



## **Criopreservação do sêmen suíno: desafios a serem superados que auxiliam a identificação de espermatozoides mais férteis**

*Boar semen cryopreservation: challenges to be overcome that help the identification of more fertile spermatozoa*

**André Furugen Cesar de Andrade<sup>a\*</sup>; Ana Carolina Pedrosa<sup>a</sup>; Simone Maria Massami Kitamura Martins<sup>a</sup>; Rosa Daniela Palchucan Nieto<sup>a</sup>; Guilherme Ferreira da Silva<sup>a</sup>; Henricco Zapparoli e Silva<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil

### **Resumo**

A criopreservação é o melhor método de armazenamento de sêmen por período indeterminado, conferindo alta flexibilidade de uso. Além disso, é o principal meio para formação de banco de germoplasma. No entanto, congelar sêmen suíno ainda é um desafio a ser enfrentado. Isso porque, além das características de membrana espermática que ocasionam maiores efeitos deletérios às células durante os processos de congelamento e descongelamento, ainda é preciso lidar com a grande variabilidade de resultados, seja entre indivíduos, ejaculados de um mesmo indivíduo ou ainda, frações de um mesmo ejaculado. Frente a isso, diferentes estratégias têm sido investigadas a fim de obter melhores resultados e assim, aumentar a aplicabilidade do sêmen congelado suíno a nível comercial. Além disso, acreditamos que haja a possibilidade de se relacionar a capacidade de criotolerância de um determinado espermatozoide a sua maior ou menor capacidade de fertilizar o ócito.

**Palavras-Chaves:** ejaculado; cachaço; IATF; biomarcadores; conservação

### **Abstract**

*Cryopreservation is the best method of storing semen indefinitely, providing high flexibility of use. In addition, it is the primary means for forming a germplasm bank. However, freezing boar semen is still a challenge to be faced because, in addition to the characteristics of the spermatic membrane that cause deleterious effects to the cells during the freezing and thawing processes, it is still necessary to deal with the significant variability of results, whether between individuals, ejaculates from the same individual or even fractions of an even ejaculated. Because of this, different strategies have been investigated to obtain better results and thus increase the applicability of frozen boar semen at a commercial level. Furthermore, we believe it is possible to relate the cryotolerance capacity of a given sperm to its greater or lesser capacity to fertilize the oocyte.*

**Keywords:** ejaculate; boar; FTAI; biomarkers; conservation

### **Introdução**

A criopreservação espermática é uma das principais biotecnologias da reprodução, pois permite o armazenamento do sêmen por tempo indeterminado, o que facilita a difusão genética de reprodutores geneticamente superiores e torna possível o transporte seminal entre regiões geograficamente distantes (Veerkamp e Beerda, 2007; Andrade et al., 2019; Yáñez-Ortiz et al., 2022). Além disso, esta técnica possibilita que as amostras de sêmen possam ser submetidas ao diagnóstico de diversas doenças antes de serem utilizadas em um determinado plantel (Knox, 2011; Andrade et al., 2019). Outro ponto interessante, é que ao armazenarmos o sêmen refrigerado, caso este não seja utilizado até um determinado período de tempo este é descartado. Deste modo, fica evidente que o uso do sêmen congelado nas granjas comerciais poderia ser viabilizado caso houvesse a possibilidade de se obter resultados de fertilidade e de números de leitões nascidos vivos compatíveis aos encontrados com sêmen refrigerado. Resultados estes que são possíveis (Estrada et al., 2014; Knox, 2015).

A fertilidade reduzida associada ao uso do sêmen criopreservado deve-se aos danos causados aos espermatozoides durante o processo de congelamento. Estes danos ocorrem nas estruturas das células que



acabam levando a perdas funcionais, como por exemplo, a quebra da assimetria bilipídica da membrana plasmática do espermatozoide que leva a uma perda da capacidade deste em manter sua homeostase (Watson, 1995; Torres et al., 2016).

Contudo, na última década, muitos avanços foram obtidos no que diz respeito à criopreservação de sêmen suíno. Dentre os principais progressos destacam-se, a otimização dos diluentes (Andrade et al., 2022; Pezo et al., 2020), uso de antioxidantes (Simonik et al., 2022; Andrade et al., 2023; Pezo et al., 2021), alterações no protocolo de criopreservação (Yeste, 2015; Ravagnani et al., 2018; Passarelli et al., 2020; Monteiro et al., 2022), além de recentemente, a identificação de marcadores de criotolerância espermática no sêmen de cachaços (Pedrosa et al., 2021; Torres et al., 2022). Entretanto, mesmo com todos os avanços, os resultados pós-descongelamento ainda podem ser inconsistentes, pois a qualidade espermática varia consideravelmente entre indivíduos e até mesmo, entre ejaculados de um mesmo indivíduo (Siqueira et al., 2011; Alkmin et al., 2014; Yeste, 2015; Andrade et al., 2019). Diversos são os fatores envolvidos na variabilidade da qualidade seminal pós-descongelamento, sendo o impacto das características genéticas e epigenéticas, um dos tópicos mais investigados na atualidade (Zeng et al., 2014; Chanapiwat e Kaeoket, 2015; Jiang et al., 2017; Akhtar et al., 2022). Além disso, é importante ressaltar que dentro de um ejaculado existem espermatozoides capazes de manterem suas estruturas e funções próximas ao fisiológico mesmo após o processo de criopreservação (Torres et al., 2016; Ravagnani et al., 2018). Este fato, como já citado, pode ocorrer com mais frequência no ejaculado de determinados indivíduos (Yeste et al., 2016; Pedrosa et al., 2021; Torres et al., 2022). Dessa maneira, não seria um devaneio, aventar a possibilidade de se relacionar a capacidade de criotolerância de um determinado espermatozoide a sua maior ou menor capacidade de fertilizar o oócito.

Diante do exposto, a presente revisão tem como objetivo expor os principais avanços realizados no processo de criopreservação do sêmen suíno, na última década. Somado a isso, serão explicados possíveis motivos que levam a melhor capacidade de determinados ejaculados, e porque não dizer “espermatozoides”, tolerarem a criopreservação.

### **Método de criopreservação e o que pode ser mudado para aumentar a criotolerância**

#### *Seleção de bons congeladores*

No que diz respeito à espécie suína, há uma grande variabilidade entre os resultados de criotolerância entre indivíduos, ejaculados de um mesmo indivíduo e até mesmo, frações de um mesmo ejaculado (Siqueira et al., 2011; Alkmin et al., 2014; Yeste et al., 2016). Portanto, selecionar ejaculados com alto potencial de criotolerância é uma estratégia perspicaz a fim de se obter melhores resultados pós-descongelamento. Isso porque células que apresentam melhor qualidade *in natura* são boas candidatas a resistirem ao processo de criopreservação (Yeste et al., 2013; Yeste et al., 2016).

No entanto, estudos recentes no âmbito da andrologia suína demonstraram que, até mesmo ejaculados com alta qualidade e viabilidade variam na capacidade de tolerar o processo de criopreservação (Passarelli et al., 2020; Pedrosa et al., 2021; Torres et al., 2022). Sendo assim, identificar marcadores ou atributos nos ejaculados *in natura* e que possam prever a criotolerância espermática, segue sendo critério importante a ser considerado antes do processo de congelamento de sêmen suíno.

Fato importante a ser citado é que ao identificarmos marcadores de criotolerância oriundos de micro-RNAs, proteínas, lipídios ou metabólitos; abriremos caminho para a identificação de possíveis genes relacionados a esta característica. Deste modo, podendo ser identificados e servindo de critério de seleção nos programas de melhoramento genético dos cachaços.

#### *Holding Time*

O holding time (“tempo de espera”) consiste em um período no qual as células espermáticas e o plasma seminal de um mesmo ejaculado, permanecem em contato direto por pelo menos 3 horas e idealmente por até 24 horas à 17 °C. Esta é uma etapa fundamental nos protocolos de criopreservação do sêmen suíno, pois fornece aos espermatozoides maior tolerância ao frio, melhorando a viabilidade pós-descongelamento e consequentemente, aumentando o potencial fertilizante destas células (Yeste et al., 2016; Torres et al., 2019).

Todos os processos que ocorrem durante o HT ainda não foram completamente elucidados. No entanto, sabe-se que as células espermáticas sofrem alterações químicas e metabólicas, como por exemplo,



a adesão de moléculas na membrana plasmática e a fosforilação dos resíduos de serina da proteína HSP70 ambas conferindo maior proteção ao choque térmico (Yeste et al., 2014).

Em 2022, Torres et al., demonstraram que durante o holding time, os espermatozoides provenientes de ejaculados com boa congelabilidade, ou seja, com maior criotolerância, utilizam os nucleosídeos inosina e hipoxantina como fonte de energia. Deste modo, são capazes de preservar outros tipos de fonte energética/ metabólica para uso no pós-descongelamento.

#### *Tempo de equilíbrio*

O tempo de equilíbrio é o período no qual os espermatozoides permanecem em contato com os diluidores não permeáveis (gema de ovo, lactose, entre outros) à uma temperatura média de 5 °C. Este processo confere maior equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular (Schäfer et al., 2017; Passarelli et al., 2020).

Diferentes tempos de equilíbrio foram avaliados a fim de descobrir qual seria o mais apropriado. Schäfer et al., 2017, consideraram 2, 4, 24 e 48 horas de tempo de equilíbrio e observaram que manter o ejaculado em diluidor com lactose-gema de ovo sem glicerol por 2 a 4 horas antes do congelamento, seria o ideal.

No entanto, Passarelli et al. (2020) aplicaram tempos de equilíbrio de 0, 2 e 4 horas e observaram que o ideal, em seu estudo, é um período de 2 horas a 5 °C. Haja vista que, nos resultados pós descongelamento obtiveram menor distúrbio lipídico de membrana espermática e consequentemente, uma melhor qualidade do sêmen criopreservado.

#### *Plasma seminal*

Na última década, muitos estudos avaliaram os benefícios causados pela reconstituição do sêmen suíno congelado com plasma seminal e através destes, ficou claro que a interação entre espermatozoide e plasma seminal é espécie-específica, bastante complexa e pode ser ambígua, promovendo efeitos benéficos ou deletérios sobre as células espermáticas (Höfner et al., 2020).

Sabe-se que os componentes do plasma seminal estão intrinsicamente envolvidos em diversos processos fisiológicos, como a ativação da motilidade espermática, combate a oxidação excessiva, estabilização das membranas plasmática e acrossomal, regulação do metabolismo mitocondrial e ainda, conferindo proteção aos espermatozoides contra o choque térmico (Alkmin et al., 2014; Torres et al., 2019). No entanto, quando adicionado pós descongelamento, o plasma seminal tem fornecido maior potencial fertilizante aos espermatozoides, através da modulação das suas funções (Torres et al., 2016b; Recuero et al., 2019).

O plasma seminal suíno é composto por açúcares, oligossacarídeos, glicanos, lipídios, metabólitos, íons inorgânicos, RNA, micro-RNAs, vesículas extracelulares, peptídeos, proteínas, hormônios e outros. No entanto, como essas moléculas aumentam ou reduzem a qualidade espermática e sua capacidade de fertilização, não está totalmente elucidada (Samanta et al., 2018; Recuero et al., 2019; Pedrosa et al., 2021; Torres et al., 2022).

Em uma revisão sobre este tema, Andrade et al. (2022), evidenciaram alguns processos nos quais os componentes do plasma seminal atuam modulando a qualidade. Dentre eles, destacam-se estabilização de membrana plasmática, proteção contra os efeitos das espécies reativas e oxigênio e a inibição do influxo de cálcio. No que diz respeito ao maior potencial fertilizante, Andrade et al. (2022), descrevem ainda, que as prostaglandinas, estrógeno e ocitocina presentes no plasma seminal de suínos facilita o transporte pelo trato reprodutivo da fêmea.

#### *Antioxidantes*

A suplementação dos meios de criopreservação ou descongelação com antioxidantes, tem sido realizada em diversas espécies e tem apresentado resultados positivos (Yeste et al., 2016). De acordo com Pezo et al. (2021), a adição de antioxidantes sintéticos ou naturais ao meio, neutraliza os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo/nitrosativo e assim, confere melhor qualidade dos parâmetros espermáticos.

Diversos são os antioxidantes utilizados, sendo a L-cisteína,  $\alpha$ -tocoferol, luteína, hidroxitolueno butilato (BHT), trolox, ácido ascórbico e glutathiona reduzida (GSH, considerados os mais usados



atualmente (Yeste et al., 2016).

Andrade et al. (2023) suplementaram um meio de congelamento comercial com os antioxidantes GSH e BHT, individualmente e combinados, a fim de investigar se estes são capazes de afetar o potencial fertilizante *in vitro* de espermatozoides suínos. Como resultado, observaram que adicionar 2 mM de GSH ao meio, aumentou a motilidade total e progressiva dos espermatozoides, não impactou a viabilidade destas células e reduziu o potencial fertilizante dos espermatozoides expostos a este antioxidante. Em contraste, as células espermáticas que foram expostas ao meio suplementado com 1 mM de BHT obtiveram melhor capacidade de fertilização. Deste modo, foi demonstrado que suplementar o meio de congelamento comercial com BHT é uma boa estratégia para obter melhores taxas de fertilização *in vitro*. Evidenciando que mesmo diluidores comerciais de alta qualidade ainda podem ter melhorias em suas fórmulas.

### **Marcadores de criotolerância**

#### *Proteínas*

As proteínas oriundas do plasma seminal tendem a se ligar à membrana plasmática dos espermatozoides e conferir a eles proteção contra o choque térmico (Caballero et al., 2012). Ainda em 2014, Yeste et al. demonstraram que proteínas como a HSP70, são responsáveis por modular as funções dos espermatozoides durante o holding time e então, fornecer a eles maior tolerância a criopreservação.

Diante disso, a avaliação do perfil proteico (proteômica) tanto das células espermáticas quanto do plasma seminal tem sido estudados a fim de investigar seu possível papel como biomarcadores de criotolerância espermática e fertilidade em suínos (Yeste et al., 2014; Parrilla et al., 2019).

Pérez-Patiño et al. (2016), realizaram análises de proteômica de ejaculados inteiros e suas frações (primeiros 10 mL da fração espermática; o restante da fração espermática e a fração pós-espermática). Através deste estudo, identificaram diversas proteínas diretamente relacionadas com as funções espermáticas, como ligação de íons e cálcio, glicolização, respostas imunológicas, atividade antioxidante bem como, propriamente na taxa de fertilização.

#### *Lipídios*

A fim de entender melhor o impacto dos lipídios sobre a criotolerância espermática, métodos lipidômicos vieram à tona. A lipidômica é a avaliação do perfil lipídico dentro de uma célula, tecido ou organismo e fornece uma análise quantitativa do teor lipídico desta amostra (Evans et al., 2021). O perfil lipídico das células espermáticas difere entre as espécies e até mesmo, entre os indivíduos da mesma espécie, o que pode propiciar maior ou menor integridade de membrana plasmática e interferir na criotolerância da célula. Fato este que deve-se à modificação dos componentes e da organização dos lipídios presentes na membrana durante o processo de congelamento (Cabrera, 2017).

Um estudo foi conduzido por Evans et al. (2020), a fim de predizer se a análise lipidômica do sêmen congelado de touros, poderia ser utilizada como um biomarcador de congelabilidade. Como resultado, demonstraram que os grupos de bons e maus congeladores apresentaram diferença em seu perfil lipídico. Haja vista que, o grupo de bons congeladores apresentou maior quantidade de ácidos araquidônico e oleico. O que pode estar relacionado à modulação da fluidez de membrana e proteção contra à oxidação durante os processos de congelamento e descongelamento.

Até o presente momento, estudos como estes não foram realizados na espécie suína. O que confere aos pesquisadores desta área, a oportunidade de buscar maior entendimento sobre como a lipidômica pode impactar a criotolerância de espermatozoides suínos.

#### *Metabólitos*

Vários componentes orgânicos e inorgânicos estão associados à criotolerância do espermatozoide suíno e consequentemente, a sua capacidade de fecundação. Uma vez que o metabolismo do espermatozoide não é completamente esclarecido, é de suma importância realizar análises metabolômicas dos ejaculados, a fim de entender qual é a influência destas moléculas sobre a criotolerância espermática (Andrade et al., 2019).

Em um estudo realizado por Torres et al. (2022), foi demonstrado que o perfil de metabólitos presentes no plasma seminal não influenciou na tolerância dos espermatozoides ao choque frio. No entanto,



os metabólitos provenientes das células espermáticas foram diferentemente abundantes em ejaculados de alta e baixa congelabilidade. Estes metabólitos (inosina; hipoxantina; creatina; niacinamida; espermina; ADP e 2-metilbutirilcartinina) foram associados à maior criotolerância, uma vez que, estavam associados a vias de produção de energia no espermatozoide. Além disso, foi demonstrado que as vias metabólicas da glutatona, prolina e arginina estão associadas à ejaculados de baixa congelabilidade.

#### *MicroRNAs*

Os microRNAs são transcritos do genoma e atuam regulando a expressão gênica de diferentes células no organismo (Bartel, 2004). Estas moléculas de pequeno tamanho, foram encontradas nas diferentes fases da espermatogênese, maturação espermática e vem sendo relacionadas à determinados padrões de motilidade e morfologia espermática (Curry et al., 2011).

Pedrosa et al. (2021) avaliaram o perfil de microRNAs presentes em espermatozoides e vesículas extracelulares de ejaculados suínos, com alta e baixa congelabilidade. O objetivo do estudo foi avaliar se estas moléculas poderiam ser consideradas marcadores de congelabilidade, em ejaculados ainda *in natura*. Como resultado, identificaram três miRNAs diferentemente abundantes nos ejaculados de baixa congelabilidade, sendo o ssc-miR-503 encontrado em maior concentração nas células espermáticas e o ssc-miR-130a e ssc-miR-9 estavam em maior abundância nas vesículas do plasma seminal. Através das análises de enriquecimento, foi possível descobrir que estes miRNAs estavam, possivelmente, relacionados a modificações no desenvolvimento das células germinativas masculinas e também, com a produção de energia para o espermatozoide, resultando em alterações maléficas em relação à viabilidade e funcionalidade dos espermatozoides suínos.

#### **O que falta ser feito e quais serão os próximos passos**

Acredita-se que estudos futuros baseados nos recentes e contínuos avanços em técnicas de ômicas contribuirão para a identificação de marcadores moleculares confiáveis e que possam ser utilizados como indicadores de fertilidade e como uma importante ferramenta utilizada para melhorar os resultados da aplicação de diferentes biotecnologias da reprodução assistida de suínos (Parrilla et al., 2019).

Além disso, modelos matemáticos têm sido utilizados a fim de definir atributos espermáticos que, em conjunto, possam prever quais ejaculados apresentarão maior qualidade e consequentemente, maior fertilidade (Kuhlgatz et al., 2019; Hürland et al., 2023). Kuhlgatz et al. (2019) utilizaram o modelo matemático de validação cruzada K-fold, considerando os dados de 7.455 ejaculados coletados em um período de 12 meses, a fim de avaliar a influência de fatores externos (temperatura da instalação, sazonalidade, frequência de coleta, idade e raça) sobre a qualidade espermática. Como resultado, verificaram que é possível prever a motilidade espermática (embora com uma pequena taxa de erro) e a quantidade de espermatozoides morfologicamente anormais.

Ainda, os estudos relacionados aos fatores epigenéticos modulando a criopreservação, tem apresentado resultados promissores acerca do melhor entendimento sobre a variabilidade de resultados entre indivíduos e ejaculados de um mesmo indivíduo, sendo o amplo e mais aprofundado estudo desta vertente uma grande aposta dos pesquisadores para estudos atuais e futuros (Zeng et al., 2014; Mankowska, 2022).

#### **Referências**

- Akhtar MF, Ma Q, Li Y, Chai W, Zhang Z, Li L, Wang C.** Effect of sperm cryopreservation in farm animals using nanotechnology. *Animals*, v.12, 2022.
- Alkmin DV, Perez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, Roca J.** Boar sperm cryosurvival is better after exposure to seminal plasma from selected fractions than to those from entire ejaculate. *Cryobiology*, v.69, p.203-210, 2014.
- Andrade AFC, Pedrosa AC, Passarelli MS, Martins SMMK.** Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.43, n.2, p.89-96, 2019.
- Andrade AFC, Knox RV, Torres MA, Pavaneli, APP.** What is the relevance of seminal plasma from a functional and preservation perspective? *Animal Reproduction Science*, v.246, 2022.
- Andrade AFC, Balogun K, Machaty Z, Knox RV.** Effects of supplemental antioxidants on in vitro fertility measures for cryopreserved boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.200, p.33-24, 2023.



- Bartel DP.** MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281-97, 2004.
- Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, del Olmo D, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM.** Seminal plasma proteins as modulators of the sperm function and their application in sperm biotechnologies. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47(3), p.12-21, 2012.
- Cabrera T.** Correlação entre o perfil lipídico do sêmen de garanhões e a qualidade espermática pós-descongelamento. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2017.
- Chanapiwat P, Kaeoket K.** Breed of boar influences the optimal concentration of gamma-oryzanol needed for semen cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, v.50, p.221–226, 2015.
- Curry E, Sifranski TJ, Pratt SL.** Differential expression of porcine sperm microRNAs and their association with sperm morphology and motility. *Theriogenology*, v.76, 2011.
- Estrada E, Rodríguez-Gil JE, Rocha LG, Balasch S, Bonet S, Yeste M.** Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, 2:88-99, 2014.
- Evans HC, Dinh TTN, Ugur MR, Hitit M, Sajeev D, Kaya A, Topper E, Nicodemus MC, Smith GD, Memili E.** Lipidomic markers of sperm cryotolerance in cattle. *Scientific Reports*, v.10:20192, 2020.
- Evans HC, Dinh TTN, Hardcastle ML, Gilmore AA, Ugur MR, Hitit M, Jousan FD, Nicodemus MC, Memili E.** Advancing semen evaluation using lipidomics. *Front. Vet. Sci.*, v.8:601794, 2021.
- Höfner L, Luther AM, Waberski D.** The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.220, 2020.
- Hürland M, Kuhlitz DA, Kuhlitz C, Osmers JH, Jung M, Schulze M.** The use of machine learning methods to predict sperm quality in Holstein bulls. *Theriogenology*, v.197, p.16-25, 2023.
- Jiang Z, Wang Y, Lin J, Xu J, Ding G, Huang H.** Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v.44, p. 90-104, 2017.
- Knox RV.** The current value of frozen-thawed boar semen for commercial companies. *Reprod. Domest. Anim.*, 46:4-6, 2011.
- Knox RV, Ringwelski JM, McNamara KA, Aardsma M, Bojko M.** The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on in vitro fertility measures of frozen-thawed boar sperm. *Theriogenology*, 84:407-12, 2015.
- Kuhlitz DA, Kuhlitz C, Aepli M, Schumann, B, Grossfeld R, Bortfeldt R, Jakob U, Jung M, Schulze M.** Development of predictive models for boar semen quality. *Theriogenology*, v.134, p.129-140, 2019.
- Mankowska A, Gilun P, Zasiadczyk L, Sobiech P, Fraser L.** Expression of TXNRD1, HSPA4L and ATP1B1 genes associated with the freezability of boar sperm. *Int. J. Mol. Sci.*, v.23, 2022.
- Monteiro MS, Torres MA, Passarelli MS, Martins MP, Ravagnani GM, Papa FO, Alvarenga MA, Dell’Aqua Júnior JA, Yasui GS, Martins SMMK, Andrade AFC.** Impact of cryopreservation protocols (one-and two-step) on boar semen quality at 5 °C and post-thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, v.247, 2022.
- Parrilla I, Perez-Patiño C, Li J, Barranco I, Padilla L, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA, Roca J.** Boar semen proteomics and sperm preservation. *Theriogenology*, v.137, p.23-29, 2019.
- Passarelli MS, Pavaneli APP, Ravagnani GM, Martins MP, Pedrosa AC, Martins SMMK, et al.** Effects of different equilibration times at 5 °C on boar sperm cryotolerance. *Anim. Reprod. Sci.*, v.219, 2020.
- Pedrosa AC, Torres MA, Alkmin DV, Pinzon JEP, Martins SMMK, Silveira JC, Andrade AFC.** Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance. *Theriogenology*, v.174, p.60–72, 2021.
- Pérez-Patiño C, Barranco I, Parrilla I, Valero ML, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H, Roca J.** Characterization of the porcine seminal plasma proteome comparing ejaculate portions. *J. Proteomics*. v.142, p.15-23, 2016.
- Pezo F, Zambrano F, Uribe P, Risopatrón J, Moya C, Andrade AFC, Burgos RA, Yeste M, Sánchez, R.** Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. II: Effect of the addition of saccharides to freezing medium on sperm function. *Cryobiology*, v.97, p.5-11, 2020.
- Pezo F, Yeste M, Zambrano F, Uribe P, Risopatrón J, Sánchez R.** Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*, v.98, p.5-11, 2021.
- Ravagnani GM, Torres MA, Leal DF, Martins SMMK, Papa FO, Della’Aqua Júnior JA, Alvarenga MA, Andrade AFC.** Cryopreservation of boar semen in 0.5mL straws at low spermatozoa concentration is better than high concentration to maintain sperm viability. *Pesq Vet Bras*, v.38(9), p.1726-1730, 2018.



- Recuero S, Fernandez-Fuertes, Bonet S, Barranco I, Yeste M.** Potential of seminal plasma to improve the fertility of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.137, p.36-42, 2019.
- Samanta L, Parida R, Dias TR, Agarwal A.** The enigmatic seminal plasma: A proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16:41, 2018.
- Schäfer J, Waberski D, Jung M, Schulze M.** Impact of holding and equilibration time on post-thaw quality of shipped boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.187, p.109–115, 2017.
- Simonik O, Bubenickova F, Tumova L, Frolikova M, Pratap Sur V, Beran J, Havlikova K, Hackerova L, Spevakova D, Komrskova K, Postlerova P.** Boar sperm cryopreservation improvement using semen extender modification by dextran and pentaisomaltose. *Animals*, v.12, p.868, 2022.
- Siqueira AP, Wallgren M, Hossain MS, Johannisson A, Sanz L, Calvete JJ, Rodríguez-Martínez H.** Quality of boar spermatozoa from the sperm-peak portion of the ejaculate after simplified freezing in Mini Flatpacks compared to the remaining spermatozoa of the sperm-rich fraction. *Theriogenology*, 2011.
- Torres MA, Ravagnani GM, Leal DF, Martins SMMK, Muro BBD, Meirelles FV, Papa FO, Dell'Aqua Junior JA, Alvarenga MA, Moretti AS, Andrade AFC.** Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. *J. Anim. Sci.*, v. 94, 2016a.
- Torres MA, Díaz R, Boguen R, Martins SMMKM, Ravagnani GM, Leal DF, Oliveira ML, Muro BBD, Parra BM, Meirelles FV, Papa FO, Dell'Aqua Jr JA, Alvarenga MA, Moretti AS, Sepúlveda N, Andrade AFC.** Novel Flow cytometry analyses of boar sperm viability: Can the addition of whole sperm-rich fraction seminal plasma to frozen-thawed boar sperm affect it? *Plos One*, v.11, e0160988, 2016b.
- Torres MA, Pedrosa AC, Novais FJ, Alkmin DV, Cooper BR, Yasui GS, Fukumasu H, Machaty Z, Andrade AFC.** Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability. *Biol. Reprod.*, v.106, p.213–226, 2022.
- Veerkamp RF, Beerda B.** Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*, v.68, p.S266-S273, 2007.
- Watson PF.** Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7(4):871-91, 1995.
- Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M.** Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, v.246, 2022.
- Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S, Rodríguez-Gil JE.** Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology*, v.79, p.929-939, 2013.
- Yeste M, Estrada E, Rivera Del Álamo MM, Bonet ST, Rodríguez-Gil JE.** The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. *PLoS One* 9:1–19, 2014.
- Yeste M.** Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. *Reprod. Dom. Anim.*, v.50 (2), p.71–79, 2015.
- Yeste M.** Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, v.85, p.47-64, 2016.
- Zeng C, Peng W, Ding L, He L, Zhang Y, Fang D, Tang K.** A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*, v.69, p.119-127, 2014.
-