



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE UN  
ANTIOXIDANTE EN DILUYENTE  
COMERCIAL SIN YEMA DE HUEVO SOBRE  
LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y  
FUNCIONAL DE LOS ESPERMATOZOIDES  
DE BOVINO CRIOPRESERVADOS**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

Monica Gabriela Navarrete García

**ASESOR(A) DE TESIS**

Dra. en C. Itzayana Mejía Flores

**Coasesor**

M. en C. Javier Hernández  
Ignacio.

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE



ASUNTO: VOTO APROBATORIO

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN XALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis.**

**Efecto de la adición de un antioxidante en diluyente comercial sin yema de huevo sobre la actividad mitocondrial y funcional de los espermatozoides de bovino criopreservados.**

Que presenta la pasante: **Monica Gabriela Navarrete Garcia.**

Con número de cuenta: **314328764** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de febrero de 2024.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés	
<b>VOCAL</b>	Dr. José Alfredo Medrano Hernández	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Itzayana Mejía Flores	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M. en C. Fernando García González	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

MCVB/ntm\*

## Dedicatoria

“El campo es el alma y sustento de la Nación y los jóvenes somos su sangre”.  
(INIFP,2009).

A mi mamá, Gabriela, por ser mi mayor soporte. Gracias por siempre impulsarme a seguir mis sueños, pero sobre todo por ayudarme a descubrir aquellos que no sabía que tenía; por enseñarme a hacerle frente a la adversidad, y disfrutar de cada momento de la vida. Te amo con todo mi corazón, siempre juntas.

A mi HHMMAPS May, por ser mi más grande cómplice y mi compañera de vida.  
Te adoro con el alma.

A mi Tía Elena, por ser mi segunda mamá y acompañarme en cada paso que doy.  
Gracias por siempre tener un momento para escucharme.

A mi abuelito Eulogio, por todas esas pláticas. Gracias por mostrarme que la vida puede verse de diferentes maneras.

A mis dos ángeles, mi abuelita Inés y mi tía tita, porque en el tiempo que compartieron la vida conmigo, me dieron grandes enseñanzas y gracias a ustedes estoy cumpliendo un objetivo más. Los extraño siempre.

A mi familia en Chetumal, porque a pesar de la distancia física siempre los siento cerquita, acompañándome.

A las familias Navarrete y González, por ser parte de este sueño. Gracias por sus consejos y apoyo siempre.

A mi mejor amigo, Erick. Por estar en cada paso de este camino, espero podamos recorrer mucho más juntos.

A mi Samara preciosa, por llegar a mi vida y quedarte para ser mi familia. Gracias por todo, te amo infinitamente.

A Ana, Kevin, Jesús, Dani y nuestra estrella en el cielo, Edgar. Por ser la mejor familia que uno pudiera elegir. Gracias por darme una amistad tan sincera, por sus enseñanzas y consejos, por tantos viajes y anécdotas. Los amo siempre.

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, no solo por mi educación, sino también por las personas que puso en mi camino.

Al proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA205221, IA206824 y FES Cuautitlán CI2264 por el financiamiento para que se pudiera llevar a cabo este trabajo de investigación.

A mi asesora la Dra. Itzayana Mejía Flores, gracias por ser parte de mi formación académica desde aquella clase de Zootecnia, usted me mostró un mundo dentro de la veterinaria que no sabía me encantaba. La quiero mucho doc, espero poder seguir aprendiendo de usted muchos años.

A mi Coasesor el M. en C. Javier Hernández Ignacio, gracias por siempre estar dispuesto a compartir sus conocimientos y por todo su apoyo.

A los miembros de mi jurado, Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés, Dr. José Alfredo Medrano Hernández, M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez y el M. en C. Fernando García González, gracias por todos sus comentarios y asesoría para poder realizar este trabajo de una mejor manera.

Al Dr. Salvador Uribe Carbajal, gracias infinitas por su apoyo en la realización de este trabajo

A los miembros del laboratorio 305 ote. A cargo del Dr. Salvador Uribe Carbajal en el Instituto de Fisiología celular, gracias por darme un espacio para poder realizar este trabajo y hacerme sentir parte de ustedes, en especial a la Dra. Natalia Chuiquete Félix, gracias por su ayuda durante este proceso, por resolver dudas y enseñarme a existir en un laboratorio.

A mi equipo tesis: Julio, Diana y Angelito, gracias por esos días en el rancho llenos de trabajo y pláticas, que bonito recorrer este ultimo tramo junto a ustedes.

Y gracias a todas las personas que han sido parte de este camino, su apoyo ha sido fundamental, los llevo siempre en mi corazón.

Contenido	
<i>Lista de figuras</i> .....	6
<i>Lista de Gráficas</i> .....	7
Resumen .....	8
Introducción.....	9
Inseminación artificial.....	10
La célula espermática .....	11
Fisiología mitocondrial .....	13
Cadena respiratoria.....	13
MARCO TEÓRICO.....	15
Especies Reactivas de oxígeno. ....	15
Estrés oxidativo.....	16
Criopreservación.....	16
Capacitación espermática in vivo.....	18
Criocapacitación .....	19
Diluyentes comerciales.....	20
Antioxidantes.....	21
Antioxidantes primarios .....	21
Antioxidantes secundarios .....	22
Antioxidantes terciarios.....	22
MitoTEMPO ®.....	22
Justificación.....	25
Objetivos.....	26
General .....	26
Particulares: .....	26
Hipótesis.....	26
Materiales y métodos.....	26
Material biológico.....	26
Obtención de semen.....	26
Análisis del semen.....	27
Congelación del semen .....	28
Descongelación .....	29
Evaluación de la actividad mitocondrial.....	29

Evaluación de la viabilidad espermática e integridad acrosomal.....	30
Análisis estadístico.....	34
Resultados.....	35
Producción de Especies Reactivas de Oxígeno .....	35
Medición ATP .....	36
Viabilidad espermática e integridad acrosomal.....	37
HOST .....	37
Tinción azul de coomassie.....	38
Tinción eosina-nigrosina.....	39
Motilidad.....	40
Discusión .....	41
Conclusiones.....	45
Perspectivas.....	45
Referencias.....	46

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema de la estructura del espermatozoide bovino. Modificado de (Vera, 2008) <a href="http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_40.pdf">http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_40.pdf</a>	12
Figura 2: Esquema de la cadena respiratoria. Modificado de (Tsukino, 2009).	14
Figura 3. Captacion de molecula de mitoTempo a traves de bicapa de fosfolipidos. Modificado de (Murphy, 2007).	23
Figura 4. Estructura quimica de MitoTEMPO. Tomado de MCE <a href="https://www.medchemexpress.com/Mito-TEMPO.html?locale=es-ES">https://www.medchemexpress.com/Mito-TEMPO.html?locale=es-ES</a>	24
Figura 5. Mecanismo de accion de mito-Tempo. Modificado de (Murphy et al, 2007).	25
Figura 6. Imágenes de espermatozoides tomadas en microscopio óptico 40X que muestran la interpretación de la prueba HOST en combinación con azul de coomassie. A. Espermatozoide de bovino positivo a HOST, la flecha señala el enrollamiento de la cola. B. Espermatozoide bovino negativo a HOST, la flecha señala la cola que se observa recta. C. Espermatozoide de bovino con presencia de acrosoma, la flecha señala el acrosoma teñido de azul. D. Espermatozoide de bovino con pérdida de acrosoma, la flecha señala la ausencia de coloración. (Foto propia tomada en el Laboratorio 305 OTE del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 2023).	32
Figura 7. Imágenes de espermatozoides tomadas en microscopio óptico 40X, que muestran la interpretación de la tinción de Eosina-Nigrosina. A. Espermatozoide bovino vivo, la flecha señala la cabeza sin teñir, no presenta coloración. B. Espermatozoide de bovino muerto, la flecha señala el patrón de tinción en matices de color rosas. (Foto propia tomada en el Laboratorio 305 OTE del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 2023).	33



## Lista de Gráficas

<i>Gráfica 1. Donde se observa la producción de EROs (nM) de los espermatozoides bovinos, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionado al diluyente con diferentes concentraciones del antioxidante (<math>P \leq 0.05</math>).</i>	35
<i>Gráfica 2. Se muestra la producción de ATP (nM) de los espermatozoides bovinos, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionado al diluyente con diferentes concentraciones de antioxidantes (<math>P \leq 0.05</math>).</i>	36
<i>Gráfica 3. Se muestra la relación de espermatozoides positivos y negativos a la prueba HOST, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionado al diluyente con diferentes concentraciones de antioxidantes (<math>P \leq 0.05</math>).</i>	37
<i>Gráfica 4. Se muestra la relación de espermatozoides con acrosoma y sin acrosoma, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionado al diluyente con diferentes concentraciones de antioxidantes. (Grupo 1= control, grupo 2= Tx 25<math>\mu</math>M, grupo 3= Tx 50<math>\mu</math>M)</i>	38
<i>Gráfica 5. Se muestra la relación de espermatozoides vivos y muertos, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionado al diluyente con diferentes concentraciones de antioxidantes</i>	39

## Resumen

La criopreservación del semen es una de las técnicas de reproducción más utilizadas, esta técnica a pesar de tener ventajas puede causar efectos adversos sobre la supervivencia de los espermatozoides. Durante el proceso de congelación-descongelación del semen se producen diversas Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), las cuales presentan efectos nocivos para el espermatozoide, estos son agentes oxidantes altamente reactivos que se generan en diferentes compartimentos, pero se considera a la mitocondria como la fuente más importante en su producción. El estrés oxidativo resulta de una producción excesiva de EROs y de su eliminación inadecuada por el sistema de defensa antioxidante. El objetivo del presente estudio fue evaluar la adición de diferentes concentraciones del antioxidante dirigido a mitocondrias MitoTEMPO® en un diluyente comercial sin yema de huevo; para lo cual se midió la producción de EROs y ATP postdescongelación por fluorescencia, así como la viabilidad espermática e integridad de la membrana y el acrosoma al descongelado, por medio de las tinciones de eosina-nigrosina e hiposmótica con azul de Coomassie (HOST/Commassie) en los espermatozoides de bovino criopreservados en medio comercial [AndroMed®]. Se emplearon 3 toros sanos de la raza Brangus de los cuales se obtuvieron y evaluaron 3 muestras de eyaculado por cada toro, los eyaculados se dividieron para su congelación en 3 grupos: Grupo 1 control, Grupo 2 con 25 mM y Grupo 3 con 50 mM, las diferentes concentraciones del antioxidante se agregaron al momento del empajillado. Al descongelado se realizó la evaluación de la motilidad, y las tinciones de eosina-nigrosina y HOST/Coomassie en los espermatozoides de bovino. Se empleó ANOVA de una vía (prueba de comparación múltiple de Tukey's) para comparar las medias de motilidad, vivos vs muertos, funcionalidad de la membrana e integridad del acrosoma en los espermatozoides entre los tratamientos, usando GraphPad Prism Versión 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Con un valor de  $P \leq 0.05$ . Los resultados obtenidos, muestran una mejora de la motilidad en los espermatozoides criopreservados con la concentración de 50  $\mu\text{M}$  en comparación con los de 25  $\mu\text{M}$  (81.6% vs 76.6%), en cuanto a la viabilidad espermática e integridad acrosomal, se observó una mayor respuesta positiva a la prueba HOST en el grupo 2: 95.92 % en comparación con el grupo 1: 94.33% y 3 92.71%. La presencia o ausencia del acrosoma en los espermatozoides se evaluó con la tinción de azul de Coomassie, el grupo adicionado con 25  $\mu\text{M}$  tuvo un marcado aumento en el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto 58.88% en comparación con el grupo control 36.21% y el grupo con 50 mM 36.34%. No existió diferencia estadística entre los tres grupos en los resultados por la tinción de eosina-nigrosina. En cuanto a la producción de EROs y ATP no se encontró una diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio, en cuanto a su producción ( $P \leq 0.05$ ).

## Introducción

En México, según la secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), al año 2020 se tiene una población de 35,653,619 cabezas de bovinos productores de carne y leche, lo que significa un crecimiento de la población del 8.5% desde el 2015 (SADER, 2021). Con este desarrollo, es importante incorporar tecnologías y conocimientos que ayuden a que haya una mayor producción de estos (INIFAP, 2009 ).

Las biotecnologías tienen una gran importancia, ya que ofrecen la posibilidad de desarrollar productos de calidad superior, aumentando y mejorando la productividad de los hatos. La manipulación reproductiva es una herramienta usada por el hombre con el propósito de intensificar la producción animal, incluyendo técnicas sencillas y tradicionales hasta la más moderna biotecnología (Ojeda et al., 2021).

La creciente demanda de alimentos de origen animal ha masificado la cría de ganado en países en vías de desarrollo y caracterizados por la intensificación de los sistemas de producción animal, provocando la introducción de razas bovinas de alto potencial productivo. A pesar de la contribución que hace la intensificación de la ganadería a la oferta de alimentos, crece la preocupación por la pérdida de los recursos zoogenéticos, considerados necesarios para satisfacer las necesidades humanas (Parra et al., 2020).

Actualmente, los adelantos biotecnológicos proponen mejorar los niveles productivos de una empresa ganadera, mejorando la productividad de carne y leche por medio de los cruzamientos, esto a partir de la inseminación artificial (Marizancén et al., 2017).

La biotecnología ingresa a cada vez más ramas de la ciencia. La inseminación en reproducción es algo que difícilmente puede reemplazarse, al menos por ahora, pues ha demostrado ser la herramienta más exitosa para la mejora genética de muchos animales de interés zootécnico y en especial de la industria bovina (Calle, 2020).

Dentro de los campos de la reproducción animal, existen detalles responsables del éxito o fracaso de los protocolos reproductivos, de ellas nace la necesidad de investigar y buscar nuevas alternativas de producción y procesamiento seminal para asegurar que este llegue en las mejores condiciones posibles a los productores (Barragán et al., 2022).

Durante el proceso de congelación-descongelación del semen se producen diversas especies reactivas de oxígeno (EROs) las cuales presentan efectos nocivos para el espermatozoide, esto a pesar que el plasma seminal y los espermatozoides presentan un sistema antioxidante que le ayuda a atenuar el daño del estrés oxidativo, desafortunadamente, este sistema presenta una pobre protección antioxidante debido a que el espermatozoide posee una pequeña porción citoplasmática que contiene antioxidantes (Valdez, 2017).

Las EROs causan daño a las proteínas, lípidos y ADN alterando así la función mitocondrial. Existen una serie de defensas antioxidantes para interceptar las EROs y minimizar así el daño oxidativo, pero la producción excesiva de EROs o la alteración de las defensas antioxidantes conduce a un daño oxidativo. Este daño oxidativo mitocondrial se puede disminuir con beneficios significativos si se aumentara la capacidad antioxidante del compartimento mitocondrial (Murphy et al., 2007).

### Inseminación artificial

El interés práctico de este método de reproducción se refleja en la mejora de la calidad, así como en la erradicación de las enfermedades venéreas (Macías, 1978) ayudando así a reducir situaciones de intensa actividad y estrés (transporte, cambios de ambiente y alimentación, etc.) que en muchas ocasiones afectan la calidad seminal (Hernández, 2019).

La inseminación artificial (IA), fue la primera biotecnología reproductiva aplicada para mejorar la producción a través del uso más eficiente de toros de alto mérito genético (Rosete et al., 2021), su constante nivel de progreso genético en el ganado lechero en países desarrollados ha estado determinado, además de la selección, por el avance en la tecnología de la IA (Giraldo, 2007).

Con los avances en esta técnica, es innegable la relevancia de la inseminación artificial en el mejoramiento de los parámetros reproductivo y productivos de la ganadería a nivel mundial y nacional (Giraldo, 2007).

### La célula espermática.

El espermatozoide es una célula especializada cuya función biológica es fecundar al ovocito y transmitir su contenido genético. Se trata de una célula haploide, producto final de un proceso de división y diferenciación denominado espermatogénesis en donde además de reducir el contenido genético se generan estructuras como el acrosoma y el flagelo (Ford, 2022).

La célula espermática madura ha sido dividida en tres regiones para su estudio:

#### La cabeza.

Consiste de un núcleo condensado, la teca perinuclear y el acrosoma. El núcleo contiene el material genético en forma de cromatina condensada, en la zona anterior, se encuentra el acrosoma, esta vesícula se origina del complejo de Golgi y contiene enzimas hidrolíticas esenciales para que el espermatozoide consiga penetrar las capas del ovocito y se logre la fecundación (Ford, 2022). Su forma es característica de cada especie (Fig. 1), siendo en los bovinos en forma de bate de béisbol (Lizarazo, 2016).

#### El cuello

Es la sección que une la cabeza con el flagelo. Se extiende entre la cabeza y la pieza media del flagelo (Fig.1), en su región anterior recibe el nombre de capitolio y se une a la placa basal del núcleo por una serie de filamentos finos, en su extremo caudal, la pieza de conexión está compuesta por nueve columnas estriadas o segmentadas (Martínez, 2003).

#### El flagelo.

contiene el axonema, las mitocondrias y otros elementos estructurales responsables del movimiento de la célula (Fig.1). Esta porción se subdivide en tres segmentos, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal (Martínez, 2003).

Durante la espermatogénesis las mitocondrias que se encuentran originariamente en el citoplasma periférico, migran y se acumulan alrededor de la porción proximal del filamento axial (pieza intermedia), estas se disponen, en un número variable según la especie, formando una vaina compacta en donde las mitocondrias permanecen unidas mediante puentes disulfuro (Ford, 2022).

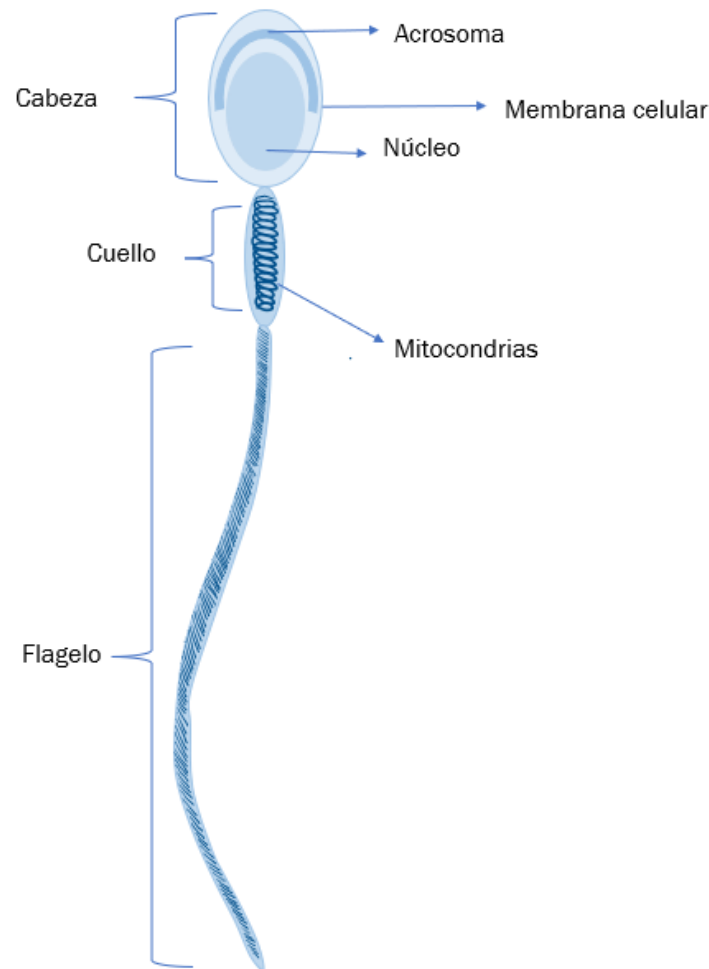


Figura 1. Esquema de la estructura del espermatozoide bovino. Modificado de (Vera, 2008) [http://www.avpa.ula.ve/libro\\_desarrollosost/pdf/capitulo\\_40.pdf](http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_40.pdf)

## Fisiología mitocondrial

Las mitocondrias, desempeñan funciones que son vitales para las células, suministrando energía en forma de Adenosín trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa, proporcionan intermediarios metabólicos para la biosíntesis de macromoléculas, señalizan en la vía de apoptosis, almacenan calcio y producen EROs (Ford, 2022).

Las mitocondrias se ubican en la pieza intermedia espermática de los mamíferos y la fosforilación oxidativa produce más ATP por molécula de glucosa que la glucólisis, la respiración ha sido históricamente considerada como la fuente principal de producción de ATP para la motilidad espermática (Ford, 2022). Este ATP es utilizado, en su mayoría, para sostener energéticamente la motilidad, que es esencial para la fertilización (Fernández et al., 2014).

Se ha reportado que la mitocondria juega un papel importante en la producción de energía y el mantenimiento del estado redox del espermatozoide de bovino criopreservados, su funcionamiento depende de la integridad de sus membranas y del acoplamiento de la fosforilación oxidativa y el transporte de electrones hacia el oxígeno, para que puedan proveer energía a la célula (Fernández et al., 2014).

## Cadena respiratoria

La mitocondria genera la mayor parte de la energía de las células animales, esto ocurre principalmente durante la fosforilación oxidativa, proceso en que los electrones pasan por una serie de moléculas transportadoras (Fig.2) de electrones dispuestas en complejos enzimáticos llamada cadena de electrones (Ford, 2022).

La fosforilación oxidativa resulta del acoplamiento entre dos procesos, primero la cadena respiratoria (Espinoza et al., 2014). Esta cadena está formada por cuatro complejos respiratorios, dispuestos en la bicapa lipídica de la membrana interna mitocondrial, y dos tipos de transportadores de electrones (ubiquinona y citocromo C) (Konigsberg, 2008). La cadena, está organizada de tal forma en que los electrones, cuando pasan de una proteína a otra van perdiendo energía potencial hasta llegar a un aceptor final de electrones (Álvarez et al., 2021).

Los electrones arrastran protones y 3 de los complejos respiratorios (I, III y IV) aprovechan la liberación de energía de las óxido-reducciones catalizadas para bombear los protones al espacio intermembrana y así almacenar la energía en forma de un gradiente de protones, estos fluyen de regreso al interior mitocondrial a través de la ATP sintetasa o complejo V liberando la energía que se usa para sintetizar ATP (Espinoza et al., 2014).

La cadena de transporte de electrones mitocondrial vincula la transferencia de electrones desde los cofactores reducidos hasta el último aceptor de electrones (el oxígeno) con el transporte simultáneo de protones desde la matriz mitocondrial a través de la membrana mitocondrial interna y hacia el espacio intermembranas (Gruber et al., 2013).

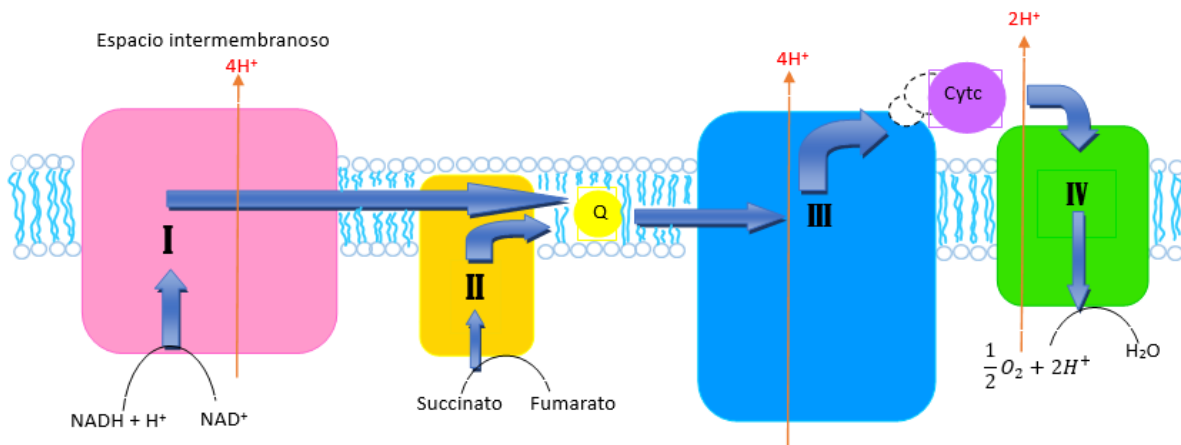


Figura 2: Esquema de la cadena respiratoria. Modificado de (Tsukino, 2009).



## MARCO TEÓRICO

### Especies Reactivas de oxígeno.

Una molécula esencial para todos los organismos aerobios es el oxígeno, dado que es el principal recurso de energía adquirido del metabolismo oxidativo. Sin embargo, el consumo de oxígeno genera diversos derivados, formas activas de metabolitos del oxígeno y moléculas peroxidadas, todas ellas conocidas como EROs (Arenas et al., 2013).

Las EROs son agentes oxidantes altamente reactivos y forman parte de una clase de moléculas conocidas como radicales libres (RL). Los RL son cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados, generados fisiológicamente por una transferencia de un electrón durante el metabolismo celular, por ejemplo, en los procesos que generan energía en la mitocondria (Tortolero, 2005).

A pesar de que los radicales libres se generan en diferentes compartimientos celulares y por múltiples enzimas, la producción de Especies Reactivas de Oxígeno mitocondriales se considera la fuente más importante de radicales libres, la razón es que el principal generador de radicales libres, la cadena de transporte de electrones se encuentra en la membrana mitocondrial interna (Martín et al., 2018).

El termino EROs se refiere a un grupo de moléculas que contienen oxígeno con diferente reactividad química. La mayoría de los EROs son producidos a nivel mitocondrial, por ejemplo, los radicales superóxidos son producidos en los complejos I y III, mediante una transferencia de oxígeno molecular. Estos EROs son los principales producidos y dan origen a los demás de importancia (Carvajal, 2019) Por ejemplo:

El radical hidroxilo (-OH), el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el ácido hipocloroso (HOCl), estas EROs tendrán una acción diferente sobre la célula, lo que determina su nivel de reactividad y daño (Zuluaga et al., 2012).

En el caso de los espermatozoides bovinos, niveles adecuados de EROs son importantes para su funcionamiento normal, estos sufren procesos controlados de

óxido reducción durante: la hiperactivación, la capacitación y la reacción acrosómica (Tortolero, 2005).

Para que exista un daño a la célula, los radicales libres deben efectuar al menos tres pasos:

- **Iniciación:** Producción inicial de los radicales libres, ya sea por alteraciones internas de la célula o por elementos externos a ella.
- **Propagación:** los radicales libres producen otros radicales y estos a su vez atacan otras moléculas, diseminando el daño a través de la célula.
- **Terminación:** una vez que las reacciones terminan y se han producido metabolitos secundarios que la célula no puede utilizar son eliminados (Gutiérrez, 2006).

## Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ocurre como resultado de desequilibrios inevitables entre oxidantes y antioxidantes en un sistema dado. Los espermatozoides son más propensos al daño oxidativo ya que los componentes antioxidantes del citoplasma son menores o se eliminan durante etapas de la diferenciación y en segundo lugar el semen es diluido para la criopreservación, lo que conduce a la dilución de los antioxidantes presentes en el plasma seminal durante el proceso de criopreservación (Kumar et al, 2022).

La producción excesiva de Especies Reactivas de Oxígeno, radicales libres y su eliminación inadecuada por parte del sistema de defensa antioxidante puede provocar estrés oxidativo celular (Shetty et al., 2013), produciendo un daño generalizado que afecta los procesos metabólicos de la célula y que, de mantenerse por mucho tiempo, pueden provocarle un daño irreparable y consecuentemente, la muerte (Gutiérrez, 2006).

## Criopreservación

La criopreservación del semen, es una de las técnicas de reproducción más utilizadas, cuyo fin es el almacenamiento indefinido por medio de congelación y así mantener la vida fértil de los espermatozoides (Moncayo, 2016)

La criopreservación del semen implica varios pasos generales, de los cuales la dilución, la crioprotección, el enfriamiento, la congelación, el almacenamiento y la descongelación pueden afectar la estructura y la función del espermatozoide lo que puede conducir a la disminución de la fertilidad (Díaz et al, 2018).

Un requisito indispensable para el desarrollo de esta biotecnología es que el semen utilizado mantenga su capacidad de fertilidad después de haber sido criopreservado y esto solo se logra haciendo valoraciones tanto del semen fresco como descongelado (Calle, 2020).

Esta técnica, a pesar de tener ventajas como la creación de bancos de germoplasma e intercambio genético internacional, entre otras, puede causar efectos sobre la supervivencia de los espermatozoides (Stornelli et al., 2005). Esto se debe al shock térmico, velocidad de congelación, constitución de los diluyentes y estrés osmótico, así como al método utilizado en la congelación y descongelación (Jiménez et al., 2011).

Debido a esto, es inevitable que se presente pérdida de la viabilidad del espermatozoide, por lo que se han tenido que desarrollar técnicas que permitan amortiguar los efectos negativos de la criopreservación, con la finalidad de que el espermatozoide mantenga su capacidad para producir energía mediante su metabolismo, mantener la configuración e integridad de la membrana plasmática, retener su motilidad y conservar enzimas (Rivera, 2020).

La criopreservación de espermatozoides, considera estudios relacionados con las técnicas y crioprotectores que se usan para obtener altas tasas de sobrevivencia (González et al., 2009).

Existen evidencias de que durante el proceso de criopreservación se inducen cambios en los espermatozoides similares a los que ocurren en la capacitación fisiológica. (Acosta, 2021).

La reducción de la temperatura por debajo de 37°C induce una serie de alteraciones en las estructuras y funciones de los espermatozoides, es así como, durante el

proceso de congelación y descongelación, el reto de las células espermáticas será mantener la viabilidad (González et al., 2009).

La crio resistencia de los espermatozoides está influenciada por diferentes factores, siendo un componente clave la composición de las membranas celulares en lo que se refiere a constitución lipídica, también se han identificado proteínas relacionadas con una mejor congelabilidad y otras que parecen predisponer a un mayor daño, en toros, se ha mencionado que la exposición durante largo tiempo a las proteínas originadas en las vesículas seminales llamadas Plasma Seminal Bovino (PSB), determinan un flujo de colesterol y fosfolípidos de la membrana del espermatozoide, haciéndola más sensible a los procesos de criopreservación (Santiago et al., 2019).

Durante el procedimiento de criopreservación, se inducen cambios en los espermatozoides, similares a los que ocurren en la capacitación fisiológica a los que se les conoce como “criocapacitación” que se asocia a la baja fertilidad encontrada en las inseminaciones en semen descongelado (González et al., 2009).

### Capacitación espermática in vivo.

La capacitación espermática se puede definir como el conjunto de modificaciones a nivel molecular que ocurren en el espermatozoide, después de la maduración en el epidídimo y que le confieren la capacidad de fertilizar al ovocito (Matás et al., 2007).

Estos cambios bioquímicos y fisiológicos por los cuales el espermatozoide termina su maduración y supera barreras fisiológicas dentro del tracto reproductor de la hembra, con lo cual se adquiere la capacidad para llevar a cabo los procesos para fecundar el óvulo como la hiperactivación y la reacción acrosomal (Cervantes et al., 2019).

Estos cambios ocurren en el espermatozoide cuando:

- Se han removido factores estabilizantes adquiridos por el espermatozoide al residir en el plasma seminal.
- Inicia el tránsito del espermatozoide a lo largo del tracto reproductivo de la hembra.

- El espermatozoide responde a los ligandos de la zona pelúcida y desencadena una reacción acrosomal (Salazar, 2019).

Entre los cambios que ocurren durante la capacitación, previo a la hiperactivación y reacción acrosómica, se encuentran: alteración de las glicoproteínas de la superficie del espermatozoide, modificaciones de las proteínas y los lípidos de la membrana plasmática al calcio y activación del sistema adenilato ciclasa (Yanagimachi, 1988).

De las modificaciones que sufre la membrana plasmática destaca el reordenamiento de proteínas y lípidos, entre los que el flujo de salida de colesterol es uno de los más importantes dándole fluidez a la membrana, activando los canales de bicarbonato y, posteriormente de calcio. El incremento de estos iones en el citoplasma del espermatozoide estimula a la adenilato-ciclasa, que comienza a producir AMPc a partir de ATP activando a proteínas cinasas dependientes de AMPc (proteínas cinasas A, PKA). Esto provoca que la membrana plasmática y la membrana externa del acrosoma adquieren la capacidad de fusionarse una con otra, esta remodelación permite que el espermatozoide sea capaz de unirse a la zona pelúcida del óvulo y que lleva a cabo la reacción acrosomal (Rodríguez et al, 2019).

### Criocapacitación

Durante los procesos de congelación y descongelación las membranas son sensibles a los cambios de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico.

Los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones en la organización de la membrana plasmática ya que presenta áreas completamente diferentes en cuanto a la disposición de los lípidos y proteínas originando propiedades físicas y funciones distintas en áreas diferentes (González et al., 2009).

Dentro de estos daños se puede observar la fluidez de la membrana y cambios en las concentraciones celulares de iones como es el caso del  $\text{Ca}^{2+}$ , esto contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre la membrana

plasmática y la membrana acrosómica externa parecida a una reacción del acrosoma (González et al., 2009).

De la misma manera, algunos experimentos indican que el proceso de criopreservación aumenta la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática, originando la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) (González et al., 2009). La peroxidación lipídica es considerada uno de los mecanismos claves del daño espermático teniendo como resultado una cascada de cambios degradativos que afectan la organización y función de la membrana del espermatozoide (Tortolero et al., 2005).

Estos inductores físicos y químicos generados durante el proceso de criopreservación activan la enzima NADPH oxidasa, causando la activación del canal Catsper dando como resultado la entrada de calcio, activación de adenilato ciclasa, formación de AMPc y la fosforilación de tirosina dependiente de PKA, conduciendo a una capacitación prematura y cambios reactivos acrosómicos (Kumar et al, 2022).

Estas alteraciones y la reducción de la actividad de la enzima superóxido-dismutasa, serán las responsables de una función espermática defectuosa con disminución de la movilidad y el metabolismo espermático, lo que podría alterar la fertilidad (González et al., 2009).

Por lo tanto, la criopreservación exitosa de espermatozoides, influye en gran medida en los resultados reproductivos de las tecnologías de reproducción asistida (Banihani et al., 2013).

### Diluyentes comerciales.

El éxito de la inseminación depende en gran medida del desarrollo de medios de dilución, cuya función es incrementar el volumen del eyaculado y proteger a los espermatozoides durante la refrigeración y congelación (Robin, 2020).

Se entiende por diluyente la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características

funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Gadea, 2015)

Los diluyentes están compuestos por varias sustancias que cumplen diferentes funciones, como conservar el semen de la criopreservación, regular el pH, elementos nutritivos y antibióticos (Díaz et al., 2018).

En la actualidad existen diversos diluyentes comerciales ya sea a base de yema de huevo o lecitina de soya.

En diversos estudios mencionan el uso de diluyentes como la lecitina de soya en lugar de yema de huevo para evitar la reducción en la motilidad y obtener un mejor resultado postdescongelación, esto por la diferencia en su composición de lípidos y contenido de ácidos grasos. Afectando la interacción de enzimas lipasas presentes en el contenido seminal (Díaz, 2013).

### Andromed ®

Es un diluyente comercial para semen de toros y utilizado también en especies no bovinas. Contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza, y antibióticos. Es libre de componentes de origen animal y al ser un medio transparente las imágenes son claras bajo microscopio (Galarza, 2013).

### Antioxidantes

El sistema antioxidante protege a los tejidos de los efectos de los RL, cualquier deficiencia en el sistema provoca una pérdida de protección de los tejidos frente al ataque de los radicales libres (Tortolero et al., 2005).

Se conocen tres grupos de antioxidantes (Valdez, 2017)

### Antioxidantes primarios

Previenen la formación de nuevos radicales como son la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (Valdez, 2017).

## Antioxidantes secundarios

Capturan radicales libres, evitando reacciones en cadena. Entre estos encontramos a la vitamina E, vitamina C, betacaroteno, ácido úrico y albúmina (Valdez, 2017)

## Antioxidantes terciarios

Reparan las biomoléculas dañadas por los radicales libres, entre estos se encuentran enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Tortolero et al., 2005).

Con niveles altos de antioxidante el semen puede tolerar altos niveles de EROs, mientras que en aquellos sin una adecuada protección antioxidante los espermatozoides pueden sufrir daño (Tortolero et al., 2005).

Los antioxidantes dirigidos a las mitocondrias son una nueva clase de antioxidantes que están diseñados para la acumulación mitocondrial y pueden proteger eficazmente contra el estrés oxidativo mitocondrial (Shetty et al., 2013).

## MitoTEMPO®

En los últimos años, se ha dedicado un esfuerzo considerable a prevenir el daño criogénico de los espermatozoides en el proceso de congelación y descongelación, es por esto por lo que los antioxidantes dirigidos a mitocondrias son muy apreciados por su resistencia eficaz al estrés oxidativo (Zhang et al., 2019). Un enfoque para abordar estos desafíos es dirigir los antioxidantes a las mitocondrias mediante la conjugación con un catión lipofílico como el trifenilfosfonio (TPP) (Murphy et al., 2007).

El trifenilfosfonio (TPP) corresponde a un átomo de fósforo que está cargado positivamente y unido a una gran superficie hidrofóbica que se encuentra dada por la unión de 3 grupos fenilo (Fig. 4), su carga positiva es utilizada para mejorar el ingreso y el aumento de la concentración al interior de la matriz mitocondrial (Castillo, 2021).

Los cationes lipofílicos pueden pasar a través de la membrana plasmática y acumularse en el citosol, impulsados por el potencial de membrana plasmática de



donde pasará a través de la bicapa de fosfolípidos sin requerir un mecanismo de absorción específico (Fig.3), acumulándose dentro de las mitocondrias impulsado por el potencial de membrana mitocondrial (Murphy et al., 2007).

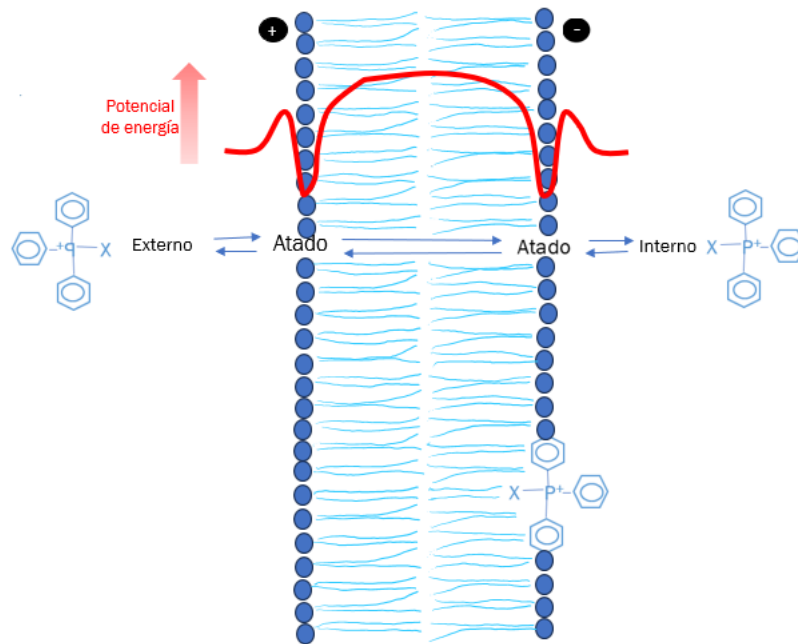


Figura 3. Captacion de molecula de mitoTempo a traves de bicapa de fosfolipidos. Modificado de (Murphy, 2007).

MitoTEMPO® es un compuesto que consta de un catión lipofílico, es decir, un catión trifenilfosfonio que permite a la molécula acumularse casi 500 veces dentro de las mitocondrias, conjugado con un antioxidante dirigido a estas, conocido como nitroxido TEMPOL (Kumar et al., 2022).

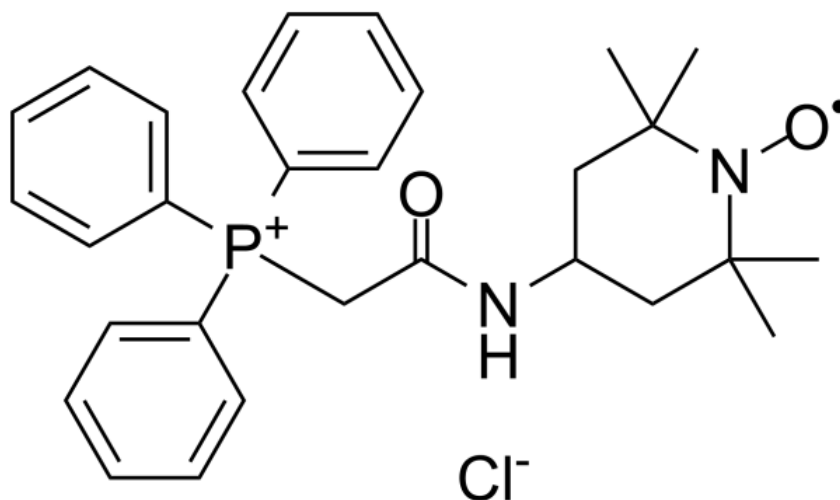


Figura 4. Estructura química de MitoTEMPO. Tomado de MCE <https://www.medchemexpress.com/Mito-TEMPO.html?locale=es-ES>

MitoTEMPO®, es un eliminador de superóxido específico de las mitocondrias que atenúa el daño oxidativo de las células y mejora la calidad del espermatozoide posterior a la descongelación durante la criopreservación del semen (Zhang et al., 2019).

Actúa como un mimético de la enzima superóxido dismutasa (SOD) promoviendo la desintoxicación del ion ferroso al oxidarlo a ion férrico (Fig.5), por lo tanto, dificulta la reacción de Fenton en la que un compuesto pro-radical reacciona con un catalizador que es generalmente un metal para generar los radicales libres (Gutiérrez, 2006) y la formación del radical hidroxilo (OH) en la reacción en cadena oxidativa a nivel mitocondrial (Kumar et al, 2022). Convirtiendo las moléculas tóxicas de superóxido en peróxido de hidrógeno u oxígeno y, posteriormente se desintoxica en oxígeno y agua mediante catalasa o glutatión peroxidasa (Mukem et al., 2021).

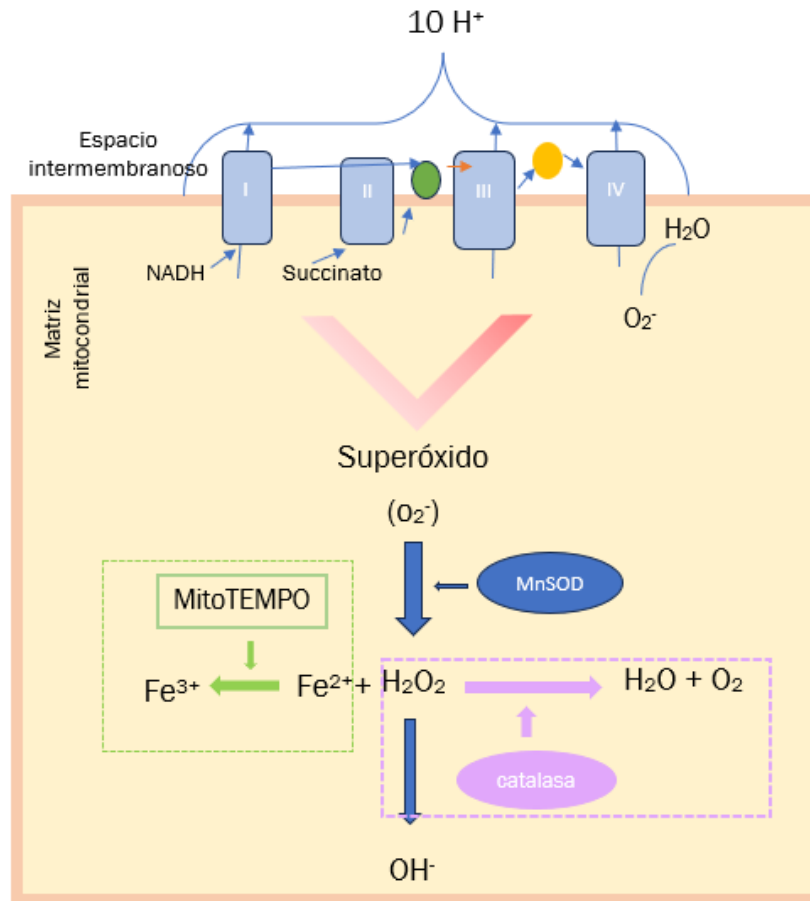


Figura 5. Mecanismo de acción de mito-Tempo. Modificado de (Murphy et al, 2007).

## Justificación

A pesar de que se ha estudiado el comportamiento de algunos antioxidantes, hay pocos estudios sobre la incorporación de MitoTEMPO® como antioxidante dirigido a mitocondrias en la criopreservación del semen, por lo que el estudio y evaluación del efecto de la adición de este tipo de antioxidantes a los medios de criopreservación sin yema de huevo podrá ser de beneficio a la industria de la inseminación artificial mejorando la capacidad fertilizante del espermatozoide bovino.

## Objetivos

### General

- ✎ Evaluar la adición del antioxidante MitoTEMPO a diferentes concentraciones sobre la producción de ATP y EROs, así como la integridad de los espermatozoides de bovino criopreservados.

### Particulares:

- ✎ Evaluar la estructura espermática de espermatozoides congelados-descongelados en un diluyente sin yema de huevo, mediante tinciones de viabilidad y morfológicas.
- ✎ Medir la producción de ATP y EROs de los espermatozoides criopreservados en un diluyente sin yema de huevo, mediante espectrometría.

## Hipótesis

La adición del antioxidante MitoTEMPO al diluyente comercial sin yema de huevo mejorará la integridad y la producción de ATP y EROs de los espermatozoides de bovino criopreservados.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Se trabajó con tres toros sanos de la raza Brangus, pertenecientes al rancho “La sábila” en Moyotepec municipio de plan de Ayala, Estado de Morelos, de los que se obtuvieron 3 eyaculados por cada uno en el mes de agosto.

### Obtención de semen.

Los eyaculados se obtuvieron mediante vagina artificial, y se llevaron al área destinada para su evaluación y congelación, se mantuvieron en baño maría a una temperatura de 37°C hasta su utilización.

## Análisis del semen

Una vez en el área de análisis se procedió a realizar la evaluación del semen previo a la congelación.

Se realizó la evaluación macroscópica (volumen, color, aspecto) y evaluación microscópica (motilidad, concentración espermática, movimiento en masa e individual y morfología). Para la evaluación de la viabilidad espermática se realizó la tinción eosina- nigrosina (Mejía et al., 2021).

## Evaluación de la motilidad

Motilidad progresiva.

Las muestras se ajustaron a una concentración de 20 millones de células.

Se colocó una gota sobre un portaobjetos precalentado a 37°C, posteriormente se cubrió con un cubreobjetos y se procedió a observarla en el microscopio óptico con el objetivo de 40X (Mejía et al., 2021).

Se determinó con base a la proporción de espermatozoides según el movimiento rectilíneo uniforme progresivo a lo que se le otorgó un valor porcentual de 0 a 100% (Mejía et al., 2021).

Para este estudio sólo se emplearon aquellos eyaculados con un valor del 80% de motilidad progresiva y menos del 20% de morfoanormalías.

## Evaluación de la concentración espermática.

Se calculó la concentración espermática (Mejía et al., 2021), por conteo en el hematocitómetro (cámara de Neubauer) y aplicando la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned} & \text{No. espermatozoides} \times 21 \times 10,000 \times 5 \\ & = \text{Concentración de espermatozoides por ml} \end{aligned}$$

Donde:

- 21 es el factor de dilución (25 µl de semen diluido en 500ul de tritón X-100 al 0.1% diluido en PBS).
- 10,000 está dado por la dimensión de la cámara
- 5 es el número de cuadros contabilizados.

La determinación de espermatozoides anormales se realizó con un aumento de 100X

## Tinción eosina-nigrosina (viabilidad)

Posterior a la cuantificación de la concentración, se procedió a realizar la tinción de eosina-nigrosina la cual permite evaluar la viabilidad expresada en porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. En una laminilla se colocó 5µl de la muestra de semen y 2.5µl del colorante, se mezclan y se procede a realizar un frotis, el cual se deja secar para su posterior observación al microscopio (Mejía et al, 2021).

Una vez realizada la evaluación de la tinción únicamente se emplearon aquellos eyaculados con un 90% de espermatozoides vivos.

## Congelación del semen

Las muestras se dividieron en 3 grupos: Grupo 1 Sin antioxidante, Grupo 2 con 25 µM y Grupo 3 con 50 µM de MitoTEMPO®, el antioxidante se agregó directamente al diluyente antes del empajillado. Se obtuvo un total de 120 pajillas por eyaculado, que se dividieron entre los 3 grupos de este estudio.

El proceso de congelación se realizó según el protocolo para el diluyente comercial sin yema de huevo andromed® (empleando agua MiliQ), en pajillas de 0.25 ml a una concentración de  $20 \times 10^6$  células/ml de espermatozoides. Se dejaron en un periodo de equilibrio durante 4 horas a 4°C, después de este tiempo se expusieron las pajillas a vapores de nitrógeno durante 10 minutos, pasado este tiempo, las pajillas se sumergieron en el nitrógeno líquido para después ser almacenadas en globets y canastillas marcadas según el grupo y se almacenaron en el tanque de nitrógeno líquido a -196°C.

## Descongelación

La descongelación se hizo exponiendo las pajillas a temperatura ambiente por 10 segundos y después en baño maría a 37°C por 30 segundos.

Al descongelado se realizó la evaluación de la viabilidad espermática y análisis de la integridad acrosomal mediante tinciones no fluorescentes de eosina-nigrosina y la prueba hipo-osmótica (HOST por sus siglas en inglés) en combinación con azul brillante de coomassie (Mejía et al., 2021).

Para el análisis de la actividad mitocondrial se midió la producción de ATP y EROs por espectrofotometría.

## Evaluación de la actividad mitocondrial.

### *EROs*

Las especies reactivas de oxígeno se midieron en espermatozoides al descongelado utilizando el Amplex Red (Invitrogen, Molecular probes). La mezcla de reacción se realizó con 0.5 mg de proteína/mL en 0.6 mM de manitol, 5 mM de MES (pH 6.8), 0.1 M de KCl, 0.5 mM de MgCl y 2 mL/mL de etanol y se incubó con oligomicina durante 5 min. A continuación, se utilizó fosfato 0.4 mM con ADP 1 mM o 2mM, o 600mM de EGTA o 600mM de  $Ca^{2+}$  o 4 mM con 1 mM de ATP o 2mM de ATP o 600 mM de EGTA o 600mM de  $Ca^{2+}$ , en ambos casos se utilizaron muestras solo incubadas con fosfato (Guerrero et al., 2012).

Después de 1 minuto, la mezcla de reacción de 80µl (50µg) se colocó en una microplaca de 96 pocillos con una solución de trabajo de 20µl (µM 10 M de rojo

Amplex, 0.2 unidades/mL de peroxidasa de rábano picante y 0.2 unidades/mL de superóxido dismutasa en 250 mM de fosfato sódico con pH 7.4), el volumen fue de 100µl (Guerrero et al., 2012).

## ATP

El ATP intracelular se midió utilizando el Kit de Ensayo de Bioluminiscencia de ATP CLS II (Roche); este kit especialmente optimizado para el uso de luminómetros, exhibe una señal de luz constante que se mantiene durante varios minutos. Para calcular la concentración de ATP intracelular, se preparó una curva de calibración de ATP en fresco, tal y como lo indica el fabricante del kit de Bioluminiscencia de ATP y utilizando el reactivo de luciferasa liofilizado (De Luca et al., 1978). El procedimiento fue el siguiente:

Se tomaron  $8 \times 10^6$  células /mL y se resuspendieron en 100 mM tris-HCl pH 7.8 y 4 mM EDTA. Las células se sumergieron en agua hirviendo durante 2 minutos y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 14,120 rpm en centrífuga BenchMarck MC- 12. los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar la concentración de ATP endógeno; se añadieron a la reacción en la microplaca. Después se añadió el reactivo de luciferasa a las muestras y a los estándares (Mendoza et al., 2018).

La fluorescencia tanto para EROs como ATP (el contenido de ATP se informará en nM) se midió en un detector POLARstar Omega (BGM LABTECH, offenburg, Alemania) ajustado a 571 y 585 nM. La fluorescencia se detectó después de 30 minutos y los resultados se interpolaron con una curva de calibración. Los resultados se normalizaron con su control sin efector y se informaron como 100% (Mendoza et al., 2018).

Evaluación de la viabilidad espermática e integridad acrosomal.

### *Prueba hipo-osmotica en combinación con azul de coomassie*

Las muestras se ajustaron a una concentración de  $35 \times 10^6$  espermatozoides/ml y fueron lavadas por centrifugación con SSF para retirar el diluyente a 2,500 rpm por 3 min. Se realizó un frotis testigo con 100µl de semen más 100 µl de



paraformaldehído al 4% por 10 min a temperatura ambiente, se lavaron 2 veces con PBS a 2500 rpm por 3 min, se reconstituyeron en 100 µl de cloruro de amonio, se realizó el frotis y se dejó secar al aire. Para el frotis prueba se tomaron 100µl de semen más 100µl de solución hipo-osmótica (50µl de citrato de sodio al 1.46% y 50µl de fructosa al 2.7%) y se incubaron por 60 min a 37°C, se adicionaron 200µl de paraformaldehído al 4% por 10 min, las muestras se lavaron 2 veces con PBS y se reconstituyeron en 100µl de cloruro de amonio, finalmente para realizar el frotis con 20µl y se dejó secar el aire. Ambos frotis se tiñeron por inmersión en azul brillante de coomassie de 10 a 15 min a temperatura ambiente posteriormente fueron sumergidos en un vaso copplin con agua destilada para remover el exceso de colorante, una vez secas se observaron al microscopio (Mejía et al., 2021).

### Interpretación de la prueba HOST en combinación con azul de coomassie.

La prueba HOST se considera positiva (Fig. 6A) cuando los flagelos se encuentran doblados, enrollados en ovillo o en látigo esto debido a que el espermatozoide intenta revertir el desequilibrio entre el medio interno y el externo provocado por la solución hipotónica, denotando que la membrana es funcional. En cambio, cuando el flagelo de los espermatozoides está recto, la prueba se considerará negativa (Fig. 6B) y por lo tanto la membrana ha sufrido algún daño (Mejía et al., 2021).

La tinción azul de coomassie nos permite evaluar la presencia o ausencia del acrosoma al marcar las proteínas de esta estructura. Si se observa el acrosoma teñido de color azul intenso y bien definido en la parte apical se considera el acrosoma intacto (Fig. 6C), si se observa la cabeza de un color celeste o sin definición (Fig. 6D) y/o pérdida de continuidad, se interpreta como ausencia de acrosoma (Mejía et al., 2021).

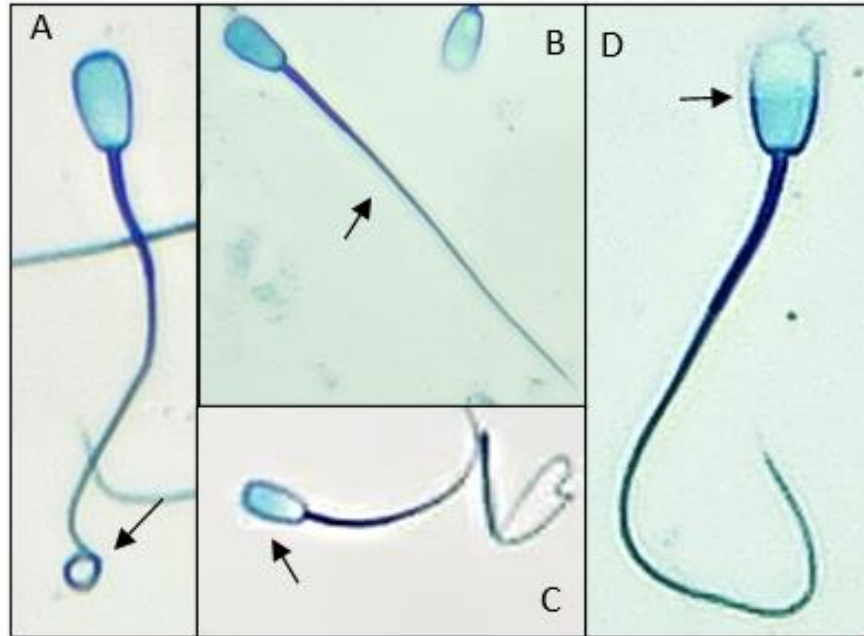


Figura 6. Imágenes de espermatozoides tomadas en microscopio óptico 40X que muestran la interpretación de la prueba HOST en combinación con azul de coomassie. A. Espermatozoide de bovino positivo a HOST, la flecha señala el enrollamiento de la cola. B. Espermatozoide bovino negativo a HOST, la flecha señala la cola que se observa recta. C. Espermatozoide de bovino con presencia de acrosoma, la flecha señala el acrosoma teñido de azul. D. Espermatozoide de bovino con pérdida de acrosoma, la flecha señala la ausencia de coloración. (Foto propia tomada en el Laboratorio 305 OTE del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 2023).

## Eosina-Nigrosina

Después de descongelar las pajillas se procedió a realizar la tinción. Se utilizaron 5µl de semen a los que se les añadió 2.5µl de colorante y se dejó incubar por 5 minutos a 37°C y posteriormente se realizan los frotis en laminillas desengrasadas, se dejan secar al aire y se aplica resina para montar el cubreobjetos para su observación al microscopio (Mejía et al., 2021).

### Interpretación de la tinción eosina-nigrosina.

Los espermatozoides con la membrana intacta no permiten el paso del colorante y por lo tanto no se tiñen (Fig. 7A). Estas células se identificarán como vivas. En cambio, los espermatozoides al presentar daño en la membrana plasmática permiten la incorporación del colorante (Fig.7B), estas células teñidas, se identificarán como muertos (Mejía et al., 2021).

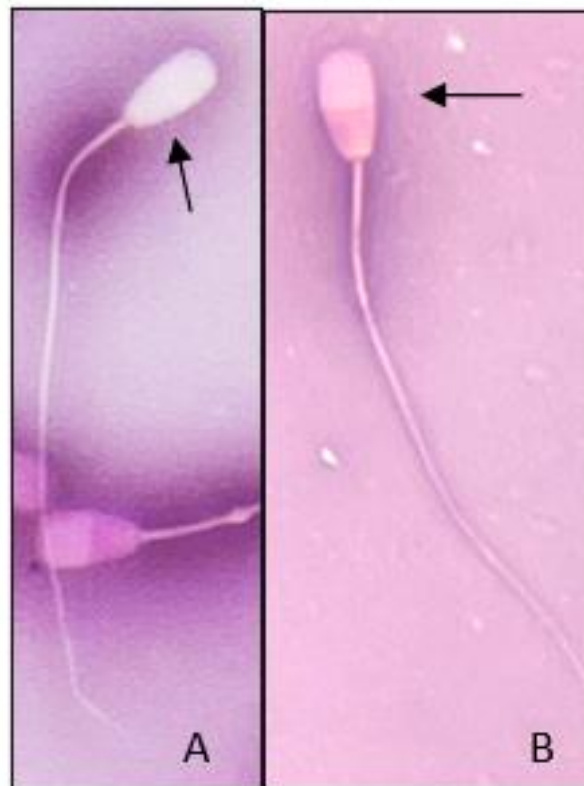


Figura 7. Imágenes de espermatozoides tomadas en microscopio óptico 40X, que muestran la interpretación de la tinción de Eosina-Nigrosina. A. Espermatozoide bovino vivo, la flecha señala la cabeza sin teñir, no presenta coloración. B. Espermatozoide de bovino muerto, la flecha señala el patrón de tinción en matices de color rosas. (Foto propia tomada en el Laboratorio 305 OTE del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 2023).

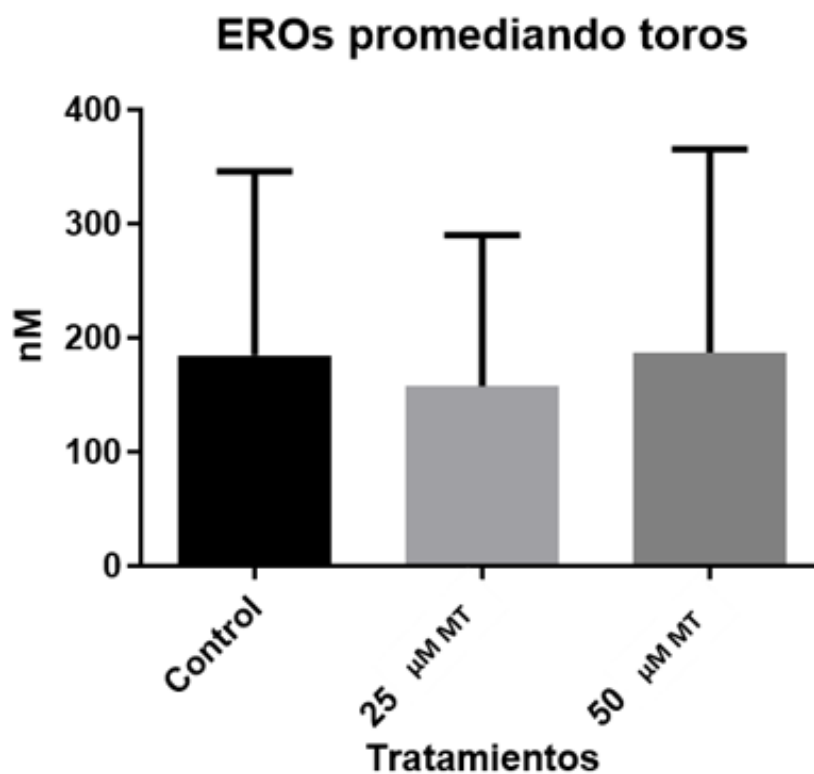
## Análisis estadístico.

Se empleó ANOVA de dos vías (prueba de comparación múltiple Tukey's), para comparar las medias de producción de EROs y ATP entre los tratamientos con 2 concentraciones de MitoTEMPO (MT), el Tx 2 (25 $\mu$ M) y el Tx 3 (50 $\mu$ M) así como la evaluación con tinciones de eosina-nigrosina y coomassie en combinación con la prueba HOST, usando GraphPad Prism Versión 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU) con un valor de  $P \leq 0.05$ .

## Resultados

### Producción de Especies Reactivas de Oxígeno

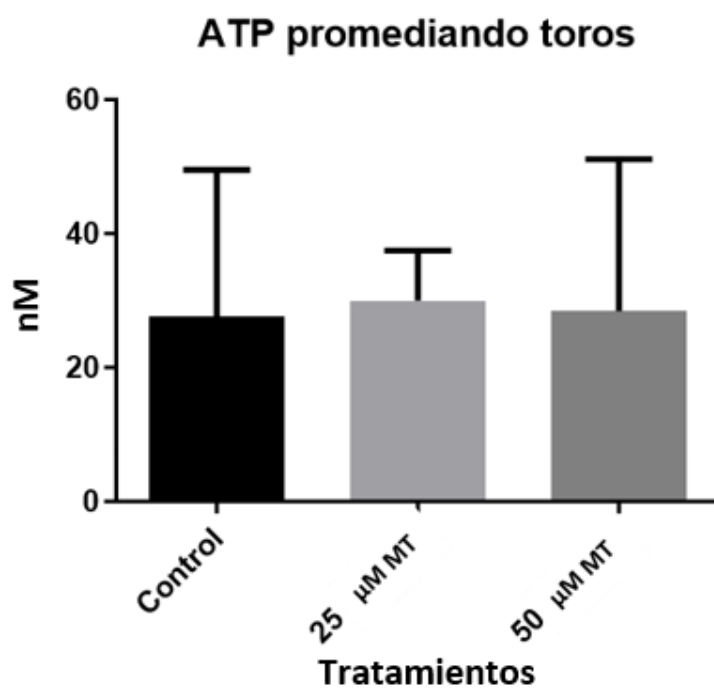
En los resultados obtenidos en cuanto a la producción de EROs (Gráfica 1), no se observó una diferencia estadística (Media $\pm$ SE) entre el grupo control (184.6 nM $\pm$ 53.70) y los grupos adicionados con 25 $\mu$ M (157.6 nM $\pm$ 44.17) y 50 $\mu$ M (187.3 nM $\pm$ 59.36).



Gráfica 1. Donde se observa la producción de EROs (nM) de los espermatozoides bovinos, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones del antioxidante ( $P \leq 0.05$ ).

## Medición ATP

En cuanto a la producción de ATP después de la descongelación, no se observó una diferencia estadística (Media $\pm$ SE) entre los tres grupos, el grupo control (27.62 nM $\pm$ 7.30), grupo 25 $\mu$ M (29.95 nM $\pm$ 2.50), grupo 50 $\mu$ M (28.44 nM $\pm$ 7.55).



Gráfica 2. Se muestra la producción de ATP (nM) de los espermatozoides bovinos, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones de antioxidantes ( $P \leq 0.05$ ).

## Viabilidad espermática e integridad acrosomal

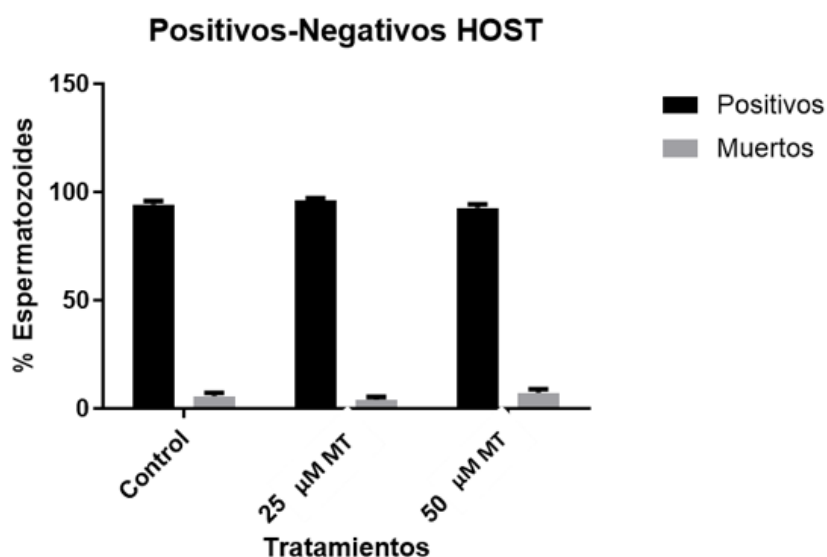
### HOST

Se analizaron los efectos de la suplementación con MitoTEMPO® sobre la viabilidad espermática e integridad acrosomal, encontrando que el porcentaje de espermatozoides con una respuesta positiva a la prueba HOST es significativamente mayor en el grupo 2 (25µM MT) en comparación con el grupo control y el adicionado con 50µM de antioxidante (Tabla1, grafica 3).

Tabla 1. Efecto de la suplementación con MitoTEMPO® a diferentes concentraciones sobre la respuesta espermática a la prueba HOST.

HOST	Grupo 1: sin MT	Grupo 2: 25µM MT	Grupo 3: 50µM MT
Positivo a HOST	94.33±0.92 <sup>a</sup>	95.92±0.92 <sup>a, b</sup>	92.71±0.92 <sup>a, c</sup>
Negativo a HOST	5.664±0.92 <sup>a</sup>	4.080±0.92 <sup>a, b</sup>	7.29±0.92 <sup>a, c</sup>

Los valores se expresan como media ± error estándar. Valores con diferente superíndice indican diferencia significativa entre tratamientos (P≤0.05).



Gráfica 3. Se muestra la relación de espermatozoides positivos y negativos a la prueba HOST, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones de antioxidantes (P≤0.05).

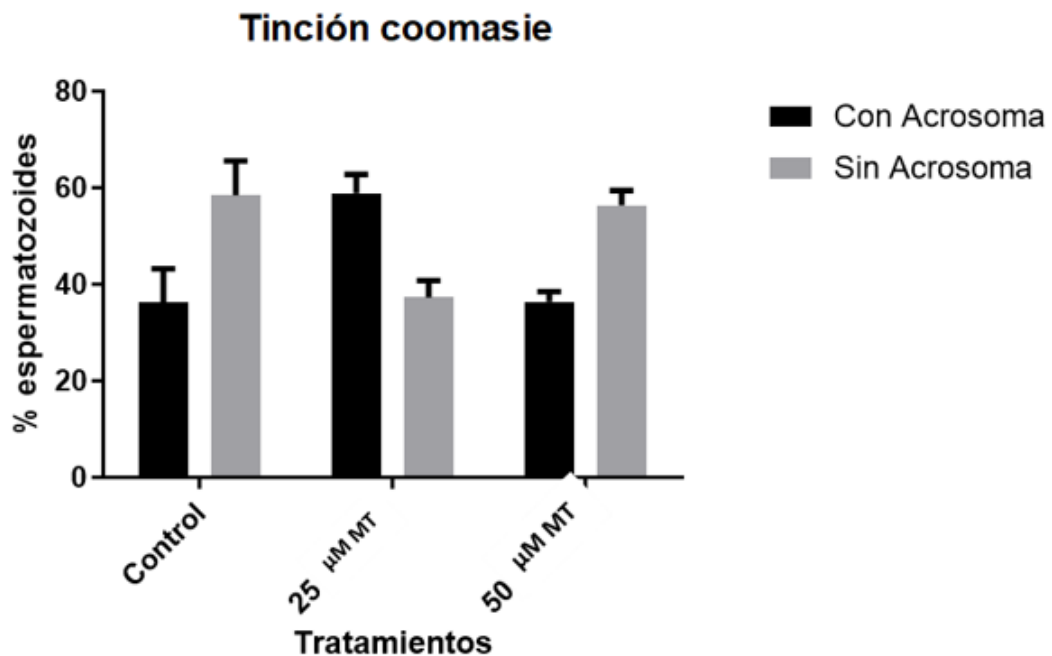
## Tinción azul de coomassie.

La presencia o ausencia del acrosoma en los espermatozoides se evaluó con la tinción de azul de coomassie, los resultados se muestran en la tabla 2. El grupo adicionado con 25µM tiene un mayor porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto (Tabla 2, gráfica. 4).

Tabla 2. Efecto de la suplementación con MitoTEMPO® sobre la integridad acrosomal.

<i>Tinción coomassie</i>	<i>Grupo 1 sin MT</i>	<i>Grupo 2 (25µM) MT</i>	<i>Grupo 3 (50µM) MT</i>
<i>Espermatozoides con acrosoma</i>	36.21±7.53 <sup>a</sup>	58.88±7.53 <sup>b</sup>	36.34±7.53 <sup>a</sup>
<i>Espermatozoides sin acrosoma</i>	58.42±6.71 <sup>a</sup>	37.77±6.71 <sup>b</sup>	37.33±6.71 <sup>a</sup>

Los valores se expresan como media ± error estándar. Valores con diferente superíndice indican diferencia significativa (P≤0.05).



Gráfica 4. Se muestra la relación de espermatozoides con acrosoma y sin acrosoma, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones de antioxidante. (Grupo 1= control, grupo 2= Tx 25µM, grupo 3= Tx 50µM)



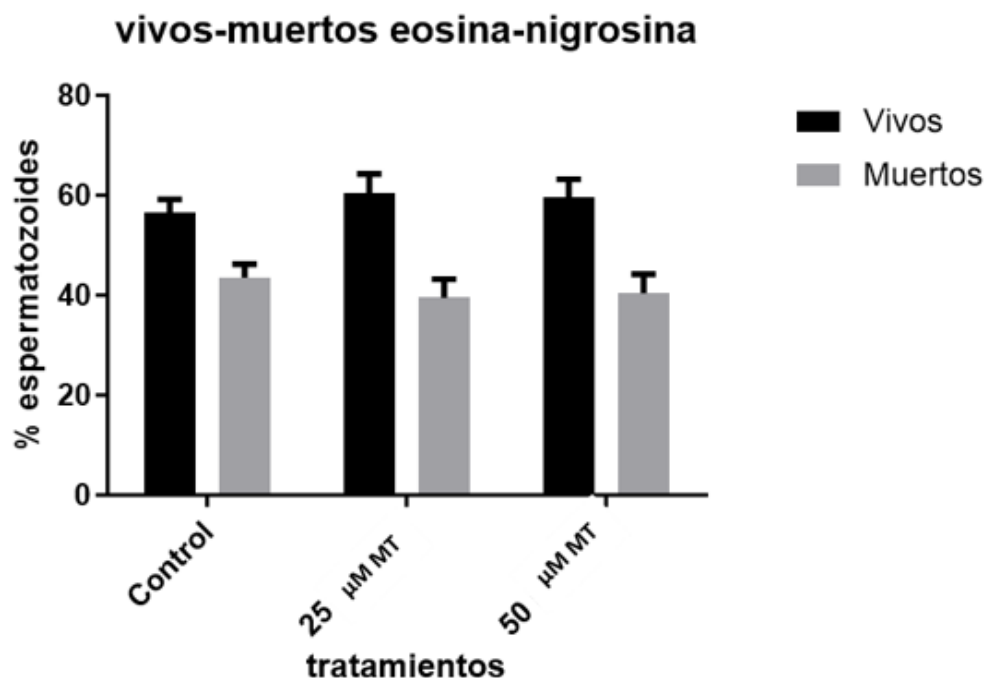
## Tinción eosina-nigrosina.

La integridad de la membrana se evaluó mediante la tinción eosina-nigrosina, en los resultados obtenidos se puede observar que el grupo 2 presentó un mayor porcentaje de espermatozoides vivos en comparación con los otros grupos, sin embargo, no hay diferencia estadística significativa (Tabla 3, grafica 5).

Tabla 3. Efecto de la suplementación sobre la integridad de la membrana espermática.

Tinción eosina-nigrosina	Grupo 1 sin MT	Grupo 2 (25m $\mu$ ) MT	Grupo 3 (50m $\mu$ ) MT
Espermatozoides vivos	56.46 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	60.53 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	59.47 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>
Espermatozoides muertos	43.53 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	39.48 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	40.47 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>

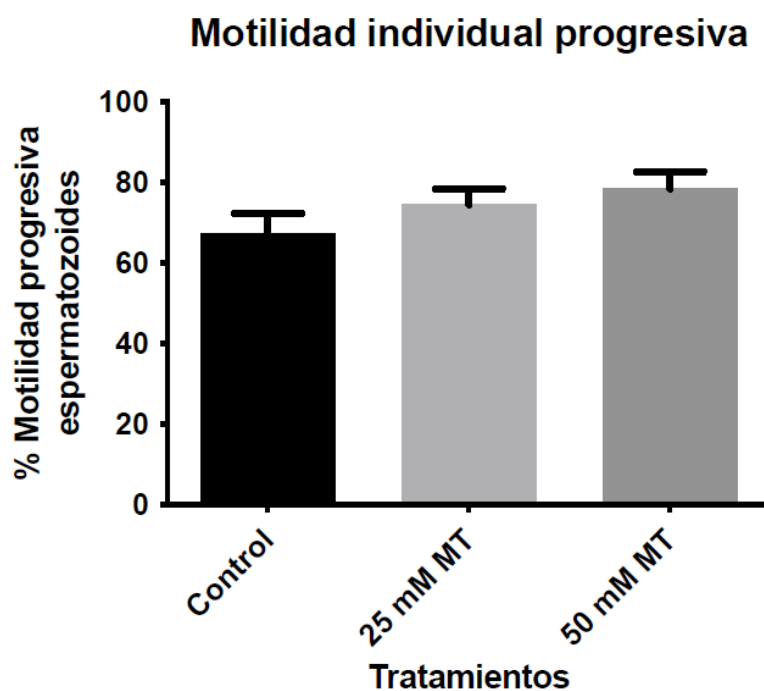
Los valores se expresan como media  $\pm$  error estándar. No hubo diferencia estadística entre tratamientos (P<0.05).



Gráfica 5. Se muestra la relación de espermatozoides vivos y muertos, obtenidos después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones de antioxidantes

## Motilidad.

Se evaluó la motilidad de los espermatozoides al descongelado, se encontró una diferencia estadística entre el grupo control ( $67.22 \pm 1.69$ ) y los grupos adicionados con  $25\mu\text{M}$  ( $74.44 \pm 1.30$ ) y  $50\mu\text{M}$  ( $78.33 \pm 1.44$ ), no existió diferencia estadística entre los grupos adicionados con MitoTEMPO®, denotando una mejora en la motilidad individual progresiva de los espermatozoides a los que se les adicionó el antioxidante.



Gráfica 6. Se muestra el porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides obtenido después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones del antioxidante ( $P \leq 0.05$ ).

## Discusión

Como se ha explicado, durante el proceso de criopreservación del semen se producen diversas EROs, las cuales presentan efectos nocivos para el espermatozoide, por lo que en este trabajo se empleó MitoTEMPO® adicionado al diluyente comercial sin yema de huevo con la finalidad de mejorar características del semen pos-descongelado.

Los resultados de este trabajo, en lo que refiere a la presencia de Especies Reactivas de Oxígeno, no muestran una diferencia estadística significativa en cuanto a su producción entre los grupos. Contrario a lo reportado por Kumar et al. en su trabajo con búfalos del 2022, reportan una reducción de la producción de EROs adicionando MitoTEMPO® en una concentración de 50µM. El presente trabajo es uno de los primeros en hacer mediciones de la producción de EROs en bovinos utilizando esta técnica. La diferencia en la concentración con mejores resultados que ellos reportan puede deberse a que los espermatozoides de búfalo tienen un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, una relación baja de colesterol a fosfolípidos en la membrana plasmática y antioxidantes seminales más bajos en comparación con el semen de toro, lo que se traduciría en una menor necesidad al suplementar el medio con el antioxidante en caso del semen bovino.

A pesar del avance en la criopreservación del semen bovino y los múltiples estudios para mejorar la calidad seminal en esta especie, el estrés oxidativo es un fenómeno inevitable durante este proceso, recientemente nuevos tipos de antioxidantes dirigidos a las mitocondrias han atraído la atención de los investigadores debido a su amplia aplicación, alta eficiencia y baja toxicidad así lo menciona Zhang et al. (2019). Se han realizado diferentes estudios en espermatozoides de otras especies como la ovina en donde Zarei et al. (2020) mencionan que la adición de MitoTEMPO® reduce el estrés oxidativo, así como el daño en las mitocondrias durante los choques térmicos utilizando concentraciones de 5 y 50µM, siendo una forma eficiente de preservar la calidad de semen.

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la función espermática normal y la homeostasis energética, siendo la principal fuente

de ATP necesaria para la motilidad y la fertilidad de los espermatozoides (Kumar et al., 2022), en la célula espermática la mayor parte del ATP producido es utilizado para sostener energéticamente la motilidad además de activar señales necesarias para la función espermática, así, la funcionalidad de la mitocondria va a depender de la integridad de sus membranas (Fernández, 2014).

La necesidad de ATP es fundamentalmente cubierta por la fosforilación oxidativa, la cadena de transporte de electrones es el proceso clave del metabolismo aeróbico y que conduce a la generación primaria de energía y de forma secundaria la generación de EROs, si la actividad mitocondrial es incrementada y/o mantenida en el tiempo se puede constituir un estado estable de generación de radicales libres,

Durante la criopreservación se pueden originar dos tipos de daño a la mitocondria, uno directo sobre su ADN o membrana y uno indirecto provocado por la fragmentación del ADN nuclear lo que podría afectar la producción energética celular (Martínez et al., 2010).

En los resultados obtenidos no se encontró una diferencia sobre la producción de ATP entre los grupos evaluados, Sánchez (2023) hizo un estudio para ver si la producción de ATP podría funcionar como parámetro adicional a la motilidad y viabilidad para determinar la calidad del esperma en el semen de toro, en el estudio descubrieron que el nivel de ATP se ve afectado por el medio de conservación, en parte de una forma independiente de la motilidad y viabilidad, de forma parecida Barbosa et al (2011) no constataron correlación entre motilidad y actividad citotóxica mitocondrial.

Para la evaluación de la viabilidad espermática e integridad acrosomal se recurrió a la prueba HOST, los resultados obtenidos nos muestran que los espermatozoides a los que se les adicionó con 25 $\mu$ M de MitoTEMPO® fueron capaces de compensar el desequilibrio osmótico ocasionado por el medio hiposmótico con mayor eficacia que el grupo control y el grupo con 50 $\mu$ M de antioxidante, reflejándose en cambios morfológicos en los flagelos de los espermatozoides como dilatación y enrollamiento de estos; al combinar esta prueba con la tinción azul de coomassie, se pudo observar el estado acrosomal de los espermatozoides en donde se encontró que el

grupo 2 (25µM) tuvo un mayor número de espermatozoides con presencia de acrosoma, Atuesta (2012) mencionó que el proceso de criopreservación tiene un efecto negativo sobre la viabilidad espermática. El acrosoma es un organelo presente en la zona apical del espermatozoide cuyo papel es importante para el proceso de fecundación (Pérez et al., 2020), razón por la cual solo los espermatozoides que puedan realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito podrán llevar este proceso con éxito (Cox et al., 1998).

Además de estas dos pruebas, se utilizó la tinción eosina-nigrosina con la finalidad de determinar la viabilidad de los espermatozoides, aunque no hubo diferencia estadística entre los grupos, se observó que el semen adicionado con 25µM obtuvo un mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana intacta, es decir, viables.

La integridad de la membrana espermática es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible en varios eventos involucrados en la fecundación como lo son la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión con el ovocito (Rubio et al., 2009). Durante el proceso de congelación-descongelación, el exceso de EROs que se producen debido al estrés oxidativo provoca peroxidación lipídica, ocasionando un ataque a los ácidos grasos poliinsaturados, dando como consecuencia daños estructurales y funcionales a la membrana plasmática de los espermatozoides, estos daños conjugados con los subproductos formados provocan cambios similares a la criocapacitación y pérdida de la integridad del acrosoma (Kumar et al., 2021).

La incorporación de antioxidantes dirigidos a las mitocondrias puede prevenir el daño a la membrana, acción que podemos comprobar en nuestros resultados donde el porcentaje medio de espermatozoides intactos en la membrana fue significativamente mayor en los grupos adicionados con MitoTEMPO® (25µM), previniendo el daño oxidativo debido al estrés por congelación y descongelación. Zarei et al. (2020) explica que MitoTEMPO® además de reducir la producción de

EROs reduce la reacción de peroxidación lipídica, manteniendo así la funcionalidad de la membrana espermática.

Estos resultados difieren con los reportados por Kumar et al. (2021) en donde menciona que la viabilidad, integridad acrosomal y la respuesta HOST mejoraron en semen diluido con 50µM de MitoTEMPO®, la diferencia en la concentración del antioxidante en la que se vieron los mejores resultados puede explicarse por las diferencias entre el semen bovino y semen de búfalo.

Como se vio en los resultados sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides, hay una mejora significativa ( $p \leq 0.05$ ) de los grupos adicionados con MitoTEMPO (25 y 50 µM) en comparación con el grupo control, esto concuerda con los resultados reportados por Valdez (2018) en donde al adicionar antioxidantes naturales observó una mejora en la motilidad progresiva, así como con los resultados obtenidos por Kumar (2021) en donde menciona que al adicionar 50µM de MitoTEMPO a semen de búfalo, hay una mejora en la motilidad progresiva, sin embargo, Foote (2002) no encontró una mejora en la motilidad al adicionar Tempo y Tempol al semen de toro. Con los resultados de este trabajo podemos decir que MitoTEMPO previene la peroxidación lipídica de la membrana, fenómeno que disminuye la flexibilidad del flagelo y por lo tanto el movimiento de la cola, así como al ser un antioxidante dirigido a las mitocondrias y protegerlas de las EROs, la energía producida se mantendrá disponible para que el espermatozoide pueda tener una motilidad progresiva efectiva (Córdova., et al 2022).

## Conclusiones

- La incorporación de antioxidantes dirigidos a las mitocondrias puede prevenir eficazmente el daño de las membranas, como demuestran los resultados obtenidos en este estudio. El grupo suplementado con 25  $\mu$ M del antioxidante mostró un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides viables y con la membrana intacta, así como una mejor presencia del acrosoma, tras el proceso de congelación-descongelación. Esto demuestra la capacidad del antioxidante para prevenir el daño oxidativo causado por el estrés de la congelación y descongelación. En general, estos hallazgos subrayan la importancia de incorporar antioxidantes en los protocolos de criopreservación de esperma para mejorar su calidad y viabilidad.

## Perspectivas

Se propone realizar tinciones complementarias como Mitotraker e Ioduro de propidio y así poder evaluar con más precisión las características funcionales de los espermatozoides.

## Referencias.

1. Acosta-Lobo, M.E. (2021). Evaluación de la integridad y funcionalidad espermática post-descongelación del caballo criollo colombiano mediante el uso de antioxidantes y un inhibidor de la capacitación [Tesis presentada para optar al título de Doctor en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia]. Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias. Medellín, Colombia. Repositorio institucional. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/80273>.
2. Álvarez, D., Becerra, G., Castro, M., Chávez, C., Cumbillo, M., Pacheco, K., Yambay, S. (2021). Cadena de soporte de electrones y fosforilación oxidativa. [https://www.academia.edu/50993871/Cadena de transporte de electrones y fosforilaci%C3%B3n oxidativa Grupo](https://www.academia.edu/50993871/Cadena_de_transporte_de_electrones_y_fosforilaci%C3%B3n_oxidativa_Grupo).
3. Arenas- Ríos, E., Rodríguez-Tobón, A., López- Trinidad, B.P., Retana-Sandoval, F.M., Rodríguez-Tobón, E., Jiménez-Salazar, J.E., León-Galván, M.A. (2013). Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(7): 73-  
<http://www.reibci.org/publicados/2014/diciembre/0700105.pdf>.
4. Atuesta-Bustos, J.E., Grajales-Lombana, H.A., López-Bejar, M. (2012). Evaluación de la integridad de la membrana acrosomal a la inducción física y química de la reacción acrosómica en espermatozoides de conejos línea Caldes. *Spei Domus*, 8(16): 16-28. <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/sp/article/view/843>.
5. Banihani, S., Agarwal, U., Sharma, R., Bayachou, M. (2013). Efecto crioprotector de la L-carnitina sobre la motilidad, vitalidad y oxidación del ADN de los espermatozoides humanos. *Andrology*, 46(6): 637-642. <https://doi.org/10.1111/and.12130>.
6. Barbosa, L.M., Kanazawa, M.Y., Peres, A., Souza, F.F. (2011). Viabilidade do sêmen congelado obtido do epidídimo de touros post-mortem. *Rev Bras Ci Vet* 19: 190-194.



7. Barragán, I., Suárez-Usbeck, A., Condolo, L., Villafuerte, A., Mira, J.M. (2022). Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino. Polo del conocimiento: Revista científico-profesional, 7(7): 1420-1437.
8. Calle-Crespo, C. (2020). Evaluación de semen bovino utilizando medios comerciales de criopreservación, provincia de Morona Santiago, Ecuador. [Trabajo final para optar por el grado académico de Especialista en Reproducción Bovina, Universidad Nacional de Córdoba]. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. <https://iracbiogen.com/wp-content/uploads/2021/06/Evaluacion-de-semen-bovino-utilizando-medios-comerciales-de-criopreservacion-provincia-de-morona-santiago-Ecuador-Calle-Crespo.pdf>.
9. Carvajal-Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: Formación, función y estrés oxidativo. Medicina Legal de Costa Rica, 36 (1): 91-100. [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es).
10. Castillo-Muena, V.I. (2021). Regulación mitocondrial plaquetaria por compuestos bioactivos [Memoria para optar por el grado de Licenciado en Tecnología Médica, Universidad de TALCA Chile], Escuela de Tecnología Médica. <http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/13145/3/2021A000990.pdf>.
11. Cervantes-Ibarra, E., Durán-Monterrosas, L.A., Carballo-Mondragón, E., Kabaly-Ambe, A. (2019). Capacitación espermática: una herramienta para las técnicas de reproducción asistida. Acta Med, 17(1): 34-41. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=89305>
12. Córdova-Izquierdo, A., Espinosa-Cervantes, R., Villa-Mancera, A. (2017). Importancia del estrés oxidativo en los espermatozoides. BM Editores. 208-2014.
13. COX, J.F., FERNANDEZ, P., SARAVIA, F., SANTA MARIA, A. (1988). Utilización de lectina Pisum sativum y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. Archivos de

- Medicina Veterinaria, 30(1): 93-99. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X1998000100010>.
14. De Luca M and McElroy (1978). Purification and properties of firefly luciferase . Methods in Enzymology. 57: 3-15.
  15. Díaz-Duque, N., López-Castaño, P.A. (2018). Protocolos de criopreservación de semen bovino. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias de la Salud. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/4af87dc9-7d24-4bac-95b8-3560ab56f475/content>.
  16. Espinoza-Simón, E., Rosas-Lemus, M., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Álvarez, C., Chiquete-Félix, N., Uribe-Carvajal, S. (2014). Oxígeno, para bien y para mal. Revista de la Facultad de Medicina, 57(6). [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422014000600057](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422014000600057).
  17. Fernández, J.M., Silva-Grigoletto, M., Túnez-Fiñana, I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. Revista Andaluza de Medicina del Deporte, 2(1): 19-34. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-andaluza-medicina-del-deporte-284-articulo-estres-oxidativo-inducido-por-el-13134195>.
  18. Fernández, S., Córdoba, M. (2014). El espermatozoide criopreservado bovino es capaz de modular su requerimiento energético dependiendo de los sustratos oxidativos disponibles para la capacitación inducida in vitro con heparina. InVet, 16(2): 69-78. <http://www.scielo.org.ar/pdf/invet/v16n2/v16n2a03.pdf>.
  19. Foote, R., Brockett, C., Kaproth, M. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. Anim Reprod Sci. 17(1-2): 13-23. DOI: 10.1016/s0378-4320(02)00018-0
  20. Ford, M. (2022). Estudio de la función mitocondrial espermática en mamíferos; un papel central en la capacitación [Tesis de Maestría, Universidad de la República de Uruguay]. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/34950/1/uy24-20545.pdf>.

21. Gadea, J. (2015). Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Portal Veterinaria. <https://www.portalveterinaria.com/porcino/articulos/2736/los-diluyentes-de-inseminacion-artificial-porcina.html>.
22. Galarza, D.A. (2013). Eficacia de dos diluyentes: TRIS + Lecitina de soja (AndroMed®) y Tris + yema de huevo (Triladyl®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador [Tesis de: Magister en Reproducción Animal, Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/526/1/TESIS.pdf>.
23. Giraldo-Giraldo, J.J. (2007). Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. Revista Lasallista de Investigación, 4(1): 51-57. <https://www.redalyc.org/pdf/695/69540108.pdf>.
24. Gonzáles-Figueroa, H., Gonzáles-Molfino, H.M. (2009). Criocapacitación espermática. Biotempo, 9: 50-54.
25. Gruber, J., Fong, S., Chen, C., Yoong, S., Pastorini, G., Schaffer, S., Cheah, I., Halliwell, B. (2013). Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. Biotechnology Advances, 32(5): 563-592. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.005>.
26. Guerrero-Castillo, S.; Cabrera-Orefice, A.; Vázquez-Acevedo, M.; González-Halphen, D.; Uribe-Carvajal, S. During the stationary growth phase, *Yarrowia lipolytica* prevents the overproduction of reactive oxygen species by activating an uncoupled mitochondrial respiratory pathway. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, 1817, 353–362.
27. Gutiérrez-Salinas, J. (2006). ¿Qué sabe usted acerca de... radicales libres? Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 37(4): 69-73. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57937409.pdf>
28. Hernández-Corredor, L., Nivia-Osuna, A., Hernández-Villamizar, D., Rubio-Parada, J. A., & Quintero-Moreno, A. (2013). Evaluación de la motilidad espermática a través del sistema C.A.S.A de semen caprino criopreservado bajo diferentes medios diluyentes. Respuestas, 18(2), 16–27. <https://doi.org/10.22463/0122820X.443>

29. Hernández-Barriga, Y.C. (2019). Crio-preservación y viabilidad espermática de semen de bovinos charoláis post-descongelación con diferentes concentraciones de trehalosa [Tesis para optar por el grado académico de Ingeniera Zootecnista, Escuela Superior Técnica de Chimborazo]. Facultad de Ciencias Pecuarias. Ecuador. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/13316/1/17T01588.pdf>
30. Hu, H., Mes, L. (2016). El MitoTEMPO antioxidante dirigido a las mitocondrias protege la función mitocondrial controla la toxicidad de la beta amiloide en neuronas de ratón cultivadas. Comunicaciones de investigación bioquímica y biofísica., 478(1): 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.071>
31. INIFAP. (2010). Informe Anual de Actividades 2009. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 4. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/396012/Informe\\_Anual\\_de\\_Actividades\\_2009.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/396012/Informe_Anual_de_Actividades_2009.pdf)
32. Jiménez, M.I., Serrano, M.G., Moreno, J.M. (2011). Técnicas de criopreservación seminal. Sociedad Española de Bioquímica clínica y Patología Molecular, 3: 34-39.
33. Konigsber-Buenstein, M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. México, El manual moderno.
34. Kumar, A., Kumar-Gosh, S., Katiyar, R., Eshetu-Gemeda, A., Rautela, R., Bisla, A., Srivastava, N., Kumar-Bhure, S., Lakshmi-Devi, H., Chanda, V. (2022). Supplementation of Mito TEMPO and acetovanillone in semen extender improves freezability of buffalo spermatozoa. *Andrology*, 10(4): 775-788. <https://doi.org/10.1111/andr.13158>
35. Kumar, A., Kumar-Gosh, S., Katiyar, R., Eshetu-Gemeda, A., Rautela, R., Bisla, A., Srivastava, N., Kumar-Bhure, S., Lakshmi-Devi, H., Chanda, V. (2021). Effect of Mito-TEMPO Incorporated Semen Extender on Physico-morphological Attributes and Functional Membrane Integrity of Frozen Thawed Buffalo Spermatozoa. *Cryoleters*, 42(2): 11-119. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33970988/>

36. Lizarazo-Quintero, A.Y. (2016). Comparación morfométrica de espermatozoides humanos y de animales domésticos, teñidos con la coloración navidad. *Colombia Forense*, 1(2), 29-33. doi:10.16925/cf.v1i2.1388.
37. Macías-Loza, F. (1978). La inseminación artificial en Bovinos, Porcinos y Ovicaprilinos [Tesis para optar por el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Guadalajara]. <http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/2149?show=full>.
38. Marizancén-Silva, M.A., Artuduada-Pimentel, L. (2017). Mejoramiento genético en bovinos a través de la inseminación artificial y la inseminación artificial a tiempo fijo. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2): 247-259. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6285365>
39. Martín-Fernández, B., Gredilla-Díaz, R. (2018). Estrés oxidativo mitocondrial y envejecimiento cardiaco. *Clínica e investigación en arterioesclerosis*, 30(2): 74-83.
40. Martínez-Oropeza, C.O. (2003). Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la teca perinuclear del espermatozoide bovino [Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista, Universidad Nacional Autónoma de México] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000320739>
41. Martínez, J.G., Pardo-Carrasco, S. (2010). Crioconservación de semen en peces: Efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biológica Colombiana*, 15 (2): 3-23. <https://www.redalyc.org/pdf/3190/319027885001.pdf>.
42. Matás, C., García-Velázquez, F., Sansegundo, M., Gadea, J., Coy, p., Ruiz, S. (2007). Estudio de la capacitación espermática in vitro en espermatozoides eyaculados y epididimarios. *ITEA*, 28(1): 30-32. [https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2007/comunicaciones/2007\\_Rep\\_10.pdf](https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2007/comunicaciones/2007_Rep_10.pdf)
43. Mejía-Flores, I., Medrano-Hernández, J.A., Uribe-Carbajal, S., Cornejo-Cortés, M.A., Hernández-Ignacio, J., Díaz-Manríquez, G., Valdez-Magaña,

- G. (2021). Evaluación macroscópica, microscópica y morfología del semen bovino. Reproducción Mediante TICs. <https://reproduccionmediantetics.blogspot.com/2021/03/evaluacion-macroscopica-microscopica-y.html>
44. Mejía-Flores, I., Medrano-Hernández, J.A., Uribe-Carbajal, S., Cornejo-Cortés, M.A., Hernández-Ignacio, J., Díaz-Manríquez, G., Valdez-Magaña, G. (2021). Guía digital para evaluar viabilidad, integridad acrosomal y estado fisiológico de los espermatozoides. Reproducción Mediante TICs: <https://reproduccionmediantetics.blogspot.com/2021/03/guia-digital-para-evaluar-viabilidad.html>
45. Mendoza-Hoffmann F, Pérez-Oseguera Á, Cevallos MÁ, Zarco-Zavala M, Ortega R, Peña-Segura C, Espinoza-Simón E, Uribe-Carvajal S, García-Trejo JJ (2018) The biological role of the  $\zeta$  subunit as unidirectional inhibitor of the F1FO-ATPase of *Paracoccus denitrificans*. Cell Rep 22:1067–1078. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.106>
46. Moncayo-Picerno, S.A. (2016). Evaluación de la calidad seminal de reproductores bovinos antes y después del proceso de crioprese, [Tesis para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/11654>
47. Mukem, S., Thongbuakaew, T., Khornchatri, K. (2021). Mito-Tempo suppresses autophagic flux via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in neuroblastoma SH-SY5Y cells. Heliyon, 7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07310>
48. Murphy, M., Smith, R. (2007). Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 47, 629-656. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105110>
49. Ojeda-Carrasco, J.J., Espinoza-Ayala, E., Hernández-García, P.A., Márquez-Molina, o., García-Rubia, V.G. (2021). Aplicación de biotecnologías reproductivas para el desarrollo de la ovinocultura en la región de los volcanes. Actualidad y prospectiva de la investigación científica en el Centro

Universitario Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México. Editorial IAPAS Academia Internacional de Ciencias Político-Administrativas y Estudios de Futuro, ISBN 978-607-98268-6-4, 130-146.

50. Parra-Cortés, R.I., Magana-Magana, M.A. (2020). Característica técnico-económicas de los sistemas de producción bovina basados en razas criollas introducidas a México. *Ecosistemas y Recursos agropecuarios*, 6(18): 535-547. <https://doi.org/10.19136/era.a6n18.2160>.
51. Pérez-Rosales, M., Román, B., Santiani, A. (2020). Efecto de la criopreservación en la integridad acrosomal de espermatozoides viables de alpaca evaluada mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i3.18172>
52. Rivera-Gaona, M.G. (2020). Congelación de semen bovino. *Revista de genética bovina colombiana*. Pag. 1-1. <https://revistageneticabovina.com/biotecnologia/congelacion-semen-bovino/>
53. Robin, H. (2020). Evaluación de la tasa de preñes utilizando dos diluyentes en protocolo de IATF en vacas de cría (Trabajo final para optar al grado académico de Especialista en Reproducción Bovina, Universidad Nacional de Córdoba]. Instituto de Reproducción Animal Córdoba. <https://iracbiogen.com/wp-content/uploads/2021/06/Evaluacion-de-la-tasa-de-prenez-utilizando-dos-diluyentes-de-semen-en-protocolos-de-iatf-en-vacas-de-cria-Robin.pdf>
54. Rodríguez-Tobón, E., Fierro-Pastrana, R.C., González-Márquez, H., Matsumura, P., Arenas-Ríos, E. (2019). El papel de glutatión reducido (GSH) en el proceso de capacitación espermática. En R. Arenas, *El espermatozoide: una mirada desde México* (págs. 137-152). México. Scriptus
55. Rosete-Fernández, J.V., Álvarez-Gallardo, H., Urbán-Duarte, D., Fragoso-Islas, A., Asprón-Pelayo, M.A., Ríos-Utrera, A., Pérez-Reynoso, S., De la Torre-Sánchez, J.F. (2021). Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México, 12(13). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5918>

56. Rubio-Guillen, J.L., Quintero-Moreno, A.A., González-Villalobos, D.M. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista científica*, 19(4). [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0798-22592009000400010](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0798-22592009000400010)
57. SADER. (2021). Población ganadera. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Obtenido de [https://nube.siap.gob.mx/poblacion\\_ganadera/](https://nube.siap.gob.mx/poblacion_ganadera/)
58. Salazar-Cartín, J.A. (2019). Biología de la capacitación espermática: un proceso in vivo. *Revista de Microbiología, Química y clínica de Costa Rica*, 25(1). <https://revista.microbiologos.cr/wpcontent/uploads/2019/05/Arti%CC%81cul-o-1-Biologi%CC%81a-de-la-capacitacio%CC%81nesperma%CC%81tica-final.pdf>
59. Santiago-Moreno, J., Galarza-Lucero, D.A. (2019). Criopreservación de espermatozoides en especies domésticas y silvestres: estado actual de los avances tecnológicos. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(2): 18-38. <https://www.revistaecuadorianadecienciaanimal.com/index.php/RECA/article/view/116>
60. Shetty, S., Kumar, R., Bharati, S. (2019). Mito-TEMPO, a mitochondria-targeted antioxidant, prevents N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in mice, *Free Radic Biol Med*, 136: 76-86. 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.037.
61. Stornelli, M.C., Tittarelli, C.M., Savignone, C.A., Stornelli, M.A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 26(2): 28-35. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11180>.
62. Tortolero, I., Arata-Bellabarba, G., Osuna, J.A., Gómez., R., Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. Revisión. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 3(3). [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1690-31102005000300003](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102005000300003).



63. Tsukino, K. (10 de enero de 2009). SlideShare. Obtenido de [https://es.slideshare.net/Dra\\_Sandra/carbohidratos-presentation-906839](https://es.slideshare.net/Dra_Sandra/carbohidratos-presentation-906839).
64. Valdez, T. (2017). Efecto de diferentes fuentes antioxidantes sobre parámetros celulares y capacitación espermática pos-descongelado en semen bovino. En AMMVEB, Memorias del XLI congreso Nacional de Buiatría "MVZ Eduardo Jaramillo Bolaños". págs. 577-583.
65. Vera, O. (2008). Fisiología de los espermatozoides bovinos. En Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito. 495-504.
66. Yanagimachi, R. (1988). Mammalian fertilization (E. Knobil y JD Neill, Eds., The Physiology of Reproduction, vol. 1, Raven Press). 135-185.
67. Zarei, F., Daghigh-Kia, H., Masoudi, R., Moghaddam, G., Ebrahimi., M. (2020). Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO I: Improvement in quality parameters and reproductive performance of cooled-stored semen. *Cryobiology*, 98: 215-218. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.10.018
68. Zhan, X., Lu, X., Li, J., Xia, Q., Gao, J., Wu, B. (2019) Mito-Tempo alleviates cryodamage by regulating intracellular oxidative metabolism in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Cryobiology*, 91: 18-22. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2019.11.005.
69. Zuluaga-Vélez, A., Gaviria-Arias, D. (2012). Una mirada al estrés oxidativo en la célula. *Revista Médica de Risaralda*, 18(2): 145-154. <https://doi.org/10.22517/25395203.7923>