

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**ADICIÓN DE FUENTES ANTIOXIDANTES AL DILUYENTE DE SEMEN BOVINO Y
SUS EFECTOS POSDESCONGELAMIENTO**

POR:

M. V. Z. JOSÉ MANUEL VALDEZ TORRES

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ÁREA MAYOR EN REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA ANIMAL**

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO

FEBRERO DE 2018



Adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos posdescongelamiento. Tesis presentada por José Manuel Valdez Torres como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, ha sido aprobada y aceptada por:

Ph. D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

Ph. D. Felipe Alonso Rodríguez Almeida
Encargado del Despacho de la Secretaría de Investigación y Posgrado

D. Ph. Agustín Corral Luna
Coordinador Académico

Ph. D. Juan Alberto Grado Ahuir
Presidente

19 Febrero 2018

Fecha

Comité:

Ph. D. Juan Alberto Grado Ahuir
D. Ph. María Eduviges Burrola Barraza
Ph. D. Felipe Alonso Rodríguez Almeida
M. C. Javier Antillón Ruíz

© Derechos Reservados
JOSÉ MANUEL VALDEZ TORRES
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO FRANCISCO
R. ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA,
CHIH., MÉXICO C.P. 31453
FEBRERO DE 2018

AGRADECIMIENTOS

A Dios, le agradezco por haberme brindado vida y salud para poder culminar con éxito la Maestría en Producción Animal, uno de mis logros más importantes en mi vida. Además de darme fortaleza para seguir adelante.

A mi familia, por todos los sacrificios, consejos y apoyo incondicional para poder culminar con éxito mis estudios de posgrado fuera de mi estado natal.

Al Ph. D. Juan Alberto Grado Ahuir, por los consejos, apoyo, paciencia, enseñanzas, disponibilidad y confianza brindada durante este proyecto. Principalmente, por toda esa experiencia compartida sin reservas.

A la D. Ph. María Eduviges Burrola Barraza, por su dedicación, confianza, entusiasmo y apoyo incondicional ofrecido durante la elaboración de este proyecto. Además de sus aportaciones acertadas en beneficio del proyecto.

Al Ph. D. Felipe Alonso Rodríguez Almeida le agradezco por todo ese tiempo, espacio, paciencia y su apoyo ofrecido a lo largo de este proyecto, principalmente para realizar los análisis estadísticos.

Al MC. Javier Antillón Ruíz, por la amistad, disponibilidad y apoyo en el trabajo de campo y laboratorio, y todos esos consejos siempre valiosos durante la elaboración del presente estudio.

Al Centro De Biotecnología y Reproducción de la UGRCH, principalmente al IZSP Normando Hernández Parra, por todo el apoyo brindado de su parte para la realización del presente proyecto en sus instalaciones.

A todos mis amigos del laboratorio y del posgrado de la FZyE, por todo

el apoyo, consejos y tiempo tan ameno que me hicieron pasar durante mi estancia dentro del programa de la Maestría en Ciencias en Producción Animal.

A la FZyE y a todo el personal, por toda esa ayuda incondicional brindada durante la maestría.

Especialmente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado para mi formación académica dentro del posgrado a través de la beca nacional con registro 595335.

A todos mis maestros y amigos de la UAMVZ – UAZ; así mismo, a todos mis amigos de Zacatecas, por todos esos consejos y el respaldo recibido para salir adelante en esta etapa de mi vida.

DEDICATORIA

Este humilde trabajo se lo dedico a **Mis Padres**, por todo el amor, apoyo, confianza y sacrificios brindados durante todos estos años para convertirme en una mejor persona y un mejor profesionalista.

A mi padre, el **Sr. José Manuel Valdez Ramírez**, por ser parte fundamental de mi formación, por todos esos consejos, confianza, y apoyo incondicional brindado, además de ser un ejemplo de vida.

A mi madre, la **Sra. María Elva Torres Núñez**, por ser uno de los pilares más importantes en mi educación, por todo ese cariño, consejos, sacrificios y apoyo brindado durante toda mi vida.

A **Eduardo, Alma Rosa y Leti Valdez Torres**, mis hermanos, gracias a su apoyo, consejos y sacrificios, los cuales han contribuido en gran medida para la conclusión de esta nueva etapa en mi vida.

A todos mis sobrinos, por tantas muestras de apoyo y alegrías recibidas de su parte.

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 17 de agosto de 1992 en el Municipio de Zacatecas, Zacatecas, México.

- 2010 - 2015 Estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma de Zacatecas, obteniendo el título de Médico Veterinario Zootecnista. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Enrique Estrada, Zacatecas.
- 2016 - 2017 Estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Reproducción y Genética Animal. Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

RESUMEN

ADICIÓN DE FUENTES ANTIOXIDANTES AL DILUYENTE DE SEMEN BOVINO Y SUS EFECTOS POSDESCONGELAMIENTO

POR:

M. V. Z. JOSÉ MANUEL VALDEZ TORRES

Maestría en Ciencias en Producción Animal

Secretaría de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: Ph. D. Juan Alberto Grado Ahuir

Con el objetivo de determinar el efecto de adicionar extracto de la planta *Rhus trilobata* (RT, 16 mg/mL) al diluyente de semen bovino en comparación a Cisteína (CIS, 2 mM/mL), Cafeína (CAF, 5 mM/mL) y Ácido Ascórbico (AA, 4.5 mg/mL), se realizaron dos experimentos; en el primero se determinó el efecto sobre características seminales posdescongelado: viabilidad, integridad funcional de la membrana celular (IFMC), motilidad y capacitación espermática. En el segundo, se evaluó la concentración intracelular de Glutati6n (GSH) como un indicador de actividad antioxidante en células espermáticas en respuesta a la adici6n de CIS y RT al diluyente de semen de toros menores y mayores de dos años. Los datos para ambos experimentos fueron analizados utilizando un modelo mixto con el procedimiento MIXED de SAS. La adici6n de RT mejoró ($P < 0.05$) la viabilidad e IFMC (4 y 8 %, respectivamente) comparado al grupo control. La motilidad se incrementó ($P < 0.05$) mediante RT, CIS y AA. Mayor ($P < 0.05$) motilidad progresiva se observó con RT, AA y CT. La cinemática

espermática se vio disminuida ($P < 0.05$) en características de velocidad en respuesta al AA; mientras que la RT tiende a incrementar este parámetro. Mayor porcentaje ($P < 0.05$) de espermatozoides no capacitados, con acrosoma intacto, se obtuvo con CT, CIS y RT. Los niveles de glutatión se incrementaron ($P < 0.05$) en toros adultos mediante la adición del extracto de RT. En conclusión, la adición del extracto de la planta RT puede mejorar la calidad posdescongelado de semen bovino criopreservado, ya que incrementa la motilidad sin afectar la integridad acrosomal, y en toros mayores de 2 años incrementa la concentración de GSH, contribuyendo a mejorar la tolerancia al estrés oxidativo.

ABSTRACT

ADDITION OF ANTIOXIDANT SOURCES TO BOVINE SEMEN EXTENDER AND IT'S POST-THAWING EFFECTS

BY:

JOSÉ MANUEL VALDEZ TORRES

The aim of this study was to determine the effects of adding *Rhus trilobata* plant extract (RT, 16.6 mg/mL) to the bovine semen extender compared to Cysteine (CIS, 2 mM/mL), Caffeine (CAF, 5 mM/mL) and Ascorbic Acid (AA, 4.5 mg/mL) on seminal post-thawing traits. Two experiments were conducted. In experiment 1, semen of six bulls was processed adding to the extender: No additive (Control, CT), CIS, CAF or RT. After thawing, viability, plasma membrane functionality (IFMC), motility and capacitation status were assessed. Experiment 2, was performed to evaluate the intracellular concentration of glutathione (GSH) in sperm cells in response to the addition of CIS or RT to semen extender in cryopreservation of bulls younger than 2 years old and older. The data for both experiments were analyzed under a mixed model with SAS using PROC MIXED. In experiment 1, the addition of the RT improved ($P < 0.05$) viability and IFMC (4 and 8%, respectively) compared to CT. Total motility was increased ($P < 0.05$) by RT, CIS and AA. Higher ($P < 0.05$) progressive motility was observed with RT, AA and CT. The spermatoc kinematics was lower ($P < 0.05$) in velocity characteristics in the AA group. However, RT treated cells tend to show higher values. Greater percentage ($P < 0.05$) of sperm no capacitated with intact acrosome was obtained with CT, CIS and RT. In the second experiment results show increased ($P < 0.05$) levels of glutathione in bulls older than 2 years in response to RT extract. In

conclusion, addition of RT extract can improve post-thawing quality of bovine cryopreserved semen.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	xiv
LISTA DE GRÁFICAS.....	xvi
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Criopreservación de Semen Bovino.....	3
Diluyente para Congelación.....	4
Fuente de energía.....	5
Amortiguador de pH.....	5
Protección contra el choque térmico.....	6
Antibióticos.....	6
Crioprotectores.....	7
Fisiología del Estrés Oxidativo.....	7
Producción de radicales libres de oxígeno.....	8
Peroxidación lipídica en el espermatozoide.....	9
Fases de la peroxidación lipídica.....	11
Antioxidantes.....	13
Enzimáticos.....	13
No enzimáticos.....	14

Cisteína.....	14
Ácido ascórbico.....	15
Cafeína.....	16
Antioxidantes de origen vegetal.....	16
<i>Rhus trilobata</i>	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Localización del Área de Estudio.....	19
Descripción de los Animales.....	19
Diseño Experimental.....	19
Recolección y Evaluación Seminal.....	20
Análisis macroscópico.....	20
Análisis microscópico.....	21
Dilución.....	21
Enfriamiento, Equilibrado y Envasado.....	21
Congelación.....	23
Descongelación.....	23
Evaluación Posdescongelado.....	23
Experimento 1.....	23
Viabilidad.....	23
Integridad funcional de la membrana.....	24
Motilidad y cinemática espermática.....	24
Determinación de la capacitación espermática.....	25
Experimento 2.....	27

Determinación de la concentración de glutatión (GSH)...	27
Procesamiento de la muestra.....	27
Determinación en el lector de microplacas.....	28
Cálculo de GSH.....	28
Análisis Estadístico.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
Experimento 1.....	31
Viabilidad e integridad funcional de la membrana.....	31
Motilidad total y progresiva.....	36
Cinemática espermática.....	39
Capacitación espermática y reacción acrosomal.....	42
Experimento 2.....	45
Niveles intracelulares de glutatión (GSH).....	45
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	49
LITERATURA CITADA.....	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Criterios de calidad establecidos para la criopreservación de semen bovino.....	22
2	Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) y estimaciones de la varianza del error ($\hat{\sigma}^2$) para el porcentaje de viabilidad e integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides en semen bovino posdescongelado, adicionado con diferentes fuentes antioxidantes.....	32
3	Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) y estimaciones de la varianza del error ($\hat{\sigma}^2$) para el porcentaje de motilidad total y progresiva en semen bovino posdescongelado adicionado con diferentes fuentes antioxidantes	37
4	Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) y estimación de la varianza del error ($\hat{\sigma}^2$) de características cinemáticas en semen de toro posdescongelado obtenidos mediante el análisis espermático asistido por computadora (CASA) con diferentes fuentes antioxidantes	40
5	Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) y estimación de la varianza del error ($\hat{\sigma}^2$) para el porcentaje de espermatozoides con patrones de capacitación F, B y RA en	

semen bovino posdescongelado adicionado con diferentes fuentes antioxidantes.....	43
--	----

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1 Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) para los niveles intracelulares (nmol/mL) de Glutación en semen bovino posdescongelado adicionado con diferentes fuentes antioxidantes.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) en espermatozoides.....	10
2	Proceso de peroxidación lipídica.....	12
3	Patrones de fluorescencia de acuerdo al estado de capacitación espermática.....	26

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) en la especie bovina es considerada una herramienta biotecnológica de suma importancia, la cual ha contribuido significativamente en el avance genético de la especie (Ardon y Suarez, 2013; Sá Filho *et al.*, 2014). Esta herramienta ha tenido un impacto relevante debido al uso de semen criopreservado de toros genéticamente superiores (Büyükleblebici *et al.*, 2014).

El objetivo principal de la criopreservación de semen es generar bancos (Amirat *et al.*, 2004), que permitan su almacenamiento por tiempo indefinido y una extensa distribución del mismo, siendo estas características clave para el amplio uso de la técnica de IA en los sistemas modernos de producción de ganado (Cao *et al.*, 2013; Layek *et al.*, 2016).

No obstante, durante los procesos de congelación-descongelación del semen se producen diversas especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), originando estrés oxidativo (EO) que provoca un efecto nocivo en el espermatozoide (Hu *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2014). Esto es debido a la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) presentes en su membrana plasmática, siendo un blanco ideal para la peroxidación lipídica (PL), provocando alteraciones bioquímicas y funcionales en los espermatozoides (Tuncer *et al.*, 2010, Baghshahi *et al.*, 2014).

El plasma seminal y los espermatozoides presentan un sistema antioxidante que le ayuda a atenuar el daño del EO. Desafortunadamente, este sistema presenta una pobre protección antioxidante debido a que el

espermatozoide solo posee una pequeña porción citoplasmática que contiene antioxidantes (Sarıözkan *et al.*, 2009).

Es por esta razón que se ha buscado mejorar las características seminales posdescongelado en el bovino, mediante la adición de distintos antioxidantes al medio de congelación, tanto enzimáticos como no enzimáticos, tales como: cisteína (Sarıözkan *et al.*, 2009; Tuncer *et al.*, 2010), glutatión (Tuncer *et al.*, 2010), ácido ascórbico (Hu *et al.*, 2010; Eidan *et al.*, 2016), taurina (Sarıözkan *et al.*, 2009), catalasa (Eidan *et al.*, 2016), Retinol (Zhao *et al.*, 2015), entre otros. Aunado a lo anterior, Malo *et al.* (2011) y Wittayarat *et al.* (2013) extendieron esta estrategia de protección hacia el uso de fuentes antioxidantes de origen natural, especialmente flavonoides y polifenoles de algunas plantas. El extracto de la planta *Rhus trilobata* (RT) ha demostrado propiedades citotóxicas, antineoplásicas, proapoptóticas y antiinflamatorias, debido a su alta composición de polifenoles que le confieren una alta actividad antioxidante (Rodríguez-Palomares, 2015; Guerrero-Salgado *et al.*, 2016; Híjar-Soto *et al.*, 2016). Además, se han encontrado efectos positivos en la maduración nuclear y desarrollo embrionario bovino mediante la adición del extracto de RT al medio de maduración *in vitro* (Rodríguez-Borbón, 2017).

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el potencial del extracto de la planta RT como aditivo en el diluyente de semen bovino, para mejorar las características seminales posdescongelado, en comparación con la Cisteína (CIS), Cafeína (CAF), y Ácido Ascórbico (AA).

REVISIÓN DE LITERATURA

Criopreservación de Semen Bovino

Actualmente, la inseminación artificial (IA) es una biotecnología de la reproducción que ha contribuido significativamente al avance genético en la especie bovina dentro de los sistemas de producción (Sá Filho *et al.*, 2014; Bó *et al.*, 2017). Gran parte de este éxito es debido al proceso de criopreservación de semen, ya que esta herramienta permite una amplia distribución y almacenamiento indefinido de semen de toros genéticamente superiores por tiempo indefinido (Cao *et al.*, 2013).

El fundamento principal para preservar la viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación consiste en la reducción o inhibición del metabolismo en las células a través del descenso gradual de la temperatura (Moore y Hasler, 2017). La criopreservación y uso posterior del semen comprende diferentes etapas: a) Dilución en medios basados en yema de huevo o leche; b) Crioprotección mediante glicerol o algunos otros crioprotectores (trehalosa, sucrosa o fructosa) los cuales ayudan a deshidratar la célula (El-Sheshtawy *et al.*, 2015); c) Descenso gradual de temperatura; d) Equilibramiento (Leite *et al.*, 2010); e) Congelación; f) Almacenamiento; y g) Descongelación (Hammerstedt *et al.*, 1990; Medeiros *et al.*, 2002).

Durante el procedimiento de criopreservación existen varios puntos críticos donde se desencadenan grandes daños a la célula: 1) Cambios de temperatura; 2) Estrés osmótico; 3) Efectos tóxicos a consecuencia de la exposición a crioprotectores; 4) Formación de cristales de hielo y descongelación en el ambiente extracelular (Watson, 2000).

La técnica de criopreservación de semen ha estado en continua evolución, mediante la invención de nuevos y mejores diluyentes y/o crioprotectores; sin embargo, la mortalidad de espermatozoides en semen posdescongelado en la especie bovina es aproximadamente del 40 a 50 % (Watson, 2000; Sathe y Shipley, 2015). Lo anterior se debe a que durante el proceso de criopreservación se inducen cambios funcionales y estructurales a las células espermáticas, principalmente a nivel de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Layek *et al.*, 2016), además de asociarse con producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que resultan en estrés oxidativo (Büyükleblebici *et al.*, 2014).

Diluyente de Congelación de Semen

Un diluyente de congelación de semen es definido como un medio químicamente definido, el cual funciona para la preservación y protección de las células espermáticas durante los distintos procesos a las que son sometidas, como almacenamiento, procesamiento, congelación y transporte (Rehman *et al.*, 2013).

El diluyente está conformado de distintos elementos esenciales para realizar sus distintas funciones como: a) proveer nutrientes al espermatozoide principalmente una fuente de energía y proteína; b) mantener un pH adecuado mediante buffers; c) mantener concentraciones de electrolitos y osmosis fisiológica correcta; d) inhibir el crecimiento bacteriano a través de antibióticos; e) protección de choque frío durante el descenso de la temperatura; y f) disminuir el daño por congelación mediante el uso de crioprotectores (Sorensen, 1982; Ball y Peters, 2004; Sathe y Shipley, 2015).

Fuente de energía. De forma natural la energía requerida por los espermatozoides es conseguida mediante la inclusión de sustratos adecuados principalmente monosacáridos en las rutas metabólicas de la glucólisis y ciclo de Krebs (Rigau *et al.*, 2002). Además, algunas moléculas de azúcar ayudan como crioprotectores de las células espermáticas (Panyaboriban *et al.*, 2015). Salamon y Maxwell (2000) señalan que la fructosa es el único monosacárido presente en semen de carnero; sin embargo, la célula espermática también llega a metabolizar la manosa y glucosa, si estas son añadidas al diluyente. Sin embargo, Rodríguez-Gil (2006) indica que las células espermáticas de los mamíferos también pueden hacer uso de otras moléculas como el citrato y lactato con la finalidad de conseguir energía.

Amortiguador de pH. La función de los buffers dentro de los diluyentes de criopreservación es la de neutralizar los desechos resultantes del metabolismo de la célula espermática, especialmente el ácido láctico (Sorensen, 1982). Uno de los tampones utilizado al principio fue el fosfato de sodio, no obstante, se ha substituido por el citrato de sodio, ya que ha mejorado la supervivencia de espermatozoides (Sathe y Shipley, 2015). Yañez *et al.* (2011) señalan que actualmente los buffers zwitteriónicos (tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), ácido 3N-Morfolino propanesulfónico (MOPS), ácido N-2-hidroxietil piperazin-N-2-etanosulfónico (HEPES) y TES (N-Tris [hidroximetil] Metil-2 ácido aminoetano sulfónico), ayudan a mejorar las variables de motilidad espermática y, combinados con el citrato, aumentan la integridad funcional de la membrana celular.

Protección contra el choque térmico. Los diluyentes a base de yema de huevo y leche se han utilizado desde que iniciaron los procesos de criopreservación, con el objetivo de protección de la membrana contra el choque térmico durante el enfriamiento, congelación y descongelación (Foulkes *et al.*, 1980). Amirat *et al.* (2004) mencionan que la principal fracción crioprotectora de la yema de huevo está conformada por una lipoproteína de baja densidad (LDL). Sin embargo, se le han adjudicado algunos efectos negativos al uso de diluyentes a base de yema de huevo: contaminación bacteriana y xenobiótica (riesgo de introducir enfermedades exóticas), variabilidad en su composición (Aires *et al.*, 2003), interferencia en la evaluación de la muestra por la presencia de vacuolas u otras partículas (Singh *et al.*, 2013). Debido a lo anterior, se han buscado alternativas para sustituir la yema de huevo, ejemplo de ello es el uso de diluyentes a base de extractos de soya, que contienen un componente llamado lecitina, una lipoproteína de alta densidad, molécula que ayuda en prevenir daños a la membrana plasmática del espermatozoide durante el proceso de criopreservación (Layek *et al.*, 2016).

Antibióticos. Este componente reviste gran importancia en los diluyentes de criopreservación, ya que su principal función es controlar la contaminación y crecimiento bacteriano generado durante la recolección y procesamiento del semen (Gloria *et al.*, 2014). La contaminación bacteriana repercute de manera negativa sobre la calidad espermática, debido a que contienen contra las células espermáticas por los nutrientes del diluyente, además de producir endotoxinas y subproductos de metabolitos tóxicos (Morrell y Wallgren, 2014). Yániz *et al.* (2010) argumentan que existe cierto grado de resistencia bacteriana a la

combinación tradicional de antibióticos (penicilina/estreptomicina) empleada para la criopreservación. Debido a lo anterior, se ha tratado de usar combinaciones de antibióticos nuevas y seguras en diluyentes para semen de bovinos como lo es ceftiofur/tilosina y ofloxacino (Gloria *et al.*, 2014).

Crioprotectores. Los crioprotectores pueden ser clasificados en moléculas permeables y no permeables en base a su propiedad de penetrar la membrana (Hammerstedt *et al.*, 1990). Los crioprotectores permeables tienen la propiedad de poder atravesar las membranas celulares, de este modo provocan la reorganización de lípidos y proteínas de la misma y una menor formación de hielo intracelular (Holt, 2000), permitiendo regular la velocidad y grado de deshidratación de la célula. Los principales crioprotectores de este grupo son el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO). Por su parte, los crioprotectores no permeables actúan extracelularmente, ya que no pueden atravesar la membrana celular. Son divididos en tres grupos: 1) Moléculas osmóticamente activas, ejemplo de estas son los disacáridos (sacarosa y trehalosa); 2) Moléculas osmóticamente inactivas como algunos polisacáridos; y 3) Proteínas como albumina y polivinilpirrolidona (Sieme *et al.*, 2016; Elliott *et al.*, 2017).

Fisiología del Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es un proceso donde se produce un desequilibrio de ROS y prooxidantes, a consecuencia de una abundancia en la producción de ROS o una baja capacidad antioxidante de la célula (Sharma y Agarwal, 1996). Agarwal *et al.* (2008) mencionan que los principales blancos del EO en la célula son macromoléculas como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. El estrés oxidativo provoca un importante daño a la funcionalidad del

espermatozoide debido a la peroxidación lipídica incitada por los ROS (Tuncer *et al.*, 2010). Entre las características que se ven afectadas se encuentran: motilidad, actividad endógena de antioxidantes enzimáticos, integridad de la membrana y fertilidad (Sariözkan *et al.*, 2009). Por su parte, Bisht *et al.* (2017) mencionan que aumentos considerables en el estrés oxidativo repercuten en daños al DNA espermático, transcripción de RNA y telómeros, resultando en infertilidad, mortalidad embrionaria y/o pérdida de la gestación.

Producción de radicales libres de oxígeno. Radical libre se define como un intermediario químico, el cual presenta en su estructura uno o más electrones desapareados (Sharma y Agarwal, 1996; Henkel, 2011). Debido a lo anterior, se consideran altamente reactivas y participan en reacciones químicas en la mayoría de los componentes celulares (Aprioku, 2013). Los principales radicales libres se clasifican en: especies reactivas de nitrógeno (NOS) y ROS, siendo estas últimas las que tienen una elevada importancia y abundancia (Chihuailaf *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2005).

La producción fisiológica de ROS toma lugar durante el metabolismo del oxígeno, a través de la cadena de transporte de electrones en la membrana interna de la mitocondria; sin embargo, cuando existe un incremento en la demanda de ATP, estas son producidas en demasía (Lavranos *et al.*, 2012). Entre las ROS más comunes se encuentran: anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH), radical peroxilo (RO_2), radical alcoxilo (RO) y radical hidroperoxilo (HO_2 ; Michael *et al.*, 2008).

Kessopoulo *et al.* (1992) señalan que la producción de ROS en el semen se origina básicamente de dos fuentes: 1) Espermatozoides inmaduros y 2)

Leucocitos (macrófagos y neutrófilos), los cuales se podrían clasificar de origen endógenos (Figura 1). Aunado a lo anterior, durante las técnicas de reproducción asistida se pueden generar abundantes ROS de tipo exógeno, resultando inevitablemente en EO (Agarwal y Majzoub, 2017).

El espermatozoide produce ROS de una forma normal; sin embargo, cuando esos niveles sobrepasan la actividad antioxidante, repercute de una manera negativa en la fertilidad, debido a que genera un daño importante en la integridad funcional y genética del espermatozoide mediante el estrés oxidativo (Sharma y Agarwal, 1996; Sapanidou *et al.*, 2015).

En las células espermáticas se pueden producir ROS mediante los siguientes procesos: a) A nivel de la membrana plasmática del espermatozoide, mediante el sistema nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés) oxidasa; b) nicotinamida adenina dinucleotido-dependiente oxido-reductasa a nivel mitocondrial; y c) L-aminoácido oxidasas citosólicas (Aitken, 2017). La mayor parte de la producción de ROS es generada durante el segundo proceso (Agarwal *et al.*, 2014).

Peroxidación lipídica en el espermatozoide. La peroxidación lipídica implica una serie de reacciones químicas que darán como resultado un deterioro oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA`s, por sus siglas en inglés) debido al ataque de ROS (Sharma y Agarwal 1996; Agarwal *et al.*, 2008).

En mamíferos, la membrana plasmática del espermatozoide presenta una composición lipídica diferente a las células somáticas, ya que contienen un mayor porcentaje de PUFA´s, siendo más predisponentes a sufrir peroxidación lipídica debido a que presentan enlaces dobles no conjugados, separados por un grupo

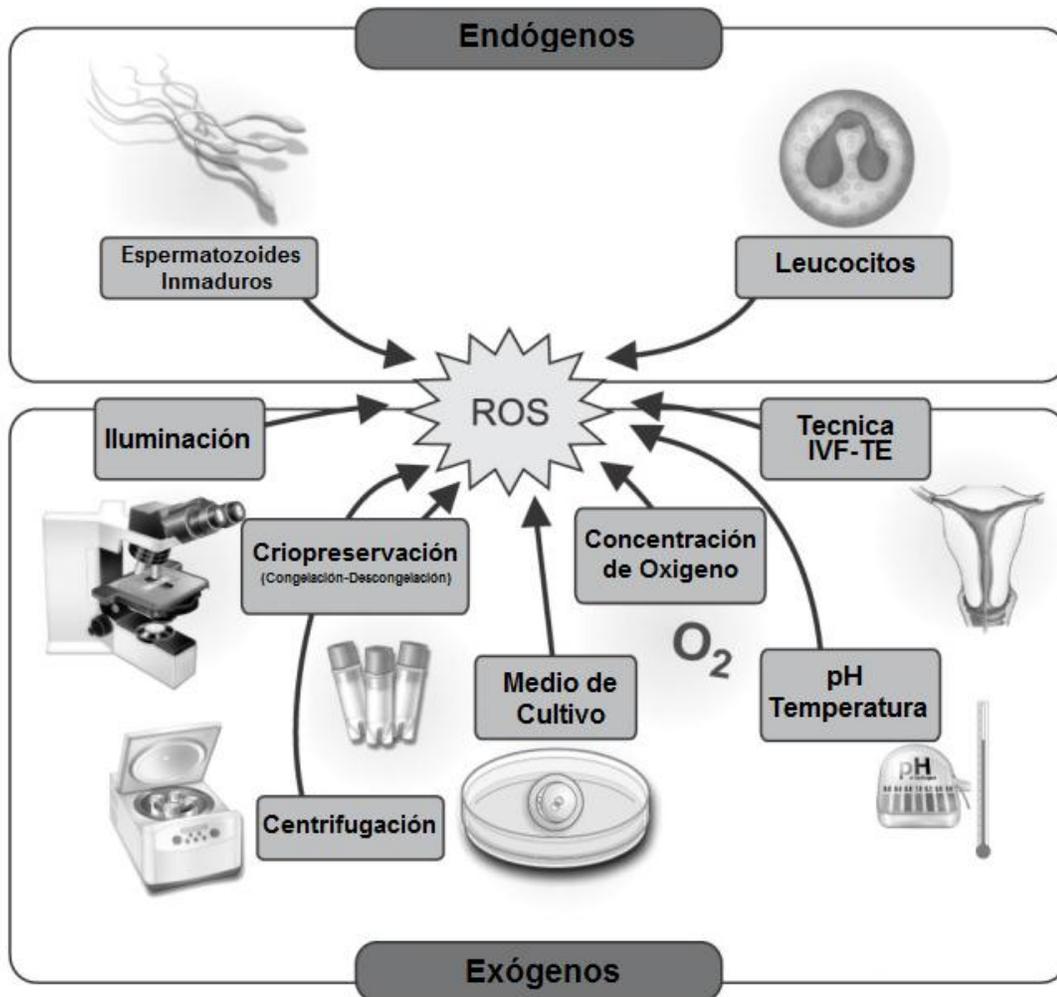


Figura 1. Fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) en espermatozoides. Adaptado de Agarwal y Majzoub (2017).

metilo, debilitando el enlace metil carbono-hidrógeno y resultando en una susceptibilidad mayor para el hidrógeno al ser separado (Bucak *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2014). La peroxidación de los PUFA's en la membrana plasmática del espermatozoide es considerada como una reacción autocatalítica y autopropagadora, la cual afecta de manera directa la funcionalidad e integridad de la membrana (Bansal y Bilaspuri, 2010).

Fases de la peroxidación lipídica. El mecanismo de peroxidación lipídica consiste en una reacción en cadena que consta básicamente de tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Yin *et al.*, 2011). La etapa de iniciación de la peroxidación lipídica se desencadena por medio del ataque de un ROS originando la extracción de un hidrógeno (H^+) hacia un grupo metilo ($-CH_2-$) de un PUFA (Figura 2). Después de esta etapa, continúa un reordenamiento molecular, donde el radical carbono se estabiliza, a través de la reorganización de enlaces, resultando en la formación de enlaces de dieno conjugados. Posteriormente, los radicales carbono posiblemente interaccionarán con oxígeno (O_2) formando un radical peroxilo (ROO; Chihuilaf *et al.*, 2002)

En la etapa de propagación, un radical ROO produce la separación de una molécula de H^+ de un grupo metileno perteneciente a un PUFA contiguo. Por otra parte, se puede llegar a producir radicales de peróxido cíclico a través del ataque de los radicales ROO hacia un doble enlace de la misma cadena (Da Fonseca, 2006). Finalmente, en la etapa de terminación, si existe disponibilidad de iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^+), se facilitara la degradación en grupos alcoholes, ésteres, cetonas y aldehídos. El resultado final de este proceso son malonaldehído (MDA) y 4 - hidroxí - 2 - nonenal (4-HNE). Los radicales peroxilo llegan a iniciar una

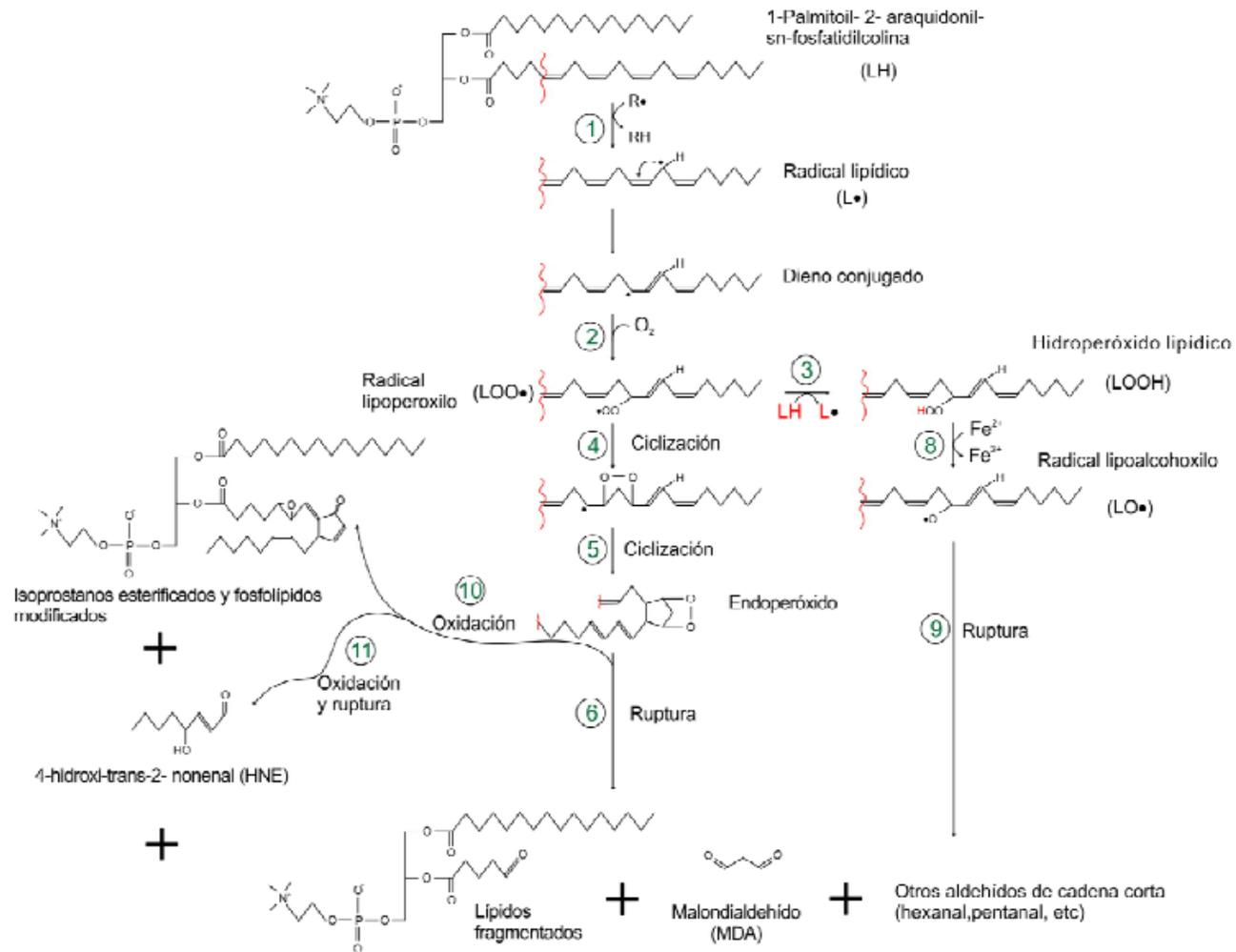


Figura 2. Proceso de peroxidación lipídica (Soledad-Fagali, 2011).

reacción en cadena produciendo la peroxidación de lípidos adyacentes, entre los que se encuentra el colesterol (Soledad-Fagali, 2011).

Antioxidantes

El concepto antioxidante es definido como una sustancia capaz de retardar, prevenir o frenar la oxidación de un substrato o molécula diana (Halliwell y Gutteridge, 2015). Esto se puede lograr al inhibir la formación de radicales libres o frenar la dispersión de los mismos, mediante diferentes mecanismos: a) Recolección de especies que inician la peroxidación; b) Quelación de iones metálicos que los, vuelve inofensivos, ya que no pueden generar ROS; c) Desaparición de O₂ previniendo la formación de peróxidos; d) Interrupción de la reacción en cadena autoxidativa, e) Disminución de concentraciones de O₂ focalizadas (Asimi *et al.*, 2013).

Bucak *et al.* (2010) mencionan que el espermatozoide presenta un sistema antioxidante conformado por las enzimas: glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GSH-PX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD). Este conjunto de enzimas funciona como un mecanismo de defensa ante la peroxidación lipídica en el semen.

Enzimáticos. A los antioxidantes pertenecientes a este grupo también se les conocen como antioxidantes naturales. Dentro de esta clase se encuentran las defensas enzimáticas primaria y secundaria. La defensa enzimática primaria está integrada por tres enzimas que frenan la producción de radicales libres: glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Agarwal *et al.*, 2005; Rahman, 2007). La defensa enzimática secundaria, a diferencia de la primaria, no neutraliza directamente los radicales libres sino que funciona como

coadyuvante con los antioxidantes endógenos. Esta defensa está conformada principalmente por dos enzimas: glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Carocho y Ferreira, 2013).

No enzimáticos. Los antioxidantes no enzimáticos reciben también el nombre de sintéticos (Agarwal *et al.*, 2005). Se encuentran conformados por una gran variedad de moléculas hidrofóbicas e hidrófilicas que tienen como función principal la de capturar radicales libres, originando especies químicas menos nocivas para la integridad celular (Córdova *et al.*, 2009). Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran: vitamina C, vitamina A, vitamina E, piruvato, taurina, albumina, hipotaurina, entre otros (Agarwal *et al.*, 2008).

Cisteína. La cisteína, es un aminoácido azufrado no esencial formado por un grupo tiol (-SH), el cual es un elemento primordial del ácido nucleico espermático, además de ayudar en el mantenimiento de la integridad del mismo (Perumal *et al.*, 2011). La cisteína funciona como precursor de varias moléculas, como la coenzima-A, taurina, azufre inorgánico (Stipanuk, 2004). Además posee aptitudes antioxidantes debido a que induce la biosíntesis de glutatión, manteniendo niveles intracelulares elevados del mismo, aparte de ayudar en la expulsión de ROS (Tuncer *et al.*, 2010). Lo anterior, se facilita debido a que las moléculas compuestas de grupo -SH como la Cisteína y GSH tienen la propiedad de atravesar con facilidad la membrana celular (Çoyan *et al.*, 2011).

Mediante la adición de cisteína al diluyente de congelación se han tratado de mejorar algunas características posdescongelado de semen en diferentes especies como bovinos (Sarıözkan *et al.*, 2009; Tuncer *et al.*, 2010), ovinos

(Çoyan *et al.*, 2011), caprinos (Memon *et al.*, 2012), caninos (Michael *et al.*, 2007), aves (Partyka *et al.*, 2013) y peces (Öğretmen *et al.*, 2015).

Ácido ascórbico. El ácido ascórbico (AA) o vitamina C es una lactona de seis carbonos, la cual puede ser sintetizada mediante una molécula de glucosa en el hígado de la mayoría de los mamíferos. El AA es clasificado como un agente reductor, ya que su función se basa en la donación de electrones (Padayatty *et al.*, 2004; Gangwar *et al.*, 2015).

Agarwal *et al.* (2004) señala que el AA es uno de los principales componentes del plasma seminal de hombres fértiles, aportando el 65 % de la capacidad total antioxidante. El AA es un excelente antioxidante hidrosoluble presente en plasma. Aunado a esto, la concentración presente de AA en plasma seminal es 10 veces mayor que en plasma sanguíneo (Gangwar *et al.*, 2015).

El AA se encuentra presente en el testículo, en el cual, mediante sus características antioxidantes, lo protege contra el estrés oxidativo favoreciendo la espermatogénesis (Vijayprasad *et al.*, 2014). Así mismo, el consumo de AA favorece el incremento de porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, mayor concentración de células espermáticas en el eyaculado (Eskenazi *et al.*, 2005) y un aumento en el nivel plasmático de testosterona (Sönmez *et al.*, 2005).

Fraga *et al.* (1991) señalan que el AA puede desempeñar una función importante en las células espermáticas brindándoles protección contra el estrés oxidativo, específicamente manteniendo la integridad del material genético. Además, Hu *et al.* (2010) mencionan que la adición de AA al diluyente de criopreservación de bovino ayuda a mejorar características de motilidad,

integridad del acrosoma e integridad funcional de la membrana plasmática posdescongelado.

Cafeína. La cafeína es un compuesto perteneciente al grupo de las metilxantinas, derivadas de los inhibidores de fosfodiesterasas (Stephens *et al.*, 2013), la cual está presente en diferentes productos como el café, té, chocolate entre otros (Ricci *et al.*, 2017). Así mismo, se creó que la cafeína presenta un impacto sobre el metabolismo celular; sin embargo, tal efecto es dependiente de las concentraciones de iones calcio (Barakat *et al.*, 2015).

Garbers *et al.* (1971) mencionan que este tipo de compuestos aumentan la glucólisis en el espermatozoide afectando de una manera positiva la motilidad. Lo anterior debido al incremento en la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) mediante la inhibición de la fosfodiesterasa y consecuentemente promueve la ruta de la proteína quinasa A (PKA, por sus siglas en inglés; Yamaguchi *et al.*, 2009). Todo lo anterior concluye en un aumento de niveles intracelulares niveles de ATP, promoviendo una alta motilidad (Stephens *et al.*, 2013).

La cafeína presenta notables aptitudes antioxidantes para proteger las membranas en contra del estrés oxidativo, debido a que ayuda a inhibir la peroxidación lipídica de manera semejante al glutatión y en mayor medida que el ácido ascórbico (Devasagayam *et al.*, 1996).

Antioxidantes de origen vegetal. En la actualidad, se conoce que las herbáceas son una fuente rica de poderosos antioxidantes, las cuales pueden ser usadas en forma de emulsiones, extractos o especias (Embuscado, 2015). Este poder antioxidante natural se debe a que las plantas están compuestas por

una gran variedad de fitoquímicos entre los que se encuentran: compuestos fenólicos, glucosinolatos, carotenoides, alcaloides, taninos compuestos azufrados, esteroides vegetales, entre otros (Pandey *et al.*, 2014). El modo de acción de la mayoría de estos compuestos se basa en la formación de compuestos con iones metálicos y la reacción con los radicales libres (Embuscado, 2015).

Rhus trilobata. La *Rhus trilobata* (RT) es una arbustiva que puede alcanzar hasta 2 metros de altura, de flores pequeñas amarillentas. Sus frutos son de color rojizo con un diámetro menor a 1 cm (Melgoza-Castillo *et al.*, 2016). La RT se considera endémica del estado de Chihuahua, México (Guerrero-Salgado *et al.*, 2016); sin embargo, esta variedad tiene una amplia distribución en norteamérica, desde el sureste de Canadá, oeste y suroeste de Estados Unidos, llegando hasta el centro de México (Rzedowski y Calderon, 1999). García-Ramírez *et al.* (2016) señalan que la RT es empleada para el tratamiento de problemas gastrointestinales, además de enfermedades degenerativas como cáncer y leucemia por personas endémicas del estado de Chihuahua, mediante infusiones de la misma.

El extracto de la planta RT se ha demostrado que presenta propiedades citotóxicas, antineoplásicas y proapoptóticas ante líneas celulares de cáncer CaCo-2 y SKOU-3, además de presentar propiedades antiinflamatorias. Estas propiedades se cree que son debido a su alto contenido de polifenoles, confiriéndole una alta actividad antioxidante (Rodríguez-Palomares, 2015; Guerrero-Salgado *et al.*, 2016; Híjar-Soto *et al.*, 2016). Rodríguez-Palomares (2015) señala que el extracto de la planta RT presenta una actividad elevada de

captación del radical superóxido (O_2^-) muy similar a la del ácido gálico. Por su parte, Rodríguez-Borbón (2017) reporta un efecto positivo en la maduración nuclear y desarrollo embrionario bovino mediante la adición del extracto de RT al medio de maduración *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del Área de Estudio

El procesamiento de semen, se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Biotecnología y Reproducción de la Unión Ganadera Regional de Chihuahua ubicado en el kilómetro 35 de la carretera Chihuahua–Cuauhtémoc, Municipio de Santa Isabel. Las tinciones y pruebas complementarias se realizaron en el laboratorio de Fertilización *In vitro* y Transgénesis Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Descripción de los Animales

Como fuente de células espermáticas para el primer experimento se utilizaron seis toros (5 Angus y 1 Charoláis), cuya edad fluctuaba entre 2 y 6 años, además de contar con una buena condición corporal. Para el segundo experimento se utilizaron 6 toros (5 Angus y 1 Brangus), agrupándolos en dos grupos de acuerdo a sus edades: toros jóvenes menores de 2 años y toros adultos, mayores de 2 años. Antes de la recolección, los toros fueron examinados físicamente y reproductivamente, para garantizar un buen estado de salud general.

Diseño Experimental

En el primer experimento se obtuvieron eyaculados de 6 toros. Cada eyaculado se separó en 5 porciones que fueron asignadas completamente al azar a cada uno de los cinco tratamientos: T0= Control; T1= Cisteína (2 mM/mL; Ansari *et al.*, 2011); T2= Cafeína (5 mM/mL; Barakat *et al.*, 2015); T3= Ácido Ascórbico (4.5 mg/mL; Hu *et al.*, 2010); y T4= *Rhus trilobata* (16.6 µg/mL; Rodríguez-Palomares, 2015).

En el segundo experimento se congeló eyaculados de 6 toros, agrupándolos en: jóvenes (<2 años) y adultos (>2 años). Cada eyaculado se separó en tres porciones que fueron asignadas completamente al azar a cada uno de tres tratamientos [T0= Control; T1= Cisteína (2 mM/mL); T2=*Rhus trilobata* (16.6 µg/mL)], por lo que se contó con un arreglo factorial 3 x 2. Además se realizaron tres replicas técnicas.

Recolección y Evaluación Seminal

El semen fue obtenido mediante electroestimulación, utilizando un dispositivo de electrodos bipolar con diámetro de 60 mm y mango colector conectado mediante un cono de plástico a un tubo cónico graduado, estéril, con capacidad de 15 mL. Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas del semen previo a su procesamiento, para determinar que los eyaculados cumplieran con los criterios de calidad establecidos por el Laboratorio de Procesamiento de Semen e Inseminación Artificial de la Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua para el proceso de criopreservación (Cuadro 1).

Análisis macroscópico. Las características macroscópicas en el eyaculado fueron evaluadas mediante lo descrito por Zemjanis (1987) las cuales incluyen volumen color, olor, densidad, además de evaluar el grado de contaminación de la muestra con impurezas. El volumen se evaluó dentro del tubo cónico de 15 mL con el que se recolectó la muestra, el color fue evaluado a simple vista, seleccionando los eyaculados con colores cremosos o lechosos, descartando los eyaculados con coloraciones rojizas o amarillentas ya que pueden indicar contaminación por sangre u orina. Al mismo tiempo, el olor fue

evaluado en cada muestra para descartar los eyaculados con olor pútrido, ya que puede ser indicador de infección o patología a lo largo del tracto reproductivo.

Análisis microscópico. La motilidad masal fue determinada mediante la escala de Evans y Maxwell (1990). Los parámetros de concentración, células vivas, células normales fueron evaluados mediante el sistema computarizado de análisis de semen (CASA; IVOS Versión 12, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, EUA).

Dilución

El diluyente que se utilizó en este estudio fue Optidyl® (IMV Technologies, L'Aigle, France), el cual está elaborado a base de yema de huevo, glicerol y tris. El diluyente se preparó mezclando una proporción de 1:1.5 de diluyente y agua destilada. El semen se diluyó a una concentración de 40×10^6 espermatozoides por mL (20×10^6 por pajilla).

Enfriamiento, Equilibramiento y Envasado

El proceso de enfriamiento consistió en el descenso gradual de temperatura del semen diluido de una temperatura de 37 °C a 5 °C. Esto se logró colocando las diluciones de semen en un recipiente que contenía agua a 37 °C, dentro de una habitación fría ajustada a temperatura de 5 °C, posteriormente se procedió a equilibrar la muestra a 5 °C durante 2 h. El semen diluido fue envasado con una máquina automatizada de llenado y sellado de pajillas (MRS1 Dual V2, IMV Technologies) dentro de una habitación fría, en pajillas francesas de 0.5 mL (IMV, Instrument de Médecine Vétérinaire, Francia) previamente identificadas con los tratamientos correspondientes.

Cuadro 1. Criterios de calidad establecidos para la criopreservación de semen bovino¹

Características	Calificación
Motilidad	≥ 70 %
Células Normales	≥ 75 %
Células Vivas	≥ 70 %
Concentración Espermática	≥ 500 x 10 ⁶
Volumen de Eyaculado	≥ 6 mL
Aspecto	Cremoso o Lechoso

¹ Laboratorio de Procesamiento de Semen e Inseminación Artificial de la Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua.

Congelación

Al terminar el proceso de envasado y sellado, se continuó con la congelación mediante la técnica de vapores de nitrógeno. Las pajillas fueron colocadas en una parrilla para mantenerlas en forma horizontal y suspendidas. La parrilla fue colocada a una altura de 5 cm con respecto al espejo de nitrógeno contenido en el interior de una hielera de nieve seca, a una temperatura aproximada de -85 °C por 12 min, para luego ser sumergida directamente en el nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C (Najafi *et al.*, 2014). Inmediatamente después del congelado se descongelaron 3 pajillas al azar para evaluar el correcto envasado y congelado. Finalmente, se almacenaron las pajillas en nitrógeno líquido a -196 °C colocándolas en bastones identificados con el tratamiento correspondiente, dentro de un termo criogénico.

Descongelación

Las pajillas se descongelaron en agua a 37 °C por 35 s. Se descongelaron tres pajillas por tratamiento y por toro para la tinción de eosina nigrosina y prueba de estrés hipo-osmótica (HOST; por sus siglas en inglés). Para determinar los patrones cinemáticos se descongelaron dos pajillas por tratamiento y por toro.

Evaluación Posdescongelado

Experimento 1

Viabilidad. El porcentaje de espermatozoides vivos se evaluó mediante la tinción de eosina-nigrosina (dilución 1:1). Esta evaluación se realizó visualmente con ayuda de un microscopio Axiolmager.M2 (Carl Zeiss®) mediante la técnica de campo claro a 40 x de magnificación, contándose por lo menos 100

espermatozoides en diferentes campos del frotis para cada variable de acuerdo a lo mencionado por Sorensen (1982).

Integridad funcional de la membrana. La integridad estructural y funcional de la membrana plasmática del espermatozoide se evaluó mediante prueba de estrés hipo-osmótica (HOST). Para ello se realizó una dilución con 50 μ l de semen y 1000 μ l de solución hipo-osmótica a 100 mOsm y se incubó en baño maría a una temperatura de 37 °C por 30 min. Posteriormente, se colocaron 10 μ l de la muestra sobre un portaobjetos y se realizó la valoración con ayuda del microscopio Axiolmager.M2 (Carl Zeiss®) mediante la técnica de campo claro a 40 x identificando 100 espermatozoides en diferentes campos con cambios en la cola (hinchamiento).

Motilidad y cinemática espermática. Los parámetros de motilidad y cinemática espermática fueron evaluados mediante el sistema computarizado de análisis de semen (CASA; IVOS Versión 12, Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, EUA). El CASA fue ajustado para el análisis de espermatozoides de bovinos. Posterior al proceso de descongelación, la muestra se diluyó (50 μ l de muestra + 950 μ l de diluyente a base de Tris, sin yema de huevo y crioprotector) y fue evaluada inmediatamente. Se tomó una muestra de 10 μ l y se llenó por capilaridad una cámara de análisis de motilidad precalentada a 37 °C (20 mm, Leja 4, Leja Products Luzernestraat B.V., Holanda). La lectura se determinó mediante el programa SpermVision™ (MiniTube, versión 3.0, EE.UU.) conectado a un microscopio Olympus CX 41 (Olympus, Japón), contabilizando al menos un total de 400 células espermáticas por muestra.

Los parámetros de movimiento de espermatozoides registrados fueron: motilidad total (%; MT), motilidad progresiva (%; MP), distancia en el camino promedio (μm ; DAP), distancia en línea recta (μm ; DSL), distancia en línea curva (μm , DCL), velocidad media ($\mu\text{m}/\text{seg}$; VAP), velocidad rectilínea ($\mu\text{m}/\text{seg}$; VSL), velocidad curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg}$; VCL), índice de rectitud (%; STR), índice de linealidad (%; LIN), amplitud media de desplazamiento lateral de la cabeza (μm ; ALH), frecuencia de batido de cola (Hz; BCF), e índice de oscilación (%; WOB).

Determinación de la capacitación espermática. La evaluación de la capacitación espermática se llevó a cabo por el método de análisis de fluorescencia con clortetraciclina (CTC), mezclando cuidadosamente 15 μl de la solución CTC (750 μM de hidrocloreto de clortetraciclina en un buffer de 5 mM de DL-cisteína, 130 mM de NaCl y 20 mM de ácido Tris, pH 7.4) con 15 μl de espermatozoides separados con Percoll. La muestra se fijó adicionando 1.5 μl de solución glutaraldehído al 8 % y mezclando suavemente. Finalmente, en un portaobjetos se colocaron 5 μl de la solución espermática fijada y 5 μl de 1,4-diaza,2,2,2-biciclo-octano disuelto en glicerol (1:9) para aminorar el desvanecimiento de la fluorescencia. Se colocó un cubreobjetos sobre la mezcla y se sellaron con barniz común para uñas, almacenándolas a 4 °C hasta la evaluación. La lectura de laminillas se realizó mediante análisis de fluorescencia, con la ayuda de un microscopio Axiomager.M2 (Carl Zeiss®) bajo iluminación fluorescente a una longitud de onda de 488 nm de excitación y 509 nm de emisión con ayuda del objetivo de 100x. En cada muestra se contaron 100 espermatozoides. La clasificación se realizó bajo los siguientes patrones (Figura 2): F, con fluorescencia ligera uniformemente distribuida en toda la cabeza del

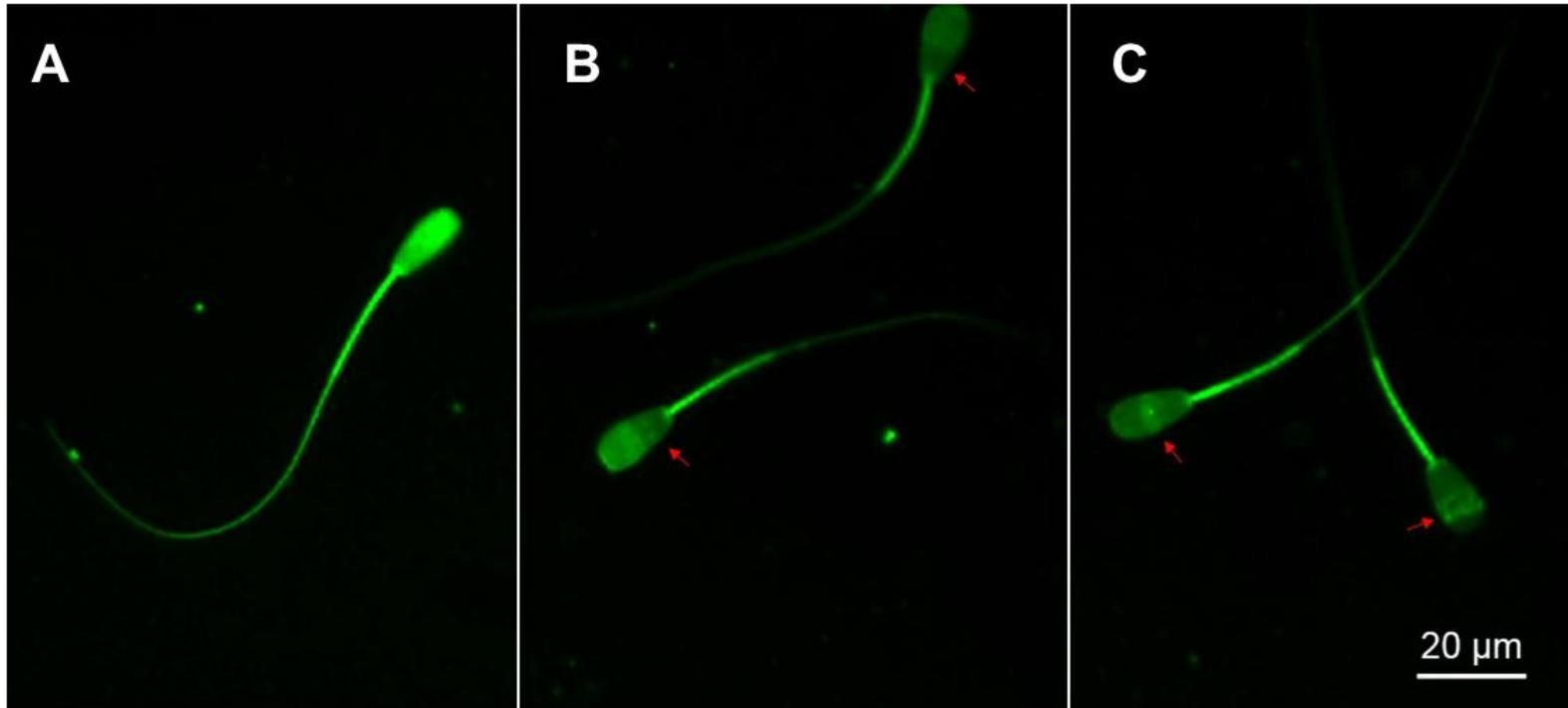


Figura 2. Patrones de fluorescencia de acuerdo al estado de capacitación espermática.

A) Patrón F, fluorescencia ligera uniformemente distribuida en toda la cabeza del espermatozoide, representado por los espermatozoides incapacitados con acrosoma intacto; B) Patrón B, fluorescencia en la región acrosomal, representando los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto; y C) Patrón RA, ausencia o presencia de una fluorescencia pequeña en la cabeza y presencia de una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial del espermatozoide, correspondiente a los espermatozoides capacitados con reacción acrosomal.

espermatozoide, correspondiente a los espermatozoides incapacitados con acrosoma intacto; B, con fluorescencia en la región acrosomal, correspondiente a los espermatozoides capacitados con acrosoma intacto; y RA, con ausencia o presencia de una fluorescencia pequeña en la cabeza y presencia de una delgada banda fluorescente en la región ecuatorial del espermatozoide, representado por los espermatozoides capacitados con reacción acrosomal (Fraser *et al.*, 1995).

Experimento 2

Determinación de la concentración de glutatión (GSH).

Procesamiento de la muestra. La cuantificación de la concentración de glutatión (GSH) se realizó mediante un procedimiento de colorimetría con el kit ensayo de glutatión (Sigma-Aldrich; número de catálogo CS0260). Cada muestra se ajustó una concentración de 1×10^8 células espermáticas por mL. Las muestras se precipitaron en 1 mL de buffer fosfato salino (PBS) en una microcentrifuga refrigerada (Labnet Prism™) a 600 g por 10 min en dos ocasiones. Se retiró el sobrenadante con ayuda de una micropipeta y se midió el volumen de la pastilla celular. Posteriormente se añadieron tres volúmenes de ácido 5-sulfosalicílico al 5 % (SSA) y se homogeneizó mediante vortex. Con la finalidad de degradar la membrana celular, la suspensión se congeló con nitrógeno líquido y se descongeló en baño maría a 37 °C en dos ocasiones, posteriormente se almacenó a 2-8 °C durante 5 min. Finalmente, la muestra se centrifugó a 10,000 g por 10 min. Se midió el volumen del sobrenadante y este fue utilizado como el volumen de muestra original para el cálculo de la determinación de glutatión. Finalmente, fue almacenado en a -80 °C.

Determinación en el lector de microplacas. El arreglo de la placa fue la siguiente: como blanco se utilizaron los primeros 2 pocillos con 10 µl de solución de SSA. Los siguientes pocillos correspondieron a 10 µl de muestra de solución estándar de glutatión para determinar la curva estándar. Subsiguientemente se adicionaron 10 µl de muestra de cada tratamiento por triplicado en pocillos separados y 150 µl de la mezcla de trabajo, mezclándola con ayuda de una pipeta. Por último, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y luego se agregaron 50 µl de solución diluida de NADPH con una pipeta multicanal y se mezcló bien. Las muestras fueron leídas mediante un lector de placas (Thermo Scientific Varioskan® Flash) a 412 nm con lectura cinética a intervalos de 1 min durante 5 min.

Cálculo de GSH. Los valores de absorbancia de las soluciones estándar de glutatión se usaron para establecer la curva estándar y calcular $\Delta A_{412} / \text{min}$ equivalente a 1 nmol de glutatión reducido por pozo.

$$\text{nmol de GSH por mL de muestra} = \frac{\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}} (\text{muestra}) \times \text{dil}}{\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}} (1 \text{ nmol}) \times \text{vol}}$$

Donde:

$\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}} (\text{muestra})$ = Pendiente por la muestra (después de restarle los valores generados por los blancos).

$\frac{\Delta A_{412}}{\text{min}} (1 \text{ nmol}) \times \text{vol}$ = Pendiente calculada de la curva estándar por 1 nmol de GSH.

dil = Factor de dilución de la muestra original

vol = volumen de la muestra en la reacción en mililitros

Análisis Estadístico

Para todas las variables analizadas se realizó una prueba de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk con ayuda del procedimiento UNIVARIATE del paquete estadístico SAS 9.1.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Cuando la prueba resultó significativa ($P < 0.05$) las variables fueron transformadas mediante raíz cuadrada para aproximar a una distribución normal.

Para ambos experimentos los datos fueron analizados utilizando el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS 9.1.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC). En el primer experimento se ajustó un modelo mixto considerando tratamiento como efecto fijo y semental como efecto aleatorio. Para el caso de los errores, se probó heterogeneidad de varianzas a través de tratamientos mediante la comparación de la bondad de ajuste del modelo con varianzas homogéneas vs el modelo con varianzas heterogéneas por medio de una prueba del logaritmo de la tasa de verosimilitud, tal como lo describe Dobson (1990). Cuando la prueba resultó significativa ($P < 0.05$) se ajustó el modelo con varianzas heterogéneas.

Cuando el análisis de varianza indicó diferencia significativa ($P < 0.05$) para tratamiento, se hizo una comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey del comando LSMEANS en el procedimiento MIXED (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Para el segundo experimento, se ajustó un modelo mixto considerando tratamiento, edad y su interacción como efectos fijos, y el semental y replica anidada dentro de semental como efectos aleatorios. Cuando en el análisis de varianza se observó significancia ($P < 0.05$) del(os) efecto(s) fijos, las

comparaciones múltiples de medias se realizaron de la misma manera que para el Experimento 1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1

Viabilidad e integridad funcional de la membrana. La adición del extracto de la planta *Rhus trilobata* (RT) en el diluyente de criopreservación afectó ($P < 0.05$) de manera positiva la viabilidad del semen bovino posdescongelado con una mayor supervivencia (62.36 ± 2.78 %) con respecto a los tratamientos Control (CT), Cisteína (CIS), Cafeína (CAF) y Ácido Ascórbico (AA; 58.03 ± 2.75 , 52.56 ± 2.74 , 54.47 ± 2.94 y 53.86 ± 2.75 %, respectivamente). Los tratamientos con CIS, CAF y AA (52.56 ± 2.74 , 54.47 ± 2.94 y 53.86 ± 2.75 %, respectivamente) resultaron en una menor ($P < 0.05$) viabilidad en relación al grupo CT (58.03 ± 2.75 %; Cuadro 2). Por otra parte, el tratamiento con CAF presentó resultados más variables ($\hat{\sigma}^2 = 62.6$ %) en comparación a los demás tratamientos: CT ($\hat{\sigma}^2 = 23.4$ %), CIS ($\hat{\sigma}^2 = 20.2$ %), AA ($\hat{\sigma}^2 = 17.9$ %) y RT ($\hat{\sigma}^2 = 28.8$ %), los cuales se comportaron de manera más similar entre ellos ($P > 0.05$).

En la actualidad, no se cuenta con estudios previos sobre el uso del extracto de RT adicionado al diluyente del semen; no obstante, existen reportes sobre otros extractos naturales utilizados como fuente antioxidante en células espermáticas en una gran variedad de especies y el humano, como lo es: *Opuntia ficus-indica* (Allai *et al.*, 2016), *Tribulus terrestris* (Asadmobini *et al.*, 2017), *Rhodiola rosea* (Yang *et al.*, 2016), *Syzygium aromaticum* (Baghshahi *et al.*, 2014), *Rosmarinus officinalis* (Malo *et al.*, 2010, 2011; Motlagh *et al.*, 2014), entre otros.

Cuadro 2. Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) y estimaciones de la varianza del error ($\hat{\sigma}^2$) para el porcentaje de viabilidad e integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides en semen bovino posdescongelado, adicionado con diferentes fuentes antioxidantes

Tratamiento	Viabilidad (%)		HOST ¹ (%)	
	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$
Control	58.03 \pm 2.75 ^b	23.42	44.81 \pm 2.82 ^{bc}	18.78
Cisteína	52.56 \pm 2.74 ^c	20.24	46.86 \pm 2.80 ^b	15.15
Cafeína	54.47 \pm 2.94 ^{bc}	62.59	42.56 \pm 2.93 ^c	40.55
Ácido Ascórbico	53.86 \pm 2.72 ^c	17.99	43.50 \pm 2.89 ^c	31.87
<i>Rhus trilobata</i>	62.36 \pm 2.78 ^a	28.84	52.81 \pm 3.07 ^a	70.86

a, b, c Diferentes literales indican diferencia estadística (P < 0.05).

¹ Integridad funcional de la membrana plasmática

De conformidad con los resultados del presente estudio, Malo *et al.* (2010) mencionan que la adición exógena de Romero (*Rosmarinus officinalis*), cisteína y su combinación en el diluyente de congelación de semen de cerdo mejoró la viabilidad posdescongelado. Del mismo modo, Malo *et al.* (2011) reportan un efecto benéfico sobre la característica de viabilidad a las dos horas de incubación con respecto al control mediante la adición de extracto de Romero al diluyente de congelación de semen porcino procedente de epidídimo. En la especie ovina, Motlagh *et al.* (2014) adicionaron extracto de Romero en 4 y 6 % al diluyente de congelación, mejorando la cantidad de espermatozoides vivos posdescongelado con respecto al control. Por su parte, Baghshahi *et al.* (2014) lograron incrementar significativamente el porcentaje de espermatozoides vivos de ovinos con la adición de 75 µg del extracto acuoso de *Syzygium aromaticum*, yema de huevo y dodecil sulfato sódico. De igual manera, Tvrdá *et al.* (2016) mencionan que la adición de extracto de cúrcuma en concentraciones de 25 a 50 µmol/L en diluyente de congelación en semen bovino logró mantener de mejor manera la vitalidad de los espermatozoides.

También, existen reportes sobre el beneficio del uso de antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos sobre la viabilidad seminal en la especie bovina, como son: 0.1, 1 y 2 mM de melatonina (Ashrafi *et al.*, 2013), mezclas de 1400 UI/mL de Vitamina C y 0.12 UI/mL de Vitamina E (Zhao *et al.*, 2015), 2.5 mM Vitamina C y 100 IU/mL de Catalasa (Eidan *et al.*, 2016). Por su parte, Najafi *et al.* (2014) reportaron incremento en la viabilidad del semen ovino con la adición de ergotioneína y cisteamina.

El porcentaje de espermatozoides con membranas integras funcionales posdescongelado resultó ser claramente mayor ($P < 0.05$) al adicionar RT al diluyente con un porcentaje de $52.81 \pm 3.07 \%$, con respecto a los demás tratamientos. Los tratamientos CT y CIS presentan comportamiento similar ($P > 0.05$) entre ellos con valores de 44.81 ± 2.82 y $46.86 \pm 2.80 \%$ respectivamente. Los tratamientos que resultaron con un menor ($P < 0.05$) porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fueron el AA ($43.50 \pm 2.89 \%$) y CAF ($42.56 \pm 2.93 \%$). Sin embargo, el tratamiento RT resultó con una $\hat{\sigma}^2$ del error muy elevada $70.86 \%^2$ en comparación a los demás tratamientos: CT ($\hat{\sigma}^2= 18.7 \%^2$), CIS ($\hat{\sigma}^2= 15.1 \%^2$), CAF ($\hat{\sigma}^2= 40.5 \%^2$) y AA ($\hat{\sigma}^2= 31.8 \%^2$). Lo anterior puede deberse al efecto particular que tiene el extracto sobre cada semental, ya que para este experimento no fueron consideradas otras fuentes de variación como las edades de los sementales. Concordando con nuestros resultados, existe una serie de reportes donde la adición de Romero (*Rosmarinus officinalis*) incrementa el porcentaje de células espermáticas con integridad funcional de la membrana celular posdescongelado en diferentes especies como: cerdos (Malo *et al.*, 2010; 2011), ovinos (Motlagh *et al.*, 2014) y macho cabrío (Zanganeh *et al.*, 2013).

De igual manera, se ha tratado de establecer concentraciones adecuadas de extractos de plantas para adicionar a los medios de congelación como fuente antioxidante y así mantener la integridad funcional de la membrana espermática. Shen *et al.* (2015) determinaron la concentración ideal de *Salvia miltiorrhiza* mediante la inclusión de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/mL al diluyente de congelación en cerdo, encontrando que 0.4 mg/mL mantenía de una mejor

manera la integridad funcional de la membrana celular. Cao *et al.* (2013) definieron la dosis ideal de *Rhodiola sachalinensis* al diluyente de criopreservación de semen bovino, encontrando que la adición de 0.06 mg/mL resultó en un mayor porcentaje de integridad de la membrana. Por su parte, Baghshahi *et al.* (2014) señalan que la adición de yema de huevo, dodecil sulfato sódico y 75 µg *Syzygium aromaticum* al diluyente de congelación de semen ovino incrementó significativamente la integridad de la membrana celular del espermatozoide. De conformidad con los resultados obtenidos en esta investigación, existen reportes del uso de otro tipo de fuentes antioxidantes como cisteína (Tuncer *et al.*, 2010), glutamina y metionina (Sariözkan *et al.*, 2014) durante la criopreservación de semen bovino resultando en mayores índices de integridad de la membrana en comparación con los del grupo control.

No obstante, existen reportes contradictorios a nuestros resultados mediante el uso de otros antioxidantes para algunas características espermáticas posdescongelado. Malo *et al.* (2012) reportan que la adición de *Foeniculum vulgare* no tuvo ningún efecto sobre la integridad del acrosoma o la integridad de la membrana celular en comparación con el tratamiento control en semen criopreservado de cerdo. Así mismo, Luño *et al.* (2014) no observaron diferencia significativa en la integridad de la membrana al adicionar *Melissa officinalis* y *Ilex paraguensis* al diluyente para congelar semen proveniente del epidídimo en cerdo. Sariözkan *et al.* (2009) en su estudio, en el que adicionaron cisteína y taurina como fuente antioxidante al diluyente de semen bovino, no encontraron diferencia estadística con respecto a la integridad funcional de la membrana plasmática de las células espermáticas posdescongelado.

Estos resultados positivos sobre la viabilidad e integridad funcional de la membrana plasmática con extractos de origen vegetal pueden deberse a su potencial antioxidante, ya que contienen compuestos fenólicos, glucosinolatos, carotenoides, alcaloides, taninos, compuestos azufrados, esteroides vegetales, entre otros (Pandey *et al.*, 2014). El modo de acción de la mayoría de estos compuestos se basa en la formación de compuestos con iones metálicos y la reacción con los radicales libres (Embuscado, 2015).

Motilidad total y progresiva. Los resultados para porcentaje de motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) en semen bovino posdescongelado adicionado con diferentes fuentes antioxidantes se presentan en la Cuadro 3. La MT posdescongelado fue mayor ($P < 0.05$) al adicionar RT (66.95 ± 2.21 %) que con CT (56.78 ± 3.89 %) y CAF (56.62 ± 3.14 %). Así mismo, la $\hat{\sigma}^2$ del error se vió incrementada drásticamente para los tratamientos CT, CIS, CAF y AA ($\hat{\sigma}^2 = 130.8, 362.3, 67.2$ y 98.6 $\%^2$, respectivamente) a excepción de la RT (7.50 $\%^2$), lo que indica que esta variable se comportó de manera más homogénea a través de los diferentes toros analizados. Así mismo, se observó un mayor ($P < 0.05$) porcentaje de motilidad progresiva en los tratamientos RT, CT y AA, ($23.07 \pm 3.31, 18.36 \pm 3.31$ y 18.10 ± 3.31 %, respectivamente) comparados con CIS (17.58 ± 3.31 %) y CAF (13.59 ± 3.31 %).

De conformidad con nuestros resultados, existen reportes del aumento tanto de la MT como de la MP con la adición de algunos otros extractos naturales, Baghshahi *et al.* (2014) concluyen que el suplemento con 35 y 75 $\mu\text{g/mL}$ de *Syzygium aromaticum* en el diluyente de criopreservación de borregos logra aumentar los parámetros de MT y MP. Así mismo en borregos, Allai *et al.* (2016)

Cuadro 3. Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) y estimaciones de la varianza del error ($\hat{\sigma}^2$) para el porcentaje de motilidad total y progresiva en semen bovino posdescongelado adicionado con diferentes fuentes antioxidantes

Tratamiento	Motilidad Total (%)		Motilidad Progresiva (%)	
	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$
Control	56.78 \pm 3.89 ^b	130.81	18.36 \pm 3.31 ^{ab}	22.16
Cisteína	65.25 \pm 5.87 ^{ab}	362.33	17.58 \pm 3.31 ^b	22.16
Cafeína	56.62 \pm 3.14 ^b	67.25	13.59 \pm 3.31 ^b	22.16
Ácido Ascórbico	58.75 \pm 3.53 ^{ab}	98.61	18.10 \pm 3.31 ^{ab}	22.16
<i>Rhus trilobata</i>	66.95 \pm 2.21 ^a	7.50	23.07 \pm 3.31 ^a	22.16

^{a, b} Diferentes literales indican diferencia estadística ($P < 0.05$).

demonstraron que la adición de 1 % de extracto de cladodios de *Opuntia ficus indica* tanto en diluyentes a base de Tris-Yema de huevo y leche desnatada, logró mejorar significativamente la MT y MP con respecto al control y los demás tratamientos durante un periodo de almacenamiento de 72 h. Por otra parte, en humanos se han logrado mejorar estas características de MT y MP posdescongelado mediante la inclusión de extractos de *Tribulus terrestris* a una concentración de 40 y 50 µg/mL (Asadmobini *et al.*, 2017), Khaleghi *et al.* (2017) reportaron un comportamiento similar para estas características (MT y MP) mediante la adición de este extracto de *Tribulus terrestris* a una concentración de 40 y 50 µg/mL en almacenamiento de semen humano por un lapso de 120 h.

En concordancia con nuestro trabajo, en bovinos existen reportes de mejoría en la MP posdescongelado al adicionar antioxidantes al diluyente de congelación como la melatonina (Ashrafi *et al.*, 2013). Otras fuentes de antioxidantes naturales como el extracto de *Rosmarinus officinalis* se ha observado que mejora tanto la MT como MP en ovinos (Motlagh *et al.*, 2014) y machos cabríos (Zanganeh *et al.*, 2013). Así mismo, esta tendencia se observa con la adición de *Salvia miltiorrhiza* en cerdos (Shen *et al.*, 2015).

Kaka *et al.*, (2015) señalan que la suplementación con ácido α -linolénico a una concentración de 5 ng/mL al diluyente de congelación mejora la MT posdescongelado en bovinos. Así mismo, en bovinos, mediante la adición de cisteína (Sariözkan *et al.*, 2009) y ácido ascórbico (Hu *et al.*, 2010) se ha observado tal efecto. Por otra parte, Longobardi *et al.* (2017) reportan que la adición de carnitina en semen de búfalos mejora la MT con respecto al control,

en ovinos también se ha observado este efecto con el tratamiento de 6 mM de cisteamina o, 6 mM ergotioneina (Najafi *et al.*, 2014).

Estos incrementos observados en las características de motilidad se pueden deber en gran medida a la alta concentración de polifenoles que contiene el extracto de la planta *Rhus trilobata* (Rodríguez-Palomares, 2015), actuando como una poderosa fuente antioxidante, concordando con lo reportado por Alizadeh *et al.* (2015), quienes señalan que los antioxidantes repercuten directamente en la motilidad espermática. Otra hipótesis que se podría plantear en la mejora de la motilidad a consecuencia del extracto de *Rhus trilobata* es que la mejora pudiera estar relacionada con algunos otros elementos trazas como lo es iones de Ca^{++} , los cuales pueden influir directamente sobre las células espermáticas mediante la inhibición de la enzima fosfodiesterasa, dando como resultado la inhibición de la degradación de AMPc y una motilidad incrementada (Keshtmand *et al.*, 2014).

En contradicción con lo observado en esta investigación, existen investigaciones donde se ha observado un efecto nulo sobre la MT al adicionar diferentes antioxidantes al diluyente de congelación en bovinos como: glutati6n (GSH) y cisteína (Tuncer *et al.*, 2010) y crocina (Sapanidou *et al.*, 2015). Por su parte, Luño *et al.* (2014) no observan diferencia estadística tanto en la MT como MP mediante la adici6n de *Melissa officinalis* y *Ilex paraguensis* en semen del epidídimo de cerdo.

Cinemática espermática. Los parámetros de cinemática espermática se presentan en la Cuadro 4, donde para las características de DAP, DSL, DCL, STR, LIN, ALH, BCF y WOB no se observó efecto ($P > 0.05$) de los distintos

Cuadro 4. Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) y estimación de la varianza del error ($\hat{\sigma}^2$) de características cinemáticas en semen de toro posdescongelado obtenidos mediante el análisis espermático asistido por computadora (CASA) con diferentes fuentes antioxidantes

Características Cinemáticas ¹	Tratamiento									
	Control		Cisteína		Cafeína		Ácido Ascórbico		<i>Rhus trilobata</i>	
	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$
DAP	17.93 \pm 1.16	11.26	17.34 \pm 1.16	11.26	19.35 \pm 1.16	11.26	17.59 \pm 1.16	11.26	20.79 \pm 1.16	11.26
DSL	16.14 \pm 1.04	8.50	15.46 \pm 1.04	8.50	17.83 \pm 1.04	8.50	15.65 \pm 1.04	8.50	18.65 \pm 1.04	8.50
DCL	28.21 \pm 1.96	37.94	27.51 \pm 1.96	37.94	29.45 \pm 1.96	37.94	27.07 \pm 1.96	37.94	33.05 \pm 1.96	37.94
VAP	90.70 \pm 3.00 ^{ab}	51.28	90.29 \pm 3.00 ^{ab}	51.28	94.07 \pm 3.00 ^{ab}	51.28	87.18 \pm 3.00 ^b	51.28	96.97 \pm 3.00 ^a	51.28
VSL	82.40 \pm 2.76 ^{ab}	37.51	81.35 \pm 2.76 ^{ab}	37.51	84.44 \pm 2.76 ^{ab}	37.51	79.39 \pm 2.76 ^b	37.51	87.40 \pm 2.76 ^a	37.51
VCL	145.48 \pm 3.95 ^b	132.00	148.99 \pm 4.20 ^{ab}	156.77	154.37 \pm 8.84 ^{ab}	881.91	137.81 \pm 4.37 ^b	174.22	157.43 \pm 2.77 ^a	37.39
STR	90.39 \pm 0.60	2.55	90.08 \pm 0.60	2.55	91.16 \pm 0.60	2.55	90.37 \pm 0.60	2.55	90.69 \pm 0.60	2.55
LIN	57.44 \pm 0.98	7.91	56.98 \pm 1.20	13.71	58.89 \pm 2.35	62.47	57.92 \pm 1.24	14.90	56.63 \pm 0.87	5.51
ALH	6.92 \pm 0.20	0.36	6.62 \pm 0.16	0.21	6.76 \pm 0.55	3.49	6.61 \pm 0.20	0.38	7.15 \pm 0.17	0.22
BCF	20.03 \pm 0.51 ^b	1.50	20.35 \pm 0.51 ^{ab}	1.50	20.69 \pm 0.51 ^{ab}	1.50	19.69 \pm 0.51 ^b	1.50	21.44 \pm 0.51 ^a	1.50
WOB	63.21 \pm 0.77	3.74	63.23 \pm 0.97	7.85	64.61 \pm 2.30	60.30	63.96 \pm 1.07	10.41	62.77 \pm 0.80	4.15

^{a,b} Diferentes literales indican diferencia estadística ($P < 0.05$) entre medias de hilera a través de columnas.

¹ DAP, Distancia en el Camino Promedio; DSL, Distancia en Línea Recta; DCL, Distancia en Línea Curva; VAP, Velocidad Media; VSL, Velocidad Rectilínea; VCL, Velocidad Curvilínea; STR, Índice de Rectitud; LIN, Índice de Linealidad; ALH, Amplitud Media de Desplazamiento Lateral de la Cabeza; BCF, Frecuencia de Batido de Cola; WOB, Índice de Oscilación.

antioxidantes evaluados. Sin embargo, las características de velocidad (VAP, VSL y VCL) y frecuencia de batido de cola (BCF) resultaron mejoradas ($P < 0.05$) mediante el tratamiento RT con respecto al AA. En cuanto a la magnitud de la $\hat{\sigma}^2$ del error, el tratamiento RT es el que resulta con una variabilidad menor para las características que muestran heterogeneidad de varianzas, lo cual implica que se podría inferir de mejor manera en la predicción de resultados futuros sobre estas características.

Sariözkan *et al.* (2015) señalan que las características cinemáticas están muy relacionadas con el éxito en la preñez debido a que facilitan el avance de las células espermáticas a través del tracto reproductor de la hembra. Aunado a lo anterior Del Olmo *et al.* (2013), reportan que existe una fuerte correlación entre las características de cinemática espermática VAP ($P = 0.04$; $R^2 = 0.678$), VCL ($P = 0.027$; $R^2 = 0.745$) y BCF ($P = 0.006$; $R^2 = 0.852$) con la fertilidad *in vivo* en ovinos, determinando que la velocidad espermática es un punto clave en el proceso de fertilización.

Para las características de cinemática espermática posdescongelado, existe mucha discrepancia sobre los resultados que se obtienen mediante la adición de diferentes aditivos al medio de congelación, como lo son vitaminas, aminoácidos y extractos de plantas. Concordando con los resultados del presente estudio, la adición de 10 mg/mL *Camellia sinensis* en el diluyente de criopreservación de ovinos solo se lograron mejorar la característica de VAP con respecto al grupo control, sin identificar diferencia significativa para las demás características (VSL, VCL, LIN, STR, ALH y BCF; Mehdipour *et al.*, 2016). En bovinos, Cao *et al.* (2013) reportan un aumento ($P < 0.05$) mediante la adición de

Rhodiola sachalinensis en relación al control para las características de cinemática espermática de velocidad (VCL, VAP, VSL) además de LIN y ALH. Por su parte, Hu *et al.* (2010) mencionan que la adición de 4.5 mg/mL de AA al diluyente de criopreservación mejora algunas características cinemáticas (VSL, VAP, LIN, WOB y ALH) de semen bovino posdescongelado con respecto al control. Aunado a esto, Hu *et al.* (2011) señalaron que la suplementación con 2.5 mg/mL de vitamina B12 logró un aumento significativo para las características cinemáticas de velocidad (VSL, VCL y VAP) y de STR en relación a los demás tratamientos y el control. Así mismo en bovinos, mediante la adición de melatonina se han observado efectos sobre los parámetros de LIN, STR, ALH y VSL, no obstante, para BCF, VCL y VAP no se observaron diferencias entre los tratamientos (Ashrafi *et al.*, 2013).

En contradicción a lo encontrado en el presente estudio, el uso de algunos extractos de plantas como fuente antioxidante, no resulta con un efecto positivo sobre los diferentes patrones de movilidad de las células espermáticas posdescongelado, entre las que figuran *Rosmarinus officinalis* (Zanganeh *et al.*, 2013; Motlagh *et al.*, 2014) e *Ilex paraguensis* (Luño *et al.*, 2014). Así mismo, el uso de otros aditivos no ha resultado satisfactorio: fetuina y hialuronano (Sariözkan *et al.*, 2015), cisteamina y ergotioneina (Najafi *et al.*, 2014) y glutatión y cisteína (Tuncer *et al.*, 2010).

Capacitación espermática y reacción acrosomal. La tinción CTC (Cuadro 5) muestra los diferentes patrones de capacitación espermática, donde se observa que los tratamientos CT, CIS y RT resultan con un mayor ($P < 0.05$) porcentaje de espermatozoides no capacitados (51.25 ± 3.40 , 50.08 ± 3.03 y

Cuadro 5. Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) y estimación de la varianza del error ($\hat{\sigma}^2$) para el porcentaje de espermatozoides con patrones de capacitación F, B y RA en semen bovino posdescongelado adicionado con diferentes fuentes antioxidantes

Tratamiento	Patrón de capacitación ¹					
	F (%)		B (%)		RA (%)	
	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$	Media \pm EE	$\hat{\sigma}^2$
Control	51.25 \pm 3.40 ^a	56.43	38.56 \pm 3.29 ^a	63.25	10.18 \pm 0.80 ^a	1.85
Cisteína	50.08 \pm 3.03 ^a	12.12	38.08 \pm 2.84 ^a	10.59	11.83 \pm 0.88 ^b	5.66
Cafeína	41.23 \pm 3.09 ^b	19.17	44.50 \pm 2.93 ^b	21.11	14.29 \pm 0.90 ^c	5.99
Ácido Ascórbico	42.33 \pm 3.14 ^b	28.07	45.58 \pm 2.85 ^b	11.82	12.08 \pm 0.88 ^b	5.72
<i>Rhus trilobata</i>	49.91 \pm 3.51 ^a	87.88	39.21 \pm 3.10 ^a	47.46	10.88 \pm 1.01 ^{ab}	11.35

^{a, b, c} Diferentes literales indican diferencia ($P < 0.05$) entre medias de tratamientos dentro de columna.

¹ F, Espermatozoides no capacitados con acrosoma intacto; B, Espermatozoides capacitados con acrosoma intacto; RA, Espermatozoides capacitados con reacción acrosomal.

49.91 ± 3.51 %, respectivamente) con respecto a los otros tratamientos. Los tratamientos que resultaron con mayor ($P < 0.05$) porcentaje de células espermáticas capacitadas fueron CAF (44.50 ± 2.93 %) y AA (45.58 ± 2.85 %). Finalmente, el tratamiento que resultó con mayor ($P < 0.05$) porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal fue la CAF (14.29 ± 0.90 %) en relación a los demás tratamientos.

Bergqvist *et al.* (2006) mencionan que durante el proceso natural de capacitación espermática se producen cambios en la organización de la membrana celular y metabolismo intracelular. Sin embargo, durante la técnica de congelación se produce un suceso al que se le ha nombrado criocapacitación, debido a la similitud ocurrida a nivel celular con respecto al proceso de capacitación natural. Esto se produce mediante el enfriamiento, congelación y descongelación a los que es sometido el espermatozoide (Córdova *et al.*, 2012). Los resultados del presente estudio muestran que el número de células espermáticas capacitadas no se ve afectada mediante la adición del extracto de RT. De conformidad con los resultados de nuestro estudio, otros experimentos que se han desarrollado para determinar el estado acrosomal y de capacitación espermática mediante la adición de extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* en espermatozoides posdescongelado de ovinos (Motlagh *et al.*, 2014) y machos cabríos (Zanganeh *et al.*, 2013), han resultado en un efecto nulo de este extracto sobre el grado de capacitación posdescongelado. Por su parte, Luño *et al.* (2014) mencionan que la integridad del acrosoma no se ve afectada por la adición de *Melissa officinalis* e *Ilex paraguensis* en espermatozoides del epidídimo criopreservado de cerdo.

Al contrario, existen reportes donde algunos extractos naturales adicionados a los diluyentes ayudan a mantener la integridad acrosomal de mejor manera. Cao *et al.* (2013) señalan que la inclusión de 0.06 mg/mL de *Rhodiola sachalinensis* incrementan significativamente la integridad del acrosoma en semen bovino. Shen *et al.* (2015) determinaron que 0.4 mg/mL de *Salvia miltiorrhiza* conserva de mejor manera la integridad acrosomal en semen posdescongelado de cerdo.

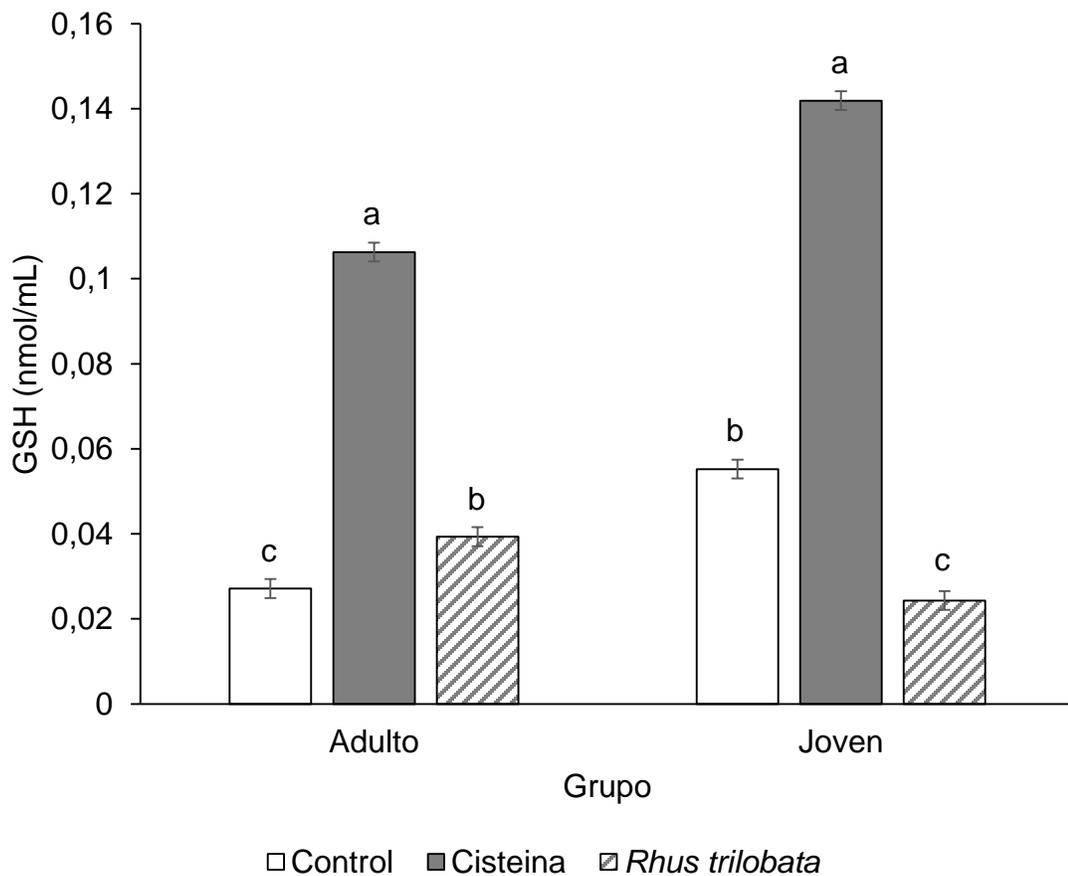
Experimento 2

Niveles intracelulares de glutatión (GSH). En la Gráfica 1 se muestran las medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) para los niveles intracelulares (nmol/mL) de Glutatión (GSH) en el semen bovino posdescongelado adicionado con las diferentes fuentes antioxidantes en el presente estudio. En este caso se observó una interacción entre los efectos de tratamiento y edad. Al comparar los tratamientos dentro de edad del semental, en toros adultos se observaron valores más elevados ($P < 0.05$) de GSH para CIS y RT en comparación al grupo CT (0.106 ± 0.002 , 0.039 ± 0.002 , y 0.027 ± 0.002 nmol/mL, respectivamente), mientras que en toros jóvenes los tratamientos CIS y CT resultaron con niveles mayores ($P < 0.05$) de GSH en comparación al grupo RT (0.142 ± 0.002 , 0.055 ± 0.002 , y 0.024 ± 0.002 nmol/mL, respectivamente).

La molécula de GSH actúa directamente contra varias ROS. Además funciona como un cofactor de la glutatión peroxidasa (GSH-PX), interviniendo contra H_2O_2 e hidroperóxidos tóxicos (Bilodeau *et al.*, 2001). Bilodeau *et al.* (2000) reportan que durante el proceso de criopreservación existe una

disminución de un 78 % en los niveles de GSH espermático en la especie bovina. Esto puede ser debido a una salida de esta enzima debida a la degradación de la membrana celular a consecuencia del estrés oxidativo (Stradaioli *et al.*, 2007). Concordando con los resultados de la presente investigación, existen reportes en machos cabríos de raza Angora, donde con la adición de 10 y 15 mM de cisteína al diluyente de congelación se logró aumentar significativamente los niveles de GSH (Atessahin *et al.*, 2008). Lo anterior, se puede deber a que la cisteína es un precursor intracelular de GSH (Tuncer *et al.*, 2010). Por su parte, Bucak *et al.* (2010) observaron que con la adición de inositol se logró incrementar los niveles de GSH posdescongelado con respecto al grupo control, carnitina y curcumina.

El incremento en GSH en respuesta a la adición de RT al eyaculado de toros adultos puede ser explicado por la existencia de una marcada reducción de las actividades enzimáticas en el plasma seminal conforme aumenta la edad en el toro (Kelso *et al.*, 1997); del mismo modo, El Sisy *et al.* (2016) reportan una tendencia de disminución en los niveles de glutatión reducido en plasma seminal de equino conforme avanza la edad. Lo anterior se puede relacionar con la concentración elevadas de flavonoides que presenta el extracto, estimulando la producción de glutatión intracelular a través del aumento en la expresión de la γ -glutamilcisteína sintetasa (Myhrstad *et al.*, 2001; Moskaug *et al.*, 2005). Además de esto, las células espermáticas en animales adultos están integradas por una mayor cantidad de lípidos (Kelso *et al.*, 1997) resultando en un mayor estrés oxidativo durante el proceso de criopreservación. De este modo, la célula llega a hacer uso de los flavonoides para una mayor síntesis de GSH intracelular.



Grafica 1. Medias de los cuadrados mínimos (\pm error estándar) para los niveles intracelulares (nmol/mL) de Glutación en semen bovino posdescongelado adicionado con diferentes fuentes antioxidantes.
 a, b, c Literales diferentes denotan diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las medias de tratamientos dentro de grupo de edad.

No obstante, existen reportes contradictorios como los publicados por Bucak *et al.* (2010), quienes mencionan que no encontraron incremento alguno en los niveles totales de GSH en semen bovino después del descongelado en respuesta a la adición de metionina, carnitina e inositol. Así mismo, taurina y cisteína no lograron mantener los niveles espermáticos de GSH en semen bovino posdescongelado (Sariözkan *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados del presente estudio muestran que de todos los antioxidantes evaluados, la adición de *Rhus trilobata* (RT) a una concentración de 16.6 µg/mL al diluyente de criopreservación de semen bovino logró conservar mejor las características celulares y la motilidad, en comparación a la utilización de cisteína, cafeína y ácido ascórbico. Así mismo, el extracto RT tiende a mejorar las características cinemáticas de velocidad, sin incrementar la capacitación y reacción acrosomal. Además, los niveles de glutatión se ven favorecidos en toros adultos mediante la adición del extracto RT.

La adición del extracto de RT al diluyente de criopreservación en semen bovino puede ser una alternativa eficaz para reducir el estrés oxidativo ocasionado por el proceso de criopreservación; sin embargo, es necesario determinar la dosis óptima, así como evaluar la capacidad de fertilización, tanto *in vitro* como *in vivo*, con el fin de determinar la eficacia en la mejora de la fertilidad del semen congelado.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, A. y A. Majzoub. 2017. Role of Antioxidants in Assisted Reproductive Techniques. *World. J. Mens. Health.* 35: 77-93.
- Agarwal, A., G. Virk, C. Ong y S. S. du Plessis. 2014. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World. J. Mens. Health.* 32: 1–17.
- Agarwal, A., K. Makker y R. Sharma. 2008. Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59: 2–11.
- Agarwal, A., K. P. Nallella, S. S. Allamaneni y T. M. Said. 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online.* 8: 616-627.
- Agarwal, A., S. Gupta y R. K. Sharma. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3: 28.
- Aires, V. A., K. D. Hinsch, F. Mueller-Schloesser, K. Bogner, S. Mueller-Schloesser y E. Hinsch. 2003. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology.* 60: 269-279.
- Aitken, R. J. 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* 84: 1039-1052.
- Alizadeh, H., A. Khaki, L. Farzadi, M. Nouri, Y. Ahmadi-Asrbadr, G. Seyed-Ghiasi y V. Shahnazi. 2015. The therapeutic effects of a medicinal plant mixture in capsule form on catalase levels in the semen of men with oligospermia. *Crescent J. Med. Biol. Sci.* 34: 9-16.
- Allai, L., X.Druart, M. Öztürk, A. BenMoula, B. Nasser y B. El Amiri. 2016. Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 175: 1-9.
- Amirat, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gérard, J. L. Courtens y M. Anton. 2004. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology.* 61: 895-907.
- Ansari, M. S., B. A. Rakha y S. Akhter. 2011. Effect of L-cysteine in extender on post-thaw quality of Sahiwal bull semen. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 29: 197-203.
- Aprioku, J. S. 2013. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil.* 14: 158-172.

- Ardon, F. y S. S. Suarez. 2013. Cryopreservation increases coating of bull sperm by seminal plasma binder of sperm proteins BSP1, BSP3, and BSP5. *Reproduction*. 146: 111-117.
- Asadmobini, A., M. Bakhtiari, S. Khaleghi, F. Esmaeili y A. Mostafaei. 2017. The effect of *Tribulus terrestris* extract on motility and viability of human sperms after cryopreservation. *Cryobiology*. 75: 154-159.
- Ashrafi, I., H. Kohram y F. F. Ardabili. 2013. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 139: 25-30.
- Asimi, O. A., N. P. Sahu y A. K. Pal. 2013. Antioxidant capacity of crude water and ethyl acetate extracts of some Indian spices and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. *J Med Plant Res.* 7: 1907-1915.
- Atessahin, A., M. N. Bucak, P. B. Tuncer y M. Kızıl. 2008. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. *Small. Rumin. Res.* 77: 38-44.
- Baghshahi, H., A. Riasi, A. H. Mahdavi y A. Shirazi. 2014. Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*. 69: 482-487.
- Ball, P. J. H. y A. R. Peters. 2004. *Reproduction in Cattle*. Third Edition. Blackwell Publishing. UK.
- Bansal, A. K. y G. S. Bilaspuri. 2010. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int.* 2011: 1-7.
- Barakat, I. A., M. A. Danfour, F. A. Galewan y M. A. Dkhil. 2015. Effect of various concentrations of caffeine, pentoxifylline, and kallikrein on hyperactivation of frozen bovine semen. *Biomed Res Int.* 2015: 1-7.
- Bergqvist, A. S., J. Ballester, A. Johannisson, M. Hernandez, N. Lundeheim y H. Rodríguez-Martínez. 2006. *In vitro* capacitation of bull spermatozoa by oviductal fluid and its components. *Zygote*. 14: 259-273.
- Bilodeau, J. F., S. Blanchette, C. Gagnon y M. A. Sirard. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 56: 275-286.
- Bilodeau, J. F., S. Chatterjee, M. A. Sirard y C. Gagnon. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 282-288.

- Bisht, S., M. Faiq, M. Tolahunase y R. Dada. 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 14: 470-485.
- Bó, G. A., J. J. de la Mata, P. S. Baruselli y A. Menchaca. 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology.* 86: 388-396.
- Bucak, M. N., S. Sariözkan, P. B. Tuncer, F. Sakin, A. Ateşşahin, R. Kulaksız y M. Çevik. 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small. Rumin. Res.* 89: 24-30.
- Büyükleblebici, S., P. B. Tuncer, M. N. Bucak, A. Eken, S. Sariözkan, U. Taşdemir y B. Ü. Endirlik. 2014. Cryopreservation of bull sperm: effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Anim. Reprod. Sci.* 150: 77-83.
- Cao, H., X. Sun, Q. Li, S. Zhou, X. Nan, J. Hu, L. Wang y Y. He. 2013. Testing *Rhodiola sachalinensis* saccharide as cryoprotectant for bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 96: 6965-6972.
- Carocho, M. y I. C. Ferreira. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology.* 51: 15-25.
- Chihuailaf, R. H., P. A. Contreras y F. G. Wittwer. 2002. Artículos de revisión Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx.* 33: 265-283.
- Córdova I. A., C. G. Ruiz, C. A. Córdova, M. S. Córdova, J. E. Guerra, B. E. Rodríguez y K. Arancibia. 2009. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 3: 1-38.
- Córdova, A., P. Strobel, O. Ulloa, J. Urrea, C. Contreras, P. Valenzuela, A. Carrillo, R. Burgos, B. Menarim, M. Ratto, J. E. Rodríguez-Gil y A. Ramírez. 2012. Development of stallion sperm cryopreservation extenders by analysis of semen quality and new cryocapacitation markers. *Cryobiology.* 65: 352.
- Çoyan, K., N. Başpınar, M. N. Bucak y P. P. Akalin. 2011. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology.* 63: 1-6.
- da Fonseca, N. da S. P. 2006. Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm. Ph. D. Dissertation. Utrecht University. Netherlands.

- Del Olmo, E., A. Bisbal, A. Maroto-Morales, O. García-Alvarez, M. Ramon, P. Jimenez-Rabadan, F. Martínez-Pastor, A. J. Soler, J. J. Garde y M. R. Fernandez-Santos. 2013. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.* 138: 102-109.
- Devasagayam, T. P. A., J. P. Kamat, H. Mohan y P. C. Kesavan. 1996. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 1282: 63-70.
- Dobson, A. J. 1990. An introduction to generalized linear model. First edition. Chapman and Hall. London, UK.
- Eidan, S. M. 2016. Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender. *Anim. Reprod. Sci.* 167: 1-7.
- El Sisy G. A., A. M. A. El-Maaty y Z. M. Rawash. 2016. Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality. *Asian Pac J Reprod.* 5: 428-433.
- Elliott, G. D., S. Wang y B. J. Fuller. 2017. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low Temperatures. *Cryobiology.* 76: 74-91.
- El-Sheshtawy, R. I., G. A. Sisy y W. S. El-Nattat. 2015. Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the post-thawing quality of cattle bull semen. *Asian Pac J Reprod.* 4: 26-31.
- Embuscado, M. E. 2015. Spices and herbs: natural sources of antioxidants—a mini review. *J Funct Foods.* 18: 811-819.
- Eskenazi, B., S. A. Kidd, A. R. Marks, E. Slotter, G. Block y A. J. Wyrobek. 2005. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum. Reprod.* 20: 1006-1012.
- Evans, G. y W. M. C. Maxwell. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 95-108.
- Foulkes, J. A., D. Sweasey y R. G. Goodey. 1980. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *J. Reprod. Fertil.* 60: 165-169.
- Fraga, C. G., P. A. Motchnik, M. K. Shigenaga, H. J. Helbock, R. A. Jacob y B. N. Ames. 1991. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 11003-11006.

- Fraser, L. R., L. R. Abeydeera y K. Niwa. 1995. Ca²⁺ Regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40: 233-241.
- Gangwar, C., S. D. Kharche, R. Ranjan, S. Kumar, A. K. Goel, S. K. Jindal y S. K. Agarwal. 2015. Effect of vitamin C supplementation on freezability of Barbari buck semen. *Small. Rumin. Res.* 129: 104-107.
- Garbers, D. L., W. D. Lust, N. L. First y H. A. Lardy. 1971. Effects of phosphodiesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry.* 10: 1825-1831.
- García-Ramírez, H. A., C. González-Horta, R. Infante-Ramírez, P. Talamás-Rohana y B. Sánchez-Ramírez. 2016. *In vitro* amoebicidal activity of the fruits and stems extracts of *Rhus trilobata* on *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Toxicol. Lett.* (259), S194 (Abstract).
- Gloria, A., A. Contri, L. Wegher, G. Vignola, D. Dellamaria y A. Carluccio. 2014. The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen–thawed bull semen. *Anim. Reprod. Sci.* 150: 15-23.
- Guerrero-Salgado, F., A. J. Rodríguez-Castillo, R. Infante-Ramírez, M. C. González-Horta, P. Talamás-Rohana y B. Sánchez-Ramírez. 2016. Anti-inflammatory effect of *Rhus trilobata* extracts in lipopolysaccharides-stimulated J774 macrophages. *Toxicol. Lett.* (259), S194 (Abstract).
- Halliwell, B. y J. M. C. Gutteridge. 2015. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Quinta edición. Oxford University Press. U. K.
- Hammerstedt, R. H., J. K. Graham y J. P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.* 11: 73-88.
- Henkel, R. R. 2011. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J. Androl.* 13: 43.
- Híjar-Soto, L. E., C. González-Horta, D. Chávez-Flores y B. Sánchez-Ramírez. 2016. Apoptotic and cytotoxic effect of bioactive fractions of *Rhus trilobata* on colon cancer cells CaCo-2. *Toxicol. Lett.* (259), S193-S194 (Abstract).
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3-22.
- Hu, J. H., W. Q. Tian, X. L. Zhao, L. S. Zan, H. Wang, Q. W. Li y Y. P. Xin. 2010. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Anim. Reprod. Sci.* 121: 72-77.

- Hu, J. H., W. Q. Tian, X. L. Zhao, L. S. Zan, Y. P. Xin y Q. W. Li. 2011. The cryoprotective effects of vitamin B12 supplementation on bovine semen quality. *Reprod. Domest. Anim.* 46: 66-73.
- Kaka, A., H. Wahid, Y. Rosnina, N. Yimer, A. M. Khumran, K. Sarsaifi, A. A. Behan, U. Kaka y M. Ebrahimi. 2015. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 153: 1-7.
- Kelso, K. A., A. Redpath, R. C. Noble y B. K. Speake. 1997. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *J. Reprod. Fertil.* 109: 1-6.
- Keshtmand, Z., S. Oryan, A. Ghanbari y M. Khazaei. 2014. Protective Effect of *Tribulus terrestris* Hydroalcoholic Extract against Cisplatin-Induced Cytotoxicity on Sperm Parameters in Male Mice. *Int. J. Morphol.* 32: 551-557.
- Kessopoulou, E., M. J. Tomlinson, C. L. R. Barratt, A. E. Bolton y I. D. Cooke. 1992. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J. Reprod. Fert.* 94: 463-70.
- Khaleghi, S., M. Bakhtiari, A. Asadmobini y F. Esmaeili. 2017. *Tribulus terrestris* extract improves human sperm parameters *in vitro*. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 22: 407-412.
- Lavranos, G., M. Balla, A. Tzortzopoulou, V. Syriou y R. Angelopoulou. 2012. Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. *Reprod. Toxicol.* 34: 298-307.
- Layek, S. S., T. K. Mohanty, A. Kumaresan y J. E. Parks. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim. Reprod. Sci.* 172: 1-9.
- Leite, T. G., V. R. do Vale Filho, R. P. de Arruda, A. F. C. de Andrade, L. L. Emerick, F. G. Zaffalo, J. A. M. Martins y V. J. de Andrade. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 120: 31-38.
- Longobardi, V., A. Salzano, G. Campanile, R. Marrone, F. Palumbo, M. Vitiello, G. Zullo y B. Gasparrini. 2017. Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology.* 88: 236-243.
- Luño, V., L. Gil, M. Olaciregui, R. A. Jerez, I. Blas y F. Hozbor. 2014. Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*)

- on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa. *Andrologia*. 47: 1004-1011.
- Malo, C., L. Gil, N. Gonzalez, F. Martínez, R. Cano, I. De Blas y E. Espinosa. 2010. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology*. 61: 142-147.
- Malo, C., L. Gil, R. Cano, F. Martínez y I. Galé. 2011. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*. 75: 1735-1741.
- Malo, C., L. Gil, R. Cano, N. González y V. Luño. 2012. Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. *Andrologia*. 44: 710-715.
- Medeiros, C. M. O., F. Forell, A. T. D. Oliveira y J. L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*. 57: 327-344.
- Mehdipour, M., H. D. Kia, A. Najafi, H. V. Dodaran y O. García-Álvarez. 2016. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*. 73: 297-303.
- Melgoza-Castillo, A., C. R. Morales-Nieto, J. Sierra-Tristan, M. H. Royo-Márquez, G. Quintana-Martinez y T. Lebgue-Keleng. 2016. Manual Práctico para la Identificación de las Principales Plantas en los Agostaderos de Chihuahua. Tercera Edición. Universidad Autónoma de Chihuahua. México.
- Memon, A. A., H. Wahid, Y. Rosnina, Y. M. Goh, M. Ebrahimi y F. M. Nadia. 2012. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. *Anim. Reprod. Sci.* 136: 55-60.
- Michael, A. J., C. Alexopoulos, E. A. Pontiki, D. J. Hadjipavlou-Litina, Ph. Saratsis, H. N. Ververidis y C. M. Boscós. 2008. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. *Theriogenology*. 70: 827-835.
- Michael, A., C. Alexopoulos, E. Pontiki, D. J. Hadjipavlou-Litina, P. Saratsis y C. Boscós. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. 68: 204-212.
- Moore, S. G. y J. F. Hasler. 2017. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *J. Dairy Sci.* 100: 10314-10331.

- Morrell, J. M. y M. Wallgren. 2014. Alternatives to antibiotics in semen extenders: A review. *Pathogens*. 3: 934-946.
- Moskaug, J. Ø., H. Carlsen, M. C. Myhrstad y R. Blomhoff. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr*. 81: 277S-283S.
- Motlagh, M. K., M. Sharafi, M. Zhandi, A. Mohammadi-Sangcheshmeh, M. Shakeri, M. Soleimani y S. Zeinoaldini. 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze–thawing process of ram sperm. *Cryobiology*. 69: 217-222.
- Myhrstad, M. C., H. Carlsen, O. Nordström, R. Blomhoff y J. Ø. Moskaug. 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the γ -glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free. Radic. Biol. Med*. 32: 386-393.
- Najafi, A., H. D. Kia, H. Mohammadi, M. H. Najafi, Z. Zanganeh, M. Sharafi, F. Martinez-Pastor y H. Adeldust. 2014. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology*. 69: 68-73.
- Öğretmen, F., B. E. İnanan, F. Kutluyer y M. Kayim. 2015. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*. 83: 1548-1552.
- Padayatty, S. J., A. Katz, Y. Wang, P. Eck, O. Kwon, J. H. Lee, S. Chen, C. Corpe, A. Dutta, S. K. Dutta y M. Levine. 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr*. 22: 18-35.
- Pandey, K. H., K. Mahalingan, S. Sharma, R. Lamsal y V. Amritha. 2014. Antioxidant properties of various fruits, herbs, spices and vegetable: A review. *World J Pharm Pharm Sci*. 3: 1101-1109.
- Panyaboriban, S., J. Suwimonteerabutr, N. Phutikanit, T. Swangchan-Uthai, T. Tharasanit y M. Techakumphu. 2015. Effect of various combinations of sugar supplementation in the extender on frozen-thawed ram semen quality and fertility. *Thai J. Vet. Med*. 45: 229-237.
- Partyka, A., W. Nizański, J. Bajzert, E. Łukaszewicz y M. Ochota. 2013. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. *Cryobiology*. 67: 132-136.
- Perumal, P., S. Selvaraju, S. Selvakumar, A. K. Barik, D. N. Mohanty, S. Das, R. K. Das y P. C. Mishra. 2011. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls

- on sperm parameters and conception rates. *Reprod. Domest. Anim.* 46: 636-641.
- Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging.* 2: 219-236.
- Rehmana, F. U., C. Zhaoa, M. A. Shaha, M. S. Qureshib y X. Wang. 2013. Semen extenders and artificial insemination in ruminants. *Veterinaria.* 1: 1-8.
- Ricci, E., P. Viganò, S. Cipriani, E. Somigliana, F. Chiaffarino, A. Bulfoni y F. Parazzini. 2017. Coffee and caffeine intake and male infertility: a systematic review. *Nutr J.* 16: 37.
- Rigau, T., M. Rivera, M. J. Palomo, J. M. Fernández-Novell, T. Mogas, J. Ballester, A. Peña, P. J. Otaegui, J. J. Guinovart y J. E. Rodríguez-Gil. 2002. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction.* 123: 579–591.
- Rodríguez-Borbón, A. 2017. Efecto de la cafeína y la *Rhus trilobata* sobre el desarrollo de competencia de ovocitos bovinos madurados *in vitro*. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Rodriguez-Gil, J. E. 2006. Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod. Domest. Anim.* 41: 11-20.
- Rodríguez-Palomares, A. I. 2015. Evaluación del potencial antioxidante y antineoplásico de los extractos de *Rhus trilobata* en la línea de cáncer de colon CaCo-2. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chih. México.
- Rzedowski, J. y G. Calderón. 1999. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 78. Instituto de Ecología.
- Sá Filho, M. F., M. O. Marques, R. Giroto, F. A. Santos, R. V. Sala, J. P. Barbuio y P. S. Baruselli. 2014. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology.* 81: 284-290.
- Salamon, S. y W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.
- Sapanidou, V., I. Taitzoglou, I. Tsakmakidis, I. Kourtzelis, D. Fletouris, A. Theodoridis, I. Zervos y M. Tsantarliotou. 2015. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and *in vitro* fertilization. *Theriogenology.* 84: 1273-1282.

- Sarıözkan, S., M. N. Bucak, P. B. Tuncer, P. A. Ulutaş y A. Bilgen. 2009. The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*. 58: 134-138.
- Sarıözkan, S., M. N. Bucak, P. B. Tuncer, S. Büyükleblebici y F. Cantürk. 2014. Influence of various antioxidants added to TCM-199 on post-thaw bovine sperm parameters, DNA integrity and fertilizing ability. *Cryobiology*. 68: 129-33.
- Sarıözkan, S., M. N. Bucak, P. B. Tuncer, S. Büyükleblebici, A. Eken y C. Akay. 2015. Influence of fetuin and hyaluronan on the post-thaw quality and fertilizing ability of Holstein bull semen. *Cryobiology*. 71: 119-124.
- Sathe, S. y C. F. Shipley. 2015. Cryopreservation of Semen. En *Bovine Reproduction*. R. M. Hopper. Eds John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Sharma, R. K. y A. Agarwal. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 4295: 835-850.
- Shen, T., Z. L. Jiang, H. Liu y Q. W. Li. 2015. Effect of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides on boar spermatozoa during freezing–thawing. *Anim. Reprod. Sci.* 159: 25-30.
- Sieme, H., H. Oldenhof y W. F. Wolkers. 2016. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim. Reprod. Sci.* 169: 2-5.
- Singh, V. K., A. K. Singh, R. Kumar y S. K. Atreja. 2013. Development of soya milk extender for semen cryopreservation of Karan Fries (crossbreed cattle). *Cryo Letters*. 34: 52-61.
- Soledad-Fagali, N. 2011. Peroxidación de diferentes especies lipídicas: efecto de antioxidantes. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas Departamento de Química. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Sorensen, A. M. 1982. Reproducción animal, principios y prácticas. 1ª ed. Editorial McGraw-Hill. México. pp. 125-152.
- Stephens, T. D., R. M. Brooks, J. L. Carrington, L. Cheng, A. C. Carrington, C. A. Porr y R. K. Splan. 2013. Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. *J. Equine Vet. Sci.* 33: 615-621.
- Stipanuk, M. H. 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* 24: 539-577.

- Stradaioli, G., T. Noro, L. Sylla y M. Monaci. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*. 67: 1249-1255.
- Tuncer, P. B., M. N. Bucak, S. Büyükleblebici, S. Sarıözkan, D. Yeni, A. Eken, P. P. Akalın, H. Kinet, F. Avdatek, A. F. Fidan y M. Gündoğan. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*. 61: 303-307.
- Tvrđá, E., E. Tušimová, A. Kováčik, D. Paál, H. Greifová, A. Abdramanov y N. Lukáč. 2016. Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Anim. Reprod. Sci.* 172: 10-20.
- Vijayprasad, S., B. B. Ghongane y B. B. Nayak. 2014. Effect of vitamin C on male fertility in rats subjected to forced swimming stress. *J Clin Diagn Res.* 8: HC05-HC08.
- Watson, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60: 481-492.
- Wittayarat, M., A. Ito, T. Kimura, Z. Namula, V. V. Luu, L. T. K. Do, Y. Sato, M. Taniguchi y T. Otoi. 2013. Effects of green tea polyphenol on the quality of canine semen after long-term storage at 5 °C. *Reprod Biol.* 13: 251-254.
- Yamaguchi, S., H. Funahashi y T. Murakami. 2009. Improved fertility in gilts and sows after artificial insemination of frozen-thawed boar semen by supplementation of semen extender with caffeine and CaCl₂. *J. Reprod. Dev.* 55: 645-649.
- Yang, S. M., T. Wang, D. G. Wen, J. Q. Hou y H. B. Li. 2016. Protective effect of *Rhodiola rosea* polysaccharides on cryopreserved boar sperm. *Carbohydr Polym.* 135: 44-47.
- Yániz, J. L., J. A. Mateos y P. Santolaria. 2011. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. *Small Rumin. Res.* 95: 54-60.
- Yániz, J. L., M. A. Marco-Aguado, J. A. Mateos y P. Santolaria. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 122: 142-149.
- Yin, H., L. Xu y N. A. Porter. 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 111: 5944-5972.
- Zanganeh, Z., M. Zhandi, A. Zare-Shahneh, A. Najafi, M. M. Nabi y A. Mohammadi-Sangcheshmeh, A. 2013. Does rosemary aqueous extract improve buck semen cryopreservation?. *Small Rumin. Res.* 114: 120-125.

- Zemjanis, R. 1987. Reproducción animal diagnóstico y técnicas terapéuticas. 1ª Edición. Editorial Limusa. Mexico. D.F. pp. 155-174.
- Zhao, X. L., Y. K. Li, S. J. Cao, J. H. Hu, W. H. Wang, R. J. Hao, L. S. Gui y L. S. Zan. 2015. Protective effects of ascorbic acid and vitamin E on antioxidant enzyme activity of freeze-thawed semen of Qinchuan bulls. Genet. Mol. Res. 14: 2572-2581.