

# UCUENCA

**Universidad de Cuenca**

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Efecto del Resveratrol sobre la criosupervivencia de espermatozoides bovinos congelados y vitrificados**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista


**Autoras:**

Nicole Alexandra Amón Togra

Jennifer Alexandra Jaramillo López

**Director:**

Diego Andrés Galarza Lucero

ORCID:  0000-0002-0266-5431

**Cuenca, Ecuador**

2023-06-12

### Resumen

Esta investigación evaluó el efecto del Resveratrol (RES) en la congelación y vitrificación de espermatozoides de toro sobre la calidad espermática. Para esto, veinticuatro eyaculados de toro fueron recolectados con vagina artificial, diluidos con el medio TCG-EY (tris, ácido cítrico y glucosa + 6% de yema de huevo) y distribuidos en 4 grupos de acuerdo al método de criopreservación (*congelación* [CC] y *vitrificación* [VIT]) y la suplementación de RES (50  $\mu$ M y 0 [CONTROL]): CC-RES, CC-CONTROL, VIT-RES, y VIT-CONTROL. La congelación se realizó en pajuelas de 0,25 mL, con 5% de glicerol y vapores de nitrógeno líquido (NL<sub>2</sub>) estático; mientras que la vitrificación se realizó con 100 mM de sacarosa y sumergiendo las muestras en gotas (30  $\mu$ L) en NL<sub>2</sub>. En general, la congelación produjo una mejor criorespuesta de calidad espermática que la vitrificación, independientemente de la adición de RES. El RES mejoró ( $P < 0,05$ ) la integridad de la membrana espermática previo a la congelación y la motilidad total previo a la vitrificación comparado con sus controles. Posterior a la congelación, el RES incrementó ( $P < 0,05$ ) las motilidades total y progresiva, e integridad de membrana plasmática y acrosomal (CC-RES vs. CC-CONTROL). Por otro lado, después de la vitrificación, el RES incrementó ( $P < 0,05$ ) la frecuencia de batida de flagelo (BCF) y disminuyó ( $P < 0,05$ ) el estrés oxidativo (VIT-RES vs. VIT-CONTROL). En conclusión, el Resveratrol mejoró la motilidad y la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides bovinos antes y después de la congelación, y redujo el estrés oxidativo posterior a la vitrificación. Se recomienda evaluar el efecto del Resveratrol sobre la fertilidad.

*Palabras clave:* espermatozoides bovinos, criopreservación, congelación, vitrificación, resveratrol

### Abstract

This research evaluated the effect of Resveratrol (RES) on the cryopreservation of bull spermatozoa by conventional slow freezing or vitrification and its impact on sperm quality. For that, twenty-four bull ejaculates were collected using an artificial vagina, diluted with TCG-EY (tris, citric acid, and glucose + 6% egg yolk) medium, and then four groups were conformed according to the cryopreservation method (*conventional freezing* [CF] and *vitrification* [VIT]) and RES supplementation (0.05 mM and 0 [CONTROL]): CF-RES, CF-CONTROL, VIT-RES, and VIT-CONTROL. Freezing process was performed using 5% glycerol, 0.25 mL straws, and exposing to liquid nitrogen (NL<sub>2</sub>) vapors. Vitrification was performed using 100 mM sucrose and submerging the samples in pellets (30 µL) into NL<sub>2</sub>. Overall, CF produced a better sperm quality cryoresponse than VIT procedure, regardless of RES addition supplementation. RES improved (P<0.05) the sperm membrane integrity before freezing and the total motility before vitrification compared to their controls. After freezing-thawing, RES increased (P<0.05) total and progressive motility, as well as plasmatic and acrosomal membrane integrity (CF-RES vs. CF-CONTROL). After vitrifying-warming, RES increased (P<0.05) the beat cross frequency (BCF) and decreased (P<0.05) oxidative stress (VIT-RES vs. VIT-CONTROL). In conclusion, Resveratrol improved the motility and plasmatic and acrosomal membrane integrity of bull sperm before and after freezing and reduced oxidative stress after vitrification. Further research is recommended to evaluate the effect of Resveratrol on fertility.

*Keywords:* bovine spermatozoa, cryopreservation, freezing, vitrification, resveratrol

## Índice de contenido

Introducción.....	16
Objetivos .....	19
a) Objetivo general .....	19
b) Objetivos específicos .....	19
Hipótesis.....	19
Revisión de literatura .....	20
2.1.  Espermatogénesis en el bovino .....	20
2.2.  Estructura del espermatozoide bovino.....	20
2.2.1. Cabeza.....	20
2.2.2. Cuello .....	21
2.2.3. Cola espermática.....	21
2.3.  Fisiología espermática bovina.....	21
2.3.1. Maduración .....	21
2.3.2. Capacitación .....	21
2.3.3. Reacción acrosomal .....	22
2.4.  Criopreservación .....	22
2.4.1. Crioprotectores .....	23
2.4.2. Factores que determinan la crioresistencia espermática .....	25
2.4.3. Aditivos y antioxidantes usados en la criopreservación de semen bovino .....	26
2.4.3.1. Melatonina .....	26
2.4.3.2. Vitamina E .....	26
2.4.3.3. Ácido ascórbico .....	26
2.4.3.4. Ubiquinona.....	27
2.4.3.5. Resveratrol .....	27
Materiales y métodos.....	28
3.1.  Materiales .....	28
3.1.1. Materiales físicos .....	28
3.1.2. Materiales biológicos .....	28

3.1.3. Reactivos .....	28
3.2. Métodos .....	29
3.2.1. Área de estudio .....	29
3.2.2. Elaboración de diluyentes y medios .....	29
3.2.3. Diseño experimental .....	31
3.2.4. Reproductores y recolección de semen .....	32
3.2.5. Criopreservación de muestras .....	33
3.2.5.2. Vitricación (VIT) .....	33
3.2.6. Análisis de calidad espermática .....	34
3.2.6.1. Cinemática espermática .....	34
3.2.6.2. Integridad de membranas espermáticas .....	35
3.2.6.3. Estrés oxidativo .....	35
3.2.7. Análisis estadístico .....	36
4.1. Cinemática .....	38
4.1.1. Motilidad espermática .....	38
4.1.2. Velocidades .....	39
4.1.3. Parámetros de relación de progresión .....	39
4.1.4. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF) .....	40
4.2. Integridad de membranas espermáticas .....	41
4.3. Estrés oxidativo .....	43
Discusión .....	45
Conclusiones .....	50
Recomendaciones .....	51
Referencias .....	52
Anexos .....	65

**Índice de figuras**

Figura 1. Ubicación del área de estudio (Azúay – Victoria de Portete). .....	27
Figura 2. Diseño experimental. ....	30
Figura 3. Porcentajes de motilidad total (MT) y progresiva (MP) de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas.....	36
Figura 4. Valores de velocidad curvilíneas (VCL), promedio (VAP) y rectilínea (VSL) de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas. ....	37
Figura 5. Porcentaje de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB) de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas. ....	38
Figura 6. Valores de ALH y BCF de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas. ....	39
Figura 7. Porcentajes totales de integridad de membrana plasmática (IMP-total) y acrosomal (IMA-total) de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas. ....	41
Figura 8. Espermatozoides bovinos observados bajo un microscopio de Epifluorescencia con tinciones P1/PNA-FITC, CellROX Deep Red Reagent® y Hoechst 33342. ....	42

**Índice de tablas**

Tabla 1. Diluyente base TCG-YH (para congelación y vitrificación). .....	28
Tabla 2. Medio HEPES para fluorescencia .....	28
Tabla 3. Yoduro de propidio. ....	29
Tabla 4. Aglutinina. ....	29
Tabla 5. Porcentajes de espermatozoides en las diversas categorías de integridad de membrana (evaluados con marcadores fluorescentes PI/PNA-FITC) de muestras bovinas frescas y criopreservadas. ....	40
Tabla 6. Porcentajes de espermatozoides con y sin estrés oxidativo (EO, leve, intenso y total) evaluados con marcadores fluorescentes CellROX Deep Red / Hoechst, de muestras bovinas frescas y criopreservadas. ....	41

### **Agradecimiento**

Hago extenso mi agradecimiento a los docentes de la Universidad de Cuenca, de manera especial al personal del Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal por brindarme la oportunidad de poner en práctica mis conocimientos teórico, práctico y experiencias adquiridas a lo largo de mi carrera profesional. De manera especial al Dr. Andrés Galarza, por depositar en nosotras su confianza para formar parte de este proyecto, también expreso mi agradecimiento al Dr. Mauricio Dumas, Dr. Xavier Samaniego y al Dr. Guido Bermúdez por acompañarnos, guiarnos y brindarnos su apoyo en cada actividad realizada. Finalmente, a todas las personas que se vieron involucrados ya sea de manera directa e indirecta durante el tiempo de mi periodo académico.

**Nicole Amón Togra**



### Agradecimiento

Agradezco a mis padres, John y Fanny, cuyo apoyo fue indispensable no solo durante el desarrollo de este trabajo, sino durante toda esta etapa académica; a nuestro director de tesis, Dr. Andrés Galarza, quien, con paciencia, dedicación y esmero, supo guiarnos durante el desarrollo de esta investigación de principio a fin. A mi compañera de tesis y gran amiga, Nicole Amón, pues el trabajo en equipo determinó el éxito de esta investigación. A los técnicos docentes del Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal: Dr. Mauricio Dumas, Dr. Xavier Samaniego y Dr. Guido Bermúdez, cuyo apoyo también fue imprescindible para la ejecución del componente experimental.

Además, agradezco a aquellos docentes y amigos que durante mi etapa universitaria me alentaron a no rendirme durante estos años de preparación académica y me motivaron siempre a dar lo mejor de mí.

**Jennifer Jaramillo López**

**Dedicatoria**

Para las personas que supieron brindarme su apoyo, dedicación y entusiasmo en esta etapa académica, para aquellos que confiaron y estuvieron para mí en cada momento.

Para mis instantes en mi mundo efímero.

**Nicole Amón Togra**

**Dedicatoria**

Dedico este trabajo a los pilares de mi vida, mis padres y hermanos, de quienes sentí su apoyo en todo momento y me motivaron a desempeñarme de la mejor manera.

Para Kimberly, quién a través de su amistad incondicional acompañó cada uno de mis pasos y siempre estuvo ahí cuando necesité un consejo o ánimos para continuar.

Para aquellos docentes a quienes hoy considero amigos, que siempre exigieron lo mejor de mí porque sabían que podía lograrlo.

**Jennifer Jaramillo López**

**Glosario**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ALH:** Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza

**AMPc:** Adenosin monofosfato cíclico

**AMPK:** Proteína kinasa activada por AMPc

**ANOVA:** Análisis de varianza

**AOP:** Actividad total antioxidante

**BCF:** Frecuencia de batida de flagelo

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**BSP:** *Major proteins of bovine seminal plasma*

**CASA:** Análisis espermático asistido por computadora

**CAT:** Catalasa

**CC:** Congelación convencional

**Co:** Control

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DPDA:** Membrana plasmática y acrosoma dañados

**DPIA:** Membrana plasmática dañada y acrosoma intacto

**DVB:** Diarrea viral bovina

**EO:** Estrés oxidativo

**FIV:** Fecundación *in vitro*

**FoxO1:** Factor de transcripción Fox

**GABA:** Ácido gamma amino butírico

**GLM:** Modelo lineal general

**GLY:** Glicerol

**GSH:** Glutación reductasa

**GSH-Px:** Glutación peroxidasa

**H2O2:** Peróxido de hidrógeno

**HOST:** Test hipoosmótico

**IA:** Inseminación artificial

**IATF:** Inseminación artificial a tiempo programado

**IBR:** Rinotraqueitis Infecciosa Bovina

**IPDA:** Membrana plasmática intacta y acrosoma dañado

**IPIA:** Membrana plasmática intacta y acrosoma intacto

**KOH:** Hidróxido de potasio

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad

**LIN:** Velocidad promedio lineal

**LP:** Per oxidación lipídica

**LPO:** Peroxidación lipídica

**mM:** Milimolar

**MOET:** Multiovulación y transferencia de embriones

**MP:** Motilidad progresiva

**MT:** Motilidad total

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NL<sub>2</sub>:** Nitrógeno líquido

**OH:** Radical hidroxilo

**PBS:** Solución buffer fosfato

**PES:** Polietersulfona

**PI:** Yoduro de propidio

**PNA-FITC:** Doble tinción fluorescente

**Q10:** Coenzima 10

**RES:** Resveratrol

**ROS:** Especies de oxígeno reactivo

**SEM:** Error estándar de la media

**SIRT1:** Sirtuína 1 desacetilasa

**SOD:** Superóxido dismutasa

**STR:** Índice de rectitud

**TCG:** Tris, ácido cítrico y glucosa

**TCG-YH:** Tris, ácido cítrico y glucosa + 6% de yema de huevo

**TRA:** Técnicas de reproducción asistida

**VA:** Vagina artificial

**VAP:** Velocidad promedio del espermatozoide

**VCL:** Velocidad curvilínea

**VIT:** Vitrificación

**VSL:** Velocidad rectilínea

**WOB:** Índice de oscilación

## Introducción

La criopreservación de espermatozoides ha permitido conservar el material genético de varias especies domésticas y silvestres por un tiempo indefinido, y luego usarlo en las técnicas de reproducción asistida (TRA) (Cardoso et al., 2020). Asimismo, la criopreservación de espermatozoides ha contribuido a los programas de conservación de germoplasma de razas genéticamente valiosas y de especies en peligro de extinción (Madrigal-Valverde et al., 2020). El semen criopreservado ha sido usado en programas de mejoramiento genético de bovinos, caprinos, ovinos y otras especies domésticas mediante la inseminación artificial (IA) convencional y a tiempo programado (IATF), protocolos de multiovulación y transferencia de embriones (MOET), y fecundación *in vitro* (FIV) (Skidmore et al., 2018). Sin embargo, a pesar de los grandes avances en la criopreservación de espermatozoides bovino todavía sigue constituyendo un gran desafío debido a las bajas tasas de criosupervivencia celular y, por lo tanto, a las bajas tasas de fertilidad logradas después de la IA (Santiago-Moreno & Galarza, 2019).

Durante la criopreservación, los espermatozoides bovinos son susceptibles a diversos eventos como el deterioro de la membrana plasmática y acrosomal, alteración de la cromatina y daño mitocondrial (Khalil et al., 2018), que pueden provocar en alguna subpoblación celular cambios ultraestructurales, bioquímicos y funcionales (Grötter et al., 2019; Mazur, 1984). Por lo general, alrededor del 50% de los espermatozoides sobreviven a la criopreservación, lo que provoca una disminución de la capacidad fecundante comparado con el semen fresco (Watson, 2000). Otras lesiones criogénicas suponen un acortamiento del tiempo de vida de los espermatozoides, daños en la capacitación espermática (Bailey et al., 2000), degeneración de la membrana plasmática (Cormier & Bailey, 2003; Pons-Rejraji et al., 2009), aumento del estrés oxidativo y/u osmótico y fragmentación del ADN (Naresh & Atreja, 2015; Westfalewicz et al., 2015). Por otro lado, el incremento desmesurado de la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS; por sus siglas en inglés “Reactive Oxygen Species”) generados principalmente a nivel mitocondrial durante la criopreservación, determina la peroxidación de fosfolípidos (LPO) de la membrana del espermatozoide. Además de ello, los radicales libres ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  y  $OH^-$ ) a los cuales están expuestas las células desencadenan apoptosis que se reflejará en la alteración del potencial de membrana mitocondrial interna ( $\Delta\Psi_m$ ), fragmentación del ADN, alteración de la fosfatidilserina en la membrana plasmática y activación de caspasas (Santiago-Moreno et al., 2013).

Los mecanismos antioxidantes endógenos atenúan los efectos deletéreos causados por la criopreservación (Upadhyay et al., 2021). Varios antioxidantes enzimáticos endógenos como el glutatión reductasa (GSH), glutatión peroxidasa (GSH-Px), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), protegen la membrana plasmática contra la LPO que pueden sufrir los espermatozoides bovinos durante la criopreservación. Esta protección antioxidante permite



obtener valores aceptables de motilidad e integridad de las membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial posterior al proceso de criopreservación (Bansal & Cheema, 2016; Losano et al., 2018). Los antioxidantes exógenos reducen el efecto perjudicial de las ROS e incrementan la calidad de los espermatozoides congelados y descongelados (Sariözkan et al., 2009). Se ha demostrado que nuevos antioxidantes exógenos, como el crocin, proantocianidinas oligoméricas y flavonoides (Ej. hoja de bambú), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y su combinación con aceite de linaza (Mousavi et al., 2019; Peris-Frau et al., 2020; Sapanidou et al., 2015; Yuan et al., 2021) han protegido la integridad de la membrana de los espermatozoides bovinos criopreservados. Aunque la actividad antioxidante ha proporcionado efectos benéficos a las células, el rendimiento en la criosupervivencia espermática no ha logrado mejorar las tasas de fertilidad (*in vitro* o *in vivo*).

El resveratrol (RES) (3, 5,40- trihidroxistilbeno), es un antioxidante polifenólico compuesto químicamente por dos anillos aromáticos unidos por un puente metilo (2,2-azinobis; 3etilbenzotiazolina-6-sulfónico; 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), que ha sido usado como antioxidante en espermatozoides criopreservados. El RES es un potente aditivo natural presente en diferentes principios dietéticos como las uvas, vino tinto, bayas, pistachos, ciruelas y cacahuates (King et al., 2006). Su estructura es similar al dietilestilbestrol y al estradiol (Tvrdá et al., 2015). Además, el RES ha sido categorizado como una fitoalexina debido a su síntesis en las plantas en respuesta a factores de estrés exógenos como las lesiones, la radiación ultravioleta, la exposición al ozono y las infecciones fúngicas; estos beneficios han promovido que el RES sea utilizado principalmente en la medicina tradicional china como el ingrediente activo de las raíces secas de *Polygonum cuspidatum* (Gambini et al., 2015).

Los efectos antioxidantes del RES permiten disminuir la LPO, actuando como un eliminador directo de ROS durante la congelación de los espermatozoides. Además, actúa indirectamente como un agente quelante de cobre y hierro reduciendo la apoptosis en las células germinales e incrementando la espermatogénesis por la estimulación del eje hipotálamo – hipofisario – gonadal sin generar efectos secundarios (Zhu et al., 2019).

La suplementación del RES a medios de congelación ha incrementado la motilidad, actividad mitocondrial y la integridad del ADN del esperma bovino. Assunção et al. (2021), evaluaron la dosis más idónea de RES (50, 100, y 1000  $\mu$ M) suplementando al medio de congelación y demostrando que la concentración de 50  $\mu$ M protegió de una mejor manera la integridad de las membranas plasmática y acrosomal; sin embargo, su efecto no fue evidenciado en la fertilidad *in vitro*. Asimismo, Li et al. (2018) demostraron que el RES disminuye significativamente los niveles nocivos de ROS, protege la función mitocondrial, la integridad acrosomal y, a diferencia de Assunção et al. (2021), incrementó la fertilidad *in vitro*. En búfalos, la adición de RES al diluyente TCG (tris, ácido cítrico y glucosa) mejoró los parámetros de

calidad espermática, niveles de Adenosin trifosfato (ATP), capacidad fecundante de los espermatozoides, y disminuyó eficientemente la fragmentación del ADN y la LPO durante la criopreservación (Ahmed et al., 2020). En rumiantes menores, el RES redujo el estrés oxidativo y aumentó la fertilidad y supervivencia después del proceso de congelación (Lv et al., 2019). En verracos, el RES incrementó la capacidad fecundante *in vitro* (Sun et al., 2020) y redujo el estrés oxidativo inducido (Tvrdá et al., 2015). En conejos, el RES, mejoró la fertilidad al potenciar los andrógenos actuando directamente sobre los receptores de estrógenos, lo que permitió aumentar el número y la motilidad de los espermatozoides epididimarios (Shin et al., 2008). Para nuestro mejor conocimiento, no existe información del efecto del RES en espermatozoides bovinos sometidos al proceso de vitrificación.

Con base a todo lo antes mencionado, esta investigación pretendió demostrar los efectos benéficos del RES suplementado al diluyente de base sintética TCG-YH (6 % de yema de huevo) sobre los parámetros cinéticos, la integridad de membranas y la reducción del estrés oxidativo en espermatozoides bovinos.

## Objetivos

### a) Objetivo general

- Evaluar el efecto del Resveratrol en la congelación y vitrificación de espermatozoides de toro sobre la calidad espermática.

### b) Objetivos específicos

- Evaluar la cinética espermática e integridad simultánea de las membranas plasmática y acrosomal de espermatozoides de toro frescos, congelados y vitrificados con y sin Resveratrol
- Evaluar el estrés oxidativo de espermatozoides de toro congelados y vitrificados con y sin Resveratrol.

## Hipótesis

La adición de 50  $\mu$ M de Resveratrol al medio sintético de congelación (TCG-YH+5% glicerol) y vitrificación (TCG-YH+100 mM sacarosa) mejora la criosupervivencia espermática y disminuir el estrés oxidativo en espermatozoides bovinos.

## Revisión de literatura

### 2.1. Espermatoogénesis en el bovino

En los túbulos seminíferos de los testículos se originan las células espermáticas. Las primeras células son los espermatogonias o gonocitos, que se encuentran en una capa sobre la base de los túbulos seminíferos; estos empiezan a dividirse por mitosis hasta formar los espermatocitos primarios en una capa superior. Posteriormente, a través de divisiones meióticas se forman las espermátidas, que son células haploides que deberán sufrir cambios morfológicos durante su trayecto hacia el lumen de los túbulos seminíferos (Barth & Oko, 1991).

Durante la espermiogénesis, las espermátidas, que son células de forma redondeada, entrarán a un proceso de diferenciación que dura aproximadamente 17 días y que permitirá su estiramiento y transformación final en espermatozoides. Finalmente, serán liberados a la luz en un proceso llamado espermiación. El ciclo en los túbulos seminíferos en los toros dura 13,5 días y la duración total de la espermatoogénesis es de 4,5 ciclos o 61 días (Staub & Johnson, 2018).

### 2.2. Estructura del espermatozoide bovino

#### 2.2.1. Cabeza

La cabeza representa una gran proporción de la parte anterior del espermatozoide. Se encarga de la penetración al ovocito y entrega del paquete genético haploide. Está formada por:

- **Núcleo:** Parte central de la cabeza y en su interior están los cromosomas haploides del macho. La cromatina es homogénea en la mayoría de especies a excepción de primates y el humano, que presentan vacuolas nucleares, las cuales se consideran indeseables en la mayoría de mamíferos (Barth & Oko, 1991).
- **Teca perinuclear:** Consiste en un citoesqueleto que protege por completo al núcleo excepto en la base y se compone de tres segmentos que son la capa subacrosomal (involucrada en la penetración de la zona pelúcida), segmento ecuatorial (evita la formación de vesículas durante la reacción acrosomal) y la capa postacrosomal (entra en contacto con el citoplasma ovocitario) (Schatten & Constantinescu, 2008).
- **Acrosoma:** Durante la espermiogénesis, las vesículas de Golgi se unen y forman una membrana que contiene enzimas como la hialuronidasa, acrosina, arilsulfatasa,

neuroaminidasa, colagenasa, esterasa y catepsinas (Schatten & Constantinescu, 2008).

### 2.2.2. Cuello

El plato basal, que es la porción cóncava de la cabeza, se une al *capitulum* (parte convexa de la cola) gracias al cuello del espermatozoide, el cuello se desprende de la cabeza cuando el espermatozoide penetra al ovocito (Staub & Johnson, 2018).

### 2.2.3. Cola espermática

Está conformada por 4 partes: cuello, pieza intermedia (rodeado por mitocondrias), principal (rodeado por un escudo fibroso) y final; la cola está rodeada por una membrana y en su interior contiene al axonema (conformado por microtúbulos) (Barth & Oko, 1991).

## 2.3. Fisiología espermática bovina

### 2.3.1. Maduración

Los espermatozoides son incapaces de fecundar un ovocito cuando salen a la luz del túbulo seminífero, por lo que requieren madurar en el epidídimo a través de procesos de incorporación, modificación y translocación proteica. Las células epiteliales permiten la secreción y reabsorción de proteínas. El adenosin monofosfato cíclico (AMPc) estimula la fosforilación proteica de tirosina que permite la hiperactivación cinética que ocurrirá en la capacitación. La motilidad espermática es determinada en esta fase.

### 2.3.2. Capacitación

El proceso de capacitación que se da en el aparato reproductor de la hembra es necesario para que los espermatozoides puedan penetrar al ovocito. La capacitación se produce en el útero y en el oviducto y dura alrededor de 1-7 horas, en ese tiempo se incrementa el metabolismo y con ello el consumo de oxígeno; además, se activan los receptores y el espermatozoide adquiere competencia (Barth & Oko, 1991).

En los mamíferos, el oviducto es el responsable principal de la capacitación pues en la primera porción del oviducto los espermatozoides encuentran un ambiente seguro para formar un reservorio. Posteriormente, se produce la hiperactivación que incrementa la motilidad del espermatozoide y permite su transporte por el aparato reproductor femenino. Se considera que

el bicarbonato y el pH del eyaculado inducen la activación de la adenilciclase y con ello la activación de la motilidad espermática. Finalmente, el movimiento lateral de cabeza aumenta por lo que el movimiento pasa de ser rectilíneo a curvilíneo (Rodríguez-Martínez, 2007).

### 2.3.3. Reacción acrosomal

Únicamente los espermatozoides que han sido capacitados pueden realizar el proceso de reacción acrosomal, que consiste en la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa cuando el espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida o con la matriz extracelular del ovocito. En general, se producen tres fenómenos durante la reacción acrosomal: Se liberan enzimas acrosomales, la membrana interna del acrosoma se expone y se obtiene la capacidad de fusión entre la membrana plasmática y acrosomal (del Río et al., 2007).

Se ha descrito que la unión de moduladores a los receptores ubicados en la membrana plasmática del espermatozoide puede regular la reacción acrosomal. Algunos moduladores de esta reacción son: progesterona, estradiol, angiotensina II, catecolaminas, insulina, leptina, prolactina, relaxina y GABA (Vigil et al., 2011).

## 2.4. Criopreservación

La criopreservación es una biotecnología reproductiva encaminada a mantener la viabilidad espermática y la fertilidad a temperaturas bajo cero; no obstante, provoca consecuencias en los espermatozoides, explicados principalmente por la generación de cristales de hielo y la deshidratación celular. Los cristales de hielo extracelular provocan un aumento de la concentración de solutos extracelulares, esto genera un gradiente de concentración que moviliza el agua desde el medio menos concentrado (intracelular) hacia el medio más concentrado (extracelular), resultando en la deshidratación de las células (Taşdemir et al., 2013).

Es necesario considerar también la velocidad de congelación, si es muy rápida, el espermatozoide es incapaz de deshidratarse lo suficientemente rápido al alcanzar la temperatura de nucleación del agua intracelular, por lo que el agua queda en forma de hielo intracelular. Por otra parte, si la velocidad es muy baja entonces provoca deformaciones debido a una deshidratación extrema y prolongada que altera la forma y el tamaño; además, se reduce el volumen y provoca alteraciones en la membrana (Grötter et al., 2019).

La criopreservación provoca cambios físicos y químicos en el semen, especialmente por el hecho de que los espermatozoides tienen una superficie larga pero un tamaño pequeño, esta

característica se interpone con la viscosidad y la temperatura de transición vítrea del citosol intracelular, por ello la fertilidad del semen criopreservado es menor a la del semen fresco (Ugur et al., 2019).

Por otra parte, la criopreservación altera el contenido de colesterol, el número de espermatozoides viables y la reacción acrosómica. Además, se reconoce que esta técnica induce efectos indeseables como: producir ROS a nivel mitocondrial, que provocan la peroxidación de la membrana plasmática, afectando su funcionalidad y disminuyendo la motilidad y viabilidad; además, también desencadena la fragmentación del ADN debido a que hay translocación de la fosfatidilserina y se activan las caspasas, las cuales desencadenan la actividad de nucleasas dentro del citoplasma que degradan el ADN y los microtúbulos (Raheja et al., 2018).

Asimismo, otro efecto indeseable es la apoptosis inducida por los ROS. Finalmente, el estrés osmótico también es indeseable debido a que genera alteraciones de la cabeza, membrana y microtúbulos. Para contrarrestar estas consecuencias asociadas a la criopreservación se implementó el uso de crioprotectores, los cuales tienen como principal objetivo resguardar a los espermatozoides de daños inducidos por la formación de cristales de hielo y el shock térmico; además, reducen el punto eutéctico. En general, los crioprotectores se clasifican en penetrantes o no penetrantes (Grötter et al., 2019).

## **2.4.1. Crioprotectores**

### **2.4.1.1. Agentes crioprotectores penetrantes**

Los agentes crioprotectores penetrantes o permeables (ACP) se caracterizan por tener bajo peso molecular, lo que les permite atravesar la membrana, estos agentes son ideales para deshidratar a los espermatozoides a bajas velocidades de congelación. Entre estos agentes se encuentran el glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO), propanediol, etilenglicol (ETG), propilenglicol y las amidas como la dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) (Ezzati et al., 2020).

El primer crioprotector utilizado fue el glicerol y actualmente se mantiene como el crioprotector más usado para la criopreservación de semen bovino gracias a su gran capacidad de deshidratar las células mediante estimulación osmótica. Desafortunadamente, algunos efectos del glicerol aún no están claros y se asocian a un desencadenamiento de estrés osmótico y toxicidad en altas concentraciones. La literatura indica que las concentraciones más usadas están entre el 4 al 10% (v/v) (Ugur et al., 2019).

Adicionalmente, el DMSO es otro crioprotector muy usado por la capacidad de proteger al espermatozoide del daño causado por el procedimiento de manera similar al glicerol. A pesar de ello, Shah et al., (2016) reportaron que la combinación de 1,75% de glicerol y 1,75% de DMSO a un diluyente de refrigeración (a 4 °C) mantienen la integridad de la membrana plasmática y acrosómica; además, produce una fertilidad del 69,45%, sugiriendo que estos dos crioprotectores desencadenan un efecto sinérgico.

Por otro lado, el ETG, un crioprotector penetrante, puede ser usado como alternativa del glicerol, debido a su bajo peso molecular puede atravesar la membrana plasmática del espermatozoide con mayor facilidad. De hecho, el ETG ha generado mejores resultados de motilidad posterior a la descongelación de semen de toro comparado con el glicerol y el

DMSO, debido a un menor estrés osmótico (Taşdemir et al., 2013). Estos resultados difieren con aquellos obtenidos por Gororo et al., (2020) que encontraron que no existe diferencias significativas en la supervivencia post-descongelación cuando compararon al DMSO con el glicerol al 7% (v/v) y ETG al 7% (v/v).

#### **2.4.1.2. Agentes crioprotectores no penetrantes**

Por otro lado, también hay agentes crioprotectores no penetrantes (ACNP) que se caracterizan por tener alto peso molecular y actúan contribuyendo a sustraer el líquido intracelular a través de la diferencia de la presión osmótica sin penetrar a la célula. Los ACNP son usados en altas velocidades de enfriamiento (15000 a 20000 ° C/min). Dentro de los ACNP encontramos a las azúcares monosacáridos (glucosa, dextrosa, dextrano, fructosa, lactosa), disacáridos (sacarosa y trehalosa), trisacáridos (rafinosa) y otros compuestos como la polivinilpirrolidona (PVP), ficol, sorbitol, entre otros (Raheja et al., 2018).

Uno de los ACNP más utilizados es la yema de huevo (YH), esta contiene un alto contenido de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se adhieren a la membrana plasmática (capa lipídica) y evitan la pérdida de fosfolípidos. Montoya-Páez et al. (2020) demostraron que la YH diluida en proporción 3:1 con agua ultrapura y luego suplementada al medio de congelación al 30%, produjo resultados deseables de velocidad de los espermatozoides posterior a la descongelación y una vitalidad de  $86 \pm 9,02\%$ .

Similarmente, la glucosa también forma parte del grupo de crioprotectores no penetrantes, al ser de alto peso molecular no ingresa a la membrana y ayuda a incrementar la osmolaridad efectiva del medio; además, se considera que también puede ser una fuente energética. Bhat et al., (2020) demostraron que el uso de 3-O-metilglucosa, un azúcar metabolizable formado por glucosa, proporciona resultados satisfactorios en la viabilidad post-descongelación al



añadir 5 mmol/L de 3-O-metilglucosa a una dilución tris-yema de huevo-glicerol; no obstante, el mecanismo de interacción aún no es conocido.

Para contrarrestar los efectos tóxicos provocados por el glicerol y la yema de huevo se ha planteado el uso de la sacarosa o trehalosa, ambos son disacáridos que actúan como ACNP para proteger del daño osmótico. Estos azúcares producen un medio hipertónico al diluyente que permite la deshidratación de la célula antes de que se congele, evitando la formación de cristales de hielo intracelular. Iqbal et al. (2018) determinaron que al suplementar con trehalosa (45 mM), YH (15%) y glicerol (5%) mejora significativamente la integridad de las membranas plasmática y acrosomal de los espermatozoides de toro.

#### **2.4.2. Factores que determinan la crioresistencia espermática**

La crioresistencia espermática se ve afectada por diferentes factores tales como: el origen de los espermatozoides que determina variaciones en la congelación, produciendo una mayor criosupervivencia celular de aquellos espermatozoides de origen epididimario que los de origen eyaculado. Esta mejor crioresistencia se debe a las diferencias químicas y físicas de los ácidos grasos insaturados, fosfolípidos y el colesterol de la membrana plasmática que proporciona menor susceptibilidad a daños criogénicos (O'Brien et al., 2019). El plasma seminal, otro factor que influye en la crioresistencia, posee proteínas que permiten una adecuada congelación y otras que evitan daños espermáticos, por ejemplo, las *Major proteins of bovine seminal plasma* (BSP), que determinan un eflujo de colesterol y fosfolípidos desde la membrana del espermatozoide hasta el medio externo, predisponiendo a una sensibilidad a la crioresistencia (Santiago-Moreno & Galarza, 2019; Pini et al., 2016).

Las diferencias entre machos se convierten en otro factor determinante, por el alto grado de polimorfismo espermático en un mismo eyaculado; sin embargo, los roles que cumplen tanto el origen como la función de las subpoblaciones de espermatozoides aún no están claros durante la capacitación espermática (Yániz et al., 2015). La composición lipídica del esperma es uno de los elementos claves dentro de la composición de las membranas celulares, por lo que una mejor resistencia al choque térmico lo permiten las especies que poseen una alta relación de colesterol/fosfolípidos. (Meyers, 2005; Santiago-Moreno & Galarza, 2019). El perfil endócrino en el que se encuentran los machos durante la obtención de espermatozoides, es otro factor condicionante en la criosupervivencia espermática. Este factor endócrino está determinado por la época del año en especies con actividad reproductiva estacional que confieren alteraciones morfofisiológicas en los espermatozoides (Martínez-Fresneda et al., 2021). Finalmente, el protocolo de características específicas de cada especie podría estar involucrado en una buena o mala respuesta a la crioresistencia espermática.

### 2.4.3. Aditivos y antioxidantes usados en la criopreservación de semen bovino

Una de las consecuencias más perjudiciales para los espermatozoides durante el proceso de criopreservación es la excesiva producción de ROS, que desencadena un estrés oxidativo con efectos perjudiciales como inactivación de enzimas glucolíticas, lesión en membrana acrosomal y oxidación del ADN. Todos estos efectos negativos repercuten en la capacidad fecundante del espermatozoide. Por lo tanto, el uso de sustancias antioxidantes en la criopreservación ha permitido aminorar el impacto de los ROS y con ello mejorar la calidad del proceso (Donoghue & Donoghue, 1997). Dentro de los antioxidantes usados en la criopreservación de semen bovino se encuentran los siguientes:

#### 2.4.3.1. Melatonina

La melatonina es una hormona que es producida por la glándula pineal y es responsable del ritmo circadiano y la estacionalidad reproductiva en algunas especies. A pesar de ser una hormona se ha reconocido que posee actividad antioxidante al ser capaz de neutralizar al radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>); además, favorece la actividad enzimática que metaboliza a los ROS (Tan et al., 2002). La adición de melatonina al diluyente para congelación-descongelación de semen mejora la actividad enzimática y la capacidad antioxidante total, resultando en una reducción de la peroxidación lipídica (Ashrafi et al., 2013).

#### 2.4.3.2. Vitamina E

La vitamina E es un antioxidante lipofílico que protege la membrana celular al inhibir la peroxidación lipídica (Membrillo-Ortega et al., 2003). Durante la criopreservación, la presencia de ROS favorece que los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana espermática sufran de peroxidación (Jha et al., 2013). Motemani et al., (2017) demostraron que la adición de vitamina E al diluyente de semen bovino disminuye la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mejorando el proceso de conservación.

#### 2.4.3.3. Ácido ascórbico

Naturalmente, la concentración en el plasma seminal de vitamina C es superior a la que se encuentra en la sangre, su función en el plasma seminal es reducir los radicales de oxígeno y prevenir el daño oxidativo al ADN del espermatozoide. Se ha demostrado una reducción en el estrés oxidativo al adicionar 5 mM de ácido ascórbico al diluyente, incremento la integridad de la membrana acrosomal, menos anomalías morfológicas y un aumento de espermatozoides vivos a la descongelación (Singh et al., 2020).

#### 2.4.3.4. Ubiquinona

La ubiquinona, también llamada coenzima Q10, es una molécula lipofílica clave en el metabolismo. Se encuentra en las mitocondrias, y la energía de la que dispone el espermatozoide depende de esta coenzima. Además, se ha reportado que protege contra la LPO, así como la fragmentación del material genético durante la criopreservación (Talevi et al., 2013). Saeed et al., (2016) reportaron que la adición de 30  $\mu\text{M}$  en un diluyente, potencia la integridad de las membranas y disminuye las anomalías morfológicas en semen bovino.

#### 2.4.3.5. Resveratrol

El resveratrol (*3,5,40-trihidroxiestilbeno*) es un polifenol que pertenece a los estilbenos, que son hidrocarburos producidos por plantas en consecuencia a estímulos estresantes como la radiación solar, incrementos bruscos de la temperatura ambiental, daños físicos y agentes patógenos. La actividad enzimática de la estilbeno sintetasa permite la formación de resveratrol a partir de fenilalanina, presentándose dos isoformas: *trans* y *cis* (Pasquariello et al., 2020). Además, es una fitoalexina natural de bajo peso molecular cuya capacidad antioxidante es mayor a la de la vitamina E y C y es menos tóxica (Li et al., 2018).

Por otra parte, es considerado un fitoestrógeno debido a que su estructura química, es semejante al dietilestilbestrol, por lo que el resveratrol es un agonista de los estrógenos y es capaz de unirse a los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  (Bowers et al., 2000). Por tanto, los estrógenos son en parte responsables de la funcionalidad del aparato reproductor del macho, por lo que se ha establecido que el resveratrol también regula la función reproductiva al ejecutar actividades parácrinas en los testículos (Juan et al., 2005).

En general, son muchos los mecanismos antioxidantes que se le atribuyen al resveratrol, pero pocos han sido comprobados. Se le atribuye una cualidad antioxidante al resveratrol porque estimula la biogénesis mitocondrial de SIRT1 y la fosforilación de la AMPK, lo que induce un aumento transcripcional de enzimas dependientes de FoxO1 (Tiwari et al., 2021); en consecuencia, se produce más catalasa y superóxido dismutasa, las cuales se encuentran en el plasma seminal y tienen una importante actividad antioxidante (Martinez & Moreno, 2000).

## Materiales y métodos

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Materiales físicos

- Refrigerador
- Microscopio de contraste de fases y fluorescencia (Nikon Eclipse Ci-E, contraste de fase negativo [Ph1] con filtro verde; Nikon Instruments, Inc., Nueva York)
- Pajuelas de 0,25 mL (IMV, L'Aigle Cedex, Francia)
- Vagina Artificial (Ref: 11021/0020, Minitube GMBH, Alemania)
- Filtro de jeringa estéril Minisart® NML PES 16555 (tamaño de poro 0,45 µm) (Sartorius, Alemania).
- Tubos Falcon de 15 mL
- Tubos eppendorf de 1,5 mL
- Papel aluminio
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Baño María
- Microcentrífuga
- Guantes de examinación
- Pipetas automáticas
- Vasos de precipitación de 20 y 100 mL

#### 3.1.2. Materiales biológicos

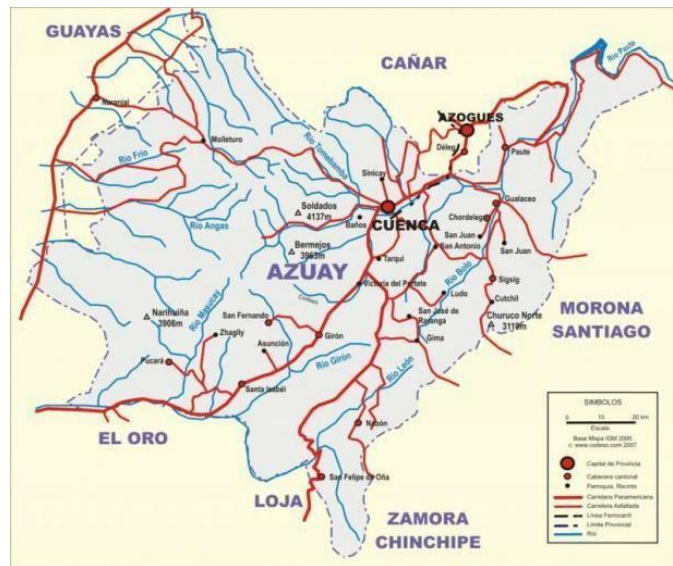
- Eyaculados de semen de toro
- Yema de huevo

#### 3.1.3. Reactivos

- Diluyente sintético: TCG (tris, ácido cítrico y glucosa)
- Nitrógeno líquido
- Resveratrol (R5010, Sigma – Aldrich)
- Glicerol (G2025, Sigma – Aldrich)
- Sacarosa (S0389, Sigma – Aldrich)
- Hepes (Fluorescencia/ Salt, NaCl, KOH, glucosa, agua destilada)
- Yoduro de propidio (PI, P4170, Sigma – Aldrich)
- Aglutinina (PNA-FITC, L7381, Sigma – Aldrich)
- CellROX Deep Red Reagent fluorescent probe (Ref: 10422, Life Technologies)

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Área de estudio



**Figura 1.** Ubicación del área de estudio (Azuay – Victoria de Portete).

La recolección de semen de toro se realizó en las granjas de Nero y de Irquis de la Universidad de Cuenca. La granja Nero (Latitud: -2.9447932; Longitud: -78.9655763) está ubicada en la parroquia Baños del Cantón Cuenca a 3.100 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m); tiene una temperatura promedio de 10° C y una precipitación anual de 789 mm. La granja Irquis (Latitud: -3.0801834; Longitud: -79.0753254) está ubicada en la parroquia Victoria del Portete a 2.663 m s.n.m; tiene una temperatura promedio de 8°C y una precipitación anual de 677 mm.

El procesamiento, congelación y análisis de las muestras frescas y descongeladas se realizó en el Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca, ubicada en la granja Irquis.

#### 3.2.2. Elaboración de diluyentes y medios

Todos los medios y diluyentes fueron elaborados en el Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal usando agentes reactivos de Sigma – Aldrich.

El diluyente de base sintética “TCG-YH” (tris, ácido cítrico, glucosa, y 6 % [v/v] yema de huevo) fue elaborado según lo descrito por Galarza et al. (2018), y se usó para la congelación y vitrificación del semen bovino (Tabla 1). La yema de huevo fue inactivada a través de la incubación programada a 56°C durante 30 minutos; una vez inactivada, la yema de huevo fue adicionada al diluyente TCG. El TCG-YH fue centrifugado a 4000g durante 20 minutos a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, el diluyente

centrifugado fue filtrado en membranas PES de 0,45  $\mu\text{m}$ , se registró la osmolaridad a 345 mOsmol/kg y se ajustó a un pH a 6,9.

**Tabla 1.** Diluyente base TCG-YH (para congelación y vitrificación).

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para 100 ml</b>
TRIS (gramos)	3,8
Ácido cítrico (gramos)	2,2
Glucosa (gramos)	0,6
Estreptomicina (gramos)	0,08
Penicilina (gramos)	0,08
Agua destilada (pura, ósmosis)	100 ml
Yema de huevo (ml) – YH	6% = 6 ml
Glicerol (GLY) ml para CC	5% (v/v)
Sacarosa (gramos) para VIT	100 mM (p/v)

pH ajustado a 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 345 mOsmol/kg

El diluyente para congelación fue preparado usando el diluyente base TCG-YH + 5 % de glicerol; y el diluyente de vitrificación fue preparado usando el mismo diluyente base TCG-YH + 100 mM de sacarosa. Finalmente, estos dos diluyentes fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En las Tablas 2 – 4 se detallan los diferentes reactivos para elaborar las tinciones fluorescentes.

**Tabla 2.** Medio HEPES para fluorescencia

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Hepes salt	476,62 mg
NaCl	1151,27 mg
KOH	16,5 mg
Glucosa	198,77 mg
Agua destilada	100 ml

Se almacenó en alícuotas de 250  $\mu\text{L}$  en tubos eppendorf y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 3.** Yoduro de propidio.

Reactivo	Cantidad
Yoduro de propidio	1 mg
PBS	1 mL

Se almacenó en alícuotas de 50  $\mu$ L y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 4.** Aglutinina.

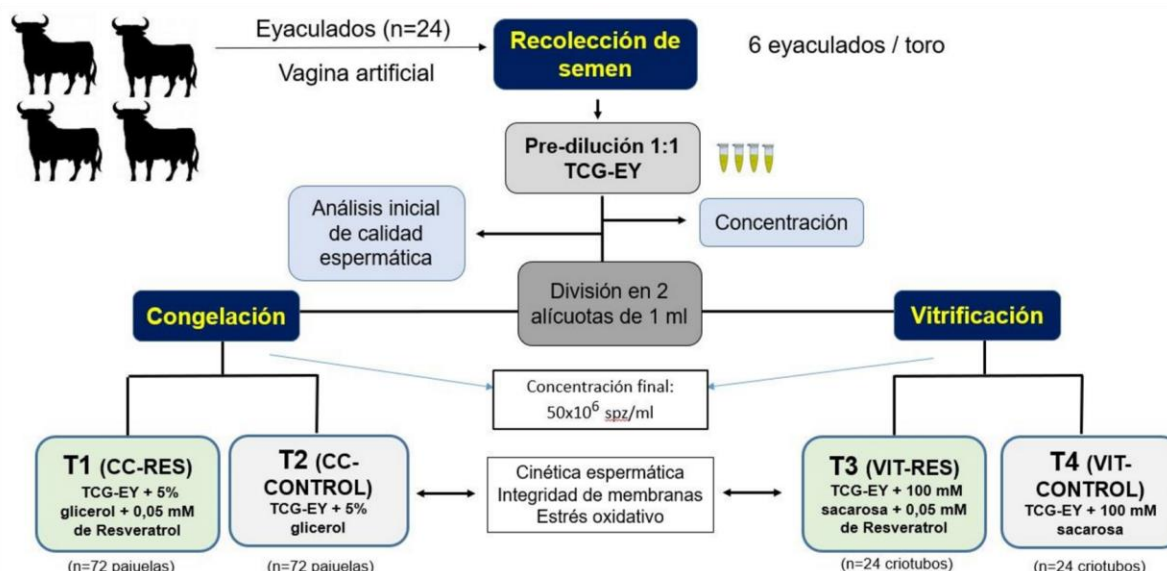
Reactivo	Cantidad
PNA-FITC aglutinina	0,2 mg
BSA	5 mg
PBS	1 mL

Se almacenó en alícuotas 50  $\mu$ L y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.3. Diseño experimental

Este experimento evaluó el efecto antioxidante y crioprotector del RES suplementado a los diluyentes de congelación convencional y de vitrificación sobre la criosupervivencia de espermatozoides bovinos. Para este propósito, se recolectaron 24 eyaculados de semen de cuatro toros reproductores, clínicamente sanos y sexualmente maduros y activos, en 6 sesiones (6 eyaculados / toro; 2 sesiones de colecta / semana durante 6 semanas). Cada eyaculado fue diluido inicialmente 1:1 con TCG-YH, y posteriormente dividido en 4 alícuotas para conformar cuatro tratamientos según el método de criopreservación (congelación convencional y vitrificación) y la suplementación o no de RES (50  $\mu\text{M}$  de RES y 0  $\mu\text{M}$  de RES [CONTROL]) (Figura 2):

- T1= Congelación convencional + 50  $\mu\text{M}$  RES: CC-RES (n= 72 pajuelas)
- T2 = Congelación convencional + 0  $\mu\text{M}$  RES: CC-CONTROL (n= 72 pajuelas)
- T3= Vitrificación + 50  $\mu\text{M}$  RES: VIT-RES (n= 24 criotubos)
- T4= Vitrificación + 0  $\mu\text{M}$  RES: VIT-CONTROL (n= 24 criotubos)



**Figura 2.** Diseño experimental.

La descongelación y el calentamiento de las muestras congeladas y vitrificadas se realizaron a 37°C y 65°C, respectivamente. La efectividad del RES en cada método de criopreservación fue analizada en los parámetros cinéticos, integridad de membranas y estrés oxidativo.

### 3.2.4. Reproductores y recolección de semen

El proceso de recolección de semen fue realizado en 4 toros reproductores de la raza Holstein Friesian de 3 a 5 años de edad clínicamente sanos y sexualmente maduros, alojados en las granjas Irquis y Nero de la Universidad de Cuenca, y alimentados mediante un sistema de pastoreo rotacional. El estado sanitario de los toros estuvo estrictamente relacionado a la ausencia de enfermedades infecciosas tales como la Brucelosis, mediante la prueba rosa de bengala, y Tuberculosis, mediante inoculación de tuberculina en la región ano caudal. La dieta de los toros fue basada netamente en el consumo de forraje verde: *Pennisetum clandestinum* (Kikuyo) y *Ryegrass* con mayor predominio 60-75% y *Trifolium patense* (Trébol rojo) y *Trifolium repens* (Trébol blanco) y algunas otras gramíneas de menor valor nutritivo. El entrenamiento de los toros para el salto y recolección de semen con vagina artificial fue realizado dos meses antes del inicio del trabajo experimental para conseguir estandarización biológica. El proceso de recolección de semen se realizó dos veces por semana (2 eyaculados / semana / toro) usando una vagina artificial (VA) rígida. La VA fue armada, atemperada a 42 – 45°C de tal modo que al momento de la colecta su temperatura osciló entre 38 a 39°C. Previo a la colecta, se realizó un lavado del pene con suero fisiológico precalentado a 37°C.

Inmediatamente después de la recolección, cada eyaculado fue pre-diluido en una proporción 1:1 con el diluyente TCG-YH atemperado a 37 °C. Las muestras fueron transportadas a una temperatura de 22 °C) hasta el Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción Animal en



un tiempo máximo de 1 hora, para su análisis inicial y subsiguiente procesamiento según cada tratamiento.

### 3.2.5. Criopreservación de muestras

En el laboratorio, las muestras frescas y diluidas fueron analizadas subjetivamente para determinar la motilidad total y el score (progresividad en escala 1 a 5; 1 sin progresividad y 5 con máxima progresividad) según lo descrito por Muiño et al., (2005). Cada muestra fresca diluida de cada eyaculado fue ajustada a un volumen y concentración inicial de 4 mL y  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, respectivamente, usando el mismo diluyente TCG-YH. Esta muestra ajustada fue dividida en cuatro alícuotas de 1 mL cada una.

#### 3.2.5.1 Congelación convencional (CC)

Las dos primeras alícuotas de 1 mL fueron usadas para la congelación convencional de los tratamientos 1 y 2. A la primera alícuota de 1 mL (T1 CC-RES), una vez ajustada a una concentración deseada ( $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL), se le adicionó una segunda fracción de 1 mL de TCG-YH que adicionalmente contenía glicerol al 10% (v/v) + 100  $\mu$ M de RES; y, asimismo, a la segunda alícuota de 1 mL (T2 CC-CONTROL), que también se ajustó a una concentración inicial de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, se le adicionó una segunda fracción de 1 mL de TCG-YH con glicerol al 10% (v/v). De esta manera, el volumen final de las muestras del T2 fueron de 2 mL a una concentración final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL y 5% de glicerol. Asimismo, el T1 alcanzó las mismas condiciones finales que T2 más una concentración final de 50  $\mu$ M de RES. Ambas muestras de T1 y T2 fueron mantenidas durante 3 horas a 5°C para su equilibrio; luego fueron cargadas en pajuelas de 0,25 mL previamente rotuladas y posteriormente selladas con alcohol de polivinilo. La congelación se realizó mediante vapores de  $NL_2$  estático colocando las pajuelas equilibradas dentro de una caja de poliestireno con dos rampas en su interior. La caja criogénica contuvo 3,4 L de  $NL_2$  en su interior. La primera rampa estuvo a 17 cm del nivel de  $NL_2$  y las pajuelas fueron expuestas a los vapores de  $NL_2$  durante 4 minutos; consecuentemente, las pajuelas fueron colocadas en la segunda rampa que estuvo a 7 cm del nivel de  $NL_2$  durante 2 minutos más; finalmente las pajuelas fueron sumergidas en  $NL_2$ .

La descongelación se realizó después de un mes de almacenamiento, sumergiendo las pajuelas en un baño maría a 37 °C durante 30 segundos. El contenido de cada pajuela fue recolectado en un tubo eppendorf de 1,5 mL y puesto en incubación a 37 °C durante 5 minutos previo a los análisis subsiguientes.

#### 3.2.5.2. Vitrificación (VIT)

La tercera y cuarta alícuota del semen diluido fueron usadas para la vitrificación de los tratamientos 3 y 4, respectivamente. A la tercera alícuota de 1 mL (T3 VIT-RES), una vez ajustada a una concentración deseada ( $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL), se le adicionó una segunda fracción de 1 mL de TCG-YH que adicionalmente contenía 200 mM de sacarosa (p/v) + 100  $\mu$ M de RES; y, asimismo, a la cuarta alícuota de 1 mL (T4 VIT-CONTROL), que también fue ajustada a una concentración inicial de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, se le adicionó una segunda fracción de 1 mL de TCG-YH con 200 mM de sacarosa. Así, el volumen final de las muestras del T3 fue de 2 mL con una concentración final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 100 mM sacarosa y 0,05 mM de RES. Además, el T4 alcanzó las mismas condiciones finales que T3, pero sin resveratrol.

Las muestras de T3 y T4 fueron mantenidas durante 30 minutos a 5°C para su equilibrio y posteriormente se vitrificaron dejando caer gotas de 30  $\mu$ L (cada gota contuvo una concentración aproximada de  $1,5 \times 10^6$  espermatozoides) al  $NL_2$  desde una altura de 15 cm con la pipeta de 1000  $\mu$ L. Los pellets fueron formados instantáneamente al entrar en contacto con el  $NL_2$ . Posteriormente se almacenaron en criotubos de 2 mL debidamente identificados.

El calentamiento de las muestras espermáticas vitrificadas se realizó en un dispositivo de calentamiento STC-3008 (de fabricación artesanal) en el cual los pellets se deslizaron por una superficie de aluminio atemperado a 65°C y el contenido fue recogido en vasos de precipitación de 20 mL. El contenido fue centrifugado a 300 g durante 5 minutos y el pellet fue re-suspendido en el medio TCG-YH atemperado a 37°C para su análisis de calidad espermática.

### **3.2.6. Análisis de calidad espermática**

#### **3.2.6.1. Cinemática espermática**

Las características cinemáticas de los espermatozoides en las muestras frescas, congeladas – descongeladas o vitrificadas – calentadas fueron analizadas mediante un sistema computarizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA Evolution® 2018, v6.0 software, Microptic S.I., Barcelona, España) acoplado a un microscopio de contraste de fases Nikon (Eclipse model 50i, fase 1 del contraste negativo con filtro verde) siguiendo los procedimientos detallados por Galarza et al. (2018). Un mínimo de tres campos y 200 trayectos de espermatozoides fueron evaluados por cada muestra a un aumento de 10X y una velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/s. Se tomó 5  $\mu$ L de cada muestra y se colocó en una lámina portaobjetos y cubreobjetos. El sistema CASA registró las siguientes variables cinemáticas: motilidad total (MT, %), motilidad progresiva (MP, %), velocidad curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidad rectilínea (VSL,  $\mu$ m/s), velocidad promedio (VAP,  $\mu$ m/s), linealidad (LIN, %),

rectitud (STR, %), oscilación (WOB, %), frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz), y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu\text{m}$ ).

### 3.2.6.2. Integridad de membranas espermáticas

El estado de la membrana plasmática y acrosomal fue evaluado mediante la prueba de doble tinción fluorescente: Yoduro de propidio (PI) + aglutinina de cacahuete (*Arachis hypogaea*) conjugada con isotiocianato de fluoresceína (PNA-FITC). Cada muestra a evaluar fue diluida en 250  $\mu\text{L}$  de HEPES a una concentración final de  $10 \times 10^6$  espermatozoides/mL. A continuación, todos los procedimientos se realizaron en ausencia de luz ambiental y artificial.

Se preparó la doble tinción fluorescente PI/PNA-FITC mezclando 50  $\mu\text{L}$  de PI + 50  $\mu\text{L}$  de PNAFITC y se protegió de la luz usando papel aluminio. Luego, a temperatura ambiente (22°C), se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de la tinción fluorescente a la muestra espermática diluida en HEPES. De esta mezcla se tomó un volumen de 5  $\mu\text{L}$  y se colocó en un portaobjetos y se cubrió un cubreobjetos (Galarza et al., 2018). El estado de las membranas espermáticas fue evaluado observando las muestras en el microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E200 (epifluorescencia D-FL, fuente de alimentación de mercurio de alta presión C-SHG1; Nikon Instruments Inc., Nueva York, EE. UU.), usando el filtro B-2A con una excitación de 450-490 nm y una emisión de 520 nm. En cada muestra se contaron un total de 200 espermatozoides y se registraron las siguientes categorías según la integridad o degeneración de la membrana plasmática y acrosomal: membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA, %), con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA, %); con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA, %) y con membrana plasmática y acrosoma dañado (DPDA, %). Además, se calculó el porcentaje total de espermatozoides con la membrana plasmática intacta, equivalente a la viabilidad (IMP-total: IPIA + IPDA), y con la membrana acrosomal intacta (IMA-total: IPIA + DPIA)

### 3.2.6.3. Estrés oxidativo

La evaluación del estrés oxidativo se realizó mediante la prueba fluorescente de la pieza intermedia usando los fluorocromos CellROX Deep Red® (CAT 10422 – Molecular Probes; Life Technologies, NY, USA) y Hoechst 33342 [diluido en PBS a una concentración de 1 mg/ml (p/v)]. La solución stock del CellROX fue elaborada diluyendo la sonda fluorescente CellROX en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) a una concentración de 1 mM (75  $\mu\text{L}$  de DMSO en 50  $\mu\text{L}$  de CellROX) y se congeló a -20°C hasta su posterior uso, según la metodología usada por Tamay et al., (2022).

Una mezcla de 100  $\mu\text{L}$  de cada muestra de semen (descongelado o calentado), 2  $\mu\text{L}$  de la solución stock de CellROX (1mM), y 2  $\mu\text{L}$  de Hoechst fue sometido a incubación a 37°C durante 30 minutos. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 600 g durante

5 minutos, y el pellet fue re-suspendido en 50  $\mu\text{L}$  de Sperm- TALP (NaCl 113,94 mM, KCl 3,08 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,30 mM, lactato de sodio 1 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,97 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,50 mM, HEPES sódico 10 mM y  $\text{NaHCO}_3$  25 mM, BSA 6 mg/ml; 0,11 mg/ml de piruvato de sodio y 5  $\mu\text{l/ml}$  de gentamicina; 326 mOsm/kg, pH 7,6). Este proceso se realizó en ausencia de luz ambiental y artificial. Una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  se colocó entre una lámina portaobjetos y cubreobjetos y se observó en un microscopio de epifluorescencia a 40X de aumento usando los tres filtros: B-2A, excitación: 450-490 nm, emisión: 520 nm; G-2A, excitación: 510-560 nm, emisión: 590 nm; y UV-2E/C, excitación: 330-380 nm, emisión: 420 nm verde, violeta y rojo. En cada muestra se contaron 200 células y se clasificaron según su grado de estrés oxidativo equivalente a la tinción roja tenue o intensa de la pieza intermedia de acuerdo a la clasificación propuesta por Alves et al., (2015) (Figura 8):

- Sin EO, espermatozoides sin estrés oxidativo: pieza intermedia sin emisión de luz fluorescente.
- EO-moderado, espermatozoides con estrés oxidativo moderado: pieza intermedia marcada de color rojo pálido.
- EO-intenso, espermatozoide con estrés oxidativo intenso: pieza intermedia marcada de color rojo intenso
- EO-total: EO-moderado + EO-intenso

### 3.2.7. Análisis estadístico

Los datos recogidos en el laboratorio fueron tabulados en una hoja de cálculo en Excel (versión 16.0) y posteriormente analizados estadísticamente usando el software STATISTICA versión 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Los datos fueron expresados en promedio  $\pm$  error estándar de la media (SEM; por sus siglas en inglés “Standard Error of the Mean”), tanto para figuras como para tablas. Cada variable numérica fue sometida a la prueba estadística Shapiro-Wilk para comprobar la distribución normal de datos. Como los datos obtenidos no cumplieron una distribución normal fueron transformados a *Arcoseno* (variables porcentuales) y *Log-10* (variables numéricas). El análisis estadístico incluyó un modelo lineal general (GLM; por sus siglas en inglés “General Linear Model”) para demostrar el efecto del RES en ambos métodos de congelación sobre los parámetros cinemáticos (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, BCF, ALH), integridad de membranas plasmática y acrosomal, y estrés oxidativo.

Un ANOVA unidireccional y la prueba de comparación múltiple ‘Tukey’ fueron usados para comparar los cuatro tratamientos (T1 – T4) según el tipo de criopreservación (congelación y vitrificación) y la suplementación con RES (0,05 mM y 0 mM). Además, en este análisis se

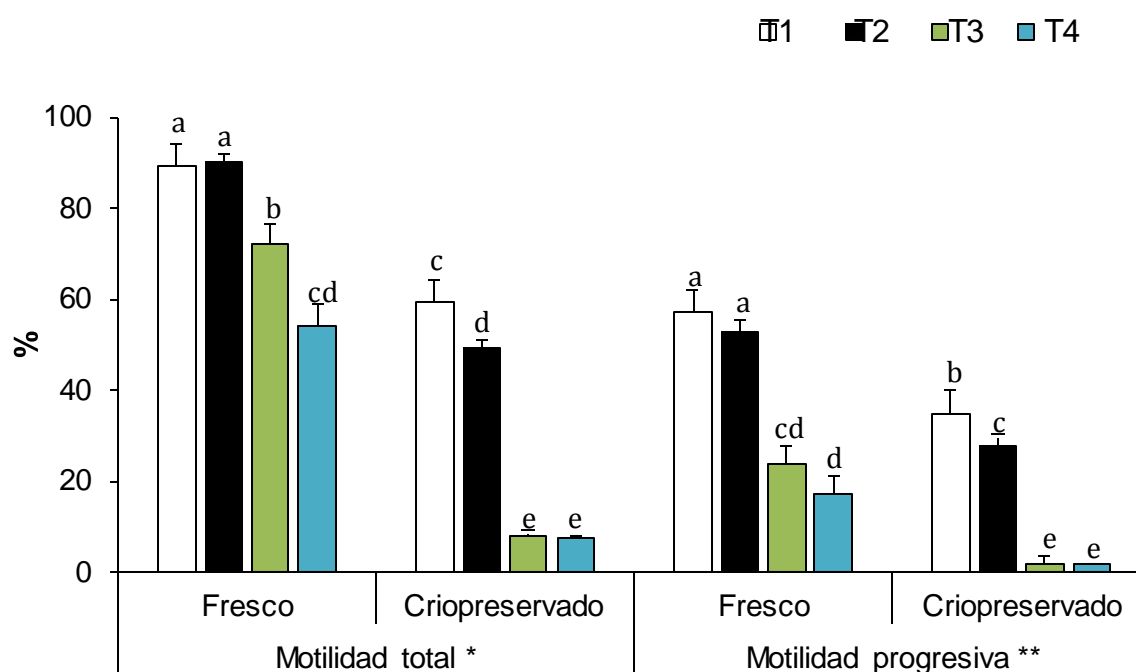
incluyó el factor 'reproductor' como covariable debido a la variabilidad entre algunos toros. El nivel de significancia fue considerado en  $P < 0.05$ .

## Resultados

## 4.1. Cinemática

## 4.1.1. Motilidad espermática

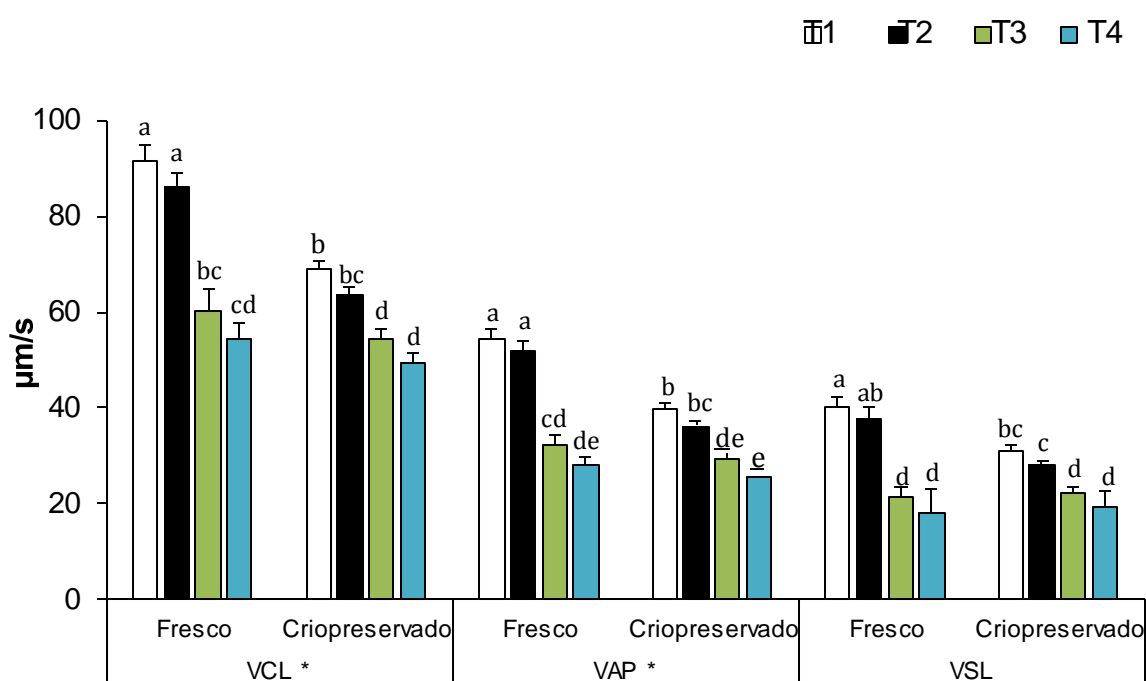
En el análisis de las muestras frescas se evidenció que los porcentajes de MT y MP de T1 y T2 fueron superiores ( $P < 0,05$ ) a los porcentajes de T3 y T4. Además, el efecto de RES se evidenció en T3 ya que presentó un porcentaje de MT más alto ( $P < 0,05$ ) que el T4 previo a la vitrificación. En el análisis de las muestras criopreservadas, los porcentajes de MT y MP, en general, se redujeron significativamente ( $P < 0,05$ ) en relación a las muestras frescas en todos los tratamientos (congelación y vitrificación). Un efecto significativo del resveratrol fue evidenciado luego de la congelación -descongelación debido a que T1 produjo porcentajes de MT y MP más altos ( $P < 0,05$ ) que T2. No obstante, no existió diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) en estas dos variables cinéticas entre T3 y T4 después de los procesos de vitrificación y calentamiento (Figura 3).



**Figura 3.** Porcentajes de MT y MP de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas con los siguientes tratamientos: T1 (CC-RES); T2 (CC-CONTROL); T3 (VITRES); y T4 (VIT-CONTROL). Letras diferentes en cada barra de cada motilidad expresa diferencias significativas: a – b – c – d – e,  $P < 0,01$ . Los asteriscos en cada variable expresan diferencias significativas entre los toros y tratamientos \*  $P < 0,01$ ; \*\*  $P < 0,0001$ .

### 4.1.2. Velocidades

En las muestras frescas se evidenció que las variables VCL, VAP y VSL de T1 y T2 fueron más altas ( $P < 0,01$ ) que las de T3 y T4. En el análisis de las muestras criopreservadas, los valores de VCL, VAP y VSL se redujeron significativamente ( $P < 0,05$ ) en relación a las muestras frescas en T1 y T2 (congelación); mientras que en T3 y T4, las velocidades no se redujeron ( $P > 0,05$ ) después de los procesos de vitrificación y calentamiento. T1 y T2 produjeron valores más altos ( $P < 0,05$ ) de VCL, VAP y VSL post-descongelación que T3 y T4 post-calentamiento. No obstante, el efecto del resveratrol no fue evidenciado en ninguna velocidad, ni posterior a los procesos de congelación – descongelación (T1 vs. T2), ni luego de la vitrificación – calentamiento (T3 vs. T4) (Figura 4).

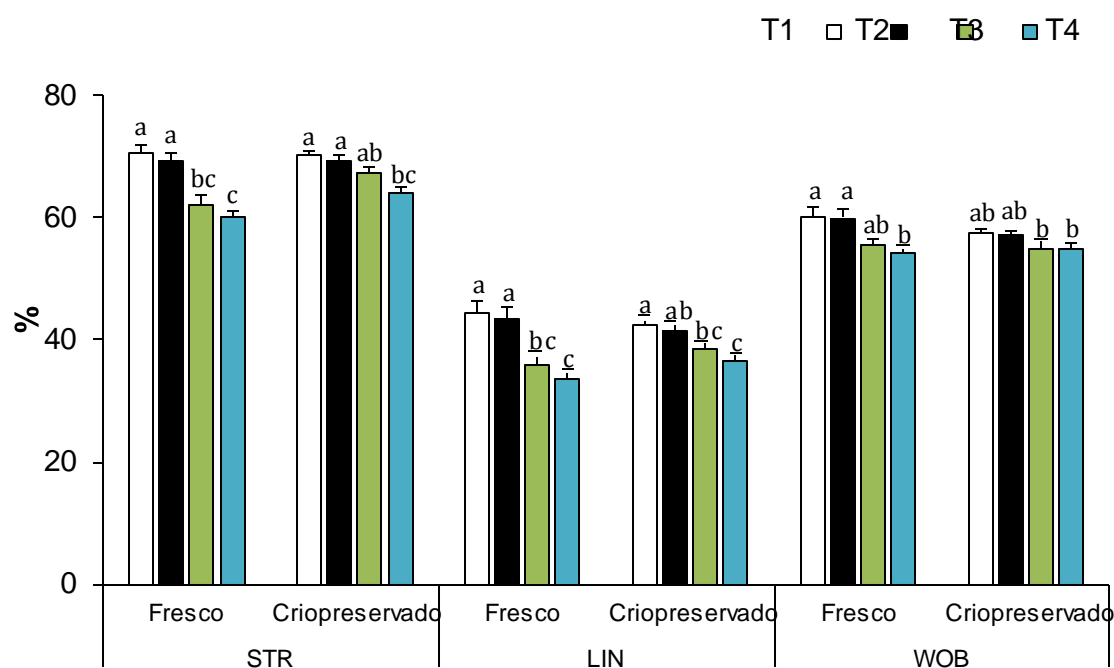


**Figura 4.** Valores de VCL, VAP y VSL de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas con los siguientes tratamientos: T1 (CC-RES); T2 (CC-CONTROL); T3 (VITRES); y T4 (VIT-CONTROL). Letras diferentes en cada barra de cada motilidad expresa diferencias significativas: a – b – c – d – e,  $P < 0,05$ . \* Asteriscos en cada velocidad expresan diferencias significativas entre los toros y tratamientos (\*  $P < 0,01$ ).

### 4.1.3. Parámetros de relación de progresión

En las muestras frescas, los porcentajes de STR y LIN de T1 y T2 fueron superiores ( $P < 0,01$ ) a los porcentajes de T3 y T4. Asimismo, los porcentajes de WOB de T1 y T2 fueron superiores ( $P < 0,05$ ) al porcentaje del tratamiento T4. No se evidenció diferencias significativas ( $P > 0,05$ )

entre muestras frescas y criopreservadas en ningún tratamiento y ningún parámetro de relación de progresión. En el análisis de las muestras criopreservadas, los porcentajes postdescongelación de STR y LIN fueron más altos ( $P < 0,05$ ) con T1 y T2 comparados con T4. Al igual que en las velocidades, el efecto del resveratrol no fue evidenciado en ningún parámetro de progresión, ni después de la descongelación (T1 vs. T2), ni del calentamiento (T3 vs. T4) (Figura 5).



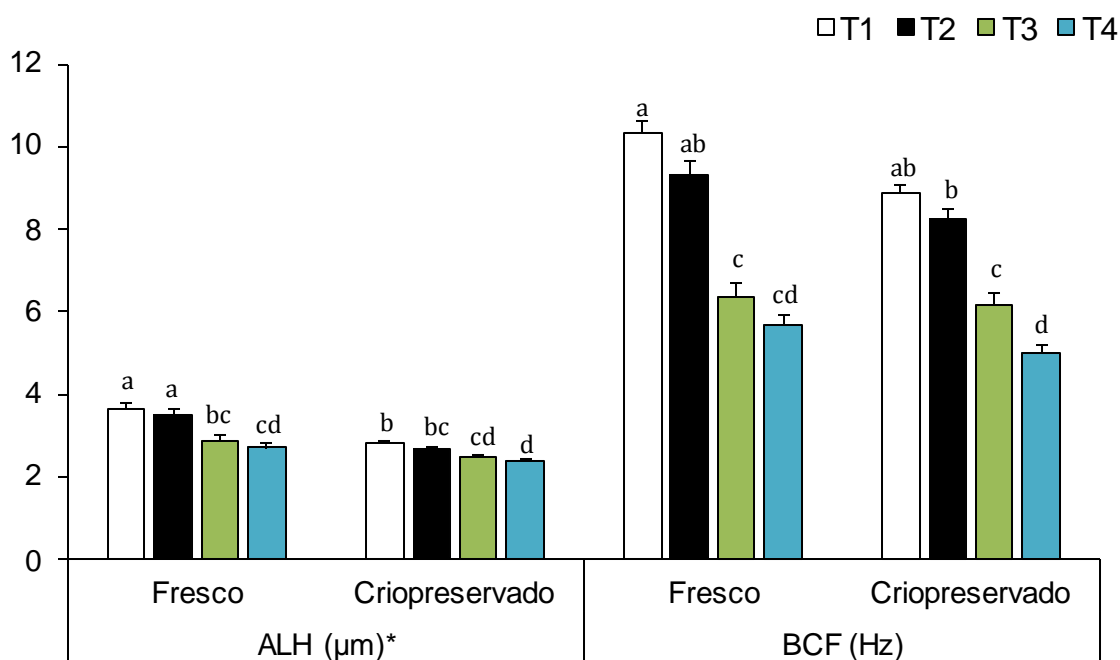
**Figura 5.** Porcentaje de STR, LIN y WOB de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas con los siguientes tratamientos: T1 (CC-RES); T2 (CC-CONTROL); T3 (VITRES); y T4 (VIT-CONTROL). Letras diferentes en cada barra de cada motilidad expresa diferencias significativas: a – b – c,  $P < 0,05$ .

#### 4.1.4. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de flagelo (BCF)

Los valores de ALH y BCF de T1 y T2 fueron más altos ( $P < 0,01$ ) que aquellos valores de T3 y T4 en las muestras frescas. Una reducción significativa ( $P < 0,05$ ) del valor de la ALH con respecto a las muestras frescas fue evidenciado únicamente en T1 y T2 después de la descongelación. En el análisis de las muestras criopreservadas, T1 produjo valores más altos ( $P < 0,05$ ) de ALH comparado con T3 y T4, mientras que T2 obtuvo mejores valores ( $P < 0,05$ ) de ALH que T4. En el caso del método de congelación convencional (T1 vs. T2), no hubo diferencia significativa ( $P > 0,05$ ) en ALH y BCF independientemente del uso de RES en muestras frescas y criopreservadas. No obstante, los tratamientos de congelación convencional produjeron valores superiores de BCF que T3 ( $P < 0,05$ ) y T4 ( $P < 0,01$ ).



Eficientemente, un efecto significativo del resveratrol fue evidenciado en la vitrificación, dado que T3 obtuvo valores de BCF más altos ( $P < 0,05$ ) que T4 (Figura 6).



**Figura 6.** Valores de ALH y BCF de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas con los siguientes tratamientos: T1 (CC-RES); T2 (CC-CONTROL); T3 (VITRES); y T4 (VIT-CONTROL). Letras diferentes en cada barra de cada motilidad expresa diferencias significativas: a – b – c,  $P < 0,05$ . \* Asterisco expresa diferencias significativas entre los toros y tratamientos (\*  $P < 0,01$ ).

#### 4.2. Integridad de membranas espermáticas

En las muestras frescas se pudo evidenciar que el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA) fue mayor ( $P < 0,05$ ) en T1 y T2 que en T3 y T4. Un efecto significativo del RES fue evidenciado antes de la congelación (muestras frescas) debido a que el porcentaje de IPIA con T1 fue más alto ( $P < 0,05$ ) que con T2. En este mismo sentido, un menor ( $P < 0,05$ ) porcentaje de espermatozoides indeseables con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA) o acrosoma dañado (DPDA) fueron obtenidos con T1 y T2 comparado con T3 y T4. Una reducción del porcentaje de IPIA ( $P < 0,001$ ), y un incremento indeseable de los porcentajes de DPIA ( $P < 0,05$ ) y DPDA ( $P < 0,01$ ) fueron evidenciados en todos los tratamientos después de los procesos de congelación (T1 y T2) y vitrificación (T3 y T4) (Tabla 5).

En el análisis de las muestras criopreservadas, T1 y T2 mostraron porcentajes más altos ( $P < 0,05$ ) de IPIA, y porcentajes menores ( $P < 0,01$ ) de las categorías indeseables DPIA y DPDA que T3 y T4. Eficientemente, el efecto del RES fue evidenciado en las muestras descongeladas

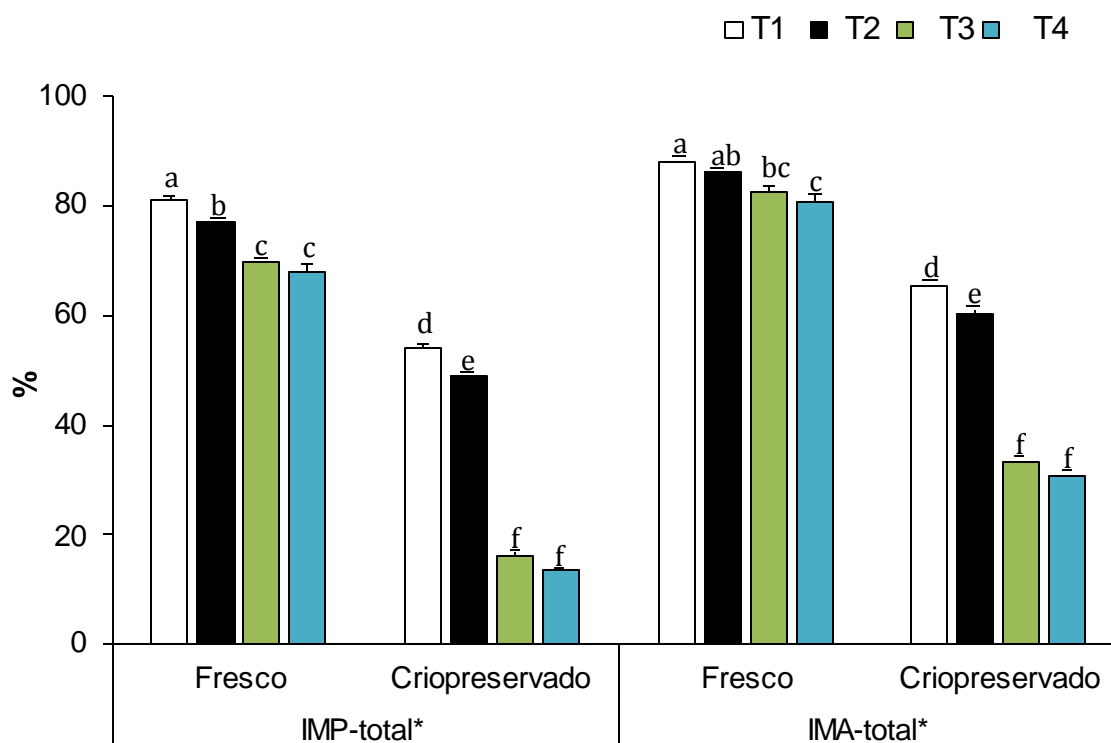
de T1 al demostrar un mayor porcentaje de IPIA ( $P < 0,05$ ) y menor porcentaje indeseable de DPDA ( $P < 0,05$ ) que las muestras descongeladas de T2 (Tabla 5). Este efecto no fue observado en las muestras seminales vitrificadas.

**Tabla 5.** Porcentajes de espermatozoides en las diversas categorías de integridad de membrana (evaluados con marcadores fluorescentes P1/PNA-FITC) de muestras bovinas frescas y criopreservadas con los siguientes tratamientos: T1 (CC-RES); T2 (CC-CONTROL); T3 (VIT-RES); y T4 (VIT-CONTROL).

	Frescos				Criopreservados			
					Post-descongelación		Post-calentamiento	
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
<b>IPIA (%)*</b>	80,0±0,92 <sup>a</sup>	76,1±1,12 <sup>b</sup>	68,0±1,25 <sup>c</sup>	66,7±1,45 <sup>c</sup>	53,2±0,86 <sup>d</sup>	48,0±0,89 <sup>e</sup>	15,2±0,45 <sup>f</sup>	12,9±0,40 <sup>f</sup>
<b>IPDA (%)*</b>	1,1±0,22 <sup>ab</sup>	1,02±0,22 <sup>ab</sup>	1,68±0,41 <sup>a</sup>	1,24±0,24 <sup>ab</sup>	0,86±0,07 <sup>b</sup>	0,82±0,10 <sup>b</sup>	0,97±0,11 <sup>b</sup>	0,59±0,08 <sup>b</sup>
<b>DPIA (%)</b>	8,1±0,75 <sup>d</sup>		14,4±1,51 <sup>b</sup>	13,9±1,30 <sup>b</sup>	12,1±0,47 <sup>c</sup>	12,3±0,39 <sup>c</sup>	17,9±0,60 <sup>a</sup>	17,8±0,63 <sup>a</sup>
	10,0±0,94 <sup>cd</sup>							
<b>DPDA (%)</b>	10,8±0,95 <sup>e</sup>	12,9±1,09 <sup>e</sup>	15,9±1,43 <sup>e</sup>	18,2±1,45 <sup>d</sup>	35,1±0,88 <sup>c</sup>	38,9±0,92 <sup>b</sup>	66,8±0,85 <sup>a</sup>	68,6±0,71 <sup>a</sup>

Diferentes superíndices en cada fila expresan diferencias significativas entre tratamientos de muestras frescas y criopreservadas ( $a - b - c - d$ ,  $P < 0,05$ ;  $a - c$ ,  $a - d$ ,  $P < 0,01$ ) \* Asterisco en cada categoría expresa diferencias significativas entre los toros y tratamientos (\*  $P < 0,01$ ).

En la evaluación de los porcentajes totales de espermatozoides con membrana plasmática intacta (IMP-Total, equivalente a la viabilidad) y acrosoma intacto (IMA-total) se evidenció que T1 y T2 produjeron valores más altos ( $P < 0,05$ ) que T3 y T4, tanto en muestras frescas (antes de la criopreservación) como criopreservadas. Asimismo, los porcentajes de IMP-Total y IMA-total se redujeron ( $P < 0,01$ ) en todos los tratamientos después de los procesos de congelación (T1 y T2) y de vitrificación (T3 y T4). Finalmente, se evidenció un efecto significativo crioprotector del resveratrol únicamente en las muestras congeladas – descongeladas, considerando que T1 produjo porcentajes de IMP-total e IMA-total más altos ( $P < 0,01$ ) que las muestras de T2 (Figura 7 y 8).



**Figura 7.** Porcentajes totales de IMP-total y IMA-total de muestras espermáticas bovinas frescas y criopreservadas con los siguientes tratamientos: T1 (CC-RES); T2 (CC-CONTROL); T3 (VIT-RES); y T4 (VIT-CONTROL). Letras diferentes en cada barra de cada motilidad expresa diferencias significativas: a – b – c,  $P < 0,05$ . \* Asterisco expresa diferencias significativas entre los toros y tratamientos (\*  $P < 0,01$ ).

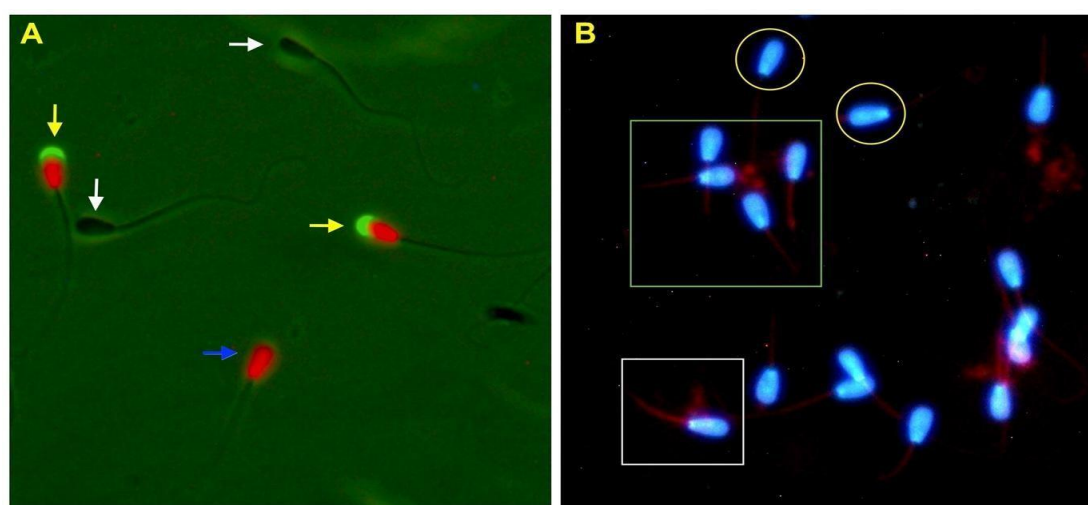
### 4.3. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) evaluado en muestras congeladas – descongeladas con (T1) y sin resveratrol (T2), y muestras vitrificadas – calentadas con (T3) y sin resveratrol (T4) no evidenció diferencias significativas entre T1 y T2. No obstante, el efecto antioxidante del resveratrol fue evidenciado en la vitrificación debido a que la muestra del tratamiento T3 produjo un menor EO (leve, intenso o total) que las muestras del tratamiento T4 (control) (Tabla 6 y Figura 6).

**Tabla 6.** Porcentajes de espermatozoides con y sin estrés oxidativo (EO, leve, intenso y total) evaluados con marcadores fluorescentes CellROX Deep Red / Hoechst, de muestras bovinas frescas y criopreservadas con los siguientes tratamientos: T1 (CC-RES); T2 (CC-CONTROL); T3 (VIT-RES); y T4 (VIT-CONTROL).

	Tratamientos Categorías			
	T1	T2	T3	T4
EO-total (%)	4,0±0,98 <sup>c</sup>	6,8±1,88 <sup>c</sup>	16,9±2,51 <sup>b</sup>	31,0±2,38 <sup>a</sup>
OE-Leve (%)	2,5±0,80 <sup>c</sup>	5,2±1,76 <sup>c</sup>	13,3±4,74 <sup>b</sup>	28,3±4,78 <sup>a</sup>
OE-Intenso (%)	1,4±0,41	1,6±0,68	3,6±1,22	2,7±1,10
Sin EO (%)	96,0±0,98 <sup>a</sup>	93,2±1,88 <sup>a</sup>	83,1±2,52 <sup>b</sup>	69,0±2,36 <sup>c</sup>

Diferentes superíndices en cada fila expresan diferencias significativas entre tratamientos de muestras frescas y criopreservadas ( $a-b-c P < 0,05$ ;  $a-c P < 0,01$ ).



**Figura 8.** Espermatozoides bovinos observados bajo un microscopio de Epifluorescencia con un filtro de triple paso de banda (B-2A, excitación: 450-490 nm, emisión: 520 nm; G-2A, excitación: 510-560 nm, emisión: 590 nm; y UV-2E/C, excitación: 330-380 nm, emisión: 420 nm). A) espermatozoides teñidos con prueba de doble fluorescencia PI/PNA-FITC. Observe los espermatozoides intactos (flechas blancas), los espermatozoides con membrana plasmática dañada (flecha azul) y los espermatozoides con membrana plasmática y acrosoma dañados (flechas amarillas). B) espermatozoides teñidos con la sonda fluorescente CellROX Deep Red Reagent® y Hoechst 33342. Observe los espermatozoides sin estrés oxidativo (círculos amarillos) y los espermatozoides con estrés oxidativo moderado (cuadrado verde) e intenso (cuadrado blanco) según la intensidad de tinción marcada en la pieza intermedia.

## Discusión

Esta investigación evaluó el efecto del RES suplementado a los medios sintéticos de congelación y vitrificación sobre la criosupervivencia de espermatozoides bovinos. Los resultados demostraron que en general el proceso de congelación convencional y descongelación produjo mejores valores de cinemática, integridad de membranas plasmática y acrosomal, y menor estrés oxidativo en comparación con el proceso de vitrificación y calentamiento, independientemente de la suplementación o no con RES. Sin embargo, previo a la congelación, el RES sí mejoró la integridad de las membranas (es decir: IPIA e IMP), mientras que previo a la vitrificación el RES mejoró únicamente la MT. Además, posterior a los procesos de congelación y descongelación, se determinó un efecto crioprotector del RES debido al mejoramiento de las motilidades (MT y MP) e integridad de membranas (IPIA, IMP e IMA). Asimismo, posterior a los procesos de vitrificación y calentamiento, el RES mejoró los valores de BCF y disminuyó el estrés oxidativo. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los efectos antioxidantes y crioprotectores del RES permitieron incrementar la calidad espermática y criosupervivencia de espermatozoides de toros, con mayor intensidad en las muestras sometidas a congelación convencional, y en menor magnitud en las muestras criopreservadas mediante vitrificación.

Se conoce que después de los procesos de criopreservación, la calidad, supervivencia espermática y capacidad fecundante disminuye debido a los efectos deletéreos provocados por la criogenización, tales como el choque de frío, estrés oxidativo, estrés osmótico, daños mecánicos (por tensiones) y daños estructurales en sus membranas (plasmática, acrosomal y mitocondrial), condensación de la cromatina y daño de ADN (Crespilho et al., 2012; Grötter et al., 2019; Qamar et al., 2020). A pesar de la reducción significativa de la calidad espermática que sufren los espermatozoides después de la criopreservación, se ha evidenciado que después de la congelación, los espermatozoides bovinos producen mayores resultados de motilidad y viabilidad que después de la vitrificación (Baiee et al., 2020; Hidalgo et al., 2018). Durante la congelación, las velocidades de enfriamiento influyen en la deshidratación celular y la formación de cristales de hielo (Mazur, 1984); no obstante, al mejorar la curva de congelación con velocidades de enfriamiento lentas al inicio y luego más rápidas, permite una mejor supervivencia espermática como fue demostrado por Tamay et al. (2022), quienes usaron una caja criogénica con dos rampas de congelación. Además, la producción excesiva de las ROS generada por la criopreservación causa una interrupción de los mecanismos de transporte en las membranas espermáticas (plasmática y mitocondrial) que dificultan el flujo y eflujo de agua y solutos con el medio externo (Sikka, 1996). En consecuencia, el estrés

oxidativo provoca un descenso de la motilidad espermática debido a la disminución de la producción de ATP (Tvrdá et al., 2015).

Por otro lado, durante la vitrificación de espermatozoides se usan azúcares disacáridos (Ej. 100 a 250 mM de sacarosa) que actúan como agentes crioprotectores no penetrantes para permitir que no se formen cristales de hielo; sin embargo, su exposición por un tiempo determinado (30 minutos) antes de la vitrificación puede provocar toxicidad en las células (Holt, V W., 2014). La citotoxicidad es muy común en los procedimientos de vitrificación de células debido a las altas concentraciones de ACNP que desencadenan un choque osmótico, por lo que una manera de evitar este efecto es al disminuir el tiempo de exposición de los espermatozoides a los ACNP, tal y como lo ha sido demostrado por Baiee et al., (2020), quienes encontraron mejores resultados cinemáticos al limitar el tiempo de equilibrio a 25 segundos al mezclar ACP como DMSO y etilenglicol (20%), y ACNP como la sacarosa (0,5 M) para la vitrificación de semen bovino. Similarmente, Isachenko et al., (2008) hallaron que el uso de sacarosa y albúmina sérica humana como ACNP en la vitrificación de semen humano mantienen la integridad mitocondrial al limitar el tiempo de exposición a cinco minutos.

Asimismo, se ha demostrado que tanto el tipo de disacárido como la concentración usada para la vitrificación son factores importantes, Pérez et al., (2022) identificaron que la adición de 0,3 M de sacarosa o 0,15 M de trehalosa al medio de vitrificación confiere un efecto protector moderado a los espermatozoides bovinos, aunque la motilidad se redujo drásticamente. El uso de 100 mM de trehalosa en medios de vitrificación para semen equino ha demostrado mejores parámetros de calidad espermática en comparación con la adición de sacarosa o rafinosa (Consuegra et al., 2019). No obstante, se recomienda alcanzar una concentración final de 0,1 M de sacarosa al usar medios de vitrificación que contengan yema de huevo (Diaz-Jimenez et al., 2019). De igual manera, el método de vitrificación también desempeña un papel importante, pues en otras especies se ha demostrado la eficacia de vitrificar al sumergir en NL<sub>2</sub> una pajuela de 0,25 mL introducida en una pajuela de 0,5 mL (Diaz Jimenez et al., 2017), vitrificar directamente sumergiendo una pajuela de 0,25 mL en NL<sub>2</sub> (Baiee et al., 2020) o vitrificar al permitir que gotas de 30 caigan sobre NL<sub>2</sub> (Isachenko et al., 2008; Pérez et al., 2022; Sánchez et al., 2011), sin embargo, no hay investigaciones disponibles que comparen la eficacia de los métodos de vitrificación en la especie bovina.

Además, se ha evidenciado que los daños criogénicos que sufren los espermatozoides durante la congelación ultrarrápida o vitrificación (Ej. enrollamiento de pieza intermedia, daño de filamentos mitocondriales, daño en la membrana plasmática y condensación en la parte apical de acrosomas) son mayores que aquellas muestras sometidas a congelación convencional con vapores de NL<sub>2</sub> (Bóveda et al., 2020). En la criopreservación de semen bovino se ha

evidenciado que el método de congelación convencional proporciona mejores resultados post-descongelación al conservar la motilidad total, progresiva y morfología normal espermática en comparación con el método de vitrificación (Baiee et al., 2020). En rumiantes, la microscopía electrónica de transmisión en muestras post-calentamiento ha revelado daños en el plasmalema y en la membrana mitocondrial (Bóveda et al., 2020). En las especies humana (Schulz et al., 2020) y canina (Sánchez et al., 2011), cuyos espermatozoides tienen un tamaño mucho menor en comparación al espermatozoide bovino, se han conseguido resultados favorables al realizar la vitrificación, pero esto no se ha conseguido en la especie bovina (Yu & Haron, 2017; Baiee et al., 2020; Pérez et al., 2022), Isachenko et al., (2003) sugieren que esto se debe a que el tamaño y la forma de los espermatozoides determinan su crioresistencia, pues hay una correlación negativa entre el tamaño de la cabeza del espermatozoide y su crioestabilidad. Los resultados de la presente investigación son consistentes con los reportes antes mencionados debido a que la congelación convencional basada en un sistema de dos rampas, produjeron resultados más altos de cinemática e integridad de membranas que la vitrificación.

El RES tiene potentes propiedades antioxidantes debido a la actividad eliminadora de radicales de este compuesto, lo que da como resultado una reducción en la generación de las ROS y de la LPO (Leonard et al., 2003; Olas & Wachowicz, 2004). Su acción antioxidante se observa mediante la eliminación de ROS/nitrógeno reactivo y radicales orgánicos secundarios con mecanismos de transferencia de átomos de hidrogeno y electrones de pérdida secuencial de protones, protegiendo así a las biomoléculas celulares del daño oxidativo, de igual manera reduce la producción de óxido nítrico, evitando la generación de peroxinitrito lo que conlleva a un menor daño celular (Q. Meng et al., 2023; Truong et al., 2018). Controla la actividad enzimática de antioxidantes impidiendo daño del ADN por la presencia de radicales libres siendo la causa subyacente de la reducción de la capacidad fertilizante de los espermatozoides; de igual manera aumenta la expresión de proteínas de la vía de señalización de Nrf2 y HO-1, lo que provoca una atenuación de la producción de mediadores inflamatorios (Lv et al., 2019; T. Meng et al., 2021), no obstante su mecanismo de acción no ha sido definido con claridad. Además, el efecto crioprotector del RES ha sido previamente investigado en espermatozoides de humanos, carneros, conejos, cabras, verracos, e incluso toros, mejorando la calidad espermática post descongelación debido a su propiedad antioxidante y su efecto en la biogénesis mitocondrial. (Branco et al., 2010; Bucak et al., 2015; Lv et al., 2019; Shin et al., 2008; Silva et al., 2012; Zhu et al., 2019). Una reciente investigación determinó que el RES a 0,05 mM mejoró la integridad del acrosoma y de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos congelados y descongelados; sin embargo, no mejoró su fertilidad valorada en condiciones de *in vitro* (Assunção et al., 2021). El mecanismo por el cual actúa el RES aún no es del todo claro. Sin embargo, se cree que la capacidad antioxidante se atribuye a la velocidad

con la que el RES elimina  $\text{OH}^\cdot$ , uno de los radicales libres más reactivos que perjudica la integridad de la membrana celular (Leonard et al., 2003). La alteración de la membrana celular es una consecuencia del efecto nocivo de los radicales libres sobre las células (Sanocka & Kurpisz, 2004). Por otro lado, se ha informado que el RES disminuye el complejo de la cadena oxidativa generado por el incremento de ROS; esto condiciona una competencia del RES con la coenzima Q, eliminando los radicales  $\text{O}_2^\cdot$  en las mitocondrias e inhibiendo la LPO (Zini et al., 1999; Alarcón De La Lastra & Villegas, 2007; Juan Gambini et al., 2013). Como resultado funcional, el RES mejora la motilidad, la integridad del acrosoma y la fluidez de la membrana plasmática de los espermatozoides, así como contribuye a la biogénesis mitocondrial (Lagouge et al., 2006; Tvrdá et al., 2015). Otros autores indicaron que el RES induce el incremento de enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), las cuales actúan como mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo y LPO (Ahmed et al., 2020; Li et al., 2018).

Los hallazgos de esta investigación indican que el RES actuó antes y después de la criopreservación, y eliminó los radicales libres ( $\text{OH}^\cdot$  y  $\text{O}_2^\cdot$ ) (Truong et al., 2018), incrementando la protección de la membrana plasmática y acrosomal, y mejorando la motilidad total y progresiva. Además, los resultados sugieren que el RES probablemente activó a SIRT1 (Howitz et al., 2003), desencadenando la activación de PGC-1 $\alpha$  (Wenz, 2013), el cual es fundamental para la biogénesis mitocondrial, que es muy importante pues la integridad mitocondrial y su potencial de membrana son indispensables para la motilidad espermática (Durairajanayagam et al., 2021). PGC-1 $\alpha$  también puede ser activado por la proteína AMPK (Jager et al., 2007). Se ha identificado previamente que la fosforilación de la proteína AMPK estimulada por acción del RES condiciona el aumento de la cinemática espermática (Sharafi et al., 2022; Hernández-Matos et al., 2010). Tiwari et al., (2021) demostraron que la adición del RES al medio de dilución de espermatozoides de búfalo antes de la congelación mejoró únicamente la integridad del acrosoma. Los autores hipotizaron que la integridad de la membrana plasmática no mejoró debido a que los espermatozoides de búfalos (en comparación con los de toro) son más susceptibles al estrés oxidativo por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la membrana plasmática. Otro estudio realizado Bucak et al., (2015) reportaron que el RES no mejoró la integridad de membranas plasmática y acrosomal de espermatozoides bovinos descongelados.

La concentración del RES ha mostrado diferentes resultados en la congelación convencional de espermatozoides. Tvrdá et al. (2015) determinaron que la adición de 0,025 a 0,050 mM de RES protegió eficientemente a los espermatozoides bovinos contra la LPO y disminuyó el daño a la integridad estructural del espermatozoide. Assunção et al. (2021) y Longobardi et al. (2017) congelaron muestras de espermatozoides bovinos adicionando 0,05 mM de RES a un



diluyente a base de tris, yema de huevo y 6% de glicerol y obtuvieron un incremento en la integridad de la membrana plasmática y/o acrosomal. Nuestros resultados confirman los hallazgos anteriormente mencionados respecto al proceso de congelación convencional. Sin embargo, en rumiantes, estudios de fluorescencia han revelado que el proceso de vitrificación afecta considerablemente a las mitocondrias de los espermatozoides en comparación con la congelación convencional, lo cual se manifiesta en la vacuolización mitocondrial al realizar microscopía electrónica de transmisión (Bóveda et al., 2020). En consecuencia, las mitocondrias, cuyo potencial de membrana ha sido afectado, generan ROS, y a su vez, los ROS causan daño a las membranas de otras mitocondrias (Sabeti et al., 2016). Por consiguiente, el proceso de vitrificación genera mayor estrés oxidativo que la congelación convencional, por lo tanto, aunque el RES sí mejoró algunos parámetros cinéticos (MT y la BCF) y disminuyó el estrés oxidativo antes y después de la vitrificación, demostrando su efecto antioxidante y eliminador de los radicales libres, los resultados sugieren que probablemente se requiera una dosis diferente de RES para compensar el estrés oxidativo consecuencia del proceso de vitrificación. Esta investigación constituye el primer reporte del uso del RES en la vitrificación de espermatozoides bovinos.

El incremento de las variables cinéticas como la ALH y BCF se relaciona positivamente con la fertilidad *in vitro* (Gillan et al., 2008). Se ha determinado que adicionando 500  $\mu\text{M}$  de RES al medio de congelación mejora los valores de BCF post descongelación en comparación con su contraparte control (Bucak et al., 2015). Sin embargo, otros reportes indican que al suplementar el medio con 200 o 400  $\mu\text{M}$  de RES no mejoraron la ALH y BCF (Al-Mutary et al., 2020). Nuestros resultados demostraron que la suplementación de 50  $\mu\text{M}$  al medio de vitrificación mejoró la BCF antes de la vitrificación y disminuyó el estrés oxidativo generado por la inmersión directa de los espermatozoides en NL<sub>2</sub>. La capacidad antioxidante (inducida por *ascorbato ferroso*) del RES (de 0,025 a 0,050 mM) ya fue demostrada previamente por Tvrdá et al. (2015), quienes concluyeron que el RES confiere cierta protección al espermatozoide frente al estrés oxidativo. Otros trabajos han demostrado la capacidad antioxidante del RES al disminuir los niveles de ROS y la LPO (Bucak et al., 2015; Longobardi et al., 2017). Hasta donde conocemos, esta investigación es el primer reporte de la evaluación del efecto del RES sobre el estrés oxidativo desencadenado por procesos de congelación o vitrificación de semen bovino mediante la tinción fluorescente CellROX, Deep Red<sup>®</sup>. La tinción fluorescente CellROX Deep Red<sup>®</sup> ha sido testada previamente en espermatozoides congelados y descongelados de carneros (Alves et al., 2015), equinos (Tamay et al., 2022) y bovinos, en esta última especie se ha sugerido que la detección de fluorescencia en la pieza intermedia es indicativo de la oxidación de la membrana mitocondrial y se asocia con muestras de toros poco fértiles y con bajos porcentajes de preñez (Celeghini et al., 2021).

### Conclusiones

- Los resultados de la presente investigación permiten concluir que el resveratrol protegió a los espermatozoides bovinos antes y después de la congelación debido al incremento de las motilidades. Asimismo, en las muestras sometidas a vitrificación, el RES demostró su capacidad antioxidante al mejorar algunos parámetros cinéticos como la motilidad total en muestras frescas y BCF en muestras criopreservadas.
- Referente a la integridad de membrana plasmática y acrosomal, el efecto de RES se evidenció en las muestras espermáticas antes y después de la congelación, pero no en las muestras sometidas a vitrificación y calentamiento.
- El RES actuó eficazmente al disminuir el estrés oxidativo en los espermatozoides sometidos a congelación y vitrificación, aunque el efecto en esta última fue de mayor magnitud

### Recomendaciones

- Suplementar rutinariamente con RES los medios de congelación TCG-EY para mejorar la criosupervivencia espermática y disminuir el estrés oxidativo en espermatozoides bovinos.
- Evaluar la suplementación de diferentes dosis de RES en los medios de vitrificación para mejorar la cinemática e integridad de membrana de los espermatozoides y disminuir el estrés oxidativo luego de la descongelación.
- Incluir al RES como antioxidante en futuras investigaciones para evaluar el efecto crioprotector y antioxidante sobre la fertilidad (*in vivo* o *in vitro*).

## Referencias

- Ahmed, H., Jahan, S., Ulla, H., Ulla, F., & Salman, M. M. (2020). The addition of resveratrol in tris citric acid extender ameliorates post-thaw quality parameters, antioxidant enzymes levels, and fertilizing capability of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*, *152*, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.034>
- Al-Mutary, M. G., Al-Ghadi, M. Q., Ammari, A. A., Al-Himadi, A. R., Al-Jolimeed, A. H., Arafah, M. W., Amran, R. A., Aleissa, M. S., & Swelum, A. A.-A. (2020). Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5 °C for up to 168 h. *Theriogenology*, *152*, 139–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.001>
- Alarcón De La Lastra, C., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: Mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, *35*(5), 1156–1160. <https://doi.org/10.1042/BST0351156>
- Alves, M. B. R., Andrade, A. F. C. de, Arruda, R. P. de, Batissaco, L., Florez-Rodriguez, S. A., & Lançon, R. (2015). An efficient technique to detect sperm reactive oxygen species: The CellRox deep red fluorescent probe. *Biochem. Physiol.*, *4*, 157.
- Ashrafi, I., Kohram, H., & Ardabili, F. F. (2013). Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, *139*(1–4), 25–30.
- Assunção, C. M., Mendes, V. R. A., Brandão, F. Z., Batista, R. I. T. P., Souza, E. D., Carvalho, B. C. de, Quintão, C. C. R., Raposo, N. R. B., & Camargo, L. S. A. (2021). Effects of resveratrol in bull semen extender on post-thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo development. *Animal Reproduction Science*, *226*(May 2020), 106697. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106697>
- Baiee, F., Al-Wahab, B. A., Almusawi, A. A., Yu, L. L., Fitri, W.-N., Haron, A. W., & Bustani, G. S. (2020). Effect of vitrification on spermatozoa quality in bull semen. *EurAsian Journal of BioSciences*, *14*(2).
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Minireview: Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, *21*(1), 1–7.

- Bansal, A. K., & Cheema, R. S. (2016). Effect of catalase on sperm function tests, lipid peroxidation and superoxide dismutase enzyme activity during cryopreservation of buffalo bull semen. *International Research Journal of Natural and Applied Sciences*, 3(11), 168–184.
- Barth, A. D., & Oko, R. J. (1991). *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Wiley.
- Bhat, M. H., Blondin, P., Vincent, P., & Benson, J. D. (2020). Low concentrations of 3-Omethylglucose improve post thaw recovery in cryopreserved bovine spermatozoa. *Cryobiology*, 95, 15–19.
- Bóveda, P., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., Estesó, M. C., López-Sebastián, A., Rizos, D., Bielli, A., Ungerfeld, R., & Santiago-Moreno, J. (2020). Ultra-rapid cooling of ibex sperm by spheres method does not induce a vitreous extracellular state and increases the membrane damages. *PLOS ONE*, 15(1), e0227946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227946>
- Bowers, J. L., Tyulmenkov, V. V., Jernigan, S. C., & Klinge, C. M. (2000). Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 141(10), 3657–3667. <https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7721>
- Branco, C. S., Garcez, M. E., Pasqualotto, F. F., Erdtman, B., & Salvador, M. (2010). Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, 60(2), 235–237. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.012>
- Bucak, M. N., Ataman, M. B., Başpınar, N., Uysal, O., Taşpınar, M., Bilgili, A., Öztürk, C., Güngör, Ş., İnanç, M. E., & Akal, E. (2015). Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. *Andrologia*, 47(5), 545–552. <https://doi.org/10.1111/and.12301>
- Cardoso, B., Sánchez-Ajofrín, I., Castaño, C., García-Álvarez, O., Estesó, M. C., MarotoMorales, A., Iniesta-Cuerda, M., Garde, J. J., Santiago-Moreno, J., & Soler, A. J. (2020). Optimization of Sperm Cryopreservation Protocol for Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*). *Animals*, 10(4), 691. <https://doi.org/10.3390/ani10040691>
- Celeghini, E., Alves, M., De Arruda, R., de Rezende, G., Florez-Rodriguez, S., & de Sá Filho, M. (2021). Efficiency of CellROX deep red® and CellROX orange® fluorescent probes in identifying reactive oxygen species in sperm samples from high and low fertility bulls. *Animal Biotechnology*, 32(1), 77–83.

Consuegra, C., Crespo, F., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., & Hidalgo, M. (2019). Vitrification of stallion sperm using 0.25 ml straws: Effect of volume, concentration and carbohydrates (sucrose/trehalose/raffinose). *Animal Reproduction Science*, 206, 69–

77.

Cormier, N., & Bailey, J. L. (2003). A Differential Mechanism Is Involved During Heparin- and Cryopreservation-Induced Capacitation of Bovine Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 69(1), 177–185. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011056>

Crespilho, A. M., Sá Filho, M. F., Dell'Aqua, J. A., Nichi, M., Monteiro, G. A., Avanzi, B. R., Martins, A., & Papa, F. O. (2012). Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science*, 149(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011>

Del Río, M. J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M. E., Moreno, R. D., & Vigil, P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*, 5(4), 368–373. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(07\)74086-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1698-031X(07)74086-4)

Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Consuegra, C., Ortiz, I., Pereira, B., Carrasco, J. J., GomezArrones, V., Domingo, A., & Hidalgo, M. (2019). Optimization of donkey sperm vitrification: Effect of sucrose, sperm concentration, volume and package (0.25 and 0.5 mL straws).

*Animal Reproduction Science*, 204, 31–38.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.03.002>

Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., Ortiz, I., Consuegra, C., Partyka, A., Dorado, J., & Hidalgo, M. (2017). Effect of different extenders for donkey sperm vitrification in straws. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 55–57.

Donoghue, A. M., & Donoghue, D. J. (1997). Effects of water- and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity, and motility during liquid storage. *Poultry Science*, 76(10), 1440–1445.

Durairajanayagam, D., Singh, D., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*, 53(1), e13666.

- 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.
- Galarza, D., López, S., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2018). Sephadex filtration as successful alternative to density-gradient centrifugation procedures for ram sperm selection with improved kinetics. *Animal Reproduction Science*, 192, 261–270.
- Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., & Borrás, C. (2015). Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/837042>
- Gambini, J., López-grueso, R., Olaso-gonzález, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El, M., Bonetcosta, V., Borrás, C., & Vi, J. (2013). Resveratrol distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriátría y Gerontología: Organo Oficial de La Sociedad Española de Geriátría y Gerontología*, 48(2), 79–88.
- Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2008). Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, 103(3–4), 201–214.
- Gororo, E., Makuza, S. M., Chidzondo, F., & Chatiza, F. P. (2020). Variation in sperm cryosurvival is not modified by replacing the cryoprotectant glycerol with ethylene glycol in bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(9), 1210–1218.
- 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>
- Hernández-Matos, Y., Delgado-Roche, L., López-Pérez, R., Martínez-Sánchez, G., & Mallok, A. (2010). Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 18(3), 153–158.
- Hidalgo, M., Consuegra, C., Dorado, J., Diaz-Jimenez, M., Ortiz, I., Pereira, B., Sanchez, R., & Crespo, F. (2018). Concentrations of non-permeable cryoprotectants and equilibration

- temperatures are key factors for stallion sperm vitrification success. *Animal Reproduction Science*, 196(June), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.022>
- Holt, V W., P. L. M. (2014). *Animal andrology: theories and applications* (P. Chenoweth & S. Lorton (eds.)). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781780643168.0000>
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.-L., Scherer, B., & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191–196. <https://doi.org/10.1038/nature01960>
- Iqbal, S., Naz, S., Ahmed, H., & Andrabi, S. M. H. (2018). Cryoprotectant effect of trehalose in extender on post-thaw quality and in vivo fertility of bull spermatozoa. *Andrologia*, 50(1), e12794.
- 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.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weiss, J. M., Kreienberg, R., Katkov, I. I., Schulz, M., Lulat, A., Risopatrón, M. J., & Sanchez, R. (2008). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction*, 136(2), 167.
- Jager, S., Handschin, C., & St-Pierre, J. (2007). Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 12017–12022.
- Jha, P. K., Paul, A. K., Rahman, M. B., Tanjim, M., Bari, F. Y., & Alam, M. G. (2013). Improvement of preservation quality of chilled bull semen using  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant. *J. Emb. Trans*, 28, 31–39.
- Juan, M. E., González-Pons, E., Munuera, T., Ballester, J., Rodríguez-Gil, J. E., & Planas, J. M. (2005). trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *The Journal of Nutrition*, 135(4), 757–760. <https://doi.org/10.1093/jn/135.4.757>
- 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, S49–S56.

King, R. E., Bomser, J. A., & Min, D. B. (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 65–70. <https://doi.org/10.1111/j.15414337.2006.00001.x>

Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2006). Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell*, 127(6), 1109–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.013>

Leonard, S. S., Xia, C., Jiang, B., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G. K., & Shi, X. (2003). Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(4), 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.105>

Li, C.-Y., Zhao, Y.-H., Hao, H.-S., Wang, H.-Y., Huang, J.-M., Yan, C.-L., Du, W.-H., Pang, Y.W., Zhang, P.-P., Liu, Y., Zhu, H.-B., & Zhao, X.-M. (2018). Resveratrol significantly improves the fertilisation capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting apoptosis and lipid peroxidation. *Scientific Reports*, 8(1), 7603. <https://doi.org/10.1038/s41598-01825687-z>

Longobardi, V., Zullo, G., Salzano, A., De Canditiis, C., Cammarano, A., De Luise, L., Puzio, M. V., Neglia, G., & Gasparri, B. (2017). Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*, 88, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.046>

Losano, J. D. A., Angrimani, D. S. R., Rui, B. R., Bicudo, L. C., Dalmazzo, A., Silva, B. C. S., Viana, C. H. C., Mendes, C. M., Assumpção, M. E. O. A., & Barnabe, V. H. (2018). The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. *Zygote*, 26(3), 199–206.

Lv, C., Larbi, A., Wu, G., Hong, Q., & Quan, G. (2019). Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. *Animal*

*Reproduction Science*, 208(July), 106127.

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106127>

Madrigal-Valverde, M., Bittencourt, R. F., de Lisboa Ribeiro Filho, A., Araujo, G. R., Lents, M. P., Santos, E. S., Lima, A. S., & Mattos, P. (2020). Can amides be alternative cryoprotectors for the preservation of feline semen? *Cryobiology*, 97(September), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.09.004>

Martínez-Fresneda, L., Sylvester, M., Shakeri, F., Bunes, A., Del Pozo, J. C., García-Vázquez, F. A., Neuhoﬀ, C., Tesfaye, D., Schellander, K., & Santiago-Moreno, J. (2021). Differential proteome between ejaculate and epididymal sperm represents a key factor for sperm freezability in wild small ruminants. *Cryobiology*, 99(November 2020), 64–77. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.012>

Martinez, J., & Moreno, J. J. (2000). Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 59(7), 865–870. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(99\)00380-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(99)00380-9)

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), C125–C142.

Membrillo Ortega, A., Córdova Izquierdo, A., Hicks Gómez, J. J., Olivares-Corichi, I. M., Martínez Torres, V. M., & Valencia Méndez, J. de J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión. *Interciencia*, 28(12), 699–704.

Meng, Q., Li, J., Wang, C., & Shan, A. (2023). Biological function of resveratrol and its application in animal production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00822-z>

Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., & He, J. (2021). Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules*, 26(1), 229. <https://doi.org/10.3390/molecules26010229>

Meyers, S. A. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science*, 89(1–4), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.026>

Montoya-Páez, J. D., Giraldo-León, M., & Duque-Cortes, J. E. (2020). Evaluation of three concentration of centrifuged egg yolk in the cryopreservation of bovine semen. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú (RIVEP)*, 31(2).

- Moreno, J. S., & Lucero, D. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2), 18–38.
- Motemani, M., Chamani, M., Sharafi, M., & Masoudi, R. (2017). Alpha-tocopherol improves frozen-thawed sperm quality by reducing hydrogen peroxide during cryopreservation of bull semen. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 15(1), 15.
- Mousavi, S. M., Towhidi, A., Zhandi, M., Amoabediny, G., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Sharafi, M., & Hussaini, S. M. H. (2019). Comparison of two different antioxidants in a nano lecithin-based extender for bull sperm cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 209, 106171.
- Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J. L., López, M., Fernández, A. I., & Peña, A. I. (2005). *Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial*.
- Naresh, S., & Atreja, S. K. (2015). The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*, 70(3), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.008>
- 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>
- Olas, B., & Wachowicz, B. (2004). Resveratrol reduces oxidative stress induced by platinum compounds in blood platelets. *General Physiology and Biophysics*, 23, 315–326.
- Pasquariello, R., Verdile, N., Brevini, T. A. L., Gandolfi, F., Boiti, C., Zerani, M., & Maranesi, M. (2020). The Role of Resveratrol in Mammalian Reproduction. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 19). <https://doi.org/10.3390/molecules25194554>
- Pérez, C. C., Quevedo, L., Salas, M., & Arando, A. (2022). Ultra-Rapid Freezing Using Droplets Immersed into Liquid Nitrogen in Bull Sperm: Evaluation of Two Cryoprotective Disaccharides and Two Warming Temperatures. *Biopreservation and Biobanking*.

- 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. (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), 2781.
- Pini, T., Leahy, T., Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Combes-Soia, L., Harichaux, G., Rickard, J. P., Druart, X., & de Graaf, S. P. (2016). Proteomic Investigation of Ram Spermatozoa and the Proteins Conferred by Seminal Plasma. *Journal of Proteome Research*, 15(10), 3700–3711. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00530>
- Pons-Rejraji, H., Bailey, J. L., & Leclerc, P. (2009). Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(4), 525. <https://doi.org/10.1071/RD07170>
- Qamar, A. Y., Fang, X., Kim, M. ., & Cho, J. (2020). Improved viability and fertility of frozenthawed dog sperm using adipose-derived mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 10, 1–10.
- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., & Kumar, N. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 239–245.
- Rodriguez-Martinez, H. (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology*, 68, S138–S146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.018>
- Saeed, A. M., El-Nagar, H. A., Wafa, W. M., & Hussein, Y. S. (2016). Effect of coenzyme Q10 as an antioxidant added to semen extender during cryopreservation of buffalo and cattle semen. *Journal of Animal and Poultry Production*, 7(11), 403–408.
- Sabeti, P., Pourmasumi, S., Rahiminia, T., Akyash, F., & Talebi, A. R. (2016). Etiologies of sperm oxidative stress. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 14(4), 231–240.
- Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., & Isachenko, E. (2011). Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia*, 43(4), 233–241.

- Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1–7.
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Estes, M. C., López-Sebastián, A., Guerra, R., Ruiz, M. J., Mendoza, N., Luna, C., & Cebrián-Pérez, J. A. (2013). Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. *Theriogenology*, 79(2), 383–391.
- Sapanidou, V., Taitzoglou, I., Tsakmakidis, I., Kourtzelis, I., Fletouris, D., Theodoridis, A., Zervos, I., & Tsantarliotou, M. (2015). Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology*, 84(8), 1273–1282.
- Schatten, H., & Constantinescu, G. M. (2008). *Comparative Reproductive Biology*. Wiley.
- Schulz, M., Risopatrón, J., Uribe, P., Isachenko, E., Isachenko, V., & Sánchez, R. (2020). Human sperm vitrification: A scientific report. *Andrology*, 8(6), 1642–1650.
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., Ahmed, H., & Qureshi, I. Z. (2016). Cryoprotection synergism between glycerol and dimethyl sulfoxide improves the mitochondrial transmembrane potential, plasmalemma, acrosomal and DNA integrities, and in vivo fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cytotechnology*, 68(6), 2335–2344.
- Sharafi, M., Blondin, P., Vincent, P., Anzar, M., & Benson, J. D. (2022). Hydroxytyrosol and resveratrol improves kinetic and flow cytometric parameters of cryopreserved bull semen with low cryotolerance. *Animal Reproduction Science*, 245(August), 107065. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107065>
- Shin, S., Jeon, J. H., Park, D., Jang, M.-J., Choi, J. H., Choi, B.-H., Joo, S. S., Nahm, S.-S., Kim, J.-C., & Kim, Y.-B. (2008). trans-resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Archives of Pharmacal Research*, 31(1), 83–87. <https://doi.org/10.1007/s12272-008-1124-7>
- Sikka, S. C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1(5), A146. <https://doi.org/10.2741/A146>
- Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C., & Guerra, M. M. P. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722–1726. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023>

- Singh, P., Agarwal, S., Singh, H., Singh, S., Verma, P. K., Butt, M. S., & Sharma, U. (2020). Effects of Ascorbic acid as antioxidant semen additive in cryopreservation of cross-bred cattle bull semen. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(7), 3089–3099.
- Skidmore, J. A., Malo, C. M., Crichton, E. G., Morrell, J. M., & Pukazhenthi, B. S. (2018). An update on semen collection, preservation and artificial insemination in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Animal Reproduction Science*, 194(December 2017), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.013>
- Staub, C., & Johnson, L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 12, s27–s35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S1751731118000435>
- Sun, L., Fan, X., Zeng, Y., Wang, L., Zhu, Z., Li, R., Tian, X., Wang, Y., Lin, Y., Wu, D., & Zeng, W. (2020). Resveratrol protects boar sperm in vitro via its antioxidant capacity. *Zygote*, 28(5), 417–424. <https://doi.org/10.1017/S0967199420000271>
- Talevi, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Longobardi, S., & Gualtieri, R. (2013). Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 1–10.
- Tamay, E., Palacios, P., Peláez, G., Saa, L. R., Dorado, J., Santiago-Moreno, J., & Galarza, D. A. (2022). Effect of Melatonin and Caffeine Supplementation to Freezing Medium on Cryosurvival of Peruvian Paso Horse Sperm Using a Two-Step Accelerating Cooling Rate. *Biopreservation and Biobanking*.
- Tan, D. X., Reiter, R. J., Manchester, L. C., Yan, M. T., El-Sawi, M., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Kohen, R., Allegra, M. C., & Hardeland, R. (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2), 181–197.
- Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydın, F. N., Büyükleblebici, O., & Gürcan, I. S. (2013). Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*, 66(1), 38–42.
- Tiwari, S., Mohanty, T. K., Bhakat, M., Kumar, N., Baithalu, R. K., Nath, S., Yadav, H. P., & Dewry, R. K. (2021). Comparative evidence support better antioxidant efficacy of mitochondrial-targeted (Mitoquinone) than cytosolic (Resveratrol) antioxidant in improving in-vitro sperm functions of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Cryobiology*, 101, 125–134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.04.007>

- Truong, V.-L., Jun, M., & Jeong, W.-S. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *BioFactors (Oxford, England)*, *44*(1), 36–49. <https://doi.org/10.1002/biof.1399>
- Tvrđá, E., Kováčik, A., Tušimová, E., Massányi, P., & Lukáč, N. (2015). Resveratrol offers protection to oxidative stress induced by ferrous ascorbate in bovine spermatozoa. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, *50*(14), 1440–1451. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1071153>
- 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. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*, 268.
- 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. *Andrologia*, *53*(8), 1–16. <https://doi.org/10.1111/and.14154>
- Vigil, P., Orellana, R. F., & Cortés, M. E. (2011). Modulation of spermatozoon acrosome reaction. *Biological Research*, *44*(2), 151–159.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, *60*, 481–492.
- Wenz, T. (2013). Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 $\alpha$  under cellular stress. *Mitochondrion*, *13*(2), 134–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.006>
- Westfalewicz, B., Dietrich, M. A., & Ciereszko, A. (2015). Impact of cryopreservation on bull (*Bos taurus*) semen proteome1. *Journal of Animal Science*, *93*(11), 5240–5253. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9237>
- Yániz, J. L., Soler, C., & Santolaria, P. (2015). Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Animal Reproduction Science*, *156*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.03.002>
- Yu, L. L., & Haron, A. W. (2017). Effect of vitrification on spermatozoa quality in bull semen. *Veterinary Sciences*, 89.
- Yuan, C., Wang, H., Li, X., Liu, H., Zhao, J., Lu, W., & Wang, J. (2021). Combined Effect of Flaxseed Oil and Vitamin E Supplementation During Bull Semen Cryopreservation on Sperm Characteristics. *Biopreservation and Biobanking*.
- Zhu, Z., Li, R., Fan, X., Lv, Y., Zheng, Y., Hoque, S. A. M., Wu, D., & Zeng, W. (2019).

Resveratrol Improves Boar Sperm Quality via 5'AMP-Activated Protein Kinase Activation during Cryopreservation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/5921503>



## Anexos



*Anexo A. Elaboración del diluyente de base sintética TCG-YH.*



*Anexo B. Recolección de semen mediante la técnica de uso de la vagina artificial.*



**Anexo C.** Dilución de las muestras espermáticas en una proporción 1:1 con el diluyente TCG-YH.



**Anexo D.** Colocación de muestras luego del tiempo de equilibrio en pajuelas de 0,25 mL y congelación mediante vapores de  $NL_2$  estático sobre una rampa de dos niveles.



**Anexo E.** Vitrificación de las muestras espermáticas en pellets (~ 30  $\mu$ l) a 15 cm de altura del NL<sub>2</sub>.



**Anexo F.** Proceso de calentamiento de las muestras vitrificadas en pellets.



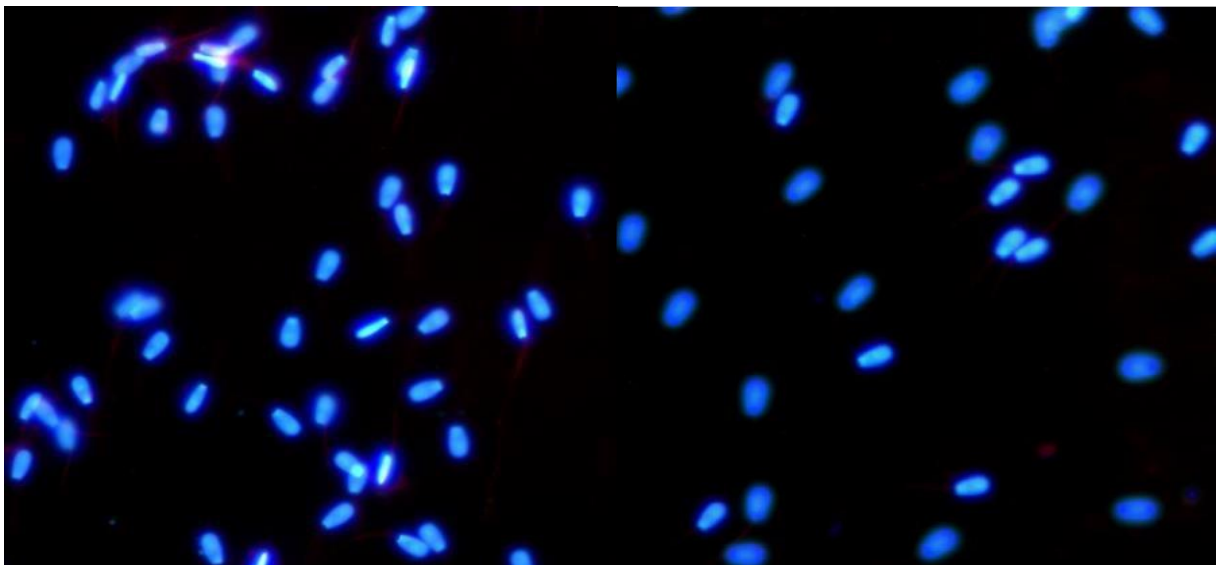
**Anexo G.** Preparación de las muestras espermáticas previo a la evaluación de la cinética.



**Anexo H.** Evaluación de la cinética de las muestras espermáticas en el sistema CASA.



**Anexo I.** Adición de la tinción fluorescente (FITC PNA + IP) en la muestra espermática y evaluación de la integridad de membranas por microscopía de epifluorescencia.



**Anexo J.** Evaluación y análisis de estrés oxidativo mediante microscopía de epifluorescencia, en espermatozoides bovinos teñidos con CellRox y Hoechst.