochondrial genomics: Sequence, inheritance and functional variation. In *Journal of Fish Biology* (Vol. 72, Issue 2, pp. 355–374). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01690.x>
- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., & Yüce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, 75(2–3), 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.09.002>
- Buch, N. C., Smith, V. R., & Tyler, W. J. (1956). Bull and Line Differences in the Survival of Spermatozoa after Freezing and Thawing. *Journal of Dairy Science*, 39(12), 1712–1716. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(56\)94913-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(56)94913-X)
- Cabrera V., P., & Pantoja A., C. (2012). Viabilidad Espermatocaria e Integridad del Aceosoma en Semen Congelado de Toros Nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(2), 192–200. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.899>
- Carmody, R. J., & Cotter, T. G. (2001). Signalling apoptosis: A radical approach. In *Redox Report* (Vol. 6, Issue 2, pp. 77–90). <https://doi.org/10.1179/135100001101536085>
- Catena, M. Y. J. C. (1999). Evaluación de semen bovino congelado. *Engormix.Com*, 1(1), 1–9. http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/genetica/articulos/evaluacion-semen-bovino-congeleado-t4454/103-p0.htm%5Cnhttps://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:-xj1-1HUNAgJ:www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/05-evalua
- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-Berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F., & Drevet, J. R. (2010). Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *Journal of Animal Science*, 88(4), 1321–1331. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2583>
- Chabory, Eléonore, Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., Schoor, M., Gottwald, U., Habenicht, U.,

- Drevet, J. R., & Vernet, P. (2009). Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(7), 2074–2085. <https://doi.org/10.1172/jci38940>
- Chang, H.-Y., Huang, H.-C., Huang, T.-C., Yang, P.-C., Wang, Y.-C., & Juan, H.-F. (2013). Flow Cytometric Detection of Mitochondrial Membrane Potential. *BIO-PROTOCOL*, 3(8). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.430>
- Chatterjee, S., & Gagnon, C. (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, 59(4), 451–458. <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>
- Chen, X., Zhu, H., Hu, C., Hao, H., Zhang, J., Li, K., Zhao, X., Qin, T., Zhao, K., Zhu, H., & Wang, D. (2014). Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Reproduction*, 147(3), 321–330. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0313>
- Chrenek, P., Spaleková, E., Olexikova, L., Makarevich, A., & Kubovicova, E. (2017). Quality of Pinzgau bull spermatozoa following different periods of cryostorage. *Zygote*, 25(2), 215–221. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000077>
- Cohen, J. (1973). Cross-overs, sperm redundancy and their close association. *Heredity*, 31(3), 408–413. <https://doi.org/10.1038/hdy.1973.96>
- Collin, F. (2019). Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 10, p. 2407). Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/ijms20102407>
- Córdova, A., Strobel, P., Vallejo, A., Valenzuela, P., Ulloa, O., Burgos, R. A., Menarim, B., Rodríguez-Gil, J. E., Ratto, M., & Ramírez-Reveco, A. (2014). Use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm: Presence and sensitivity of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cryobiology*, 69(3), 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.10.008>
- Coulter, G. H., & Foote, R. H. (1973). Sperm changes during processing in straws. *J. Anim. Sci.*, 37(306).
- Crespilho, A. M., Papa, F. O., Zahn, F. S., Guasti, P. N., & Dell'Aqua, J. A. (2009). Influence of Different Preservation Methods on Fertility of Bovine Semen. *Biology of Reproduction*, 81(1), 459–459. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/81.s1.459>
- Critser, J. K., Arneson, B. W., Aaker, D. V., Huse-Benda, A. R., & Ball, G. D. (1987). Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertility and Sterility*, 47(6), 980–984. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59233-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59233-4)
- Curry, M. R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*, 5, 46–52. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2193-5_10
- 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)

- Darr, C. R., Varner, D. D., Teague, S., Cortopassi, G. A., Datta, S., & Meyers, S. A. (2016). Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS production. *Biology of Reproduction*, *95*(2), 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140707>
- Davis, R. O., & Gravance, C. G. (1994). Consistency of Sperm Morphology Classification Methods. *Journal of Andrology*, *15*(1), 83–91. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1994.tb01690.x>
- De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1995). Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: A balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction*, *10*(SUPPL. 1), 15–21. https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl_1.15
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., & Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, *2*(1), 48–54.
- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, *30*(1), 32–44. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1005>
- Devenish, R. J., Prescott, M., & Rodgers, A. J. W. (2008). The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 267, pp. 1–58). [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00601-1](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00601-1)
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. In *Advances in Urology* (pp. 1–12). <https://doi.org/10.1155/2012/854837>
- Díaz, R., Lee-Estevez, M., Quiñones, J., Dumorné, K., Short, S., Ulloa-Rodríguez, P., Valdebenito, I., Sepúlveda, N., & Farías, J. G. (2019). Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm morphology and membrane lipid composition related to cold storage and cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, *204*, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.004>
- Dode, M. A. N., & Rumpf, R. (2002). Produção in vitro de embriões na espécie bovina. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, *26*, 32–37.
- Du Plessis, S. S., Makker, K., Desai, N. R., & Agarwal, A. (2008). Impact of oxidative stress on IVF. In *Expert Review of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 3, Issue 4, pp. 539–554). <https://doi.org/10.1586/17474108.3.4.539>
- Dunn, H. O., & Hafs, H. D. (1953). Extenders and techniques for freezing bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, *36*(6), 577–577.
- Duru, N. K., Morshedi, M. S., Schuffner, A., & Oehninger, S. (2001). Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *Journal of Andrology*, *22*(4), 646–651. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02225.x>
- Ensslin, M., Vogel, T., Calvete, J. J., Thole, H. H., Schmidtke, J., Matsuda, T., & Töpfer-

- Petersen, E. (1998). Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. *Biology of Reproduction*, *58*(4), 1057–1064. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.4.1057>
- Evans, J. P., Kopf, G. S., & Schultz, R. M. (1997). Characterization of the binding of recombinant mouse sperm fertilin β subunit to mouse eggs: Evidence for adhesive activity via an egg β 1 integrin-mediated interaction. *Developmental Biology*, *187*(1), 79–93. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8611>
- Ezzati, M., Shanebandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., & Pashaiasl, M. (2020). Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell and Tissue Banking*, *21*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09797-0>
- Feldschuh, J., Brassel, J., Durso, N., & Levine, A. (2005). Successful sperm storage for 28 years. *Fertility and Sterility*, *84*(4), 1017.e3-1017.e4. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.05.015>
- Ferrusola, C. O., Fernández, L. G., Sandoval, C. S., García, B. M., Martínez, H. R., Tapia, J. A., & Peña, F. J. (2010). Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, *74*(3), 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.029>
- Figuroa, E., Valdebenito, I., Zepeda, A. B., Figuroa, C. A., Dumorné, K., Castillo, R. L., & Farias, J. G. (2017). Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 9, Issue 1, pp. 76–87). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/raq.12105>
- Flores C, V. L. (2015). Metabolismo espermático Sperm Metabolism. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, *20*(1), 23–32.
- Florman, H. M., Arnoult, C., Kazam, I. G., Li, C., & O’Toole, C. M. B. (1998). A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: A tale of two channels. *Biology of Reproduction*, *59*(1), 12–16. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.1.12>
- Ford, W. C. L. (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, *10*(5), 387–399. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMH034>
- Forero-Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F., & Arruda, R. P. (2012). Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, *44*(SUPPL.1), 154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01154.x>
- Fraser, L., Strzerek, J., & Kordan, W. (2014). Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Animal Reproduction Science*, *147*(3–4), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.010>
- Gadella, B. M., & Harrison, R. A. P. (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of

- aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cell. *Biology of Reproduction*, 67(1), 340–350. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.340>
- Gadella, Bart M., Tsai, P. S., Boerke, A., & Brewis, I. A. (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 473–480. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082583bg>
- Galloway, D. (1992). Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. *Australian Veterinary Journal*, 69(1), 22–22. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1992.tb09864.x>
- Garrett, L. J. A., Revell, S. G., & Leese, H. J. (2008). Adenosine triphosphate production by bovine spermatozoa and its relationship to semen fertilizing ability. *Journal of Andrology*, 29(4), 449–458. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003533>
- Ghareeb, S., Haron, W., Yusoff, R., Yimer, N., Baiee, F., Ahmedeltayeb, T., & Ebrahimi, M. (2017). Post-Thaw Evaluation of Cryopreserved Bull Semen Extended In Four Different Semen Extenders. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(5), 80–87. https://www.researchgate.net/publication/322741133_Post-Thaw_Evaluation_of_Cryopreserved_Bull_Semen_Extended_In_Four_Different_Semen_Extenders
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). The Impact of Sperm Metabolism during in Vitro Storage: The Stallion as a Model. *BioMed Research International*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/9380609>
- Gille, L., & Nohl, H. (2001). The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 388(1), 34–38. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2257>
- Gomez, E., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1998). Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: Relationships with semen quality and sperm function. *International Journal of Andrology*, 21(2), 81–94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1998.00106.x>
- Gonçalves, F. S., Barretto, L. S. S., Arruda, R. P., Perri, S. H. V., & Mingoti, G. Z. (2010). Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(1), 129–135. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01272.x>
- Goodson, S. G., Qiu, Y., Sutton, K. A., Xie, G., Jia, W., & O'Brien, D. A. (2012). Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 87(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.102673>
- Goshme, S., Asfaw, T., Demiss, C., & Besufekad, S. (2021). Evaluation of motility and morphology of frozen bull semen under different thawing methods used for artificial insemination in North Shewa zone, Ethiopia. *Heliyon*, 7(10), e08183. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08183>
- Graham, J. K. (2001). Assessment of sperm quality: A flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*, 68(3–4), 239–247. <https://doi.org/10.1016/S0378->

4320(01)00160-9

- Graham, J. K., Kunze, E., & Hammerstedt, R. H. (1990). Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 43(1), 55–64. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.55>
- Gravance, C. G., Garner, D. L., Baumber, J., & Ball, B. A. (2000). Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, 53(9), 1691–1703. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00308-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00308-3)
- Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985a). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 260, Issue 6, pp. 3440–3450). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83641-4)
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985b). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)83641-4)
- Gualtieri, R., Kalthur, G., Barbato, V., Di Nardo, M., Adiga, S. K., & Talevi, R. (2021). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. In *Antioxidants* (Vol. 10, Issue 3, pp. 1–23). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antiox10030337>
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., & Bollwein, H. (2015). Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>
- Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. In *Theriogenology* (Vol. 78, Issue 8, pp. 1700–1708). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.002>
- Hafez, E. S., & Hafez, B. (2000). *Reproducción e inseminación artificial en animales*.
- Halliwell, B., Edition), J. G.-L. (British, & 1984, U. (n.d.). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Pascal-Francis.Inist.Fr*. Retrieved December 22, 2022, from <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=8895792>
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73–88. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>
- Haugan, T., Gröhn, Y. T., Kommisrud, E., Ropstad, E., & Reksen, O. (2007). Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Animal Reproduction Science*, 97, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.12.010>

- Hayashi, Y., & Isobe, N. (2005). Characteristics of Cryopreserved Spermatozoa from a Holstein-Friesian Bull Thawed at Different Temperature. *Journal of International Development and Cooperation*, 12(1), 107–110.
https://www.researchgate.net/publication/44843962_Characteristics_of_Cryopreserved_Spermatozoa_from_a_Holstein-Friesian_Bull_Thawed_at_Different_Temperature
- Henry, M. A., Noiles, E. E., Gao, D., Mazur, P., & Critser, J. K. (1993). Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and Sterility*, 60(5), 911–918. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56296-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56296-7)
- Hernández Corredor, L., Camargo Rodríguez, O., Silva Torres, A., Montoya Páez, J. D., & Quintero Moreno, A. (2018). Efectos de la criopreservación sobre las subpoblaciones espermáticas en caprinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 29(3), 882–893. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i3.14169>
- Hernandez, D., & Carrillo, D. (2015). Aplicación del test hipoosmótico (HOST) en la evaluación de calidad seminal en ovinos criollos de pelo colombiano. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 6, 165–171.
- Hernandez, L., Quintero-Moreno, A., Rubio Parada, A., & Silva Torres, A. (2017). Evaluación de la calidad espermática mediante citometría de flujo en semen caprino criopreservado con dos diluyentes. *Revista Científica Universidad Del Zulia*, 27(1), 35–43.
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Ho, H. C., & Suarez, S. S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: Function and regulation. In *Reproduction* (Vol. 122, Issue 4, pp. 519–526). Society for Reproduction and Fertility. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220519>
- Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Holt, W. V., & North, R. D. (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 91(2), 451–461. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0910451>
- Holt, W. V., & North, R. D. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 51(3), 414–424. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.414>
- Holt, W. V., Penfold, L. M., Chenoweth, P., & Lorton, S. (2014). *Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation*. Theories and Applications. https://books.google.hn/books?hl=en&lr=&id=hv6dAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA76&ots=DC3JC7vqep&sig=fv5qM7bLU9aMWzgfLqZQjildw84&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

- Hossain, M. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 406–419). <https://doi.org/10.1038/aja.2011.15>
- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, 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)
- James, A. N., Green, H., Hoffman, S., Landry, A. M., Paccamonti, D., & Godke, R. A. (2002). Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*, 58(2–4), 401–404. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00883-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00883-X)
- Januskauskas, A., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60(4), 743–758. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00050-5)
- Jeyendran, R. S., Ven, H. H. Van der, Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Jones, R., Mann, T., & Sherins, R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31(5), 531–537. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43999-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43999-3)
- Kamp, G., Büsselmann, G., & Lauterwein, J. (1996). Spermatozoa: Models for studying regulatory aspects of energy metabolism. In *Experientia* (Vol. 52, Issue 5, pp. 487–494). Springer. <https://doi.org/10.1007/BF01919321>
- Karu, T. I. (2010). Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. In *IUBMB Life* (Vol. 62, Issue 8, pp. 607–610). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/iub.359>
- Karunakaran, M., & Devanathan, T. G. (2017). Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 136–144. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1129343>
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>
- Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A., & Zhang, Y. (2021). Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 8, p. 139). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.609180>

- Kiani Esfahani, A., Tavalaei, M., Deemeh, M. R., Hamiditabar, M., & Nasr Esfahani, M. H. (2012). DHR123: An alternative probe for assessment of ROS in human spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(3), 168–174. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.681420>
- Kim, S.-H., Yu, D.-H., & Kim, Y.-J. (2010). Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm. *Theriogenology*, 73(3), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.09.011>
- Koppers, A. J., De luliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(8), 3199–3207. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2616>
- Kumar, A., Prasad, J. K., Srivastava, N., & Ghosh, S. K. (2019). Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. In *Biopreservation and Biobanking* (Vol. 17, Issue 6, pp. 603–612). <https://doi.org/10.1089/bio.2019.0037>
- Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T. K., Bonde, J. P., Ernst, E., Hjollund, N. H. I., Zhou, Y., Skakkebaek, N. E., Giwercman, A., Bonde, J. P. E., Henriksen, T. B., Kolstad, H. A., Anderson, A. M., Giwercman, A., & Olsen, J. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reproduction*, 15(7), 1562–1567. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1562>
- Lee, A. J., Salisbury, G. W., Boyd, L. J., & Ingalls, W. (1977). In Vitro Aging of Frozen Bull Semen. *Journal of Dairy Science*, 60(1), 89–95. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83833-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83833-2)
- Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., Martins, J. A. M., & Andrade, V. J. de. (2010). Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.005>
- Lemma, A. (2011). Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In *Artificial Insemination in Farm Animals*. <https://doi.org/10.5772/16563>
- Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., & Dondero, F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: From polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. In *Human Reproduction Update* (Vol. 2, Issue 3, pp. 246–256). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.3.246>
- Lessard, C., Parent, S., Leclerc, P., Baileys, J. A. N. I. C. E. L., & Sullivan, R. (2000). Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrology*, 21(5), 700–707. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02138.x>
- Li, C. jin, Wang, D., & Zhou, X. (2016). Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 173, pp. 1–7). Elsevier.

- <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.008>
- Lin, Y., & Kan, F. W. K. (1996). Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. *Biology of Reproduction*, 55(5), 1133–1146. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.5.1133>
- Lone, S. A., Shah, N., Yadav, H. P., Wagay, M. A., Singh, A., & Sinha, R. (2017). Sperm DNA damage causes, assessment and relationship with fertility: A review. *Theriogenology Insight - An International Journal of Reproduction in All Animals*, 7(1), 13. <https://doi.org/10.5958/2277-3371.2017.00010.9>
- López-Fernández, C., Pérez-Llano, B., García-Casado, P., Sala, R., Gosálbez, A., Arroyo, F., Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2008). Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Animal Reproduction Science*, 103(1–2), 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.11.015>
- Losano, J., Angrimani, D., Dalmazzo, A., Rui, B., Brito, M., Mendes, C., Kawai, G., Vannucchi, C., Assumpção, M., Barnabe, V., & Nichi, M. (2017). Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(2), 289–297. <https://doi.org/10.1111/rda.12901>
- Macpherson, J. W. (1960). Semen Storage in Liquid Nitrogen. *The Canadian Veterinary Journal*, 1(7), 292–294. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1585590/>
- Malik, A., Laily, M., & Zakir, M. I. (2015). Effects of long term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(1), 22–25. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(14\)60052-X](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(14)60052-X)
- Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J., & Fan, J. (2007). Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. In *Society of Reproduction and Fertility supplement* (Vol. 65, pp. 217–228).
- Mansour, N., Lahnsteiner, F., McNiven, M. A., Richardson, G. F., & Pelletier, C. S. (2011). Relationship between fertility and fatty acid profile of sperm and eggs in Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Aquaculture*, 318(3–4), 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.023>
- Martín Cano, F. E., Gaitskell Phillips, G., Ortiz Rodríguez, J. M., Silva Rodríguez, A., Román, Á., Rojo-Domínguez, P., Alonso-Rodríguez, E., Tapia, J. A., Gil, M. C., Ortega-Ferrusola, C., & Peña, F. J. (2020). Proteomic profiling of stallion spermatozoa suggests changes in sperm metabolism and compromised redox regulation after cryopreservation. *Journal of Proteomics*, 221, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103765>
- Martin, G., Cagnon, N., Sabido, O., Sion, B., Grizard, G., Durand, P., & Levy, R. (2007). Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Human Reproduction*, 22(2), 380–388. <https://doi.org/10.1093/humrep/del399>

- Mazur, P., & Cole, K. (1989). Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. *Cryobiology*, 26(1), 1–29.
- Mazur, Peter, Katkov, I. I., Katkova, N., & Critser, J. K. (2000). The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an Escherichia coli membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology*, 40(3), 187–209. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2238>
- Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4)
- 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)
- Mishra, C., Palai, T. K., Sarangi, L. N., Prusty, B. R., & Maharana, B. R. (2013). Candidate gene markers for sperm quality and fertility in bulls. *Veterinary World*, 6(11), 905–910. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2013.905-910>
- Moreno, J., & Galarza, D. (2019). 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). *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3, 18–38. <http://revistaecuadorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/116>
- Morris, G. J. (2006). Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. *Human Reproduction*, 21(8), 2075–2083. <https://doi.org/10.1093/humrep/del116>
- Moustafa, M., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M. A., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, 19(1), 129–138. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh024>
- Muñoz-Blanco, T., Pérez-Pé, R., & Cebrián-Pérez, J. A. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. In *Reproduction in Domestic Animals* (Vol. 43, Issue SUPPL.4, pp. 18–31). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x>
- Nallella, K. P., Sharma, R. K., Said, T. M., & Agarwal, A. (2004). Inter-sample variability in post-thaw human spermatozoa. *Cryobiology*, 49(2), 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.07.003>
- Naresh, S., & Atreja, S. K. (2015). The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. In *Cryobiology* (Vol. 70, Issue 3, pp. 211–216). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.008>
- Nazari, H., Ahmadi, E., Hosseini Fahraji, H., Afzali, A., & Davoodian, N. (2021). Cryopreservation and its effects on motility and gene expression patterns and fertilizing potential of bovine epididymal sperm. *Veterinary Medicine and Science*,

- 7(1), 127–135. <https://doi.org/10.1002/vms3.355>
- Neild, D. M., Gadella, B. M., Chaves, M. G., Miragaya, M. H., Colenbrander, B., & Agüero, A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, *59*(8), 1693–1705. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01231-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01231-1)
- Nicolas, M., Alvarez, M., Borragán, S., Martínez-Pastor, F., Chamorro, C. A., Alvarez-Rodríguez, M., de Paz, P., & Anel, L. (2012). Evaluation of the qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (Maxifreeze, Cushion Fluid Equine, and PureSperm 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa. *Theriogenology*, *77*(6), 1119–1128. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.016>
- Noiles, E. E., Bailey, J. L., & Storey, B. T. (1995). The temperature dependence in the hydraulic conductivity, l_p , of the mouse sperm plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0°C. *Cryobiology*, *32*(3), 220–238. <https://doi.org/10.1006/cryo.1995.1022>
- O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., López-Sebastián, A., Martínez-Nevado, E., Guerra, R., López Fernández, M., Vega, R. S., Guillamón, F. G., & 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>
- O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, *17*(3), 704–709. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>
- O'Flaherty, C., Breininger, E., Beorlegui, N., & Beconi, M. T. (2005). Acrosome reaction in bovine spermatozoa: Role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1726*(1), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.07.012>
- Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., & Karahuseyinoglu, S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *25*(8), 403–411. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9232-3>
- Pagl, R., Aurich, J. E., Müller-Schlösser, F., Kankofer, M., & Aurich, C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology*, *66*(5), 1115–1122. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.006>
- Parks, J. E., & Graham, J. K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, *38*(2), 209–222. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F)
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., & Graham, J. K. (1999). In vitro capacitation of bovine spermatozoa: Role of intracellular calcium. *Theriogenology*, *51*(2), 461–472.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00240-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00240-4)

- Pegg, D., & Diaper, M. (1989). The 'unfrozen fraction' hypothesis of freezing injury to human erythrocytes: a critical examination of the evidence. *Cryobiology*, 26(1), 30–43.
- Peña, F. J., Macías García, B., Samper, J. C., Aparicio, I. M., Tapia, J. A., & Ortega Ferrusola, C. (2011). Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? In *Theriogenology* (Vol. 76, Issue 7, pp. 1177–1186). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.023>
- Pereira, R., Sá, R., Barros, A., & Sousa, M. (2017). Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 19, Issue 1, pp. 5–14). Wolters Kluwer -- Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.167716>
- Peris-Frau, P., Soler, A. J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D. A., Fernández-Santos, M. R., García-álvarez, O., Maroto-Morales, A., Montoro, V., & Garde, J. J. (2020). Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082781>
- Peris, S. I., Bilodeau, J.-F., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 74(7), 878–892. <https://doi.org/10.1002/mrd.20686>
- Pickett, B. W., Martig, R. C., & Cowan, W. A. (1961). Preservation of Bovine Spermatozoa at -79 and -196° C. *Journal of Dairy Science*, 44(11), 2089–2096. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(61\)90023-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)90023-6)
- Pommer, A. C., Rutllant, J., & Meyers, S. A. (2002). The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, 58(7), 1373–1384. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01039-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01039-7)
- Pommer, A. C., Rutllant, J., & Meyers, S. A. (2003). Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of Reproduction*, 68(4), 1208–1214. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011106>
- Prihantoko, K. D., Kusumawati, A., Widayati, D. T., & Pangestu, M. (2020). Effects of storage duration on mitochondrial activity and dna fragmentation of post-thawed spermatozoa from several ongole grade bull in Indonesia. *Veterinary Practitioner*, 21(2), 264–268.
- Pryor, W. (1976). Free radicals in biology. In *Antioxidants and the Skin* (pp. 21–29). Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9781315207254-2>
- Raad, G., Bakos, H. W., Bazzi, M., Mourad, Y., Fakih, F., Shayya, S., Mchantaf, L., & Fakih, C. (2021). Differential impact of four sperm preparation techniques on sperm motility, morphology, DNA fragmentation, acrosome status, oxidative stress, and mitochondrial activity: A prospective study. *Andrology*, 9(5), 1549–1559.

- <https://doi.org/10.1111/andr.13038>
- Ramírez-Reveco, A., Hernández, J. L., & Aros, P. (2016). Long-Term Storing of Frozen Semen at -196°C does not Affect the Post-Thaw Sperm Quality of Bull Semen. In *Cryopreservation in Eukaryotes*. InTech. <https://doi.org/10.5772/64948>
- Reers, M., Smith, T. W., & Chen, L. B. (1991). J-Aggregate Formation of a Carbocyanine as a Quantitative Fluorescent Indicator of Membrane Potential. *Biochemistry*, 30(18), 4480–4486. <https://doi.org/10.1021/bi00232a015>
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M. I., & Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Rodriguez-Martinez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H., & Johannisson, A. (2001). Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. In *Reproduction (Cambridge, England) Supplement* (Vol. 58, pp. 129–145). <https://doi.org/10.1530/biosciprocs.16.0010>
- Rodriguez, O. L., Berndtson, W. E., Ennen, B. D., & Pickett, B. W. (1975). Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *Journal of Animal Science*, 41(1), 129–136. <https://doi.org/10.2527/jas1975.411129x>
- Roldan, E. R. S. (1998). Signal transduction during mammalian sperm acrosomal exocytosis. In *Gametes: Development and function* (pp. 219–228). https://www.researchgate.net/profile/Eduardo-Roldan/publication/349771261_Signal_transduction_during_mammalian_sperm_acrosomal_exocytosis/links/60410c5792851c077f187c70/Signal-transduction-during-mammalian-sperm-acrosomal-exocytosis.pdf
- Rubio, J. L., Quintero, A. A., & González, D. M. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 19(4), 382–389. http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-22592009000400010&script=sci_arttext&lng=pt
- Ruiz, E., Diez, C., López, M., & Enriquez, J. (2007). The Role of the Mitochondrion in Sperm Function: Is There a Place for Oxidative Phosphorylation or Is This a Purely Glycolytic Process? In *The Mitochondrion in Germline and Early Development* (pp. 3–14).
- Sa-Ardrit, M., Saikhun, J., Thongtip, N., Damyang, M., Mahasawangkul, S., Angkawanish, T., Jansittiwate, S., Faisaikarm, T., Kitiyanant, Y., Pavasuthipaisit, K., & Pinyopummin, A. (2006). Ultrastructural alterations of frozen-thawed Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *International Journal of Andrology*, 29(2), 346–352. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00578.x>
- Said, T. M., Gaglani, A., & Agarwal, A. (2010). Implication of apoptosis in sperm

- cryoinjury. In *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 21, Issue 4, pp. 456–462). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.011>
- Salazar, J. L., Teague, S. R., Love, C. C., Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology*, *76*(3), 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.016>
- Salisbury, G. W. (1967). Aging Phenomena in Spermatozoa. III. Effect of Season and Storage at -79 to -88 C on Fertility and Prenatal Losses. *Journal of Dairy Science*, *50*(10), 1683–1689. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(67\)87694-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(67)87694-X)
- Salisbury, G. W., & Hart, R. G. (1970). Gamete aging and its consequences. *Biology of Reproduction. Supplement*, *2*, 1–13. https://doi.org/10.1095/biolreprod2.Supplement_2.1
- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C., & Cossarizza, A. (1997). JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Letters*, *411*(1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00669-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00669-8)
- Satorre, M., & Córdoba, M. (2010). Involvement of intracellular calcium and src tyrosine-kinase in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. *InVet*, *12*(1), 75–83.
- Schober, D., Aurich, C., Nohl, H., & Gille, L. (2007). Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, *68*(5), 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.004>
- Shimizu, T., & Johnson, K. A. (1983). Kinetic evidence for multiple dynein ATPase sites. *Journal of Biological Chemistry*, *258*(22), 13841–13846. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43994-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43994-9)
- Shoshan-Barmatz, V., Krelin, Y., & Shteinfer-Kuzmine, A. (2018). VDAC1 functions in Ca^{2+} homeostasis and cell life and death in health and disease. In *Cell Calcium* (Vol. 69, pp. 81–100). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.007>
- Sieme, H., Harrison, R. A. P., & Petrunkina, A. M. (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Animal Reproduction Science*, *107*(3–4), 276–292. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.001>
- Stohs, S. J. (1995). The role of free radicals in toxicity and disease. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, *6*(3–4), 205–228. <https://doi.org/10.1515/JBCPP.1995.6.3-4.205>
- Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*, *52*(5–6), 427–437. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs>
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., Savignone, C. A., & Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, *25*(2), 28–35. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11180>

- Stradaoli, G., Noro, T., Sylla, L., & Monaci, M. (2007). Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. *Theriogenology*, *67*(7), 1249–1255. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.009>
- Sullivan, J. J., & Mixner, J. P. (1963). Effects of Storage Temperature and Length of Storage Time upon the Post-thawing Motility and Metabolic Activity of Frozen Bull Semen. *Journal of Dairy Science*, *46*(8), 850–853. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(63\)89160-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(63)89160-2)
- Sun, W., Jiang, S., Su, J., Zhang, J., Bao, X., Ding, R., Shi, P., Li, S., Wu, C., Zhao, G., Cao, G., Sun, Q. Y., Yu, H., & Li, X. (2020). The effects of cryopreservation on the acrosome structure, enzyme activity, motility, and fertility of bovine, ovine, and goat sperm. *Animal Reproduction*, *17*(4), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0219>
- Tanga, B. M., Qamar, A. Y., Raza, S., Bang, S., Fang, X., Yoon, K., & Cho, J. (2021). Semen evaluation: Methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment - A review. *Animal Bioscience*, *34*(8), 1253–1270. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0072>
- Thomas, A. D., Meyers, S. A., & Ball, B. A. (2006). Capacitation Like Changes in Equine Spermatozoa following Cryopreservation. *Theriogenology*, *65*(8), 1531–1550.
- Thomas, C. A., Garner, D. L., Dejarnette, J. M., & Marshall, C. E. (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, *58*(3), 786–793. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.3.786>
- Thurston, L. M., Watson, P. F., & Holt, W. V. (1999). Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *Journal of Reproduction and Fertility*, *117*(2), 271–280. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170271>
- Thurston, Lisa M., Watson, P. F., & Holt, W. V. (2002). Semen cryopreservation: A genetic explanation for species and individual variation? *Cryo-Letters*, *23*(4), 255–262. https://www.researchgate.net/publication/5329483_Semen_cryopreservation_A_genetic_explanation_for_species_and_individual_variation
- Treulen, F., Arias, M. E., Aguila, L., Uribe, P., & Felmer, R. (2018). Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. *Cryobiology*, *83*(June), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.06.001>
- Triphan, J., Aumüller, G., Brandenburger, T., & Wilhelm, B. (2007). Localization and regulation of plasma membrane Ca²⁺-ATPase in bovine spermatozoa. *European Journal of Cell Biology*, *86*(5), 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2007.02.003>
- Tulsiani, D. R. P., Zeng, H.-T., & Abou-Haila, A. (2007). Multiple signaling pathways leading to capacitation Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signaling pathways. *Reprod Fertil Suppl.*, *63*(257–72).

- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 6, p. 268). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Upadhyay, V. R., Ramesh, V., Dewry, R. K., Kumar, G., Raval, K., & Patoliya, P. (2021). Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. In *Andrologia* (Vol. 53, Issue 8, p. e14154). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/and.14154>
- Van Dop, C., Hutson, S. M., & Lardy, H. A. (1977). Pyruvate metabolism in bovine epididymal spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, 252(4), 1303–1308. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)40655-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)40655-7)
- Van Overveld, F. W. P. C., Haenen, G. R. M. M., Rhemrev, J., Vermeiden, J. P. W., & Bast, A. (2000). Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemico-Biological Interactions*, 127(2), 151–161. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00179-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00179-4)
- Villa Duque, N., Amaya Torres, C. M., García Rojas, D., Nieto Omeara, N., & Terán Acuña, N. (2016). Efecto de la manipulación del semen criopreservado de bovinos *Bos Taurus* sobre la integridad espermática. *CIENCIA Y AGRICULTURA*, 13(1), 9. <https://doi.org/10.19053/01228420.4802>
- Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. J., & Loughlin, K. R. (1997). Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 49(6), 921–925. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(97\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(97)00070-8)
- Watson, P. F. (1981). The effects of cold shock on sperm cell membranes. *Trends in Biochemical Sciences, Effects of low temperatures on biological membranes*, 189-218. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10027566484/>
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Wood, P. L., Scoggin, K., Ball, B. A., Troedsson, M. H., & Squires, E. L. (2016). Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- ω -hydroxy-fatty acids. *Theriogenology*, 86(5), 1212–1221. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.012>
- Woolley, D. M., & Richardson, D. W. (1978). Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53(2), 389–394. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0530389>
- Yanagimachi, R. (1994). The physiology of Reproduction. *Raven Press*, 189–317.
- Yildiz, C., Yavas, I., Bozkurt, Y., & Aksoy, M. (2015). Effect of cholesterol-loaded

- cyclodextrin on cryosurvival and fertility of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Cryobiology*, 70(2), 190–194. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.01.009>
- Yoon, S.-J., Kwon, W.-S., Rahman, M. S., Lee, J.-S., & Pang, M.-G. (2015). A Novel Approach to Identifying Physical Markers of Cryo-Damage in Bull Spermatozoa. *PLOS ONE*, 10(5), e0126232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126232>
- Yoon, S. J., Rahman, M. S., Kwon, W. S., Ryu, D. Y., Park, Y. J., & Pang, M. G. (2016). Proteomic identification of cryostress in epididymal spermatozoa. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0128-2>
- Zamboni, L. (1987). The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: The role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. In *Fertility and Sterility* (Vol. 48, Issue 5, pp. 711–734). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)59520-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)59520-x)
- Zhang, X. G., Hu, S., Han, C., Zhu, Q. C., Yan, G. J., & Hu, J. H. (2015). Association of heat shock protein 90 with motility of post-thawed sperm in bulls. *Cryobiology*, 70(2), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.12.010>
- Zhu, W. J., & Liu, X. G. (2000). Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian Journal of Andrology*, 2(2), 135–138. <http://www.asiaandro.com/archive/1008-682X/2/135.htm>