

El 3,4-dihidroxifenilglicol reduce la peroxidación lipídica producida durante el proceso de criopreservación de semen del carnero

Peláez-Caro, M.P.¹; Arando, A.^{1,2}; Bermúdez-Oria, A.³; Díaz-Ruiz, E.^{1@}; Fernández-Prior, A.³; Salgado J.I.¹; Galán-Luque, I.¹; Navas-González, F.J.^{1,4}; González-Ariza, A.¹ y Pérez-Marín, C.C.⁵

¹ Departamento de Genética. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

² Animal Breeding Consulting S.L. Córdoba. España.

³ Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Sevilla. España.

⁴ Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA). Alameda del Obispo. Córdoba. España.

⁵ Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Córdoba. Córdoba. España.

RESUMEN

PALABRAS CLAVE

Antioxidantes.
Semen.
Aceite de oliva.
Conservación.

Los daños que se producen durante los procesos de criopreservación en los espermatozoides de la especie ovina reducen la calidad del semen y por lo tanto su capacidad fecundante. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de adición de diferentes concentraciones de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) sobre el semen ovino durante el proceso de criocongelación. Para ello el espermatozoides recogido se agrupó y fue diluido con Biladyl, suplementado con diferentes concentraciones de DHPG (59 μ M, 177 μ M, 295 μ M y 413 μ M), dejando un tratamiento control sin antioxidante. Se evaluó la motilidad, la viabilidad, la integridad del acrosoma, el potencial de la membrana mitocondrial y la peroxidación lipídica (LPO). No se observaron diferencias significativas derivadas de la adición de DHPG para todas las variedades estudiadas, a excepción de la LPO, que resultó verse reducida con respecto al control cuando las muestras fueron criopreservadas. Se concluyó por tanto que la adición de DHPG tiene un efecto positivo sobre los espermatozoides descongelados en la medida en que redujeron la LPO.

3,4-dihydroxyphenylglycol reduces lipid peroxidation during the cryopreservation process of ram semen

SUMMARY

The damage produced by cryopreservation processes on ovine spermatozoa reduces semen quality and therefore its fertilising capacity. The aim of this study was to evaluate the effect of adding different concentrations of 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) to sheep semen during the cryopreservation process. For this purpose, the sperm, once collected, were pooled and diluted with Biladyl, supplemented with different concentrations of DHPG (59 μ M, 177 μ M, 295 μ M and 413 μ M), leaving a control treatment without antioxidant supplementation. Motility, viability, acrosome integrity, mitochondrial membrane potential and lipid peroxidation (LPO) were assessed. No significant differences were observed derived from the addition of DHPG for all the studied variables, with the exception of the LPO, which was reduced in comparison to the control treatment when the samples were cryopreserved. It was therefore concluded that the addition of DHPG has a positive effect on thawed sperm as they reduced LPO.

ADDITIONAL KEYWORDS

Antioxidants.
Semen.
Olive oil.
Conservation.

INFORMATION

Cronología del artículo.

Recibido/Received: 28.10.2021

Aceptado/Accepted: 10.04.2023

On-line: 15.04.2023

Correspondencia a los autores/Contact e-mail:

estherdrr@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los procesos de criopreservación de los espermatozoides derivan en daños irreversibles que condicionan los resultados de fertilidad (Hashem, Haddad & Eslami 2017). Los espermatozoides de carnero son células especialmente sensibles al choque térmico como consecuencia de los daños producidos en la células que derivan de la formación de hielo intracelular, variaciones osmóticas y en algunos casos, la toxicidad de los medios de criopreservación (Curry & Watson 1994).

Dicha sensibilidad de los espermatozoides de carnero está asociada a la composición de su membrana plasmática, alta en ácidos grasos poliinsaturados y con baja relación colesterol:fosfolípido, que la hacen susceptible a las moléculas prooxidantes y especies reactivas de oxígeno (ERO) que derivan en la peroxidación de la membrana plasmática.

Los efectos que pueden tener las ERO en los espermatozoides dependen del tipo y su concentración, teniendo a bajas concentraciones un efecto positivo sobre la capacitación o reacción acrosómica (Bucak *et al.* 2007),

mientras que a altas concentraciones acaba por inhibir la función normal de los espermatozoides por medio de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados localizados en la misma, reduciendo así la viabilidad de la célula (Aziz *et al.* 2004).

A pesar de que los espermatozoides poseen mecanismos endógenos que les ayudan a contrarrestar el estrés oxidativo, la manipulación de semen o un descenso brusco de la temperatura pueden dar lugar a un entorno en que estos mecanismos vean sobrepasada su actividad, no pudiendo contrarrestar el estrés producido (Agarwal & Saleh 2002). Es por esto que la adición de antioxidantes exógenos se presenta como una posible alternativa para reducir los efectos negativos de la LPO.

Han sido múltiples los estudios realizados con extractos obtenidos a partir de hojas, semillas y raíces de plantas que han afirmado tener propiedades antioxidantes debido a su alto contenido en polifenoles, flavonoides, carotenos, ácido gálico, taninos y aceites esenciales, teniendo además una mayor actividad que los antioxidantes sintéticos, al reducir la toxicidad y la formación de residuos (Zhong & Zhou 2013). El alto porcentaje de fenoles que posee el aceite de oliva (Fernandez-Bolanos *et al.* 2008) lo hace un producto de interés como agente antioxidante.

El 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) es un fenol que se obtiene a partir del Alperujo, residuo derivado del proceso de molturación de la aceituna para la obtención de aceite de oliva, del cual se han documentado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Rodríguez *et al.* 2007).

Los estudios realizados referentes al efecto del aceite de oliva y sus derivados sobre la calidad del semen no son muy numerosos, teniendo como ejemplo algunos trabajos recientes realizados en especies como el caprino (Arando *et al.* 2021) o el canino (Shakouri *et al.* 2021). Por tanto, teniendo en cuenta la capacidad antioxidante señalada, se planteó la hipótesis de que la suplementación de DHPG al diluyente de congelación de semen de carnero, podría mejorar la calidad post-descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE MEDIOS Y ANTIOXIDANTES

Para la dilución y criopreservación de los espermatozoides se utilizó el diluyente comercial Biladyl (Minitub Ibérica, S.L., Tarragona, España). Las fracciones A y B se prepararon de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El semen se diluyó 1:2 con la fracción A del diluyente. Las muestras se complementaron con diluyentes que contenían diferentes concentraciones de DHPG (59 µM, 177 µM, 295 µM y 413 µM).

El DHPG se extrajo del Alperujo y se trató a 160°C y 9 kg/cm² de presión, durante 60 min. La extracción térmica se realizó en un reactor de 100 l utilizando vapor como calentamiento directo. Tras el enfriamiento, el material húmedo se centrifugó a 4700 g (Comteifa S.L., Barcelona, España) para la separación de sólidos y líquidos. Finalmente, el DHPG se purificó hasta al-

canzar un 95% de pureza, en relación con la materia seca, utilizando un sistema cromatográfico (Fernández-Bolaños Guzmán *et al.* 2013).

ANIMALES Y RECOGIDA DE SEMEN

Se utilizaron seis carneros de la raza Merina de entre 2 y 3 años. Los eyaculados fueron recogidos mediante vagina artificial fuera de la estación óptima de reproducción. Se recogieron 12 eyaculados por macho para un total de 72 eyaculados totales.

Los animales se mantuvieron en el Centro Agropecuario Provincial de Córdoba (España), alojados en un cubículo con suelo de hormigón y alimentados con un pienso concentrado comercial (0,5 kg), con acceso ad libitum a heno, agua y bloques de suplementos minerales. El manejo de los animales se ajustó a la normativa de la Unión Europea (2010/63/UE) en su transposición a la legislación española (RD 53/2013). El experimento contó con la autorización del Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba.

Una vez recogidos los eyaculados estos se introdujeron en un baño de agua a 37°C, donde se mantuvieron durante la evaluación inicial del semen. El volumen fue determinado con la ayuda de tubos graduados, la concentración espermática con fotómetro (Accuread, IMV technologies, Francia) y la motilidad masal mediante microscopio (0-5, 40 aumentos; Olympus, Tokio, Japón). Sólo se incluyeron en este estudio los eyaculados con un volumen $\geq 0,5$ ml, una concentración $\geq 3000 \times 10^6$ spz/ml y una motilidad masal ≥ 4 .

DILUCIÓN, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DEL SEMEN

Los eyaculados fueron diluidos 1:2 con la fracción A del diluyente, para acto seguido agruparlos de manera que se pudiera reducir el efecto individual de cada macho. A partir de la dilución ya indicada, se obtuvieron 5 alícuotas, las cuales se completaron con la fracción A del diluyente suplementado con diferentes concentraciones de DHPG de forma que en todos los casos se obtuviera un volumen total de 500 µl por alícuota y manteniendo la concentración arriba indicada. Tras el proceso de refrigeración de 2 horas a 5°C se añadieron 500 µl de la fracción B del diluyente, complementado con las distintas concentraciones de DHPG, obteniéndose un volumen total de 1000 µl por alícuota. La concentración era de 400×10^6 spz/ml por alícuota.

Las muestras fueron congeladas en pajuelas de 0,25 ml conteniendo 100×10^6 spz/pajuela y se congelaron en vapores de nitrógeno a 4 cm durante 10 minutos.

EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD DEL SEMEN

La motilidad espermática fue evaluada mediante el software ISAS v.1.2 (Integrated Semen Analyser System, Proiser, Valencia, España). Previamente, las muestras se diluyeron con la fracción A del Biladyl hasta una concentración final de 25×10^6 spz/ml. Se capturaron un total de cuatro campos al azar. El área de la cabeza se consideró ser de 10-70 µm².

EVALUACIÓN CON CITÓMETRO DE FLUJO

Los análisis de citometría de flujo se realizaron utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences).

ces, San José, CA, EE.UU.) con un láser azul de argón de 488 nm.

La viabilidad de los espermatozoides se determinó mediante el kit de viabilidad LIVE/DEAD (Molecular Probes Europe, Leiden, Países Bajos) (Arando *et al.* 2017). Se diluyó un volumen de 10 μ l de espermatozoides con 240 μ l de tampón de citómetro (4×10^6 spz/ml) y se mezcló inmediatamente con 2,5 μ l de SYBR-14 (20 nM de concentración final) y 5 μ l de yoduro de propidio (IP, 10 μ M de concentración final). La mezcla se incubó en la oscuridad durante 15 minutos y a continuación se analizaron las muestras. Los espermatozoides que emiten en la longitud de onda verde (FL1) se consideraron como espermatozoides con membranas plasmáticas intactas.

La integridad del acrosoma se determinó utilizando la combinación de PI (Molecular Probes Europe, Leiden, Países Bajos) y aglutinina de cacahuete conjugada con isotiocianato de fluoresceína (PNA-FITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Arando *et al.* 2017). Un total de 100 μ l de muestra (5×10^6 spz/ml de concentración final) se mezcló con 5 μ l (100 μ g/ml en DMSO, solución madre) y 5 μ l de IP (6 μ M de concentración final) y se incubó en la oscuridad durante 5 min. A continuación, se añadieron 400 μ l de tampón del citómetro y se analizaron las muestras. Los resultados se presentaron como el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto.

El potencial de la membrana mitocondrial se evaluó utilizando MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes Europe, Leiden, Países Bajos) y SYBR-14 (Molecular Probes Europe, Leiden, Países Bajos) (Hallapet *et al.* 2005; Santiani 2016). Un total de 50 μ l de semen (10^8 spz/ml) se mezclaron con 350 μ l de tampón de citómetro, 2 μ l (2 μ M de concentración final) de SYBR-14 y 2 μ l (10 μ M de concentración final) de MitoTracker Red CMXRos. Se incubaron en la oscuridad durante 10 minutos a 37°C y sólo se registraron los espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial (HMMP).

La LPO se estimó utilizando C11-BODIPY581/591 (Molecular Probes Europe, Leiden, Países Bajos) de acuerdo con un protocolo modificado (Thuwanut *et al.* 2009). En resumen, el espermatozoides descongelado se diluyó hasta alcanzar una concentración final de 4×10^6 spz/ml. A continuación, se cargaron 100 μ l de espermatozoides diluido con 1 μ l de C11-BODIPY581/591 (concentración final de 2 μ M) y se incubaron a 37°C durante 30 min. Después, se añadió 1 ml de PBS y se centrifugó a 600g durante 8 min. El pellet se resuspendió con 100 μ l de PBS antes de la evaluación. Los espermatozoides con LPO emitieron luz en la longitud de onda verde y se consideraron células positivas al BODIPY.

Los datos adquiridos se analizaron con el software FlowJo® versión 7.6.2, utilizando gráficos de puntos en base al tamaño celular relativo (FSC), la complejidad interna (SSC) y la intensidad de fluorescencia específica para cada sonda. El porcentaje de eventos no espermáticos se corrigió matemáticamente en función de la viabilidad y la integridad del acrosoma (Petrunkina *et al.* 2013).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks para determinar si los datos estaban distribuidos normalmente. Como los datos no presentaban una distribución normal, los parámetros VCL, VSL, VAP, ALH y BCF se transformaron en logaritmos, mientras que los parámetros TM, PM, LIN, STR, WOB, viabilidad espermática, integridad del acrosoma, HMMP y LPO, se transformaron en arcoseno. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples para detectar diferencias entre las alícuotas suplementadas con DHPG frente al grupo control (sin antioxidante). Se consideraron diferencias significativas cuando $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Como podemos observar en la **figura 1**, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control y las diferentes concentraciones de DHPG para las variables estudiadas, a excepción de la peroxidación de la membrana plasmática, para la cual se observó como la adición de DHPG a diferentes concentraciones disminuyó el porcentaje de peroxidación de la membrana plasmática.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han hecho múltiples ensayos evaluando el efecto de diferentes tipos de antioxidantes como aditivos a los diluyentes para preservación (Arando *et al.* 2021). Sin embargo, a día de hoy los resultados obtenidos siguen siendo contradictorios e inciertos en la literatura en relación a los roles y efectos que dichos antioxidantes ofrecen y sugieren que el éxito de la criopreservación se debe a la influencia de otros factores como el papel desempeñado por cada individuo o los tipos y concentraciones de diluyentes y antioxidantes empleados (Silva *et al.* 2012).

Existen estudios con antioxidantes que afirmaron que la suplementación con metionina y ditioneol no causaba un efecto negativo en la motilidad de los espermatozoides tras la congelación (Çoyan *et al.* 2010). Sin embargo, atendiendo a los resultados obtenidos en el presente estudio, la adición de antioxidante no supuso una mejora especialmente significativa de los parámetros cinéticos y de velocidad en comparación con los valores obtenidos en el grupo control.

El hecho de que la membrana de los espermatozoides de los mamíferos se encuentre compuesta por ácidos grasos poliinsaturados, la hace sensible frente a las ERO, ya que pueden afectar a la fluidez de la membrana y promover la reorganización de las proteínas, lo que se traduce en una desestabilización de la membrana plasmática. En el presente estudio la adición de DHPG no tuvo ningún efecto sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. Sin embargo, otros estudios llevados a cabo con antioxidantes como la cisteína, la ergotioneína, o la rafinosa (Ahmad *et al.* 2013; Najafi *et al.* 2014; Sharafi, Zhandi & Sharif 2015) han demostrado que protegen la integridad de la membrana

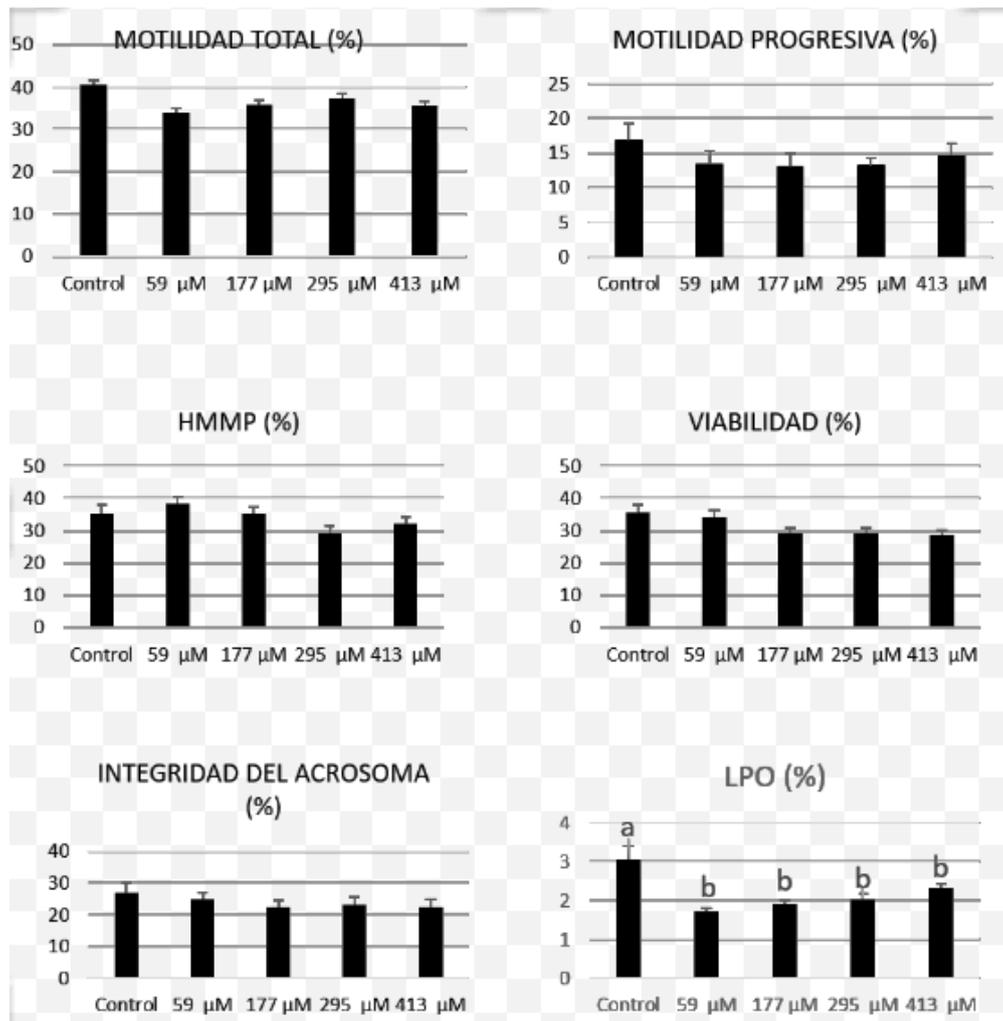


Figura 1. Resultados de motilidad total, progresiva, HMMP, viabilidad, integridad del acrosoma y LPO expresado en porcentaje (Results of total motility, progressive, HMMP, viability, acrosome integrity and LPO expressed as a percentage).

post-descongelación. Igualmente, en este estudio no se pudo comprobar la mejoría de la integridad del acrosoma tras la descongelación sugiriendo que el daño estructural que produce el proceso de congelación en el espermatozoide no puede ser revertido por la adición de antioxidantes (Silva *et al.* 2012). Sin embargo, antioxidantes fenólicos, ácido oleico, metionina, ácido elálgico y curcumina han mostrado tener un efecto beneficioso sobre el acrosoma (Al-Daraji 2012; Hashem, Haddad & Eslami 2017).

Las mitocondrias dañadas inducen un aumento de la producción de ERO, que afecta directamente las funciones normales de los espermatozoides (Cámara *et al.* 2011; Evans & Maxwell 1987; Hashimoto *et al.* 2004). Además, algunos estudios sugieren que la suplementación con antioxidantes endógenos de las muestras de semen reduce la producción de ERO y, como consecuencia, se mantiene o mejora el potencial mitocondrial post-descongelación (Hashimoto *et al.* 2004; Cámara *et al.* 2011). Sin embargo, en este estudio no se observó una mejoría en el potencial de membrana mitocondrial de las muestras suplementadas con antioxidante con respecto al grupo control, al igual que lo observado por

otros autores cuando añaden catalasa o glutatión (Flora 2009; Ortega-Ferrusola *et al.* 2008; Zhong & Zhou 2013).

En lo que respecta a la LPO se pudo comprobar un efecto positivo que ejerció la adición de DHPG al diluyente de semen congelado, reduciendo así la peroxidación lipídica de las membranas de los espermatozoides. Este efecto positivo también ha sido descrito en estudios realizados en carprino con antioxidantes derivados del aceite de oliva (Arando *et al.* 2021) en otros estudios (Zeitoun & Al-Damegh 2014).

De cara a la interpretación los valores obtenidos es importante tener en cuenta el hecho de que la capacidad antioxidante enzimática endógena en el esperma de carnero varía en diferentes épocas del año, aumentando en época no reproductiva (de marzo a septiembre) (Martí *et al.* 2007). La falta de efecto del antioxidante exógeno podría estar ligado a esta actividad antioxidante endógena por llevarse a cabo este estudio en la época de mayor actividad de la misma.

En conclusión, los resultados sugieren que la adición de DHPG al diluyente de congelación ofrece una protección significativa contra la LPO de la membrana de los espermatozoides, mientras que otras caracte-

rísticas del espermatozoa más ligados a la cinética (motilidad total y progresiva, velocidad), la integridad de la membrana, el estado del acrosoma y el potencial de membrana mitocondrial no sufrieron efecto positivo alguno.

FINANCIACIÓN

Esta investigación ha sido financiada por el Programa Torres Quevedo del Ministerio de Ciencia e Innovación de España, número de subvención PTQ2019-010670, concedida a Ander Arando Arbulu.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A & Saleh, RA 2002, 'Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment', *Urologic Clinics*, vol. 29, no. 4, pp. 817-27.
- Ahmad, E, Aksoy, M, Serin, İ, Küçük, N, Ceylan, A & Uçan, U 2013, 'Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro', *Small Ruminant Research*, vol. 115, no. 1-3, pp. 77-81.
- Al-Daraji, HJ 2012, 'Adding olive oil to rooster semen diluents for improving semen quality and storage ability during liquid storage', *Baltic Journal of Comparative and Clinical Systems Biology*, vol. 42, no. 2, pp. 3-11.
- Arando, A, Gonzalez, A, Delgado, JV, Arrebola, FA, & Perez-Marín, CC 2017, 'Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification'. *Animal reproduction science*, vol 181, pp 175-185.
- Arando, A, Navas-González, FJ, Bermúdez-Oria, A, Delgado, JV, Fernández-Prior, Á, González-Ariza, A, León, JM & Pérez-Marín, CC 2021, 'Bayesian Analysis of the Effects of Olive Oil-Derived Antioxidants on Cryopreserved Buck Sperm Parameters', *Animals*, vol. 11, no. 7, p. 2032.
- Aziz, N, Saleh, RA, Sharma, RK, Lewis-Jones, I, Esfandiari, N, Thomas Jr, AJ & Agarwal, A 2004, 'Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index', *Fertility and sterility*, vol. 81, no. 2, pp. 349-54.
- Bucak, MN, Ateşşahin, A, Varışlı, Ö, Yüce, A, Tekin, N & Akçay, A 2007, 'The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process', *Theriogenology*, vol. 67, no. 5, pp. 1060-7.
- Câmara, D, Mello-Pinto, M, Pinto, L, Brasil, O, Nunes, J & Guerra, M 2011, 'Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen', *Small Ruminant Research*, vol. 100, no. 1, pp. 44-9.
- Çoyan, K, Başpınar, N, Bucak, MN, Akalın, PP, Ataman, MB, Ömür, AD, Güngör, Ş, Küçükgünay, S, Özkalp, B & Sariözkan, S 2010, 'Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen', *Research in veterinary science*, vol. 89, no. 3, pp. 426-31.
- Curry, M & Watson, P 1994, 'Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury', *Cryobiology*, vol. 31, no. 1, pp. 39-46.
- Evans, G & Maxwell, WC 1987, *Salamons' artificial insemination of sheep and goats*, Butterworths.
- Fernandez-Bolanos, JG, Lopez, O, Fernandez-Bolanos, J & Rodriguez-Gutierrez, G 2008, 'Hydroxytyrosol and derivatives: Isolation, synthesis, and biological properties', *Current Organic Chemistry*, vol. 12, no. 6, pp. 442-63.
- Fernández-Bolaños Guzmán, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama Muñoz, A., Fernández-Bolaños Guzmán, J. M., Maya, I., López López, Ó., & Maset Castro, A. 2013. Method for obtaining hydroxytyrosol extract, mixture of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol extract, and hydroxytyrosyl acetate extract, from by-products of the olive tree, and the purification thereof.
- Flora, SJ 2009, 'Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure', *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2, no. 4, pp. 191-206.
- Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, Ü., Johannisson, A., & Rodriguez-Martinez, H. 2005. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*, 2005, vol. 63, no 8, p. 2311-2322.
- Hashem, EZ, Haddad, R & Eslami, M 2017, 'Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage', *Small Ruminant Research*, vol. 150, pp. 30-9.
- Hashimoto, T, Ibi, M, Matsuno, K, Nakashima, S, Tanigawa, T, Yoshikawa, T & Yabe-Nishimura, C 2004, 'An endogenous metabolite of dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury', *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 36, no. 5, pp. 555-64.
- Marti, E, Mara, L, Marti, J, Muino-Blanco, T & Cebrián-Pérez, J 2007, 'Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma', *Theriogenology*, vol. 67, no. 9, pp. 1446-54.
- Najafi, A, Kia, HD, Mohammadi, H, Najafi, MH, Zanganeh, Z, Sharafi, M, Martinez-Pastor, F & Adeldust, H 2014, 'Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender', *Cryobiology*, vol. 69, no. 1, pp. 68-73.
- Ortega-Ferrusola, C, Sotillo Galan, Y, Varela-Fernandez, E, Gallardo-Bolanos, J, Muriel, A, Gonzalez-Fernandez, L, Tapia, J & Pena, F 2008, 'Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm', *Journal of andrology*, vol. 29, no. 2, pp. 213-21.
- Petrunkina, A. M., Waberski, D., Bollwein, H., & Sieme, H. 2010. Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology*, vol. 73, no 7, p. 995-1000
- Rodríguez, G, Rodríguez, R, Fernández-Bolaños, J, Guillén, R & Jiménez, A 2007, 'Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenyl glycol from olive oil waste', *European Food Research and Technology*, vol. 224, no. 6, pp. 733-41.
- Santiani, A., Ugarelli, A., & Evangelista-Vargas, S. 2016. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (Vicugna pacos) sperm using imaging flow cytometry. *Animal reproduction science* vol. 173, p. 49-55
- Shakouri, N, Soleimanzadeh, A, Rakhshanpour, A & Bucak, MN 2021, 'Antioxidant effects of supplementation of 3, 4-dihydroxyphenyl glycol on sperm parameters and oxidative markers following cryopreservation in canine semen', *Reproduction in Domestic Animals*.
- Sharafi, M, Zhandi, M & Sharif, AA 2015, 'Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flow-cytometric study on post-thawed ram spermatozoa', *Cell and tissue banking*, vol. 16, no. 2, pp. 261-9.
- Silva, E, Cajueiro, J, Silva, S, Soares, P & Guerra, M 2012, 'Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm', *Theriogenology*, vol. 77, no. 8, pp. 1722-6.
- Thuanut, P., Axner, E., Johannisson, A., & Chatdarong, K. (2009). Detection of Lipid Peroxidation Reaction in Frozen-Thawed Epididymal Cat Spermatozoa Using BODIPY581/591 C11. *Reproduction in domestic animals*, 2009, vol. 44, p. 373-376.
- Zeitoun, MM & Al-Damegh, MA 2014, 'Effect of nonenzymatic antioxidants on sperm motility and survival relative to free radicals and antioxidant enzymes of chilled-stored ram semen', *Open Journal of Animal Sciences*, vol. 5, no. 01, p. 50.
- Zhong, R-z & Zhou, D-w 2013, 'Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction', *Journal of integrative agriculture*, vol. 12, no. 10, pp. 1826-38.