

## Uso de antioxidantes en los medios de congelación y descongelación de semen de cerdo Ibérico

Lucía Arranz-Virseda, Cristina Tomás-Almenar, Juan José Ciruelos, Emilio Gómez-Izquierdo y Eduardo de Mercado\*

Subdirección de Investigación y Tecnología, Instituto Tecnológico Agro de Castilla y León, Consejería de Agricultura y Ganadería, Ctra Riaza-Toro s/n, 40353 Hontalbilla, Segovia, España

### Resumen

Los espermatozoides de cerdo Ibérico pueden ser más susceptibles a la peroxidación lipídica durante el proceso de crioconservación debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de sus membranas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de tres antioxidantes (glutatión reducido,  $\alpha$ -tocoferol, hidroxitirosol) cuando estos son incluidos en los medios de enfriamiento-congelación o en el medio de descongelación. Se utilizaron doce eyaculados de cerdos Ibéricos sanos y se criopreservaron con un protocolo adecuado para esta raza porcina. Se evaluaron distintos parámetros de calidad espermática a los 30 min y 150 min post-descongelación: porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto (EAI), vivos (EV), mótiles totales (EMT) y mótiles progresivos (EMP). Además, se evaluaron diferentes parámetros relacionados con balance redox en los mismos tiempos de incubación. La inclusión de antioxidantes en el medio de enfriamiento-congelación mejoró EV, EAI, EMT y EMP, pero solo estos dos últimos parámetros mejoraron al incluir los antioxidantes en el medio de descongelación, especialmente a lo largo del tiempo de incubación. Los resultados mostraron diferencias en la producción de sustancias oxígeno reactivas y la capacidad antioxidante total entre los tratamientos que incluyen antioxidantes en el medio de enfriamiento-congelación o en el medio de descongelación, sin diferencias entre tratamientos en la peroxidación lipídica y alcanzando todos valores similares en el tiempo. En conclusión, sería aconsejable incluir antioxidantes, especialmente glutatión reducido, en el medio de enfriamiento-congelación. E incluir antioxidantes en el medio de descongelación podría mantener una mayor motilidad de los espermatozoides a en tiempo.

**Palabras clave:** Cerdo Ibérico, criopreservación espermática, diluyentes, antioxidantes.

### Use of antioxidants in the freezing and thawing extender in Iberian pig sperm

### Abstract

Iberian pig sperm may be more susceptible to lipid peroxidation during the cryopreservation process due to the high content of polyunsaturated fatty acids in their membranes. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of three antioxidants (reduced glutathione,  $\alpha$ -tocopherol, hydroxytyrosol) when these are included in the cooling-freezing or in the thawing extender. Twelve ejaculates from healthy Iberian boars were used and cryopreserved with an adequate protocol for Iberian pig

\* Autor para correspondencia: ita-merpened@itacyl.es

Cita del artículo: Arranz-Virseda L, Tomás-Almenar C, Ciruelos JJ, Gómez-Izquierdo E, de Mercado E (2021). Uso de antioxidantes en los medios de congelación y descongelación de semen de cerdo Ibérico. ITEA-Información Técnica Económica Agraria 117(5): 544-556. <https://doi.org/10.12706/itea.2021.010>

sperm. Different sperm quality parameters were evaluated at 30 min and 150 min post-thaw: the percentage acrosome intact sperm (AIS), live sperm (LS), total motile sperm (TMS) and progressively motile sperm (PMS). In addition, different parameters related to redox balance were evaluated at the same incubation times. The inclusion of antioxidants in the cooling-freezing extender improved LS, AIS, TMS and PMS, but only these last two parameters were improved by including antioxidants in the thawing extender, especially over incubation time. The results showed differences in the production of reactive oxygen species and the total antioxidant capacity between the treatments that include antioxidants in the cooling-freezing medium or in the thawing medium, without differences between any treatment in lipid peroxidation and reaching all similar values over time. In conclusion, it would be advisable to include antioxidants, especially reduced glutathione, in the cooling-freezing extender. And the inclusion of antioxidants in the thawing extender could maintain greater sperm motility over time.

**Keywords:** Iberian pig, sperm cryopreservation, extenders, antioxidants.

## Introducción

El cerdo Ibérico es una raza porcina autóctona de España, que tiene un alto valor ecológico, económico y cultural al estar su producción ligada con la dehesa, la producción rural y la obtención de productos de alto valor organoléptico. Pero su censo y por tanto su variabilidad genética se ha visto afectado a lo largo de los años por factores como la peste porcina africana, el cruce con la raza Duroc, su menor uso en sistemas de producción intensivo debido a su menor rendimiento productivo y reproductivo, o la elección de solo determinadas variedades de cerdo Ibérico con mejores caracteres productivos, relegando al resto de variedades a una situación real de peligro de extinción (Herrero-Medrano et al., 2013). En este contexto, la creación de bancos de recursos zoológicos podría mejorar el manejo de estas poblaciones y preservaría su riqueza genética. Así la congelación de semen es una excelente manera de preservar material genético de alto valor (Johnson et al., 2000), y tiene especial relevancia en el cerdo Ibérico, ya que es en especial en el macho el que más reducido se ve su número, debido a que la inseminación artificial hace que el número de machos necesarios para la reproducción sea muy bajo (1 macho por cada 100 hembras), o que el 95 % de los cerdos Ibéricos producidos ac-

tualmente son cruzados (hembra Ibérica pura y macho de raza Duroc) (MAPA, 2019). Un número reducido de machos implica una pérdida de variabilidad, un peligro añadido en las distintas variedades que son cada vez menos usadas. Pero la implementación del uso de sistemas de crioconservación espermático tiene que ir de la mano de la mejora de los mismos, ya que los actuales protocolos de congelación y descongelación afectan negativamente a la función y supervivencia espermática, causando una reducción en el rendimiento reproductivo (Johnson et al., 2000; Yeste, 2017).

Algunos autores determinan que gran parte de los problemas derivados de la criopreservación son derivados de un estrés oxidativo, causado por un exceso de producción de sustancias oxígeno reactivas (ROS) (Awda et al., 2009), y una disminución del sistema endógeno de defensa antioxidante (Gadea et al., 2004; Barranco et al., 2015), que provoca cambios físicos y químicos en la membrana espermática (Watson, 1995). Además, las membranas espermáticas de la especie porcina son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Maldjian et al., 2005), lo que las hace más susceptibles a sufrir daños por peroxidación lipídica (Awda et al., 2009). Y en este sentido, el cerdo Ibérico podría verse más afectado por este daño, ya que la composición lipídica de sus membranas espermáticas tiene un alto con-

tenido en ácidos grasos mono y poliinsaturados (de Mercado et al., 2011).

Para evitar los posibles daños oxidativos son muchos los estudios que han investigado la adición de antioxidantes a los medios de congelación (Gadea et al., 2005a; Breininger et al., 2011; Yeste et al., 2014; Pei et al., 2018), y descongelación (Gadea et al., 2005b; Gadiani et al., 2017; Weng et al., 2018) pero no siempre con los mismos resultados. Y hasta donde sabemos, no hay estudios reportados que hayan probado el efecto de los antioxidantes en el proceso de criopreservación espermática de cerdo Ibérico, por tanto, sería necesario determinar que antioxidantes podrían ser los más eficaces en esta raza. La disparidad de resultados y el alto número de compuestos con capacidad antioxidante hace difícil saber cuáles serían los más óptimos para el estudio en esta raza. El glutatión reducido ha tenido buenos resultados por distintos autores en su uso en los protocolos de congelación y descongelación de semen de porcino (Gadea et al., 2005a,b), y lo mismo ocurre con el  $\alpha$ -tocoferol (Jeong et al., 2009; Breininger et al., 2011). Por otra parte, el hidroxitiroсол, un compuesto fenólico extraído del aceite de oliva virgen, ha demostrado tener varios efectos biológicos beneficiosos, entre ellos una alta actividad antioxidante (Tripoli et al., 2005), y ha presentado buenos resultados en otras especies (Kedechi et al., 2017; Arando et al., 2019), pero no ha sido testado aun en la especie porcina.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto protector de estos tres antioxidantes (glutatión reducido,  $\alpha$ -tocoferol e hidroxitiroсол), determinando su efecto al añadirse en el medio de congelación o en el medio de descongelación, valorando diferentes parámetros de calidad espermática y estrés oxidativo.

## Material y métodos

### Diseño Experimental

Para este estudio, se evaluaron tres antioxidantes diferentes no probados en la raza de cerdo Ibérico, el glutatión reducido, el  $\alpha$ -tocoferol y el hidroxitiroсол. Para el glutatión reducido se seleccionó la concentración de 1 mM, ya que es la que ha mostrado buenos resultados tanto en su adición en el medio de congelación como en el medio de descongelación (Gadea et al., 2005a,b). Para el  $\alpha$ -tocoferol se seleccionó la concentración de 200  $\mu$ g/ml, la cual se ha observado como la que obtenía mejores resultados post-descongelación en distintos estudios (Jeong et al., 2009; Breininger et al., 2011). Por último, como el hidroxitiroסול no ha sido testado hasta ahora en la raza porcina, se hizo una prueba previa (datos no incluidos) en base a los resultados de Kedechi et al., 2016, donde la concentración de 200  $\mu$ g/ml fue la que mejores resultados obtuvo.

Se evaluó el efecto de los antioxidantes cuando fueron añadidos al medio de enfriamiento-congelación (tratamientos con el acrónimo LEY) o al medio de descongelación (tratamientos con el acrónimo BTS). Obteniendo así un total de 7 tratamientos diferentes: Tratamiento A: un control que no incorporaría antioxidantes ni en el medio de enfriamiento-congelación, ni en el medio de descongelación; Tratamientos GSH-LEY y GSH-BTS: tratamientos que incorporarían 1 mM de glutatión reducido, en el medio de enfriamiento-congelación (GSH-LEY) o en el medio de descongelación (GSH-BTS); Tratamientos TOC-LEY y TOC-BTS: tratamientos que incorporarían 200  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -tocoferol, en el medio de enfriamiento-congelación (TOC-LEY) o en el medio de descongelación (TOC-BTS); y tratamientos HIDROX-LEY y HIDROX-BTS: tra-

tamientos que incorporarían 200 µg/ml de hidroxitirosol, en el medio de enfriamiento-congelación (HIDROX-LEY) o en el medio de descongelación (HIDROX-BTS).

En cada tratamiento fue analizada la calidad espermática y estrés oxidativo a los 30 min y 150 min de incubación post-descongelación.

#### ***Animales, recuperación del semen y protocolo de congelación-descongelación***

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en conformidad con la normativa específica de la Directiva del Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE) y el Gobierno de España (RD 53/2013), y previamente aprobados por el Comité de Ética del Instituto Tecnológico Agrario de Tecnología de Castilla y León (ITACyL).

En este estudio se utilizaron un total de 12 eyaculados de diferentes verracos Ibéricos (AIM, Segovia, España), obtenidos mediante método manual y diluidos en el diluyente Beltsville Thawing Solution (BTS) (Pursel y Johnson, 1975) (1:1, v/v), después de lo cual fueron transportados al laboratorio del Centro de Pruebas de Porcino (ITACyL) a 15-17 °C.

Los espermatozoides se congelaron utilizando un protocolo de crioconservación adecuado para cerdo Ibérico (de Mercado *et al.*, 2010). Brevemente, las muestras de semen diluidas para el transporte se centrifugaron a 2400g durante 3 min a 15 °C. Los pellets resultantes se diluyeron en un medio de enfriamiento LEY (80 % (v/v) de β-lactosa (310 mM), 20 % (v/v) de yema de huevo, 100 µg/ml de sulfato de kanamicina; 330 ± 5 mOsm/kg; pH ajustado a 7,2) hasta una concentración de  $1,5 \times 10^9$  células/ml. Después de enfriar las muestras hasta 5 °C en 120 min en un baño de agua termostático programable, los espermatozoides fueron rediluidos hasta una concentración final de  $1 \times 10^9$  células/ml con un medio de congelación LEYGO (92,5 % de diluyente LEY, 1,5 %

Equex STM (Nova Chemical Sales Inc, Scituate, Mass) y 6 % de glicerol (v/v); 1650 ± 15 mOsm/kg, pH ajustado a 7,2. A continuación, las muestras se cargaron en pajuelas de 0,5 ml (Minitüb, Tiefenbach, Alemania), se sellaron y se transfirieron a un congelador programable (IceCube 14S, Minitüb) donde se congelaron de la siguiente manera: desde 5 °C a -5 °C a un ratio de 6 °C/min, desde -5 °C a -80 °C a 40 °C/min; se mantuvieron 30 s a -80 °C, para a continuación enfriar las muestras a 70 °C/min hasta una temperatura final de -150 °C, paso en el cual fueron sumergidas en nitrógeno líquido, donde permanecieron almacenadas hasta su análisis. Los antioxidantes correspondientes a cada tratamiento que se incorporaban en el medio de enfriamiento-congelación (GSH-LEY, TOC-LEY y HIDROX-LEY) fueron añadidos antes de iniciar el proceso tanto en el medio LEY como en el LEYGO, para que la concentración de los mismos fuera siempre la misma durante todo el proceso.

La descongelación se realizó sumergiendo las pajuelas en un baño de recirculación de agua a 37 °C durante 20 s, diluyéndolas acto seguido en BTS (1:1, v/v) atemperado a 37 °C. Estas muestras se incubaron en el baño de agua a 37 °C hasta los 150 min, y se evaluó la calidad espermática y los parámetros relacionados con el estrés oxidativo a los 30 min y 150 min post-descongelación. Los antioxidantes correspondientes a cada tratamiento que se incorporaban en el medio de descongelación (GSH-BTS, TOC-BTS, HIDROX-BTS) fueron añadidos antes comenzar la descongelación.

#### ***Evaluación de calidad espermática post-descongelación***

##### ***Análisis del estado del acrosoma***

La morfología del acrosoma se evaluó mediante microscopía de contraste de fase ×1000. Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2 %, examinándose un mínimo de

200 acrosomas por muestra. El daño del acrosoma se clasificó por el sistema de puntuación reportado por Pursel *et al.* (1972), determinándose el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto (EAI, %).

#### *Análisis de la viabilidad espermática*

La viabilidad fue evaluada mediante la determinación de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante una técnica que combinaba el uso de la fluorescencia y la microscopía de contraste de fase, como describen Tomás *et al.* (2014). Las muestras espermáticas, se tiñeron con 5  $\mu$ l de yoduro de propidio (IP, 0,5 mg/ml) y se incubaron a 37 °C en la oscuridad durante 10 min. Posteriormente, las muestras se analizaron utilizando microscopía de contraste de fase (Nikon Eclipse E400, Tokio, Japón), combinada con un equipo de fluorescencia (Nikon C-SHG1) con una lámpara de mercurio (100 W) y un filtro Nikon G-2A (excitación/barrera de 510/590) que permite una excitación simultánea de azul y verde. Después de observar la muestra bajo microscopía de contraste de fase, se conectó la fluorescencia mostrando los espermatozoides no viables de color rojo, y los espermatozoides viables sin teñir, pero visibles por contraste de fases. Se examinaron un mínimo de 300 células por portaobjetos, en campos aleatorios en cada muestra. Solo se consideró en los resultados el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta como espermatozoides vivos (EV; %) (espermatozoides no teñidos de rojo por el IP).

#### *Análisis de la motilidad*

Los parámetros de calidad del movimiento se evaluaron objetivamente utilizando un sistema computarizado de análisis de semen (ISAS, Proiser, Valencia, España) operando a 25 frames por segundo (25 Hz), con un ajuste de área de partículas de 10  $\mu$ m a 80  $\mu$ m, y un radio de búsqueda de 11  $\mu$ m. Los esperma-

tozoides se definieron como no móviles si su velocidad media (VAP) era inferior a 10  $\mu$ m/s; y los espermatozoides se consideraron móviles progresivos si exhibían una VAP > 45  $\mu$ m/s y un índice de rectitud (STR)  $\geq$  45 % (Crema-des *et al.*, 2005).

Para este análisis se tomaron alícuotas de 3  $\mu$ l de cada muestra espermática en una cámara Makler precalentada (38 °C) (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel). De cada muestra se analizaron cinco campos, evaluando un mínimo de 100 espermatozoides por campo, evaluándose los siguientes parámetros espermáticos: porcentaje de espermatozoides móviles totales (EMT; %) y porcentaje de espermatozoides móviles progresivos (EMP; %).

#### *Producción de sustancias oxígeno reactivas (ROS)*

La determinación de ROS se realizó según el protocolo de Hayashi *et al.* (2007) con modificaciones para células espermáticas. El análisis se realizó en placas de 96 pocillos, usando 5  $\mu$ l de una solución estándar de peróxido de hidrógeno (para la generación de una curva de calibración) o de muestra. A esta cantidad se añadieron 40  $\mu$ l de tampón de acetato de sodio 0,1 M (pH 4,8), y se incubaron a 37 °C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 100  $\mu$ l de una solución mixta, con un cromógeno y una solución con ion metal de transición en una proporción de 1:25. Luego se incubó a 37 °C durante 1 min antes de la lectura espectrofotométrica a 505 nm durante 12 min, a intervalos de 1 min. Se construyó automáticamente una curva de calibración a partir de las pendientes, calculadas en función de la absorbancia variable (delta) a 505 nm de cada lectura (min), correspondiente a la concentración de peróxido de hidrógeno. El analizador (lector de placas espectrofotométricas) calculó los niveles de ROS en las muestras a partir de la curva de calibración y se expresó en términos de niveles equivalentes de peróxido de hidrógeno (1 unidad = 1,0 mg de  $H_2O_2/l$ ).

### *Capacidad antioxidante total (FRAP)*

La capacidad antioxidante total se analizó mediante la prueba de poder antioxidante reductor férrico (FRAP) como describió Benzie y Strain (1996), con modificaciones para su uso con células espermáticas. Para este análisis, solo se usó un reactivo de trabajo, que consistía en 300 mmol/l de tampón de acetato (pH 3,6), 10 mmol/l de 2,4,6-tri-piridil-s-triazina (TPTZ) en 40 mmol/l de HCl y 20 mmol/l de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en una proporción de 10:1:1. El análisis se realizó en placas de 96 pocillos mezclando 180  $\mu\text{l}$  de reactivo de trabajo con 6  $\mu\text{l}$  de muestra o estándar (se utilizó como estándares distintas concentraciones de Fe (II). Fe (II) (1000  $\mu\text{mol/L}$ ) es equivalente a 1000  $\mu\text{mol/L}$  de FRAP), e incubando 10 min a 37 °C, para finalmente realizar la lectura espectrofotométrica a 593 nm. El cambio de absorbancia se traduce en un valor FRAP al relacionar el cambio de absorbancia a 593 nm de la muestra de prueba con el valor de concentración de una solución estándar de valor FRAP conocido (37,5-2400  $\mu\text{mol/L}$ ).

Para los análisis de ROS y FRAP, fue necesario un tratamiento previo de los espermatozoides para la liberación de los compuestos intracelulares oxidantes y antioxidantes. A los 30 min y 150 min, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de la muestra descongelada (200 millones de espermatozoides) y se homogeneizó con 100  $\mu\text{l}$  de solución de PBS (solución salina tamponada con fosfato) con tritón al 0,4 % para solubilizar las membranas, incubándolas a temperatura ambiente durante 1 h. Después de ese tiempo, se centrifugaron a 3900g y se recuperó el sobrenadante en el cual se realizaron los análisis de ROS y FRAP.

### *Peroxidación lipídica de la membrana (MDA)*

La peroxidación lipídica de la membrana se estimó mediante la generación final de malondialdehído (MDA), determinada por la prueba de ácido tiobarbitúrico (TBA) adaptada para

espermatozoides (Roca et al., 2004). Para su determinación, en primer lugar, se mezclaron 200  $\mu\text{l}$  de cada muestra descongelada (250  $\times$  10<sup>6</sup> espermatozoides/ml) con 1 ml de ácido tricloroacético frío al 20 % (p/v) para precipitar las proteínas. Las muestras se centrifugaron a 1500g durante 10 min y se descartó el precipitado. 200  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes se incubaron con 200  $\mu\text{l}$  de TBA al 0,67 % (p/v) en un baño de agua hirviendo a 100 °C durante 10 min. A continuación, las muestras se enfriaron con hielo y se realizó una lectura espectrofotométrica a 534 nm. Se realizó la curva estándar a partir de los resultados de absorbancia a 534 nm, correspondientes a las diferentes concentraciones de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (precursor de MDA). Los resultados se expresaron como una concentración simple de MDA (pmol/10<sup>8</sup> células).

### *Análisis estadístico*

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SAS versión 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, EE. UU.). Todos los datos se verificaron previamente para la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk). Se utilizó el procedimiento de análisis de varianza del modelo MIXTO (ANOVA) para evaluar los efectos de los distintos tratamientos con antioxidantes (tanto en el medio de enfriamiento-congelación como de descongelación), así como el efecto del tiempo de incubación post-descongelación (30 min y 150 min) a 37 °C, sobre el estado del acrosoma, la viabilidad, motilidad y los parámetros de estrés oxidativo. Estos efectos y sus interacciones se incluyeron como efectos fijos y el verraco como un efecto aleatorio en el modelo mixto. En la prueba de efectos fijos, las interacciones no mostraron un efecto estadísticamente significativo y las medias que se muestran corresponden a cada uno de los efectos por separado en los diferentes parámetros de calidad espermática evaluados.

Cuando el ANOVA reveló un efecto significativo, los valores se compararon mediante la prueba de Tukey-Kramer y se consideraron significativos cuando  $P$  era inferior a 0,05. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  ES (error estándar).

## Resultados

Los resultados principales de la calidad espermática post-descongelación pueden verse en la Tabla 1. En términos generales, la adición de antioxidantes tuvo efecto sobre la calidad espermática, pero con resultados diferentes cuando se añadían en los medios de enfriamiento-congelación que en el medio de descongelación. El % de EAI se conserva mejor a los 30 min post-descongelación en todos los tratamientos comparado con el control. Pero a los 150 min los tratamientos que incluyeron los antioxidantes en los medios de enfriamiento-congelación (tratamientos LEY) son los que mantuvieron las diferencias significativas con el control, y los tratamientos con antioxidantes en el medio de descongelación (tratamientos BTS) mantuvieron valores intermedios.

En el % de EV a los 30 min no hay diferencias significativas entre ningún tratamiento, pero a los 150 min los tratamientos con antioxidantes en los medios de enfriamiento-congelación mostraron diferencias significativas con el control, manteniendo una mayor viabilidad de los espermatozoides en el tiempo, que si los antioxidantes se hubieran incluido en el medio de descongelación.

En el % de EMT a los 30 min post-descongelación, no hubo diferencias significativas entre ningún tratamiento (con la excepción del TOC-LEY). Pero a los 150 min, la motilidad de todos los tratamientos disminuyó significativamente, siendo el control el que tuvo el % más bajo. Los mejores resultados se observa-

ron en los tratamientos TOC-BTS, HIDROX-BTS y GSH-LEY. Por otra parte en el % EMP a los 30 min, los tratamientos con glutatión reducido (GSH-LEY y GSH-BTS) mostraron los mejores resultados, pero a los 150 min post-descongelación, los resultados se volvieron similares a los observados en los EMT.

Los resultados de ROS, FRAP y MDA se muestran también en la Tabla 1. Los resultados de MDA no mostraron diferencias significativas entre ningún tratamiento ni a los 30 min ni a los 150 min post-descongelación. Pero si hubo diferencias entre tratamientos en los parámetros de ROS y FRAP, mostrando cómo los tratamientos con antioxidantes en los medios de enfriamiento-congelación a los 30 min tienen los valores más altos, y los tratamientos con antioxidantes en el medio de descongelación los más bajos, mostrando valores intermedios el control ( $P < 0,05$ ). A los 150 min, casi todos los tratamientos se equipararon entre sí en estos dos parámetros.

## Discusión

Este estudio muestra que la incorporación de antioxidantes en el proceso de criopreservación espermática de cerdo Ibérico, podría proteger la calidad espermática post-descongelación, pero también muestra resultados diferentes cuando los antioxidantes se incorporan en el medio de enfriamiento-congelación que cuando están presentes solo en el medio de descongelación.

Los tratamientos con antioxidantes en los medios de enfriamiento-congelación (tratamientos LEY) mantuvieron más elevados los porcentajes de EV y EAI durante más tiempo. Estudios que han usado estos mismos antioxidantes han visto también que pueden mejorar la viabilidad espermática en la especie porcina en razas de capa blanca (Gadea et al., 2005a; Jeong et al., 2009; Yeste et al., 2014)

Tabla 1. Efecto de la inclusión de diferentes antioxidantes en los diluyentes de congelación (LEY) y de descongelación (BTS) sobre la calidad espermática y el estrés oxidativo, a los 30 min y 150 min post-descongelación (37 °C).  
 Table 1. Effect of the inclusion of different antioxidants in freezing (LEY) and thawing (BTS) extenders on sperm quality and oxidative stress, at 30 min and 150 min post-thawing (37 °C).

Variable	Tiempo (min)	TRATAMIENTOS						
		A (Control)	GSHE-LEY	GSHE-BTS	TOC-LEY	TOC-BTS	HIDROX-LEY	HIDROX-BTS
EAI	30	56 ± 0,6 <sup>b</sup> *	58,65 ± 0,83 <sup>a*</sup>	59,72 ± 1,21 <sup>a*</sup>	57,44 ± 1,54 <sup>ab*</sup>	58,78 ± 1,23 <sup>a*</sup>	59,67 ± 1,08 <sup>a*</sup>	59,28 ± 1,14 <sup>a*</sup>
EAI	150	45,69 ± 0,8 <sup>c</sup>	52,04 ± 1,36 <sup>a</sup>	47,63 ± 1,39 <sup>bc</sup>	49,05 ± 1,54 <sup>ab</sup>	48,69 ± 1,39 <sup>abc</sup>	50,78 ± 1,31 <sup>ab</sup>	48,37 ± 1,65 <sup>bc</sup>
EV	30	58,72 ± 0,76 <sup>*</sup>	59,82 ± 1,3	59,5 ± 0,89 <sup>*</sup>	58,77 ± 1,86	61,25 ± 1,1 <sup>*</sup>	59,85 ± 1,15	61,11 ± 0,75
EV	150	53,51 ± 0,63 <sup>c</sup>	60,83 ± 1,1 <sup>a</sup>	54,32 ± 1,31 <sup>c</sup>	58,37 ± 2,01 <sup>ab</sup>	54,81 ± 1,3 <sup>c</sup>	58,75 ± 1,11 <sup>a</sup>	55,65 ± 1,06 <sup>bc</sup>
EMT	30	70,04 ± 1,34 <sup>a*</sup>	70,95 ± 2,56 <sup>a*</sup>	72,43 ± 1,91 <sup>a*</sup>	59,57 ± 3,01 <sup>b*</sup>	73,29 ± 2,2 <sup>a*</sup>	70,32 ± 1,25 <sup>a*</sup>	69,01 ± 1,49 <sup>a*</sup>
EMT	150	34,71 ± 1,42 <sup>d</sup>	46,77 ± 2,55 <sup>abc</sup>	40,86 ± 1,57 <sup>c</sup>	41,22 ± 3,25 <sup>c</sup>	51,09 ± 2,32 <sup>a</sup>	44,84 ± 1,88 <sup>bc</sup>	49,46 ± 1,65 <sup>ab</sup>
EMP	30	55,02 ± 1,22 <sup>b*</sup>	57,12 ± 1,96 <sup>ab*</sup>	59,75 ± 1,11 <sup>a*</sup>	48,58 ± 2,75 <sup>c*</sup>	55,03 ± 1,6 <sup>b*</sup>	54,67 ± 1,09 <sup>b*</sup>	54,32 ± 1,55 <sup>b*</sup>
EMP	150	25,95 ± 1,21 <sup>c</sup>	36,03 ± 1,95 <sup>a</sup>	30,51 ± 1,46 <sup>b</sup>	30,94 ± 2,54 <sup>b</sup>	38,12 ± 2,33 <sup>a</sup>	34,83 ± 1,49 <sup>ab</sup>	38 ± 1,79 <sup>a</sup>
FRAP	30	360,23 ± 16,01 <sup>b</sup>	425,29 ± 21,22 <sup>a*</sup>	297,66 ± 13,93 <sup>c*</sup>	445,99 ± 14,3 <sup>a*</sup>	291,01 ± 16,77 <sup>c*</sup>	438,99 ± 16,19 <sup>a*</sup>	306,91 ± 14,93 <sup>c*</sup>
FRAP	150	331,42 ± 11,12 <sup>ab</sup>	352,82 ± 15,23 <sup>ab</sup>	338,59 ± 14,71 <sup>ab</sup>	364,77 ± 11,49 <sup>a</sup>	317,52 ± 24,16 <sup>bc</sup>	353,8 ± 18,89 <sup>ab</sup>	291,72 ± 17,6 <sup>a</sup>
ROS	30	12,49 ± 1,29 <sup>b*</sup>	17,31 ± 0,72 <sup>a*</sup>	6,07 ± 0,22 <sup>c</sup>	16,72 ± 0,4 <sup>a*</sup>	4,67 ± 0,36 <sup>c</sup>	16,2 ± 0,71 <sup>a*</sup>	5,47 ± 0,56 <sup>a</sup>
ROS	150	6,21 ± 0,37 <sup>ab</sup>	5,13 ± 0,51 <sup>bc</sup>	6,72 ± 0,39 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,41 <sup>c</sup>	5,63 ± 0,78 <sup>abc</sup>	5,22 ± 0,34 <sup>bc</sup>	4,75 ± 0,39 <sup>c</sup>
MDA	30	6,3x10 <sup>-4</sup> ± 1,2x10 <sup>-4</sup>	9,3x10 <sup>-4</sup> ± 1,8x10 <sup>-4</sup>	6,3x10 <sup>-4</sup> ± 3x10 <sup>-4</sup>	7,3x10 <sup>-4</sup> ± 1x10 <sup>-4</sup>	6,2x10 <sup>-4</sup> ± 2,4x10 <sup>-4</sup>	9,1x10 <sup>-4</sup> ± 1,8x10 <sup>-4</sup>	5,9x10 <sup>-4</sup> ± 0,9x10 <sup>-4</sup>
MDA	150	5,1x10 <sup>-4</sup> ± 0,8x10 <sup>-4</sup>	5,7x10 <sup>-4</sup> ± 0,5x10 <sup>-4</sup>	6,7x10 <sup>-4</sup> ± 1,9x10 <sup>-4</sup>	6x10 <sup>-4</sup> ± 0,5x10 <sup>-4</sup>	7x10 <sup>-4</sup> ± 1,5x10 <sup>-4</sup>	5,4x10 <sup>-4</sup> ± 0,8x10 <sup>-4</sup>	4,6x10 <sup>-4</sup> ± 1,2x10 <sup>-4</sup>

A control, no incluye antioxidantes; GSHE-LEY y GSHE-BTS, incluyen 1 mM de glutatión reducido; TOC-LEY y TOC-BTS, incluyen 200 µg/mL de α-tocoferol; HIDROX-LEY y HIDROX-BTS, incluyen 200 µg/mL de hidroxitirosol. EAI: % espermatozoides con el acrosoma intacto; EV: % espermatozoides vivos; EMT: % espermatozoides motiles progresivos; ROS: producción de sustancias oxígeno reactivas (1 unidad = 1,0 mg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L); FRAP: capacidad antioxidante total (µmol/L); MDA: peroxidación lipídica de la membrana (pmol/10<sup>8</sup> células). Letras diferentes (a, b, c) dentro de una misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P < 0,05$ ). \* Indica diferencias significativas entre los tiempos de incubación post-descongelación para un mismo tratamiento ( $P < 0,05$ ). Los datos se expresan como la media ± error estándar ( $n = 12$ ).

o también en otras especies diferentes (Hu et al., 2014; Pei et al., 2018). Incluso algunos autores, en cerdo de capa blanca, han observado al igual que en nuestro estudio que el efecto protector sobre las membranas se observa pasado un tiempo post-descongelación y no poco después de la descongelación (Malo et al., 2010). Muchos de estos autores asumen que la peroxidación lipídica es la causante del mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana dañada post-descongelación. Pero en nuestro estudio, los resultados mostraron que la peroxidación, analizada indirectamente por MDA, fue muy baja y sin diferencias entre los tratamientos, y la viabilidad solo se mantuvo en el tiempo cuando los antioxidantes estaban presentes durante la congelación y no así en la descongelación. Por esta razón, el efecto beneficioso de los antioxidantes puede estar más relacionado con su capacidad para estabilizar las membranas (Wang y Quinn, 1999; Khan et al., 2020). Ciertos antioxidantes como el  $\alpha$ -tocopherol pueden formar complejos con los componentes lipídicos de la membrana, haciendo que la membrana sea más estable (revisado por Wang y Quinn, 1999). Algunos estudios, en cerdos de capa blanca, han visto cómo los antioxidantes aumentan el porcentaje de espermatozoides con menor desorden lipídico en sus membranas (Peña et al., 2004; Gadea et al., 2005a), y han mostrado también un efecto estabilizador en la estructura de la nucleoproteína (Yeste et al., 2013 y 2014). Así sabiendo que el proceso de crioconservación induce cambios en la membrana de los espermatozoides que conducen a su desestabilización, lo que afecta a la integridad del acrosoma y el desorden lipídico de las membranas (revisado por Yeste, 2015), es posible que la estabilidad durante el enfriamiento y la congelación dada por los antioxidantes, pudiera permitir la existencia de un mayor porcentaje de espermatozoides sin cambios en la estructura de su membrana lipídica y, por lo tanto, una mejor resistencia

contra el proceso de crioconservación. Esto explicaría porque no se mantiene la vialidad y la acrosomía igual cuando los antioxidantes están en el medio de enfriamiento-congelación que en el de descongelación.

La motilidad en términos generales a los 30 min (EMT y EMP) no se vio influenciada por la presencia de antioxidantes en el medio de congelación o descongelación. Esto se asemeja a lo observado en otros estudios en cerdos de otras razas, donde la motilidad tampoco se vio afectada por los antioxidantes justo después de la descongelación (Gadea et al., 2005a,b; Malo et al., 2010; Arando et al., 2019). Cabe remarcar que los tratamientos que incluían glutatión reducido (GSH-LEY y GSH-BTS), mostraron valores significativamente más altos de EMP que otros tratamientos y, resultados similares han sido observados en otros estudios en la especie porcina, donde usaron este antioxidante (Yeste et al., 2014; Giaretti et al., 2015). Por otro lado, el tratamiento TOC-LEY fue el único que mostró valores más bajos de EMT, hecho que podría ser debido al tipo de  $\alpha$ -tocopherol utilizado, ya que mostró más problemas para su dilución en el medio LEY.

Aunque se ha descrito una disminución en la formación de MDA debido a la presencia de antioxidantes en el proceso de congelación espermática (Hu et al., 2014; Pei et al., 2018), en este estudio se ha observado que no existen diferencias significativas en su formación entre tratamientos, siendo además los valores muy bajos, lo que concuerda con estudios similares, en distintas especies, donde el porcentaje de espermatozoides peroxidados eran muy bajos (Guthrie y Welch, 2007; Gómez-Fernández et al., 2013; Arando et al., 2019).

Además, nuestro estudio muestra resultados muy diferentes en la capacidad antioxidante total y la producción de ROS cuando el antioxidante se encuentra en el medio de congelación o en el de descongelación a los 30

min post-descongelación. Esto podría ser debido al propio equilibrio redox espermático. Estudios recientes han determinado (Panner Selvam et al., 2018) que medir el potencial de reducción oxidativa, que en esencia mide el potencial resultante entre todas las moléculas oxidativas y todas las moléculas reductoras, podría permitir medir el estrés oxidativo de manera más fiable. Y es que la mayoría de los trabajos se centran en analizar la producción de ROS o la peroxidación lipídica, sin tener en cuenta si existe o no un desequilibrio. El estrés oxidativo ocurre cuando el equilibrio entre la oxidación y los sistemas antioxidantes se interrumpe debido a los niveles excesivos de ROS o al agotamiento de los antioxidantes, por lo tanto, para evaluar adecuadamente el nivel de estrés oxidativo, estos marcadores deben interpretarse juntos (de Mercado et al., 2018). En este estudio se intentó observar, si variaciones en la producción de sustancias ROS irían acompañadas también de variaciones en la capacidad antioxidant (medido por FRAP), observando así si hay una descompensación con respecto al control. Así, observando los resultados, el punto de mayor desequilibrio redox podría ser el momento de la descongelación. En el control los valores de ROS son altos, pero no es así en los tratamientos con antioxidantes en el medio de descongelación. Es posible que la presencia de estos antioxidantes en el diluyente de descongelación ayude a prevenir la formación temprana de ROS, que no ocurre en la muestra control. En consecuencia, la menor producción de ROS disminuye la respuesta antioxidant, y por eso estos tratamientos tienen valores de FRAP más bajos. Al observar los resultados en los tratamientos con antioxidantes en los medios de enfriamiento-congelación, se observaron niveles más altos de ROS que el control. Esto puede deberse a que, durante la descongelación, el momento de mayor desequilibrio redox, las muestras se diluyen en BTS 1:1 (sin ningún antioxidant para estos tratamientos), lo que

provoca que su capacidad antioxidant se reduzca bruscamente a la mitad; esto causaría el mayor incremento de ROS observado en los resultados y, en consecuencia, el aumento de la capacidad antioxidant (FRAP) como respuesta compensatoria. Con el tiempo (150 min post-descongelación), los valores de ROS y FRAP se equiparán entre todos los tratamientos, posiblemente debido a que el estrés oxidativo del momento inicial de la descongelación ha ido disminuyendo y por tanto todos los valores se van equilibrado. Esto mostraría que el momento de descongelación podría ser un punto clave del posible desequilibrio redox.

Todos estos resultados concuerdan con estudios anteriores que sugieren que el sistema endógeno de defensa frente a sustancias ROS en el esperma de cerdo es suficientemente eficiente para proteger las células durante el proceso de criopreservación (Guthrie et al., 2008), y con estudios que han demostrado que los niveles de espermatozoides peroxidados son extremadamente bajos (Guthrie y Welch, 2007; Gómez-Fernández et al., 2013; Arando et al., 2019). Por lo tanto, esto podría sugerir que la peroxidación lipídica no es uno de los principales factores responsables de la disfunción espermática en la especie porcina atribuida a la criopreservación (Parilla et al., 2012).

## Conclusiones

Este estudio muestra que el uso de antioxidantes en el medio de enfriamiento-congelación puede mejorar la criopreservación espermática de cerdo Ibérico, especialmente la inclusión de glutatión reducido (1 mM), facilitando la implementación del uso del semen congelado en la inseminación artificial en cerdo Ibérico. Por otro lado, en el caso de muestras espermáticas ya congeladas en, por ejemplo, bancos de recursos zoogenéticos,

sería interesante la inclusión de antioxidantes en el medio de descongelación, por ser capaces de mantener la motilidad espermática post-descongelación durante más tiempo. Aun así, serían necesarios más estudios para determinar si otras concentraciones u otros antioxidantes pudieran funcionar mejor en esta raza porcina, y también profundizar en su efecto sobre el equilibrio redox.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional FEDER.

### Referencias bibliográficas

- Arando A, Delgado JV, Fernández-Prior A, León JM, Bermúdez-Oria A, Nogales S, Pérez-Marín CC (2019). Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology* 86: 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.002>.
- Awda BJ, Mackenzie-Bell M, Buhr MM (2009). Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of Reproduction* 81: 553-561. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076471>.
- Barranco I, Tvarijonaviciute A, Pérez-Patiño C, Parrilla I, Ceron JJ, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J (2015). High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Scientific Reports* 5: 18538. <https://doi.org/10.1038/srep18538>.
- Benzie I, Strain J (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power. The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
- Breininger E, Descalzo A, Rossetti L, Abramovich D, Beconi MT (2011). Boar sperm functionality is related to  $\alpha$ -tocopherol content after freezing-thawing. *Andrologia* 43: 409-415. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01094.x>.
- Cremades T, Roca J, Rodríguez-Martínez H, Abaigar T, Vazquez JM, Martínez EA (2005). Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *Journal of Andrology* 26: 610-618. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05028>.
- De Mercado E, Rodríguez A, Gómez E, Sanz E (2010). Cryopreservation of Iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders based on post-thaw sperm quality. *Animal Reproduction Science* 118: 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.006>.
- De Mercado E, Tomás C, Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, González-Bulnes A, Sánchez-Sánchez R (2011). Estudio de la composición de ácidos grasos de la membrana del espermatozoide de cerdo Ibérico y su posible relación con la resistencia al proceso de crioconservación. XIV Jornadas Sobre Producción Animal, 17-18 mayo 2011, Zaragoza, España, pp. 401-403.
- De Mercado E, Larrán AM, Pinedo J, Tomás-Almenar C (2018). Skin mucous: A new approach to assess stress in rainbow trout. *Aquaculture* 484: 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.031>.
- Gadani B, Bucci D, Spinaci M, Tamanini C, Galeati G (2017). Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 90: 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.020>.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R, Ruiz S (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extender. *Theriogenology* 62: 690-701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.013>.
- Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D (2005a). Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *Journal of Andrology* 26: 396-404. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04155>.

- Gadea J, Gumbao D, Matás C, Romar R (2005b). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology* 26: 749-756. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05057>.
- Giaretta E, Estrada E, Bucci D, Spinaci M, Rodríguez-Gil JE, Yeste M (2015). Combining reduced glutathione and ascorbic acid has supplementary beneficial effects on boar sperm cryotolerance. *Theriogenology* 83: 399-407. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.002>.
- Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, Tomás C, Mocé E, de Mercado E (2013). Is sperm freezeability related to the post-thaw lipid peroxidation and the formation of reactive oxygen species in boars? *Reproduction in Domestic Animals* 48: 177-182. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02126.x>.
- Guthrie HD, Welch GR (2007). Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. *Journal of Animal Science* 85: 1402-1411. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-787>.
- Guthrie HD, Welch GR, Long, JA (2008). Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology* 70: 1209-1215. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.017>.
- Hayashi I, Morishita Y, Imai K, Nakamura M, Nakachi M, Hayashi T (2007). High throughput spectrophotometric assay of reactive oxygen species in serum. *Mutation Research* 631: 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.006>.
- Hu J, Geng G, Li Q, Sun X, Cao H, Liu Y (2014). Effects of alginate on frozen-thawed boar spermatozoa quality, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities. *Animal Reproduction Science* 147: 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.007>.
- Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian S, Rho GJ (2009). Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology* 58: 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.12.004>.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62: 143-172. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00157-3).
- Kedechi, S, Zribi N, Louati N, Menif H, Sellami A, Lassoued S, Ben Mansour R, Keskes L, Rebai T, Chakroun N (2016). Antioxidant effect of hydroxytyrosol on human sperm quality during *in vitro* incubation. *Andrologia* 49(1): e12595. <https://doi.org/10.1111/and.12595>.
- Khan M, Samrana S, Zhang Y, Malik Z, Daud Khan M, Zhu S (2020). Reduced glutathione protects subcellular compartments from Pb-Induced ROS injury in leaves and roots of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Frontiers in Plant Science* 11: 412. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00412>.
- Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM, Cerolini S, Penny P, Noble R (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63: 411-421. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.021>.
- Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, de Blas I, Espinosa E (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology* 61: 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.06.009>.
- MAPA (2019). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Censos de animales y productos comercializados. Disponible en: [www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/control-calidad/merca-iberico/iber-publico/censos-animales-productos-comercializados/](http://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/control-calidad/merca-iberico/iber-publico/censos-animales-productos-comercializados/) (Consultado: Mayo 2020).
- Panner Selvam MK, Henkel R, Sharma R, Agarwal A (2018). Calibration of Redox potential in sperm wash media and evaluation of oxidation-reduction potential values in various assisted reproductive technology culture media using MiOXSYS system. *Andrology* 6: 293-300. <https://doi.org/10.1111/andr.12461>.

- Parrilla I, del Olmo D, Sijses L, Martinez-Alborcia MJ, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA Roca J (2012). Differences in the ability of spermatozoa from individual boar ejaculates to withstand different semen-processing techniques. *Animal Reproduction Science* 132: 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.04.003>.
- Pei Y, Yang L, Wu L, He H, Geng G, Xu D, Chen H, Li Q (2018). Combined effect of apigenin and ferulic acid on frozen-thawed boar sperm quality. *Animal Science Journal* 89: 956-965. <https://doi.org/10.1111/asj.13009>.
- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H (2004). Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote* 12: 117-124. <https://doi.org/10.1017/s096719940400262x>.
- Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL (1972). Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science* 35: 580-584. <https://doi.org/10.2527/jas1972.353580x>.
- Pursel VG, Johnson LA (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science* 40: 99-102. <https://doi.org/10.2527/jas1975.40199x>.
- Herrero-Medrano JM, Megens H, Groenen MAM, Ramis G, Bosse M, Pérez-Enciso M, Crooijmans RPMA (2013). Conservation genomic analysis of domestic and wild pig populations from the Iberian Peninsula. *BMC Genet* 14: 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-106>.
- Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology* 25: 397-405. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02806.x>.
- Tomás C, Gómez-Fernández J, Gómez-Izquierdo E, de Mercado E (2014). Combined use of fluorescence and phase contrast microscopy for the determination of sperm viability. *Reproduction in Domestic Animals* 49: 103. <https://doi.org/10.1111/rda.12402>.
- Tripoli E, Giannamico M, Tabacchi G, Di Majo D, Giannamico S, La Guardia M (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews* 18: 98-112. <https://doi.org/10.1079/NRR200495>.
- Wang X, Quinn PJ (1999). Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research* 38: 309-336. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(99)00008-9).
- Watson PF (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7(4): 871-891. <https://doi.org/10.1071/rd9950871>.
- Weng XG, Cai MM, Zhang YT, Liu Y, Gao ZL, Song J, Liu ZH (2018). Effect of Astragalus polysaccharide addition to thawed boar sperm on in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology* 121: 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.07.030>.
- Yeste M, Flores E, Estrada E, Bonet S, Rigau T, Rodríguez-Gil JE (2013). Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. *Reproduction, Fertility and Development* 25: 1036-1050. <https://doi.org/10.1071/RD12230>.
- Yeste M, Flores E, Estrada E, Bonet S, Miró J, Rodríguez-Gil JE (2014). The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezeability. *Cryobiology* 68: 251-261. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.004>.
- Yeste M (2015). Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. *Reproduction in Domestic Animals* 50: 71-79. <https://doi.org/10.1111/rda.12569>.
- Yeste M (2017). State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction* 14: 69-81. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>.