



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Actividad antioxidante de la
Silimarina y sus componentes
(Silidianina, Silicristina y Silibinina) y
su efecto sobre la conservación de
semen porcino (*Sus scrofa*)
refrigerado**

Kelly Vanessa Zapata Carmona

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Área Curricular de Biotecnología
Medellín, Colombia
2022

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Kelly Vanessa Zapata Carmona

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director (a):

Giovanni Restrepo Betancur

Zootecnista, Médico Veterinario, M.Sc y Ph.D en Biotecnología

Línea de Investigación:

Línea de Reproducción animal

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biotecnología Animal GIBA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Área curricular de Biotecnología

Medellín, Colombia

2022

(Dedicatoria o lema)

A mis padres, John y Mery

A mi abuela, quien me guía desde el cielo

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre: Kelly Vanessa Zapata Carmona

Fecha 06/05/2022

Agradecimientos

Agradezco a mi director de tesis, Giovanni Restrepo Betancur, por su paciencia, confianza, asesorías y enseñanzas.

A mi familia y a Luis Fernando Mendoza, por su amor y apoyo incondicional, por ser mi mayor fortaleza y mi motivación.

A Daniela Munera, por su disposición e incondicionalidad en el desarrollo de esta investigación.

A Giovanni Grisales, a los laboratorios de Reproducción animal y de Ciencias de Alimentos (Universidad Nacional, sede Medellín), al profesor Mauricio Rojas y la unidad de citometría de flujo (Universidad de Antioquia), por hacer posible la realización exitosa de la parte experimental de este trabajo.

A la estación agraria San Pablo por facilitar sus machos reproductores, y a sus operarios, por su tiempo y disposición para la colecta del material de investigación.

Al grupo de investigación en Biotecnología Animal (GIBA) y al Politécnico Jaime Isaza Cadavid.

Resumen

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Durante la refrigeración, el espermatozoide porcino puede experimentar estrés oxidativo, osmótico, químico y térmico, que afectan su capacidad fecundante. La adición de antioxidantes al diluyente espermático constituye una alternativa para mitigar dichas alteraciones. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) sometido a refrigeración. Para ello, quince eyaculados de cinco cerdos fueron diluidos en MRA, suplementados con Silimarina, Silibinina, Silicristina y Silidianina y refrigerados cinco días a 16°C. Cada 24 h se evaluó la movilidad y cinética espermática con un CASA IVOS. A las 0 y 96 h se determinaron la funcionalidad de membrana por test hipoosmótico; la producción de EROs y la capacidad antioxidante total (ABTS-FRAP), por espectrofluorimetría; el potencial de membrana mitocondrial, la integridad estructural y la peroxidación lipídica mediante citometría de flujo, con JC-1, SYBR14/IP y Bodipy respectivamente. Se realizaron comparaciones de medias por Duncan, se calculó un índice para calidad espermática y se hicieron análisis de regresión para movilidad y cinética espermática, y para cinética de EROs. La suplementación con Silidianina (10-20 μM) incrementó MT, MP, $\Delta\%M$ y VE, y redujo la producción de EROs. Silicristina, a partir de 20 μM , disminuyó la MT, MP, $\Delta\%M$ y VE. Mientras que Silimarina redujo la producción de EROs/minuto. En definitiva, la Silimarina y sus componentes pueden incrementar la calidad espermática, reducir la generación de EROs, potenciar la CAT y modificar el $\Delta\%M$ en el semen porcino refrigerado.

Palabras clave:

calidad seminal, estado redox, flavonolignanos, refrigeración, Silimarina, semen porcino.

Abstract

Antioxidant activity of silymarin and its components (silydianin, silychristin and silybinin) and their effect on the preservation of refrigerated boar semen (*Sus scrofa*).

In refrigerated conditions, boar spermatozoa are susceptible to oxidative, osmotic, chemical and thermal stress, affecting their fertilizing capacity. The addition of antioxidants to the sperm extender is an alternative to mitigate these alterations. The objective of this research was to evaluate the antioxidant capacity of Silymarin and its components (Silydianin, Silicristin and Silibinin) and their effect on the preservation of refrigerated boar semen (*Sus scrofa*). For this purpose, fifteen ejaculates from five swine were diluted in MRA, supplemented with Silymarin, Silybinin, Silychristin and Silydianin and refrigerated for five days at 16°C. Sperm motility and sperm kinetics were evaluated every 24 h with a CASA IVOS. At 0 and 96 h, membrane functionality was determined by hypoosmotic test; EROs production and total antioxidant capacity (ABTS-FRAP), by spectrofluorimetry; mitochondrial membrane potential, structural integrity and lipid peroxidation by flow cytometry with JC-1, SYBR14/PI and Bodipy probes, respectively. Duncan mean comparisons were performed, an index for sperm quality was calculated and regression analyses were performed for sperm motility and sperm kinetics, and for EROs kinetics. Silydianin supplementation (10-20 μM) increased MT, MP, $\Delta\%M$ and VE, and reduced EROs production. Silychristin, from 20 μM , decreased MT, MP, $\Delta\%M$ and VE. While Silymarin reduced EROs/minute production. In conclusion, Silymarin and its components can improve sperm quality, reduce EROs generation, enhance CAT and modify $\Delta\%M$ in refrigerated boar semen.

Keywords:

Flavonolignans, porcine semen, redox status, refrigeration, seminal quality, Silymarin.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Abstract	X
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Introducción	1
Objetivos	5
Marco teórico	7
Producción porcina	7
Biotecnología reproductiva en porcinos	8
Diluyentes espermáticos porcinos	10
• Composición de los diluyentes espermáticos porcinos	11
Refrigeración y criopreservación de semen porcino	12
• Susceptibilidad del espermatozoide porcino a la refrigeración	14
Estrés oxidativo y defensa antioxidante del semen porcino	16
Uso de antioxidantes en el semen porcino	17
Antioxidantes alternativos para la conservación de semen.....	18
Silimarina	19
• Componentes de la Silimarina	20
Bibliografía	24
Capítulo 1: Efecto de la Silimarina y sus flavonolignanos sobre la calidad espermática del semen porcino refrigerado.....	
32	
1.1. Introducción	34
1.2. Materiales y métodos	36
1.2.1. Localización.....	36
1.2.2. Recolección y procesamiento del material de investigación.....	36
1.2.3. Análisis de la calidad espermática	38
• Movilidad y cinética espermática	38
• Integridad funcional de la membrana plasmática	38
1.2.4. Análisis estadístico	39
1.3. Resultados	40
1.3.1. Movilidad Total.....	40
1.3.2. Movilidad Progresiva.....	42
1.3.3. Cinética espermática	44
1.3.4. Integridad funcional de membrana plasmática	47
1.3.5. Análisis de Regresión lineal	48
1.4. Discusión	51

XII **Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado**

1.5. Conclusiones	58
1.6. Bibliografía	59
Capítulo 2: efecto de la Silimarina y sus componentes sobre el perfil oxidativo/antioxidante y la actividad mitocondrial del semen porcino refrigerado . 64	
2.1. Introducción	67
2.2. Materiales y métodos	69
2.2.1. Localización	69
2.2.2. Recolección y procesamiento del material de investigación	69
2.2.3. Análisis mediante espectrofluorimetría	72
• Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS ^{•+}	72
• Evaluación de la capacidad antioxidante por el método FRAP, reducción del hierro férrico (Fe ⁺³) hasta su forma ferrosa (Fe ⁺²).	72
• Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs).	73
2.2.4. Análisis mediante citometría de flujo	73
• Peroxidación lipídica de la membrana plasmática (LPO).....	73
• Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_M$).	74
• Integridad estructural de membrana plasmática (Vitalidad espermática, VE). ..	74
2.2.5. Análisis estadístico	75
2.3. Resultados	76
2.3.1. Espectrofluorimetría	76
• Capacidad antioxidante total (CAT)	76
• Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)	78
• Análisis de regresión lineal: Cinética - producción de EROs.....	80
2.3.2. Citometría de flujo	82
• Peroxidación lipídica de la membrana plasmática	82
• Potencial de membrana mitocondrial.....	85
• Integridad estructural de la membrana plasmática	88
2.4. Discusión	90
2.5. Conclusiones	100
2.6. Bibliografía	101
Conclusiones y recomendaciones	106
Conclusiones.....	106
Recomendaciones.....	107

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1 Efecto de los antioxidantes sobre la Movilidad Total durante la refrigeración	.41
Figura 1.2 Efecto de los antioxidantes sobre la Movilidad Progresiva durante la refrigeración	43
Figura 1.3 Integridad funcional de membrana en 0 y 96 horas de refrigeración	48
Figura 2.1 Capacidad antioxidante total mediante ensayo ABTS ●+	77
Figura 2.2 Capacidad antioxidante total mediante ensayo FRAP	78
Figura 2.3 Producción de especies reactivas de oxígeno	79
Figura 2.4 Análisis representativo por citometría de flujo de la peroxidación de los lípidos de membrana plasmática	82
Figura 2.5 Peroxidación de los lípidos de membrana a la hora 0 de refrigeración	83
Figura 2.6 Peroxidación de los lípidos de membrana a la hora 96 de refrigeración	84
Figura 2.7 Análisis representativo por citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial	85
Figura 2.8 Potencial de membrana mitocondrial evaluada mediante JC-1	86
Figura 2.9 Análisis representativo por citometría de flujo de la vitalidad espermática ...	88
Figura 2.10 Integridad estructural de membrana plasmática mediante kit live/dead	89

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1 Resumen de estudios realizados en espermatozoides de diferentes especies	22
Tabla 1.2. Cantidad de antioxidante suplementada por tratamiento	37
Tabla 1.3. Efecto de los antioxidantes sobre la cinética espermática durante la refrigeración.....	44
Tabla 1.4. Análisis de regresión lineal, tratamiento - tiempo de refrigeración.....	49
Tabla 2.1. Tratamientos suplementados para las evaluaciones de la Capacidad antioxidante total y la generación de especies reactivas de Oxígeno.....	70
Tabla 2.2. Tratamientos suplementados para las evaluaciones de Potencial de membrana mitocondrial, vitalidad espermática y peroxidación lipídica.....	71
Tabla 2.3. Análisis de regresión para la producción de Especies Reactivas de Oxígeno por Tratamiento y Tiempo.....	80

Abreviaturas

Abreviatura	Término
°C	Grados centígrados
β_1	Coeficiente de Regresión
$\Delta\psi_M$	Potencial de Membrana Mitocondrial
μM	Micromolar
μL	Microlitro
ABTS+•	Radical Catiónico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALH	Amplitud Lateral de Cabeza
ATP	Adenosín Trifosfato
BCF	Frecuencia de Batido de Cola
CASA	Análisis Asistido por Computadora
CAT	Capacidad Antioxidante Total
DMSO	Dimetilsulfoxido
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
EO	Estrés Oxidativo
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura
FRAP	Poder Antioxidante Férrico Reductor
GSH	Glutatión Reducido
h	Horas
HAT	Transferencia de un Átomo de Hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-iletanosulfónico
HOST	Test Hipoosmótico
IA	Inseminación Artificial
LIN	Índice de Linearidad
LPO	Peroxidación Lipídica de la Membrana Plasmática
mOsm	Miliosmol
mOsm/Kg	Miliosmol por Kilogramo
MP	Movilidad Progresiva
MT	Movilidad Total
PUFA	Ácidos Grasos Poliinsaturados
R^2	Coeficiente de Determinación
REDOX	Oxidación - Reducción
SET	Transferencia de un Solo Electrón
SILIB	Silibinina
SILIC	Silicristina
SILID	Silidianina
SILIM	Silimarina
SQi	Índice de Calidad espermático
TEAC	Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox
STR	Índice de Rectitud
VAP	Velocidad Promedio
VCL	Velocidad Curvilínea
VE	Integridad Estructural de la Membrana Plasmática
VSL	Velocidad Rectilínea

Introducción

A lo largo de la historia, la especie porcina se ha relacionado con los humanos de una manera muy singular, siendo animales importantes en diversos ámbitos como el alimenticio, el cultural e incluso el religioso (Price & Hongo, 2019).

El desarrollo de esta especie está influenciado por factores genéticos (Pezo et al., 2019), lo que explica el papel fundamental de la reproducción a la hora de potenciar el crecimiento de estos animales, donde el uso de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, contribuye con la sanidad y el progreso genético (Waberski et al., 2019). Esta importancia toma cada vez más sentido dado que en la actualidad, el consumo de carne de cerdo a nivel mundial ha aumentado, lo que a su vez ha propiciado un incremento en la producción y en las exigencias del mercado en términos de calidad y precio (Pezo et al., 2019).

En este sentido, la reproducción permite un avance constante en la industria porcina, teniendo en cuenta que, prácticas como la inseminación artificial, permiten mayor disponibilidad del material genético de reproductores y favorece el mejoramiento genético (Restrepo et al., 2014).

La principal biotecnología reproductiva empleada en la industria porcina es la inseminación artificial, la cual es realizada en más del 95% con semen refrigerado (Yeste, 2017). El uso de esta práctica ha traído grandes beneficios al sustituir en gran medida la monta natural, permitiendo aprovechar la genética del macho, asegurar la sanidad de la granja y aumentar su rentabilidad (Waberski et al., 2019). No obstante, la refrigeración sumada al estrés oxidativo que esta implica, puede llegar a afectar la integridad, la funcionalidad y la capacidad fertilizante del espermatozoide porcino (Tian et al., 2019), impidiendo así, el desarrollo exitoso de la reproducción.

Esta reducción en la calidad espermática presentada durante la conservación, se debe a la composición de la membrana plasmática del espermatozoide porcino, que, al ser rica en ácidos grasos poliinsaturados y poseer una relación colesterol/fosfolípido inferior a la de otras especies, presenta una menor resistencia a las bajas temperaturas (Li et al., 2017; Parks & Lynch, 1992). Esto, explica el bajo uso de la criopreservación de semen en la industria porcina, práctica que además está enormemente restringida a casas genéticas y

a producciones o entidades donde es necesario el transporte de material seminal a largas distancias (Waberski et al., 2019).

Una de los principales factores que genera esta disminución en la calidad del semen porcino refrigerado, es la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs), moléculas altamente asociadas a la pérdida de permeabilidad y funcionalidad de la célula espermática (Cordova et al., 2009).

De este modo, especies reactivas como los Radicales aniones superóxido, radicales libres hidroxilos, peróxidos de hidrógeno y peróxidos de lípidos tóxicos, generan un impacto negativo en la calidad del espermatozoide, agotan los sistemas antioxidantes, promueven la peroxidación de los lípidos de la membrana, reducen el potencial de membrana mitocondrial, ocasionan la desnaturalización de las proteínas, el deterioro del ADN y la pérdida de la movilidad espermática (Khoi et al., 2021).

En este sentido, una alternativa planteada y usualmente estudiada para disminuir estos efectos deletéreos generados durante la refrigeración es la adición de antioxidantes al diluyente de conservación (Tian et al., 2019), que, al inhibir la formación descontrolada de radicales libres (Cordova et al., 2009) puede llegar a prolongar el mantenimiento de la capacidad fertilizante y mitigar los efectos deletéreos generados en la célula espermática.

En la especie porcina se han estudiado diversas moléculas antioxidantes como la melatonina (Flores et al., 2018), vitamina C y E (Beconi et. al, 1993), glutatión y cisteína (Funahashi & Sano, 2005), ácido rosmarínico (Feng et al., 2020) y ácido salvánico A (Tian et al., 2019), con muy buenos resultados en la conservación de células espermáticas.

Entre estos antioxidantes adicionados al semen, muchos sintéticos, otros naturales, existe un antioxidante alternativo natural conocido como Silimarina, un flavonoide extraído de *Silybum marianum* (cardo mariano), compuesto de varios flavonolignanos, principalmente por Silidianina, Silicristina y Silibinina (Pascual et al., 1993), con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, y que ha cobrado gran importancia en los últimos años dada la eficacia obtenida al ser utilizada como tratamiento para el hígado (Surai, 2015).

En espermatozoides, se ha reportado que la Silimarina, es capaz de eliminar radicales libres, aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes y brindar protección contra la peroxidación de lípidos celulares (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017). En este sentido, se han

encontrado estudios en los cuales la adición de esta molécula al semen bovino, mejoró el porcentaje de membranas intactas y mantuvo la movilidad durante la conservación (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017).

Del mismo modo, se ha evaluado su capacidad de compensar daños ocasionados por arsenito de Sodio en espermatozoide de carnero (Eskandari & Momeni, 2016), por cloruro de Aluminio (Aghashahi et al., 2020) y cloruro de Cadmio (Etemadi et al., 2020) en humanos y por Bisphenol en semen porcino (Jang et al., 2011), mostrando la Silimarina como un antioxidante con excelente capacidad protectora, no obstante, este último estudio ha sido el único hallado hasta el momento con suplementación de esta molécula en espermatozoides porcinos.

La acción terapéutica de la Silimarina también ha sido evaluada en espermatozoides de ratas diabéticas (Pourheydar et al., 2021), y de ratas sometidas a un estrés oxidativo al ser previamente tratadas con acrilamida (Ahmed et al., 2022).

Por otro lado, los flavonolignanicos que componen esta molécula, han mostrado muy buena actividad protectora y diferente capacidad de captación de radicales libres (Dvořák et al., 2003). Y aunque no se han encontrado estudios de Silidianina y Silicristina donde hayan sido adicionados a células espermáticas, se tienen investigaciones en hepatocitos humanos (Vrba et al., 2018) y de ratones (Šuk et al., 2019) que confirman su actividad protectora.

Paralelamente, la Silibinina ha sido estudiada en hepatocitos (Pascual et al., 1993), y en fibroblastos embrionarios de rata (Baeeri et al., 2018), confirmando sus actividades antioxidantes. Además, se han encontrado reportes de estas moléculas en células espermáticas epididimarias de ratas macho, donde se ha demostrado su acción terapéutica ante los efectos tóxicos del metotrexato (Oufi & Al-Shawi, 2014) y del Sulfato de Níquel (Temamogullari et al., 2021). Sin embargo, no se han encontrado trabajos en los que se haya utilizado Silibinina en la refrigeración de semen porcino.

Dicho esto, y ante la poca información encontrada hasta el momento sobre la adición de Silimarina y sus componentes en la conservación de semen, y mucho menos en células porcinas, la presente investigación planteó la adición de Silimarina, Silicristina, Silibinina y Silidianina como antioxidantes suplementados al diluyente espermático porcino para su refrigeración a 16°C. Esto, con miras a disminuir los daños ocasionados durante la

conservación y a su vez, potenciar esta práctica de conservación, que constituye un proceso de suma importancia en busca de maximizar el progreso genético, prolongar la viabilidad celular y mantener la calidad fertilizante del espermatozoide hasta el momento de la inseminación artificial.

Por tanto, este estudio tuvo como objetivo general de investigación, evaluar la capacidad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) sometido a refrigeración. Evaluando específicamente, el impacto de dichas moléculas sobre la movilidad y cinética espermática, la integridad (funcional y estructural) de la membrana plasmática, el estado redox, la peroxidación lipídica y el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides porcinos.

Objetivos

General

Evaluar la capacidad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) sometido a refrigeración.

Específicos

1. Evaluar el efecto de la Silimarina y algunos componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) sobre la calidad espermática del semen porcino refrigerado.
2. Determinar el efecto de la adición de Silimarina y sus componentes en la capacidad antioxidante, el estado redox y la peroxidación lipídica en el semen porcino refrigerado.
3. Evaluar el efecto de la refrigeración de semen porcino suplementado con Silimarina y otros flavonolignanos (Silidianina, Silicristina y Silibinina) sobre la actividad mitocondrial de los espermatozoides.

Marco teórico

Producción porcina

En el año 2018, la producción mundial de carne de cerdo se estimó en 120.5 millones de toneladas, siendo China el país con mayor cantidad de importaciones de esta carne (FAO, 2019), al tiempo que ocupó el primer lugar como productor, con cerca de 54 millones de toneladas métricas, mientras que la Unión Europea y Estados Unidos ocuparon el segundo y tercer lugar respectivamente (Waberski et al., 2019).

En efecto, para el año 2021, la producción mundial de carne (bovino, porcino, pollo y ovino), alcanzó 352.7 millones de toneladas, un 4.2% más que lo producido en el 2020; de este aumento en la producción de carne, gran parte estuvo representado en carne porcina, con 122 millones de Toneladas de carne de cerdo producidas a nivel mundial para el año 2021, un 11.2% más que en el 2020, y donde China, como primer productor, logró incrementar su producción con inversiones a gran escala en el sector y la liquidación de las existencias de porcinos después de la disminución en sus precios (FAO, 2021).

Este mismo reporte publicado por la FAO en el 2021, muestra a Brasil como el país con mayor producción de carne de cerdo de Latinoamérica, seguido de Argentina, Chile y Colombia (FAO, 2021). En este último país, la industria porcina incrementó su producción de carne en un 5% durante el año 2020, pasando de 446603 a 468429 toneladas (Dirección de Cadenas Pecuarias Pesqueras y Acuícolas, 2021), mientras que cerró el 2021 con 491244 toneladas producidas y lleva 383535 a septiembre de 2022, siendo Antioquia el departamento con mayor producción de carne de cerdo en el país (Porkcolombia, s.f)

Paralelamente, el consumo de esta proteína a nivel mundial ha aumentado (Pezo et al., 2019). Como ejemplo de ello está Colombia, cuyo consumo per cápita de carne de cerdo en el 2021 pasó de 10,8 a 12,2 Kg de carne por habitante por año (Porkcolombia, s.f). Por esta situación, la industria porcina se ha visto en la necesidad de producir de una manera sostenible, eficiente y competitiva, incentivando la mejora de factores que potencien el progreso genético y por ende, se aumente la producción y se mejore la calidad (Roca et al., 2015).

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Para este aumento en la productividad se requiere optimizar la eficiencia de la producción. Es por ello que, en la actualidad, la industria porcina se ha convertido en un mercado competitivo que desea mejorar los estándares de calidad de la carne y el rendimiento en la producción. En efecto, la reproducción juega un papel crucial al mejorar su eficiencia mediante la implementación de biotecnologías y la realización de estudios e investigaciones que permitan aumentar la competitividad del sector porcicultor.

Biotechnología reproductiva en porcinos

Las biotecnologías reproductivas, han sido aplicadas durante décadas (Pezo et al., 2019) y son vistas desde un enfoque reproductivo como un conjunto de técnicas que al ser implementadas aumentan la eficiencia en la reproducción y por ende el rendimiento en la producción (Palma, 2008).

El uso de estas herramientas biotecnológicas como la criopreservación, la inseminación artificial, entre otras, permite una mayor disponibilidad del material genético de reproductores de alto interés para su conservación y distribución, lo cual favorece el mejoramiento genético y el valor comercial de la especie para realizar cruzamientos dirigidos (Restrepo et al., 2014).

Las biotecnologías reproductivas mayormente utilizadas en la actualidad son la inseminación artificial y la criopreservación, sin embargo, el uso de esta última depende en gran medida de la especie (Palma, 2008). En primera instancia, la inseminación artificial (IA) aparte de ser la más utilizada, es reconocida globalmente como la herramienta biotecnológica reproductiva de mayor impacto zootécnico, que además de tener la mejor relación costo/beneficio, constituye la base de cualquier otra biotecnología (Palma, 2008).

En cerdos, la IA es la práctica más aplicada donde el 90% de las hembras pertenecientes a granjas porcinas en el mundo, están sometidas a programas comerciales de inseminación artificial (Waberski et al., 2019), y cuya implementación ha sustituido en gran medida la práctica de la monta natural, permitiendo reducir la transmisión de enfermedades, acelerar el progreso genético (Hidalgo, 2013; Fair & Romero-Aguirregomez, 2019) y extender las ventajas genéticas a otras granjas de producción (Knox, 2016).

La primera inseminación artificial en esta especie se dio en el siglo XX con un reporte inicial realizado en Rusia, y con un uso posterior en Japón y varios países de Europa. Sin embargo, su práctica en porcinos ha evolucionado de una manera más lenta al compararse con otras especies como los bovinos (Hidalgo, 2013; Waberski et al., 2019).

Convencionalmente, se vienen realizando inseminaciones artificiales por deposición cervical de semen en una dosis de 80 - 100 mL con una concentración de 2 – 3 billones de espermatozoides (Fair & Romero-Aguirregomezcorta, 2019). No obstante, avances en la técnica como el depositar semen más cerca al sitio de fertilización, han permitido la disminución del volumen y del número de espermatozoides necesarios en una dosis inseminante (Soriano et al., 2013).

Este avance ha permitido que la eficiencia de la inseminación artificial en la producción porcina aumente, incrementando su importancia, trayendo consigo una mayor rentabilidad ante la posibilidad de obtener muchas más dosis inseminantes a partir de un mismo eyaculado. Sin embargo, esta disminución de células por dosis puede asociarse a una reducción en las tasas de preñez y el tamaño de camada, por lo que el semen a usar debe ser de excelente calidad (Fair & Romero-Aguirregomezcorta, 2019).

La calidad de los espermatozoides depende de factores intrínsecos (genéticos) como el reproductor y sus características, y extrínsecos (ambientales) como la temperatura ambiente, el fotoperíodo, el ritmo de recolección del semen, nutrición y entorno social. (Pinart & Puigmulé, 2013).

Adicionalmente, durante el procesamiento del semen los espermatozoides se someten a condiciones que también pueden llegar a alterar la estructura y función celular, entre ellos se encuentra la luz, el oxígeno, la temperatura, los gradientes de pH y fuerzas mecánicas pueden afectar potencialmente la membrana, sus lípidos y proteínas (Leahy & Gadella, 2011). Mientras que otros factores como el diluyente y los días de conservación influyen significativamente en la actividad metabólica del espermatozoide (Dziekońska et al., 2017).

Por esta razón, se han establecido requisitos mínimos de calidad del semen en la especie porcina (Estándar británico) entre ellos, motilidad mayor o igual a 70%, morfología con células anormales menor a 30%, longevidad o células móviles a la fecha de vencimiento

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

mayor o igual a 60% y 0 unidades formadoras de colonias después de 48 h a 37°C; mientras que el estándar ZDS coincide con el primero en motilidad, pero tiene como referencia una morfología anormal máxima de 25%, mínimo 65% de movilidad a las 72 horas de almacenamiento y sin patógenos (Fair & Romero-Aguirregomez, 2019).

Para realizar la inseminación artificial, el semen puede ser almacenado en refrigeración o congelado. Esta conservación permite prolongar la viabilidad de los espermatozoides dado que, a temperatura ambiente, las reservas energéticas de la célula se agotan, experimentando una tasa de supervivencia menor (Cuevas et al., 2013).

Dicho esto, la refrigeración es el método de conservación espermática más simple y práctico. No obstante, este enfriamiento sumado al estrés oxidativo que implica, puede llegar a afectar en gran medida la calidad, la integridad y la funcionalidad del espermatozoide porcino (Tian et al., 2019), e impedir una reproducción exitosa. En efecto, se hace necesaria la adición de diluyentes espermáticos adecuados con el fin de preservar la calidad espermática y la capacidad fecundante (Yeste, 2017).

En el campo investigativo, se han realizado gran cantidad de estudios e investigaciones para diseñar diluyentes eficientes que aumentan la vida útil de los espermatozoides, conservando una fertilidad adecuada hasta el momento de la inseminación y permitiendo a los productores almacenar dosis hasta 15 días sin un deterioro considerable en la calidad espermática (Rodríguez-Gil & Estrada, 2013). Estas soluciones acuosas reducen la actividad metabólica, conservan la función espermática y mantienen un nivel de fertilidad adecuado al brindarle a la célula un medio con las condiciones necesarias para su supervivencia (Yeste, 2017).

Diluyentes espermáticos porcinos

La producción de semen porcino implica diferentes factores que ponen en riesgo su calidad, como lo son el manejo, la salud y la edad del animal, la frecuencia de colecta, la contaminación bacteriana, el procesamiento y el almacenamiento (Rodríguez et al., 2017) para lo cual, es necesaria la adición de un diluyente espermático adecuado.

Estos diluyentes espermáticos porcinos logran aumentar el volumen, proteger la célula contra el choque térmico, proporcionar los sustratos necesarios para el metabolismo de los espermatozoides, estabilizar el pH, inhibir el crecimiento bacteriano y mantener el esperma viable hasta que este sea introducido en el genital femenino (Bortolozzo et al., 2005; Araújo et al., 2016) logrando preservar la vida útil funcional de las células y permitiendo conservar las características espermáticas aceptables por un período aproximado de 3 a 7 días a una temperatura de 15°C a 17°C (Fair & Romero-Aguirregomez, 2019).

Los diluyentes son clasificados a nivel comercial como diluyentes a corto, mediano y largo plazo según su capacidad de conservación espermática que varía entre 1-2, 3-4 o 7-10 días respectivamente (Karageorgiou et al., 2016).

- **Composición de los diluyentes espermáticos porcinos**

Estos medios están compuestos principalmente por nutrientes como glucosa, por sustratos que permiten regular el pH y controlar la presión osmótica, y por antibióticos que evitan la proliferación bacteriana (Yeste, 2017). Además de mantener el metabolismo celular y permitir la motilidad (Rodríguez-Gil & Estrada, 2013).

- **Nutrientes:** La fuente de energía más utilizada en los diluyentes espermáticos es la glucosa ya que genera mejores resultados que otros como la trehalosa y la sacarosa (Gadea, 2003; Pinart & Puigmulé, 2013).
- **Reguladores del pH:** Una vez eyaculado, el semen del cerdo presenta un pH de 7.4 ± 0.2 . La disminución de este parámetro puede alterar y reducir el metabolismo energético y la motilidad del espermatozoide, es por esto que se deben incluir tampones con el fin de controlar las variaciones del pH (Yeste, 2017). El pH de los diluyentes oscila entre 6.8 y 7.1 (Bussalleau & Torner, 2014), y puede utilizarse desde bicarbonato de sodio y citrato de sodio, con capacidad amortiguadora limitada, hasta sistemas más complejos como TES, HEPES o tris que son capaces de regular rangos más amplios en las variaciones del pH (Gadea, 2003).
- **Reguladores de presión osmótica:** El semen de cerdo puede tolerar osmolaridades que pueden variar entre 250 y 390 mOsm, mientras que, la de los diluyentes oscila entre 240 y 380 mOsm/k, por lo tanto, para regular la presión

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

osmótica se utilizan las sales de haluro, como el cloruro de sodio y el cloruro de potasio, siendo este último el más usado (Yeste, 2017).

- **Antibióticos:** El semen de cerdo es susceptible a sufrir contaminación durante la colecta o procesamiento, afectando la integridad y función de los espermatozoides (Bussalleau & Torner, 2014). La proliferación de bacterias puede ser promovida por el contenido de glucosa y por la temperatura de almacenamiento (Yeste, 2017). Diversos estudios se han enfocado a la identificación de antibióticos que permitan mejorar la supervivencia celular (Pezo et al., 2019).

Adicionalmente, pueden presentar otros componentes como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) que tiene propiedades quelantes y limita el movimiento de calcio a través de la membrana plasmática evitando el inicio de la capacitación (Yeste, 2017), o por sustratos que proporcionen fuerza iónica al semen como el bicarbonato sódico, el citrato sódico o el cloruro potásico (Hidalgo, 2013).

Refrigeración y criopreservación de semen porcino

La criopreservación de semen es una biotecnología importante en la difusión de características genéticas, que además de facilitar el aprovechamiento de material genético de gran valor, permite la conservación del eyaculado por tiempo ilimitado y el comercio internacional con el transporte a largas distancias, sin embargo, es una biotecnología poco implementada en porcicultura con un 1% del total de cerdas inseminadas (Waberski et al., 2019).

Este poco uso en la especie porcina, radica principalmente en la menor eficiencia presentada respecto a los resultados obtenidos con semen refrigerado, en efecto, su práctica está restringida a la creación de bancos de germoplasma y a la transferencia de material genético valioso, evidenciando una implementación mucho menor, incluso en entidades comerciales de genética (Waberski et al., 2019).

El implementar la criopreservación en el semen porcino, conduce a que los espermatozoides exhiban una capacidad fertilizante menor, logrando tasas de preñez entre el 60 y el 70% y alcanzando un tamaño de camada entre 9 y 10 cerdas (Knox, 2015),

No obstante, son datos que en la actualidad tienen más posibilidad de variar y obtener rendimientos reproductivos aceptables dado los avances logrados en la implementación de esta técnica (Yeste, 2017).

Sin embargo, la criopreservación ocasiona la muerte celular en el 30 al 50% de los espermatozoides porcinos, mientras que otra cantidad considerable de células pueden sobrevivir, pero experimentan daño criogénico subletal, que generan alteraciones en el transporte de los espermatozoides y en el tiempo de supervivencia en el tracto genital femenino (Waberski et al., 2019).

Estos efectos adversos se deben a criolesiones generadas por la formación de hielo en el medio que rodea a los espermatozoides, al tiempo que la célula experimenta un estrés osmótico que deshidrata las células durante el proceso de la congelación (Rodríguez-Martínez & Wallgren, 2010). Alterando la supervivencia en el tracto femenino, el establecimiento de reservorios de espermatozoides en el útero, la fertilización de los óvulos y la supervivencia del embrión (Knox, 2015).

Adicionalmente, los estudios basados en la criopreservación de semen porcino demuestran un importante interés en modificar protocolos y lograr resultados satisfactorios (Pezo et al., 2019). No obstante, la congelación del eyaculado porcino es aún un proceso complejo, costoso (Yeste, 2017), menos eficiente y poco rentable, al requerir mayor número de espermatozoides y generar menos dosis a partir de un eyaculado (Williams, 2013). Por ello, es considerada una práctica poco factible en un mercado que exige comercializar la carne de cerdo a bajos precios, para lograr competitividad y rentabilidad en la producción.

En este sentido, el semen refrigerado a temperaturas de 5°C o entre 15 y 17°C (Cuervas et al., 2013), constituye el método principal para conservar las dosis seminales porcinas hasta la inseminación artificial (Waberski et al., 2019). Esta situación data desde 1980, donde los inicios de la inseminación artificial y el desarrollo de diluyentes para refrigeración, proporcionó más tiempo para realizar la inseminación al permitir el aumento la vida útil de las dosis seminales refrigeradas a 15 – 17°C (Rodríguez-Gil & Estrada, 2013).

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

De esta manera, más del 95% de las inseminaciones realizadas en la especie porcina utilizan semen líquido refrigerado a 17°C (Yeste, 2017). Esta gran implementación se debe a que el semen refrigerado presenta una mayor conservación de la calidad espermática logrando una eficiencia superior en las tasas de preñez y el número de nacidos vivos (Pezo, 2019).

Incluso se encuentran gran cantidad de investigaciones en las que se estudia el efecto de adicionar diferentes compuestos al diluyente espermático porcino, buscando mantener y mejorar la capacidad fertilizante de las células durante la refrigeración, es decir, a temperaturas entre 15 o 17°C (Pereira et al., 2018), con suplementación de ácido linoleico (Teixeira et al., 2015), Melatonina (Hidalgo et al., 2011), Resveratrol (Martín-Hidalgo et al., 2013), entre otros investigaciones con semen porcino refrigerado.

- **Susceptibilidad del espermatozoide porcino a la refrigeración**

El semen conservado mediante refrigeración experimenta cambios morfológicos y funcionales similares a los procesos del envejecimiento natural (Hidalgo, 2013). Por esto, el manejo de la temperatura de almacenamiento es un factor determinante en el mantenimiento de la calidad espermática, especialmente en el espermatozoide porcino, una célula particularmente susceptible a la reducción de temperatura (Parks & Lynch, 1992; Yeste, 2017), y cuyo descenso desde la corporal hasta la de almacenamiento, genera en la célula un choque térmico y provoca la pérdida de la movilidad espermática y de la viabilidad celular (Hidalgo, 2013).

Vinculado a esto, existen diferencias entre el espermatozoide bovino (resistente al frío) y el porcino (susceptible al frío), que pueden explicar el comportamiento y la resistencia de cada célula frente a la refrigeración (Parks & Lynch, 1992). Estas diferencias están basadas principalmente en la composición lipídica de la membrana (Yeste, 2017), y muestran que el espermatozoide porcino presenta menor contenido de fosfatidilcolina y mayor cantidad de fosfatidil-etanolamina y esfingomielina (de Leeuw et al., 1990), aspectos que lo hacen susceptible a este método de conservación.

Esta susceptibilidad al frío, también puede estar determinada por el contenido de colesterol, uno de los componentes de la bicapa lipídica capaz de aumentar la flexibilidad y la estabilidad mecánica de la membrana, adicionalmente, este componente está

relacionado con la susceptibilidad de los espermatozoides al choque térmico (Juarez, 2009). En efecto, la membrana del espermatozoide porcino tiene menor contenido de colesterol que el de otras especies como bovinos y humanos (Parks & Lynch, 1992). Como consecuencia de la refrigeración se pueden generar alteraciones en la célula porcina, como reducciones en la permeabilidad de la membrana, disminución de la movilidad, de la viabilidad y de la actividad mitocondrial (Huo et al., 2002), ocasionando el descenso de su período fértil.

En definitiva, la refrigeración es el método de conservación espermática más simple y práctico, sin embargo, este enfriamiento sumado al estrés oxidativo que implica, puede llegar a afectar la calidad y la funcionalidad del espermatozoide porcino (Tian et al., 2019). Por esta razón, es de gran importancia determinar la calidad espermática del eyaculado, mediante diferentes técnicas que permiten evaluar diversos parámetros, como el volumen, la morfología, la acción de las mitocondrias (Jung et al., 2015), la funcionalidad de la membrana plasmática con técnicas como la prueba hipoosmótica (Neild et al., 2000) y la movilidad y cinética espermática, no obstante, esta última también es posible analizarla mediante análisis asistido por computadora (CASA) (Jung et al., 2015).

La determinación de la movilidad es considerada como la base de toda evaluación rutinaria de la calidad del semen (Restrepo et al., 2013), constituyendo un análisis primordial para el control de este factor en un eyaculado. Algunos autores han mostrado a la motilidad como la columna vertebral de las evaluaciones espermáticas, mientras que, el desarrollo de sistemas CASA ocurrido en las últimas décadas, ha permitido obtener gran cantidad de información, con datos funcionales de velocidad y subpoblaciones espermáticas (Fair & Romero-Aguirregomez, 2019), otorgando resultados mucho más objetivos y precisos (Restrepo et al., 2013)

Adicionalmente, se cuenta con pruebas alternativas que son más innovadoras y de mayor precisión, como es el caso de aquellas evaluaciones que emplean espectrofluorimetría y citometría de flujo. Estas, son posibles gracias al descubrimiento de sondas y fluorocromos que permiten visualizar y cuantificar la fluorescencia emitida por la célula y sus compartimentos, logrando realizar un análisis más completo de los espermatozoides (Restrepo et al., 2013), logrando evaluar parámetros como el potencial de membrana mitocondrial (Guo et al., 2017), integridad estructural de membrana plasmática (Merino et

al., 2017), fragmentación de ADN (Darzynkiewicz et al., 1992), peroxidación lipídica (Awda et al., 2009), estabilidad de membrana (Kavak et al., 2003), producción de especies reactivas de oxígeno (Guthrie & Welch, 2006), capacidad antioxidante total (Ou et al., 2001), entre muchas otras.

Estrés oxidativo y defensa antioxidante del semen porcino

El metabolismo del espermatozoide produce una serie de moléculas denominadas especies reactivas de oxígeno (EROs) que incluye aniones superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radicales hidroxilos ($\bullet OH$), óxido nítrico (NO) y peroxinitrito (ONOO) (Rhoades et al., 1990; Cuevas et al., 2013).

El alto contenido de ácidos grasos y la poca cantidad de citoplasma en la célula espermática favorece la producción de estas especies reactivas de oxígeno (Hidalgo, 2013). Estas especies llegan a ser esenciales y determinantes para el cumplimiento de ciertas funciones normales en los espermatozoides como lo son la capacitación, la hiperactivación y la reacción del acrosoma, sin embargo, su acumulación induce a un estrés oxidativo (Bollwein & Bittner, 2018) y afectar negativamente la calidad espermática y la capacidad fertilizante (Agarwal et al., 2014).

Las EROs más comunes encontradas en los espermatozoides porcinos e implicadas en el daño oxidativo son el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Guthrie & Welch, 2006). Un incremento en los niveles de EROs suele estar asociado a la presencia de espermatozoides no funcionales, siendo los leucocitos y los espermatozoides inmaduros la principal fuente endógena de estas moléculas (Garrido et al., 2004).

La conservación tanto en refrigeración como congelado produce estrés oxidativo, el cual es generado al existir un equilibrio a favor de los radicales libres como consecuencia del agotamiento en el nivel de antioxidantes (Bollwein & Bittner, 2018; Faudale et al., 2008). Este estrés oxidativo puede afectar los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e incluso azúcares (Bollwein & Bittner, 2018).

Los lípidos, que están presentes en la membrana plasmática son los más susceptibles a sufrir daño a causa del estrés oxidativo, dado que las EROs atacan los ácidos grasos

poliinsaturados y producen una serie de reacciones químicas en cadena (peroxidación lipídica), como consecuencia de la acumulación de EROs, al romperse el equilibrio entre la generación de estas moléculas y la acción de defensa (Agarwal et al., 2008; Bollwein & Bittner, 2018).

La peroxidación lipídica genera lípidos peroxidados que al ser degradados generan nuevos radicales libres y compuestos citotóxicos (Hidalgo et al., 2013). Esta serie de reacciones pueden ocasionar la pérdida de hasta el 60% de ácidos grasos presentes en la membrana como el docosahexanoico (Jones et al., 1979), afectando la integridad de la membrana, su cohesión, fluidez, permeabilidad y función, llegando incluso a producir la muerte celular (Hidalgo, 2013).

Este aumento en las EROs, también puede afectar a las proteínas, ocasionando pérdida de la actividad catalítica de las enzimas, daño en la integridad de proteínas estructurales, oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, escisión de los enlaces peptídicos e incluso, la interrupción de la regulación de vías metabólicas (Cárdenas & Pedraza, 2006).

Las EROs también pueden afectar el ADN, principalmente el ADN mitocondrial dado que este se encuentra más expuesto a las EROs provenientes de la cadena respiratoria y presenta menor estabilidad al carecer de histonas (Cordova et al., 2009). Estas EROs reaccionan con las bases nitrogenadas y la desoxirribosa, generando daño en el ADN al modificar, causar rotura de filamentos y provocar la liberación de bases (Cárdenas & Pedraza, 2006; Bollwein & Bittner, 2018). El ADN en presencia de EROs sufre fragmentación, alteración en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina, afectando su funcionalidad (Cárdenas & Pedraza, 2006).

Uso de antioxidantes en el semen porcino

Los espermatozoides porcinos están equipados con un sistema antioxidante presente a nivel intracelular y en el plasma seminal, que contrarresta los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno producidas durante el estrés oxidativo generado en la conservación, sin embargo, este sistema tiende a ser relativamente débil (Hidalgo, 2013). Dentro de este sistema antioxidante se encuentran varias enzimas, entre las que se

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

destaca la superóxido dismutasa (SOD) cuya concentración disminuye durante el proceso de refrigeración, crioconservación y postdescongelamiento, aumentando la susceptibilidad de los espermatozoides a la acción de los radicales libres (Martí et al., 2008).

Por su parte, un antioxidante es definido como una sustancia que cuando se encuentra presente en bajas concentraciones respecto a los sustratos oxidables, retrasa o anula la oxidación de dicho sustrato, además tiene la capacidad de prevenir la formación descontrolada de radicales libres e inhibir sus reacciones (Membrillo Ortega et al., 2003).

En la actualidad, se han realizado diversos estudios suplementando los diluyentes espermáticos porcinos con diferentes tipos de antioxidantes como la melatonina (Flores et al., 2018; Hidalgo, 2013), y otros más con vitaminas como la C y la E (Beconi et al., 1993); todo ello, en busca de evitar los cambios y efectos perjudiciales que suceden durante la conservación espermática. Sin embargo, una concentración alta de estos antioxidantes en la suplementación de los diluyentes puede afectar la integridad funcional del acrosoma y la membrana celular (Zhang et al., 2015), alterando así, la funcionalidad espermática.

Antioxidantes alternativos para la conservación de semen

En los últimos años, ha existido un interés particular en estudiar la fisiología espermática durante su almacenamiento y encontrar alternativas que permitan conservar una calidad óptima hasta la inseminación, aumentando el interés de hallar antioxidantes naturales que además de ser amigables con el ambiente, tengan una buena capacidad protectora (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017).

En la especie porcina, los estudios basados en la suplementación de diluyentes espermáticos con antioxidantes alternativos no son muy abundantes, sin embargo, se reportan estudios de moléculas naturales como el Resveratrol y su uso como antioxidante en diluyentes espermáticos porcinos, sin embargo, su suplementación en estos espermatozoides ha evidenciado un efecto deletéreo ocasionando la caída en el contenido de ATP y la reducción en el potencial de membrana mitocondrial y en la movilidad (Martín-Hidalgo et al., 2013).

Silimarina

La Silimarina constituye un flavonoide polifenólico con función antioxidante que se extrae de las semillas de cardo mariano (*Silybum marianum*) (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017), capaz de eliminar radicales libres, aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes y brindar protección contra la peroxidación de lípidos celulares. Esta molécula, tiene actividad antioxidante y protectora contra enfermedades cardiovasculares y otras patologías asociadas a este tejido como lo son la hipertensión inducida por estrés oxidativo, arteriosclerosis y toxicidad cardiaca (Taleb et al., 2018)

En la actualidad, se han realizado diversas investigaciones, una de ellas confirma la actividad antifatiga del extracto de Silimarina en ratones (Jia & Zhao, 2022), mientras que otras investigaciones demuestran su efecto protector, entre ellas se encuentra la administración de esta molécula a nivel intraperitoneal y su acción protectora en células cardiacas de rata expuestas a fluoruro de sodio (Nabavi et al., 2012). Así mismo, se ha evaluado su efecto en células hepáticas, donde dicha molécula disminuyó los efectos nocivos causados por la ictericia crónica en hepatocitos de rata (Onalan et al., 2016), obteniendo en ambos estudios, resultados muy positivos en cuanto a la capacidad antioxidante y de protección de la Silimarina.

En un estudio basado en el efecto antioxidante y el mecanismo de acción de la Silimarina en enfermedades cardiovasculares inducidas por estrés oxidativo, se detalla que esta molécula actúa como captador de radicales libres y mejora la acción de enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, potenciando la actividad antioxidante propia de la célula, al tiempo que mejora la actividad de enzimas mitocondriales, aumenta la activación de ribosomas y la síntesis de proteínas, incrementando la capacidad regenerativa (Taleb et al., 2018).

También se ha encontrado que la Silimarina puede actuar sobre la permeabilidad de la membrana celular y aumentar su estabilidad, al unirse a varias proteínas de membrana y modificar funciones de transportadores y receptores celulares (Taleb et al., 2018). Adicionalmente, la Silimarina es una molécula capaz de prevenir la formación de radicales libres al inhibir enzimas específicas de la producción de EROs, mejorar la integridad de las

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

mitocondrias, optimizar la cadena transportadora de electrones cuando se encuentra en condiciones de estrés y reducir la fuga de estos (Taleb et al., 2018).

- **Componentes de la Silimarina**

La Silimarina, es una molécula descrita como una mezcla de flavonolignanos caracterizados como Silidianina, Silicristina y Silibina (Pascual et al., 1993; Surai, 2015), esta última también conocida como Syn, Silibin o Silibinina (Andrzejewska et al., 2015). La capacidad de captación de radicales libres entre estos componentes es variable, con estudios que muestran que los flavonolignanos menos abundantes, Silicristina y Silidianina, tienen mayor actividad que la Silibinina, siendo este último el compuesto de la Silimarina más abundante y estudiado (Dvořák et al., 2003; Surai, 2015). Incluso, se ha encontrado que, la Silimarina, llega a ser hasta 8 veces más potente que la Silibinina, como eliminador de radicales libres (Surai, 2015).

También, se han encontrado otros estudios donde se ha evaluado el efecto de usar Silidianina y Silicristina en hepatocitos de ratones (Šuk et al., 2019) y de humanos (Vrba et al., 2018). constituyendo de esta manera, un enfoque preventivo contra enfermedades generadas por estrés oxidativo. Adicionalmente, la Silidianina, ha sido evaluada en neutrófilos polimorfonucleares, donde redujo la producción de radicales superóxidos, la peroxidación lipídica y exhibió una buena capacidad para eliminar radicales libres (Zielińska-Przyjemska & Wiktorowicz, 2006).

Paralelamente, existen investigaciones sobre la Silibinina en las que la evaluación de esta molécula en células hepáticas, demuestra que su actividad protectora está basada en la capacidad para captar radicales libres y acelerar la regeneración de los hepatocitos (Pascual et al., 1993). De la misma manera, se evaluó el efecto de la Silibinina en células de fibroblastos embrionarios de rata expuestas a peróxido de hidrógeno, confirmando la actividad antioxidante y antiinflamatoria propia de esta molécula (Baeeri et al., 2018).

- **Uso de Silimarina y sus componentes en células espermáticas**

La suplementación de Silimarina en diluyentes espermáticos se ha realizado con el fin de evaluar su efecto protector en la conservación celular.

En la actualidad, se han realizado varios estudios en espermatozoides de diversas especies, entre ellos, se ha encontrado su efecto a nivel terapéutico en espermatozoides de rata sometidos previamente a un estrés oxidativo con acrilamida (Ahmed et al., 2022) y en ratas diabéticas (Pourheydar et al., 2021).

Adicionalmente, se encuentra la suplementación con Silimarina en diluyentes espermáticos bovinos, donde se logró conservar el semen de toro en refrigeración hasta por 8 o 9 días y con una calidad adecuada para ser usado en Inseminación artificial según la concentración adicionada, además de mejorar el porcentaje de células vivas y con membranas intactas posdescongelación, y mantener la motilidad espermática. Concluyendo así, que la adición de Silimarina mejoró la conservación en semen de toro refrigerado y congelado (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017).

Del mismo modo, se tiene reporte de la suplementación de esta molécula en los diluyentes espermáticos de carnero, donde la adición de Silimarina demostró su capacidad antioxidante y protectora en parámetros como la viabilidad, movilidad y potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides tratados previamente con arsenito de sodio. En este estudio se mostró a la Silimarina como una molécula capaz de compensar los efectos tóxicos del arsenito de sodio y mejorar la capacidad del sistema antioxidante propio del plasma seminal (Eskandari & Momeni, 2016).

Asimismo, es posible encontrar dos estudios realizados en espermatozoides humanos, donde se muestra a la Silimarina como un potente antioxidante capaz de compensar los efectos negativos producidos por el cloruro de Aluminio sobre la calidad espermática y peroxidación lipídica (Aghashahi et al., 2020) y mitigar la toxicidad generada por Cloruro de Cadmio (Etemadi et al., 2020).

Por último, y no menos importante, se reporta un único estudio donde se evaluó el efecto protector de la Silimarina en espermatozoides porcinos previamente sometidos a Bisphenol, permitiendo mejorar y compensar las características espermáticas de las células porcinas, aun en presencia de compuestos tóxicos (Jang et al., 2011).

Hasta el momento, no se han encontrado reportes de Silidianina y Silicristina en espermatozoides de ninguna especie, pero su acción protectora descrita en diferentes

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

tipos de células, hacen que sean consideradas como alternativas viables en la preservación de semen porcino.

No obstante, se encontraron algunos reportes del efecto de la Silibinina en células espermáticas del epidídimo de ratas macho, donde se demuestra que su administración vía intraperitoneal, generó la disminución en el porcentaje de espermatozoides muertos / vivos, aumentó la motilidad espermática vs espermatozoides de animales sin Silibinina y logró mitigar los efectos tóxicos del metotrexato en el tejido testicular (Oufi & Al-Shawi, 2014), mientras que conservó la motilidad, el número de células viables y mostró un efecto protector sobre el tejido testicular en ratas macho tratadas con del Sulfato de Níquel (Temamogullari et al., 2021).

A continuación, se evidencia en la **tabla 1.1**, un resumen de los artículos encontrados donde se evalúan las moléculas estudiadas en la presente tesis y su efecto en espermatozoides de diferentes especies. Esta tabla solo incluye estudios basados en la adición de Silimarina y Silibinina, dado que, hasta el momento, no se han encontrado investigaciones que evalúen la actividad de Silicristina y Silidianina en células espermáticas.

Tabla 1.1 Resumen de estudios realizados en espermatozoides de diferentes especies

Molécula	Especie	Artículo	Autores	Año
Silimarina	Porcino	Protective Effects of Silymarin against the Toxicity of Bisphenol A (BPA) on Boar Sperm	Jang et al.	2011
	Carnero	Protective effect of Silymarin on viability, motility and Impact of membrane potential of ram sperm treated with sodium arsenite	Eskandari, F., & Momeni, H. R.	2016
	Carnero	Effect of Different Levels of Silymarin and Caproic impact Storage of Ram Semen in Liquid Form	Roostaei-Ali, M., Parisoush, P.	2016
	Bovino	Impact of Silymarin enriched semen extender on bull sperm	El-Sheshtawy, R., & El-Nattat, W.	2017
	Humano	Impact of aluminium toxicity on vital human sperm parameters—Protective effects of Silymarin	Aghashahi et al.	2020
	Humano	Impact of Silymarin on cadmium-induced apoptosis in human spermatozoa	Etemadi et al.	2020
	Ratas	Effect of Silymarin and metformin on the sperm parameters and histopathological changes of testes in diabetic rats: An experimental study	Pourheydar et al.	2021
	Ratas	Silymarin abrogates acrylamide-induced oxidative stress-mediated testicular toxicity via modulation of antioxidant mechanism, DNA damage, endocrine deficit and sperm quality in rats.	Ahmed et al.	2022

Silibinina	Ratas	The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice	Oufi, H. G., & Al-Shawi, N. N.	2014
	Ratas	Protective role of silibinin over nickel sulfate-induced reproductive toxicity in male rats	Temamogullari et al.	2021

Bibliografía

- Agarwal, A., Makker, K., & Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *American Journal of Reproductive Immunology*, 59(1), 2–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x>
- Agarwal, A., Virk, G., Ong, C., & du Plessis, S. S. (2014). Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1), 1. <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>
- Aghashahi, M., Momeni, H. R., & Darbandi, N. (2020). Impact of aluminium toxicity on vital human sperm parameters—Protective effects of silymarin. *Andrologia*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/and.13742>
- Ahmed, H., Amin, H., Clement, A. (2022). Silymarin abrogates acrylamide-induced oxidative stress-mediated testicular toxicity via modulation of antioxidant mechanism, DNA damage, endocrine deficit and sperm quality in rats. *Andrologia*, 54(9). <https://doi.org/10.1111/and.14491>
- Andrzejewska, J., Martinelli, T., & Sadowska, K. (2015). *Silybum marianum*: non-medical exploitation of the species. *Annals of Applied Biology*, 167(3), 285–297. <https://doi.org/10.1111/AAB.12232>
- Araújo, L. R. S., Barros, T. B., Guimarães, D. B., Cantanhêde, L. F., Dias, A. V., & Toniolli, R. (2016). Uso de diluentes e temperaturas alternativas na conservação prolongada do sêmen do varrão. *Ciencia Animal Brasileira*, 17(1), 26–35. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i118885>
- Awda, B. J., Mackenzie-Bell, M., & Buhr, M. M. (2009). Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of Reproduction*, 81(3), 553–561. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076471>
- Baeri, M., Mohammadi-Nejad, S., Rahimifard, M., Navaei-Nigjeh, M., Moeini-Nodeh, S., Khorasani, R., & Abdollahi, M. (2018). Molecular and biochemical evidence on the protective role of ellagic acid and silybin against oxidative stress-induced cellular aging. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 441(1–2), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3172-0>
- Beconi M.T., Francia C.R., Mora N.G., Affranchino M.A. (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40841-851
- Bollwein, H., & Bittner, L. (2018). Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. *Animal Reproduction*, 15, 703–710. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0041>
- Bortolozzo, F.P., Wentz, I., Dallanora, D. (2005). Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.17-32. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.14429>
- Bussalleau, E., & Torner, E. (2014). Quality Improvement of Boar Seminal Doses. In *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends* (pp. 517–546). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8>
- Cárdenas, N., & Pedraza, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2006.2.66056>

- Córdova, A., Ruiz, C., Córdova, C., Córdova, M., Eulogio, J., Guerra, J., Rodríguez, B., & Salinas, K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Computense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 1–38.
- Cuevas, M., Romero, F., & Parodi, J. (2013). Reactive oxygen species can alter physiological parameters of sperm; the future of macromolecules in boar semen dilutions. *International Journal of the Bioflux Society*, 3(2), 40–49.
- Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M., Lassota P., & Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13, 795-808.
- de Leeuw, F. E., Chen, H. C., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1990). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, 27(2), 171–183. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90009-5](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90009-5)
- Dirección de Cadenas Pecuarias Pesqueras y Acuícolas. (2021). *Cadena cárnica porcina*.
- Dvořák, Z., Kosina, P., Walterová, D., Šimánek, V., Bachleda, P., & Ulrichová, J. (2003). Primary cultures of human hepatocytes as a tool in cytotoxicity studies: Cell protection against model toxins by flavonolignans obtained from *Silybum marianum*. *Toxicology Letters*, 137(3), 201–212. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00406-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00406-X)
- Dziekońska, A., Świader, K., Kozirowska-Gilun, M., Mietelska, K., Zasiadczyk, L., & Kordan, W. (2017). Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 20(1), 77–84. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2017-0011>
- El-Sheshtawy, R., & El-Nattat, W. (2017). Impact of silymarin enriched semen extender on bull sperm preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 6(2), 81–84. <https://doi.org/10.12980/apjr.6.20170206>
- Eskandari, F., & Momeni, H. R. (2016). Protective effect of silymarin on viability, motility and mitochondrial membrane potential of ram sperm treated with sodium arsenite. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(6), 397–402. <https://doi.org/10.29252/ijrm.14.6.397>
- Etemadi, T., Reza, H., & Asghar, A. (2020). Impact of silymarin on cadmium-induced apoptosis in human spermatozoa. *Andrologia*, 52(11), 1-9. <https://doi.org/10.1111/and.13795>.
- Fair, S., & Romero-Aguirregomezcorta, J. (2019). Implications of boar sperm kinematics and rheotaxis for fertility after preservation. *Theriogenology*, 137, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.032>
- FAO. (2019). Meat market review. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, March*, 1–11.
- FAO. (2021). Meat market review. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, December* 1–15

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

- Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., & Codina, C. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(6), 1912–1920. <https://doi.org/10.1021/jf073083c>
- Feng, T. Y., Lv, D. L., Zhang, X., Du, Y. Q., Yuan, Y. T., Chen, M. J., Xi, H. M., Li, Y., Han, N., & Hu, J. H. (2020). Rosmarinic acid improves boar sperm quality, antioxidant capacity and energy metabolism at 17°C via AMPK activation. *Reproduction in Domestic Animals*, *55*(12), 1714–1724. <https://doi.org/10.1111/rda.13828>
- Flores, C., Meléndez, C., Mendoza, C., Márquez, Y., & Vilanova, L. T. (2018). Efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdo. *Revista Veterinaria*, *29*(1), 13. <https://doi.org/10.30972/vet.2912780>
- Funahashi, H., & Sano, T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology*, *63*(6), 1605–1616. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>
- Gadea, J. (2003). Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *1*(2), 17. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- Garrido N., Meseguer M., Simon C., Pellicer A., Remohi J. (2004). Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian J Androl*, *6*:59–65.
- Guo, H., Gong, Y., He, B., & Zhao, R. (2017). Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. *Theriogenology*, *87*, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.005>
- Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, *84*(8), 2089–2100. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-766>
- Hidalgo, D. M., Barón, F. J., Bragado, M. J., Carmona, P., Robina, A., García-Marín, L. J., & Gil, M. C. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology*, *75*(8), 1550–1560. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.021>
- Hidalgo, D. M. (2013). Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. In *Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado*. [Universidad de Extremadura]. <https://dehesa.unex.es:8443/handle/10662/799?mode=full>
- Huo, L. J., Ma, X. H., & Yang, Z. M. (2002). Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, *58*(7), 1349–1360. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00953-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00953-6)
- Jang, H.-Y., Kong, H. S., Choi, B.-Y., Shin, J.-S., Cheong, H.-T., Kim, J.-T., Park, I.-C., Park, C.-K., & Yang, B.-K. (2011). Protective Effects of Silymarin against the Toxicity of Bisphenol A (BPA) on Boar Sperm Quality. *Journal of Embryo Transfer*, *26*(4), 257–263.

- Jia, L., & Zhao, F. (2022). Evaluation of silymarin extract from *Silybum marianum* in mice: anti-fatigue activity. *Food Science and Human Wellness*, 11(4), 914–921. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.03.017>
- Jones, R., Mann, T., & Sherins, R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31(5), 531–537. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)43999-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43999-3)
- Juarez, J. D. (2009). *Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de espermatozoides porcinos*. [Universidad de Murcia]. <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/14316>
- Jung, M., Rüdiger, K., & Schulze, M. (2015). In Vitro Measures for Assessing Boar Semen Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20–24. <https://doi.org/10.1111/RDA.12533>
- Karageorgiou, M. A., Tsousis, G., Boscós, C. M., Tzika, E. D., Tassis, P. D., & Tsakmakidis, I. A. (2016). A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. *Acta Veterinaria Brno*, 85(1), 23–31. <https://doi.org/10.2754/avb201685010023>
- Kavak, A., Johannisson, A., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., Aidnik, M., & Einarsson, S. (2003). Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and Flow cytometry. *Animal Reproduction Sciences*, 76, 205–216. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00247-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00247-6)
- Khoi, H. X., Shimizu, K., Yoneda, Y., Minagawa, I., Abe, Y., Kuwabara, Y., Sasanami, T., & Kohsaka, T. (2021). Monitoring the reactive oxygen species in spermatozoa during liquid storage of boar semen and its correlation with sperm motility, free thiol content and seasonality. *Andrologia*, 53(11), e14237. <https://doi.org/10.1111/AND.14237>
- Knox, R. V. (2015). The fertility of frozen boar sperm when used for artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 90–97. <https://doi.org/10.1111/rda.12552>
- Leahy, T., & Gadella, B. M. (2011). Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(SUPPL. 2), 7–13. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01799.x>
- Li, H., Zhang, X. G., Fang, Q., Liu, Q., Du, R. R., Yang, G. S., Wang, L. Q., & Hu, J. H. (2017). Supplemental effect of different levels of taurine in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17°C. In *Animal Science Journal* (Vol. 88, Issue 11, pp. 1692–1699). <https://doi.org/10.1111/asj.12865>
- Marti E., Marti J., Muiño T., Cebrián J. (2008). Effect of the cryopreservation process on the activity and immuno-localization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androloly*, 29, 459-467
- Martín-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Henning, H., Wallner, U., Waberski, D., Bragado, M. J., Gil, M. C., & García-Marín, L. J. (2013). The Effect of Resveratrol on the Quality of Extended Boar Semen

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

During Storage at 17°C. *Journal of Agricultural Science*, 5(8), 231–242. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n8p231>

Membrillo Ortega, A., Córdova Izquierdo, A., Hicks Gómez, J. J., Olivares-Corichi, I. M., Martínez Torres, V. M., & Valencia Mendez, J. D. J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, 28(12).

Merino, O., Figueroa, E., Cheuquemán, C., Valdebenito, I., Isachenko, V., Isachenko, E., Sánchez, R., Farías, J., & Risopatrón, J. (2017). Short-term storage of salmonids semen in a sodium alginate-based extender. *Andrologia*, 49(5), 1–5. <https://doi.org/10.1111/and.12661>

Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., Moghaddam, A. H., Setzer, W. N., & Mirzaei, M. (2012). Effect of silymarin on sodium fluoride-induced toxicity and oxidative stress in rat cardiac tissues. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 84(4), 1121–1126. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000056>

Neild, D. M., Chaves, M. G., Flores, M., Miragaya, M. H., Gonzalez, E., & Agüero, A. (2000). The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*, 32(6), 351–355. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0272.2000.00357.X>

Onalan, A. K., Tuncal, S., Kilicoglu, S., Celepli, S., Durak, E., Kilicoglu, B., Devrim, E., Barlas, A. M., & Kismet, K. (2016). Effect of silymarin on oxidative stress and liver histopathology in experimental obstructive jaundice model. *Acta Cirurgica Brasileira*, 31(12), 801–806. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020160120000004>

Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*, 49(10):4619-26. doi: <https://doi.org/10.1021/jf010586o>

Oufi, H. G., & Al-Shawi, N. N. (2014). The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice. *European Journal of Pharmacology*, 730(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.02.010>

Palma, G. A. (2008). Biotecnología de la reproducción, ciencia, tecnología y sociedad, *Biotecnología de la reproducción* (1-36)

Parks, J. E., & Lynch, D. v. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255–266. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-V](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-V)

Pascual, C., Gonz, R., Armesto, J., & Muriel, P. (1993). Effect of silymarin and silybinin on oxygen radicals. *Drug Development Research*, 29(1), 73–77. <https://doi.org/10.1002/ddr.430290109>

Pereira, B. A., Chaves, B. R., Teles, M. C., Pontelo, T. P., Oliveira, C. R., de Souza, R. v., Rodríguez-Gil, J. E., & Zangeronimo, M. G. (2018). Chlorogenic acid improves the quality of boar semen subjected to cooled storage at 15°C. *Andrologia*, 50(5), e12978. <https://doi.org/10.1111/AND.12978>

Pezo, F., Romero, F., Zambrano, F., & Sánchez, R. S. (2019). Preservation of boar semen: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 423–434. <https://doi.org/10.1111/rda.13389>

- Pinart, E., & Puigmulé, M. (2013). Factors Affecting Boar Reproduction, Testis Function, and Sperm Quality. In *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends* (pp. 1–632). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8>
- Porkcolombia (s.f). *Estadísticas sectoriales*. Recuperado el 21 de octubre de 2022 de: <https://porkcolombia.co/estadisticas-sectoriales/>
- Pourheydar, B., Azarm, F., Farjah, G., Karimipour, M., & Pourheydar, M. (2021). Effect of silymarin and metformin on the sperm parameters and histopathological changes of testes in diabetic rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 19(12), 1091–1104. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i12.10060>
- Price, M., & Hongo, H. (2019). The Archaeology of Pig Domestication in Eurasia. *Journal of Archaeological Research*, 1–59. <https://doi.org/10.1007/s10814-019-09142-9>
- Restrepo, G., Úsuga, A., & Alberto, B. (2013). Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia / Volumen 8 / Número 1 / enero-junio de 2013/ ISSN 1900-9607 Techniques for analyzing the potential fertility of stallion semen. *Revista CES Medicina veterinaria Zootecnia*, 8(1), 115–127.
- Restrepo, G., Usuga, A., Montoya, J. D., Celis, Á. D., & Henao, A. A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de Investigacion*, 11(2), 63–70. <https://doi.org/10.22507/rli.v11n2a7>
- Rhoades R. A., Packer C. S., Roepke D. A., Jin N., Meiss R. A. (1990). Reactive oxygen species alter contractile properties of pulmonary arterial smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*, 68, 1581–1589
- Roca, J., Broekhuijse, M., Parrilla, I., Rodríguez-Martinez, H., Martínez, E., & Bolarin, A. (2015). Boar differences in artificial insemination outcomes: can they be minimized? *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 48–55. <https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1111/rda.12530>
- Rodríguez, A. L., Soom, A. Van, Arsenakis, I., & Maes, D. (2017). Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management*, 3, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0062-5>
- Rodríguez-Gil, J., & Estrada, E. (2013). Artificial Insemination in Boar Reproduction. In S. Bonet, I. Casas, W. v. Holt, & M. Yeste (Eds.), *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends* (Vol. 9783642350, pp. 589–607). *Springer Berlin Heidelberg*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8>
- Rodríguez-Martinez, H., & Wallgren, M. (2010). Advances in boar semen cryopreservation. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/396181>
- Roostaei-Ali Mehr, M., & Parisoush, P. (2016). Effect of different levels of silymarin and caproic acid on storage of ram semen in liquid form. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 569–574. <https://doi.org/10.1111/rda.12721>

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

- Soriano, C., Matás, C., & García, F. (2013). An overview of swine artificial insemination: Retrospective, current and prospective aspects. *Journal of Experimental and Applied Animal Sciences*, 1(1), 67. <https://doi.org/10.20454/jeaas.2013.709>
- Šuk, J., Jašprová, J., Biedermann, D., Petrásková, L., Valentová, K., Křen, V., Muchová, L., & Vítek, L. (2019). Isolated Silymarin Flavonoids Increase Systemic and Hepatic Bilirubin Concentrations and Lower Lipoperoxidation in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6026902>
- Surai, P. F. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204–247. <https://doi.org/10.3390/antiox4010204>
- Taleb, A., Ahmad, K. A., Ihsan, A. U., Qu, J., Lin, N., Hezam, K., Koju, N., Hui, L., & Qilong, D. (2018). Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102(January), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.140>
- Temamogullari, F., Atessahin, A., Cebi Sen, C., Yumusak, N., & Dogru, M. (2021). Protective role of silibinin over nickel sulfate-induced reproductive toxicity in male rats. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 24(1), 29–34. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.135817>
- Teixeira, S. M. P., Chaveiro, A., & Moreira da Silva, F. (2015). Effect of Conjugated Linoleic Acid on Boar Semen Quality After Long-term Refrigeration at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(4), 604–610. <https://doi.org/10.1111/rda.12535>
- Tian, X., Li, D., He, Y., Zhang, W., He, H., Du, R., Pang, W., Yang, G., & Yu, T. (2019). Supplementation of salvianic acid A to boar semen extender to improve seminal quality and antioxidant capacity. *Animal Science Journal*, 90(9), 1142–1148. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13263>
- Vrba, J., Papoušková, B., Roubalová, L., Zatloukalová, M., Biedermann, D., Křen, V., Valentová, K., Ulrichová, J., & Vacek, J. (2018). Metabolism of flavonolignans in human hepatocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 152, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.048>
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F., & Johnson, L. (2019). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*, 137, 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>
- Williams, S. (2013). Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37(2), 207–212.
- Yeste, M. (2017). State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, 14(1), 69–81. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>
- Zhang, X. G., Yan, G. J., Hong, J. Y., Su, Z. Z., Yang, G. S., Li, Q. W., & Hu, J. H. (2015). Effects of Bovine Serum Albumin on Boar Sperm Quality During Liquid Storage at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 263–269. <https://doi.org/10.1111/rda.12481>

Zielińska-Przyjemska, M., & Wiktorowicz, K. (2006). An in vitro study of the protective effect of the flavonoid silydianin against reactive oxygen species. *Phytotherapy Research*, 20(2), 115–119. <https://doi.org/10.1002/ptr.1812>

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Capítulo enfocado al cumplimiento del objetivo específico 1: Evaluar el efecto de la Silimarina y algunos componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) sobre la calidad espermática del semen porcino refrigerado.

Capítulo 1: Efecto de la Silimarina y sus flavonolignanos sobre la calidad espermática del semen porcino refrigerado

Resumen

La adición de antioxidantes en los diluyentes para semen porcino es una alternativa para mitigar la reducción de la calidad espermática durante la refrigeración como consecuencia del estrés oxidativo. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la Silimarina y los flavonolignanos (Silibinina, Silicristina y Silidianina) sobre la calidad del semen porcino durante el almacenamiento líquido a 16°C. El semen de cerdo se diluyó en MRA ® diluyente porcino de KUBUS y se complementó con las diferentes concentraciones de los flavonolignanos evaluados. Los efectos de los respectivos tratamientos sobre el semen se analizaron cada 24 horas durante el periodo de almacenamiento (96 horas) en un sistema CASA y se evaluó la integridad funcional de la membrana plasmática a las 0 y 96 horas de enfriamiento. Los resultados del presente estudio sugieren que las concentraciones de los diferentes flavonolignanos tienen diversos efectos sobre la calidad del semen. La suplementación de 10 µM y 20 µM de Silidianina y Silibinina 20 µM mostró valores más altos de motilidad total y progresiva en los espermatozoides porcinos a la hora 96 de enfriamiento. Las muestras de semen suplementadas con DMSO, Silibinina 20 µM, Silidianina (todas las concentraciones), Silimarina 20 µM y Silicristina 10 µM mostraron una menor reducción de la calidad del semen durante el tiempo de almacenamiento en condiciones de refrigeración, respecto al control. Mientras que Silibinina 60 µM, Silicristina 40 µM y 60 µM y Silimarina 60 µM mostraron una mayor reducción de la calidad del semen que el control durante el almacenamiento. Se concluye que la suplementación del diluyente espermático con Silimarina y sus flavonolignanos, puede modificar y mejorar la movilidad y cinética espermática del semen porcino refrigerado.

Palabras clave:

Análisis espermático, Porcino, Silibinina, Silicristina, Silidianina, Silimarina.

Abstract

The addition of antioxidants in swine semen extender is an alternative to mitigate the reduction of sperm quality during refrigeration due to oxidative stress. The purpose of this research was to evaluate the effect of Silymarin and flavonolignans (Silybinin, Silychristin and Silydianin) on the boar semen quality during liquid storage at 16°C. Porcine semen was diluted in MRA ® KUBUS (refrigeration diluent for porcine semen) and supplemented with the different concentrations of the flavonolignans evaluated. The effects of the respective treatments on semen quality were analyzed every 24 hours during the storage period (96 hours) in a CASA system and the functional integrity of the plasma membrane was evaluated at 0 and 96 hours of cooling. The present study results suggest that concentrations of the different flavonolignans have different effects on semen quality. Supplementation of 10 µM and 20 µM of silydianin and Silybinin 20 µM showed higher values of total and progressive motility in porcine spermatozoa at hour 96 of cooling. Semen samples supplemented with DMSO, Silybinin 20 µM, Silydianin (all concentrations), Silymarin 20 µM and Silychristin 10 µM showed a smaller decrease in semen quality per storage time than the control. While Silybinin 60µM, Silychristin 40 µM and 60 µM and Silymarin 60 µM showed a greater reduction in semen quality than the control during storage. It is concluded that the supplementation of sperm extender with silymarin and its flavonolignans can modify and improve the sperm motility and sperm kinetics of refrigerated porcine semen.

Keywords: Silybinin, Silychristin, Silydianin, Silymarin, Sperm Analysis, Swine.

1.1. Introducción

La inseminación artificial (IA) es la técnica de mayor implementación en la producción porcina (Fair & Romero-Aguirregomez, 2019), la cual, puede ser realizada con semen congelado o refrigerado. En porcinos, este último método de conservación hace referencia a someter las dosis seminales a temperaturas de 5°C o entre 15 y 17°C (Cuevas et al., 2013). En este sentido, la práctica de la inseminación artificial en esta especie, está mayormente direccionada al uso de la refrigeración como medio de conservación, donde más del 95% de estas inseminaciones son realizadas con semen almacenado en estado líquido (15 - 17°C) (Yeste, 2017). Estas condiciones de almacenamiento, permiten la conservación del semen porcino por hasta varios días según el diluyente empleado (Fair & Romero-Aguirregomez, 2019).

Aunque la refrigeración, es el método de conservación espermática más simple y práctico, el semen porcino no puede refrigerarse durante largos períodos de tiempo, dado que su calidad se reduce rápidamente como consecuencia del enfriamiento, que, sumado al estrés oxidativo que implica, puede afectar la calidad y la funcionalidad del espermatozoide porcino (Tian et al., 2019), e impedir una reproducción exitosa.

Estas alteraciones, se deben a la composición de su membrana plasmática, que, al ser rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), convierte al espermatozoide porcino en una célula altamente susceptible a sufrir daños durante el período de conservación, propiciando la disminución de la calidad espermática (Williams, 2013); y generando gran interés en potenciar esta técnica, al ser considerado un proceso complejo cuando se tiene el objetivo de preservar su capacidad fertilizante.

La reducción en la calidad espermática ocurrida durante la refrigeración, es explicada por la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs), moléculas que están asociadas a la pérdida de permeabilidad y funcionalidad de la célula espermática (Cordova et al., 2009). Por tal razón, una alternativa planteada y ampliamente estudiada para mejorar la calidad del semen conservado es la adición de antioxidantes al diluyente espermático porcino (Funahashi & Sano, 2005; Tian et al., 2019), dado que presentan efectos protectores sobre las membranas al reducir la producción de EROs (Li et al., 2017).

En la actualidad, existen investigaciones en el semen de diferentes especies donde se ha estudiado la adición de moléculas antioxidantes y su efecto sobre diferentes parámetros espermáticos. De igual manera, se ha evaluado la suplementación de moléculas antioxidantes en el semen porcino, como melatonina (Flores et al., 2018), vitamina C y E (Beconi et. al, 1993), glutatión y cisteína (Funahashi & Sano, 2005), ácido rosmarínico (Feng et al., 2020) y ácido salviánico A (Tian et al., 2019) con muy buenos resultados en la conservación de células espermáticas.

Entre los antioxidantes alternativos que han sido usados recientemente, se encuentra la Silimarina, un flavonoide extraído de la planta *Silybum marianum* (cardo mariano), que ha sido estudiado en células cardíacas, hepáticas, y en espermatozoides de rata (Pourheydar et al., 2021; Ahmed et al., 2022), bovinos (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017), humanos (Aghashahi et al., 2020; Etemadi et al., 2020; Etemadi et al., 2022) y ovinos (Eskandari & Momeni, 2016). Específicamente en células espermáticas porcinas, se encuentra un estudio donde se prueba su buena acción protectora frente a los efectos tóxicos generados por el bisphenol (Jang et al., 2011). Todas aquellas investigaciones, han permitido comprobar la capacidad antioxidante y de protección atribuida a la Silimarina.

A su vez, la composición de esta molécula ha sido detallada por la presencia de varios flavonolignanos, principalmente Silidianina, Silicristina y Silibinina (Pascual et al., 1993), los cuales poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Surai, 2015). A la fecha no se han encontrado estudios de la suplementación de Silidianina y Silicristina en la conservación de espermatozoides. Mientras que, se ha probado el efecto antioxidante de la Silibinina en testículos y en espermatozoides recuperados del epidídimo de ratas macho con administración intraperitoneal de sulfato de níquel (Temamogullari et al., 2021) y de metotrexato (Oufi & Al-Shawi, 2014).

En este sentido, el presente capítulo se plantea con el fin de cumplir con el objetivo específico 1, Evaluar el efecto de la Silimarina y algunos componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) sobre la calidad espermática del semen porcino refrigerado a 16°C.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Localización

Esta investigación se llevó a cabo en la Estación Agraria San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Un centro de producción ubicado en el municipio de Rionegro, vereda el Tablacito, zona Oriental del Departamento de Antioquia, con una extensión de 27.67 hectáreas dedicadas a la producción e investigación en porcinos y que cuenta con un laboratorio para el procesamiento de semen.

Este centro de producción, se caracteriza por presentar una temperatura promedio entre 12 y 18°C, está ubicado a una altura aproximada de 2100 metros sobre el nivel del mar y presenta una precipitación de 2280 mm al año y una humedad relativa de 75.5%.

El material de investigación (semen porcino) se recolectó de los cerdos pertenecientes a esta granja, cuyas muestras fueron procesadas y evaluadas en el Laboratorio de reproducción animal ubicado en esta misma estación agraria.

1.2.2. Recolección y procesamiento del material de investigación

Para esta investigación se colectaron cinco machos porcinos de diversas líneas genéticas (Landrace Belga, PIC410 y Pietrán, entre 3 y 5 años de edad) con tres eyaculados por animal, para un total de quince eyaculados. La recolección del semen se realizó mediante el método de mano enguantada (Feng et al., 2020), donde empleando guantes de polivinilo y sobre un “potro” sólido o maniquí, se realizó la colecta de los eyaculados. Posterior a la eyaculación, se removió por filtración y de manera inmediata, la primera parte del eyaculado o fracción gel que carece de espermatozoides y puede afectar la conservación del eyaculado. Dentro de los siguientes 15 minutos siguientes a la colecta, el material seminal fue sometido a una temperatura de 37°C en un baño maría.

Al semen colectado le fue medida la concentración en fresco mediante un fotómetro minitube SDM1, con el software previamente configurado en especie porcina y con una gota de 30 µL de semen puro. Además, se evaluaron los parámetros de volumen y movilidad, mediante una probeta graduada y un sistema CASA (HTM-IVOS versión 12.3

by HAMILTON THORNE). Solo se procesaron los eyaculados con mínimo 60% de movilidad.

Posteriormente, se realizó la dilución en MR-A ® diluyente porcino de KUBUS (Kubus S.A, Madrid, Spain), hasta alcanzar una concentración de 60 millones de espermatozoides / mL, se midió nuevamente la movilidad en sistema CASA después de la dilución y se depositaron 5 mL de este semen diluido en tubos falcón, para su respectiva suplementación con el antioxidante correspondiente de las 4 moléculas planteadas (Silimarina, Silidianina, Silicristina y Silibinina).

También se analizó un control sin adición de antioxidante (Control) y otro con Dimetilsulfoxido (DMSO) en un volumen representativo de la cantidad utilizada en la disolución de cada molécula. Este último se tuvo en cuenta dado que este crioprotector constituyó el medio de dilución utilizado para los antioxidantes trabajados. Lo anterior se especifica en la siguiente tabla (**tabla 1.2**).

La refrigeración del semen diluido y previamente suplementado con la molécula respectiva, se realizó a una temperatura de 16°C en una nevera modificada para refrigeración, durante cinco días consecutivos. Esto último, teniendo en cuenta que la refrigeración de semen porcino a una temperatura de 15 a 17°C (Torres et al., 2014) y por 5 días, es el método de conservación espermática más utilizado para la implementación de la inseminación artificial (Hidalgo, 2013).

Tabla 1.2. Cantidad de antioxidante suplementada por tratamiento

Antioxidante	Stock	Concentración	Tratamiento
-	-	-	CONTROL
Silibinina	5,18 mM	20 µM	SILIB20
		40 µM	SILIB40
		60 µM	SILIB60
Silicristina	2,47 mM	10 µM	SILIC10
		20 µM	SILIC20
		40 µM	SILIC40
		60 µM	SILIC60
Silidianina	20,73 mM	10 µM	SILID10
		20 µM	SILID20

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

		40 μ M	SILID40
		60 μ M	SILIC60
Silimarina	20,73 mM	20 μ M	SILIM20
		40 μ M	SILIM40
		60 μ M	SILIM60

Todas las moléculas del presente estudio, fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

1.2.3. Análisis de la calidad espermática

- **Movilidad y cinética espermática**

La movilidad y cinética espermática fue evaluada mediante un sistema computarizado de análisis de semen (CASA, Hamilton Thorne, Computer Assisted Sperm Analyzer, HTM-IVOS versión 12.3, Hamilton Thorne Research, Massachusetts, USA), dotado de una placa térmica a 37°C, previamente configurado en la opción CERDO, para muestras de semen con una concentración de 2×10^6 células / mL, y seleccionando 5 campos de lectura o 500 espermatozoides.

Cada 24 horas, durante los 5 días de refrigeración, se realizaron las mediciones de movilidad y cinética espermática de cada tratamiento. Para dicha evaluación, las muestras provenientes de la nevera de refrigeración (16°C), fueron incubadas a 37°C durante 20 minutos (Fang et al., 2017). Cumplido este período, se depositó una gota de 5 μ L en un portaobjetos y se cubrió con una lámina cubreobjetos, ambas precalentadas a 37°C.

En esta técnica, fueron analizados movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), velocidad rectilínea (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP), amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de batido (BCF), índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN), y las células rápidas.

- **Integridad funcional de la membrana plasmática**

La integridad funcional de la membrana plasmática se evaluó mediante el Test de Hinchamiento hipoosmótico (HOST) con algunas modificaciones (Neild et al., 2000), y cuya solución hipoosmótica fue preparada con fructosa, citrato de sodio y agua destilada (Fang et al., 2017)

Para esta evaluación, se depositó en tubos eppendorf, 1 mL de solución HOST y 50 μ L de la muestra de semen de cada tratamiento. Los tubos fueron incubados en un baño María durante 30 minutos a 37 °C. Finalizada la incubación, se tomaron 10 μ L de la mezcla en un portaobjetos con su respectivo cubreobjetos y se realizó el conteo de 200 espermatozoides por lámina en mínimo 5 campos diferentes (400X), utilizando un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon Inc.). De esta manera, se determinaron las células con y sin reacción, clasificando como espermatozoides con membrana plasmática funcional aquellos que mostraron hinchamiento en la cola (reaccionados) (Basioura et al., 2018). Esta evaluación fue realizada a la hora 0 y 96 de refrigeración.

1.2.4. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los antioxidantes sobre la calidad del semen porcino refrigerado, se ajustaron modelos lineales generalizados con el fin de determinar el efecto del tratamiento en las variables dependientes (movilidad total, movilidad progresiva, cinética espermática e integridad funcional de la membrana plasmática). Para cada una de las variables dependientes se usó el efecto fijo anidado del eyaculado dentro del porcino y el efecto fijo del tratamiento. La comparación de las medias entre los tratamientos fue realizada mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Se realizó un análisis de componentes principales que permitieran retener la mayor cantidad de información de las variables originales, posteriormente, se realizó un análisis no jerárquico, por último, un análisis discriminante por etapas de los clusters obtenidos (Núñez-Martínez et al., 2006), calculando un índice de calidad del semen (SQi), con los parámetros de movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), y cinética espermática (VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR, LIN y Rápidos). Este índice fue utilizado para evaluar la influencia del tiempo en la calidad del semen de cada tratamiento, mediante un análisis de regresión lineal. El nivel de significancia considerado para todas evaluaciones fue $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el software SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

1.3. Resultados

Todos los modelos ajustados fueron significativos ($p < 0,05$) para las diferentes variables en los 5 días consecutivos de evaluación, presentando coeficientes de determinación (R^2) entre 19,20% y 72,41%. Al mencionar específicamente los intervalos de R^2 en los diferentes tiempos, se evidencia que, para el tiempo 0, los valores se encontraron entre 30,35% y 55,14%, mientras que, para el tiempo 24 y 48, se presentaron R^2 entre 39,90% y 60,01% y entre 29,02% y 54,23% respectivamente. A la hora 72 de refrigeración se mostraron R^2 superiores a los obtenidos en los otros tiempos, con un rango entre 36,44% y 72,41%. Mientras que para la hora 96, el intervalo estuvo entre 19,20% y 64,35%.

El efecto del porcino, anidado en el eyaculado mostró significancia para todos los tiempos en todas las variables de movilidad y cinética espermática, con valores p inferiores a 0,05. Mientras que, para el efecto del tratamiento, las mayores diferencias ($p < 0,05$) en las variables evaluadas se presentaron en los tiempos 72 y 96 de refrigeración.

A continuación, se presentan diversas gráficas y tablas que reflejan los resultados obtenidos en los diferentes parámetros evaluados mediante el sistema CASA IVOS y el test hipoosmótico.

1.3.1. Movilidad Total

La **figura 1.1** representa el comportamiento de la movilidad total evaluada durante los 5 días (96 horas) consecutivos de refrigeración, como consecuencia de la respectiva molécula antioxidante suplementada por tratamiento.

En este período de tiempo transcurrido durante la refrigeración (96 horas), se puede observar una reducción gradual en el porcentaje de movilidad total.

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Los valores de movilidad total están expresados en porcentaje \pm el error estándar. a-e: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos, dentro de un mismo tiempo de evaluación ($p < 0,05$). 0h, 24h, 48h, 72h y 96h hace referencia a las horas de enfriamiento a 16°C.

En la **figura 1.1**, es posible observar que las diferencias de movilidad total no fueron tan evidentes en el tiempo 0 y 24, no obstante, a partir de las 48 h de refrigeración, las diferencias entre tratamientos empiezan a aumentar, haciéndose más notoria esta tendencia a las 72 h y 96 h de conservación.

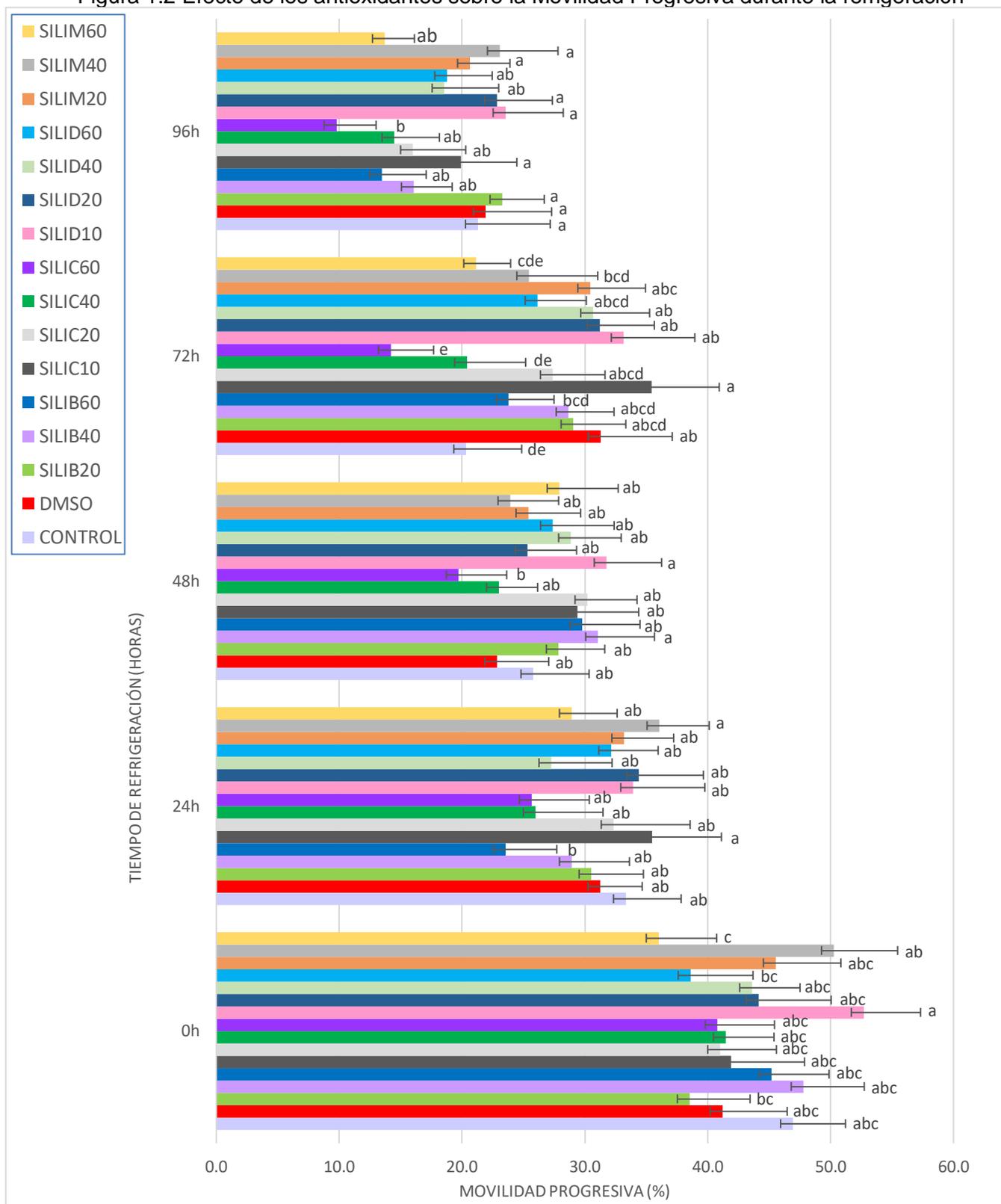
Vinculado a esto, no se presentaron diferencias en la movilidad total entre el control y el DMSO durante ningún momento de la refrigeración, sin embargo, ambos tratamientos empiezan a diferir de otros a partir de la hora 72 de refrigeración.

Del mismo modo, es posible apreciar que el tratamiento SILIC60 muestra una tendencia a reducir la movilidad desde el tiempo 0, no obstante, este efecto negativo sobre la movilidad es más drástico a partir de las 72 h de refrigeración. Mientras que, SILID20 evidencia mayores valores de este parámetro en el tiempo 96 de conservación.

1.3.2. Movilidad Progresiva

En la **figura 1.2**, se evidencia el efecto de los diferentes antioxidantes y sus concentraciones sobre la movilidad progresiva, evaluada con el sistema casa IVOS en los 5 días consecutivos de refrigeración. En este parámetro, también es evidente una disminución gradual, a medida que avanza el tiempo de almacenamiento para todos los tratamientos (**figura 1.2**).

Figura 1.2 Efecto de los antioxidantes sobre la Movilidad Progressiva durante la refrigeración



Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Los valores de movilidad progresiva están expresados en porcentaje \pm el error estándar. a-e: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos, dentro de un mismo tiempo de evaluación ($p < 0,05$). 0h, 24h, 48h, 72h y 96h hace referencia a las horas de enfriamiento a 16°C.

En la **figura 1.2**, se observan muchas más diferencias entre tratamientos respecto a la **figura 1.1**. Sin embargo, es importante mencionar que el tratamiento SILID10 muestra una mayor movilidad progresiva en la mayoría de los tiempos de evaluación, mientras que SILIC60 conserva la tendencia de generar un efecto negativo sobre este parámetro a lo largo del almacenamiento.

Cabe resaltar que a la hora 96 tanto en la **figura 1.1** como en la **1.2**, las menores concentraciones de cada molécula fueron las que presentaron mayores porcentajes de movilidad (total y progresiva) respecto a las más altas concentraciones del mismo antioxidante, exceptuando SILIM40 que fue quien presentó movilidades superiores en Silimarina, y SILID60, que para movilidad total presentó mayor porcentaje que SILID40 (**figura 1.1**).

1.3.3. Cinética espermática

El comportamiento de la cinética espermática se muestra en la **tabla 1.3**, la cual representa los parámetros VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN y rápidos en un tiempo de refrigeración determinado.

Tabla 1.3. Efecto de los antioxidantes sobre la cinética espermática durante la refrigeración

tiempo (h)	TTO	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	LIN	RAPIDOS
0 h	CONTROL	50,44 ± 3,17 ^{ab}	42,61 ± 2,42 ^{ab}	96,64 ± 4,05	5,01 ± 0,21	42,50 ± 0,75	78,06 ± 1,76 ^a	45,86 ± 2,20 ^a	51,06 ± 4,61 ^{ab}
	DMSO	51,01 ± 3,04 ^{ab}	38,86 ± 2,28 ^b	95,49 ± 4,68	5,41 ± 0,23	40,42 ± 0,81	76,00 ± 1,53 ^{ab}	40,13 ± 3,05 ^b	45,73 ± 5,93 ^{ab}
	SILIB20	49,98 ± 3,23 ^b	37,43 ± 2,00 ^b	92,86 ± 5,35	5,26 ± 0,24	40,42 ± 0,93	75,53 ± 1,43 ^{ab}	42,40 ± 1,46 ^{ab}	43,46 ± 5,74 ^{ab}
	SILIB40	53,73 ± 2,81 ^{ab}	41,20 ± 2,17 ^{ab}	95,73 ± 3,67	5,02 ± 0,19	41,93 ± 0,99	77,20 ± 1,53 ^{ab}	44,13 ± 1,46 ^{ab}	51,46 ± 5,12 ^{ab}
	SILIB60	54,20 ± 2,82 ^{ab}	41,00 ± 2,02 ^{ab}	100,48 ± 4,42	5,52 ± 0,22	42,10 ± 0,65	76,33 ± 1,46 ^{ab}	42,33 ± 1,30 ^{ab}	49,80 ± 5,03 ^{ab}
	SILIC10	51,28 ± 3,59 ^{ab}	38,28 ± 2,70 ^b	96,40 ± 5,42	5,53 ± 0,24	41,89 ± 0,65	74,76 ± 1,57 ^{ab}	41,76 ± 2,27 ^{ab}	49,30 ± 6,22 ^{ab}
	SILIC20	52,40 ± 2,76 ^{ab}	39,10 ± 1,54 ^b	96,83 ± 5,11	5,24 ± 0,28	39,88 ± 0,93	75,53 ± 1,85 ^{ab}	42,93 ± 1,90 ^{ab}	46,40 ± 5,15 ^{ab}
	SILIC40	51,66 ± 2,40 ^{ab}	38,57 ± 1,70 ^b	99,12 ± 4,39	5,52 ± 0,22	40,03 ± 0,98	74,66 ± 1,48 ^{ab}	40,60 ± 1,62 ^{ab}	45,86 ± 4,36 ^{ab}
	SILIC60	52,92 ± 3,02 ^{ab}	40,05 ± 2,41 ^{ab}	99,83 ± 4,35	5,43 ± 0,25	41,35 ± 1,05	75,80 ± 1,28 ^{ab}	41,53 ± 1,15 ^{ab}	44,60 ± 5,13 ^{ab}
	SILID10	58,08 ± 2,97 ^a	44,99 ± 2,17 ^a	102,70 ± 5,00	5,19 ± 0,24	41,36 ± 0,93	77,69 ± 1,30 ^{ab}	46,00 ± 1,73 ^a	57,46 ± 5,16 ^a
	SILID20	53,92 ± 3,26 ^{ab}	39,92 ± 1,95 ^{ab}	101,64 ± 5,36	5,34 ± 0,21	41,99 ± 0,93	75,33 ± 1,47 ^{ab}	41,66 ± 1,26 ^{ab}	46,00 ± 5,55 ^{ab}
	SILID40	54,08 ± 2,73 ^{ab}	40,22 ± 1,71 ^{ab}	100,72 ± 5,23	5,29 ± 0,22	41,30 ± 1,01	74,80 ± 1,21 ^{ab}	42,13 ± 1,04 ^{ab}	48,40 ± 4,49 ^{ab}
	SILID60	51,29 ± 3,64 ^{ab}	38,89 ± 2,20 ^b	96,05 ± 6,76	5,03 ± 0,20	41,36 ± 0,96	77,13 ± 1,27 ^{ab}	43,33 ± 1,35 ^{ab}	43,00 ± 5,78 ^{ab}
	SILIM20	53,47 ± 3,07 ^{ab}	41,30 ± 2,23 ^{ab}	95,70 ± 5,66	4,98 ± 0,26	41,85 ± 1,32	77,26 ± 1,48 ^{ab}	44,86 ± 1,69 ^{ab}	49,73 ± 5,82 ^{ab}
	SILIM40	54,96 ± 2,18 ^{ab}	41,84 ± 2,04 ^{ab}	98,50 ± 3,29	5,26 ± 0,25	41,86 ± 0,84	75,80 ± 1,62 ^{ab}	44,13 ± 1,96 ^{ab}	55,26 ± 5,29 ^a
SILIM60	49,69 ± 2,93 ^b	36,80 ± 1,96 ^b	93,50 ± 5,25	5,54 ± 0,21	39,90 ± 0,96	74,13 ± 1,08 ^b	41,33 ± 1,12 ^{ab}	40,06 ± 5,43 ^b	
24 h	CONTROL	50,36 ± 3,00 ^{abc}	36,44 ± 1,99 ^{ab}	95,83 ± 5,83 ^{abc}	5,80 ± 0,25 ^{ab}	37,98 ± 1,12 ^c	73,86 ± 1,84 ^{abc}	41,86 ± 1,82 ^{abc}	38,73 ± 5,34
	DMSO	49,39 ± 2,93 ^{abc}	36,26 ± 1,64 ^{ab}	92,42 ± 5,45 ^{abc}	5,51 ± 0,30 ^{ab}	38,62 ± 1,29 ^{bc}	75,53 ± 2,38 ^{ab}	43,06 ± 2,07 ^a	36,33 ± 3,91
	SILIB20	49,30 ± 3,14 ^{abc}	35,57 ± 1,77 ^{ab}	96,95 ± 4,92 ^{abc}	5,93 ± 0,31 ^{ab}	40,48 ± 1,07 ^{abc}	73,33 ± 1,80 ^{abc}	39,20 ± 1,34 ^{abcd}	35,73 ± 5,29
	SILIB40	48,38 ± 3,64 ^{abc}	34,28 ± 2,11 ^{ab}	96,37 ± 6,02 ^{abc}	6,00 ± 0,29 ^{ab}	40,94 ± 0,75 ^{ab}	72,40 ± 1,83 ^{bc}	37,86 ± 1,35 ^{bcd}	34,53 ± 5,99
	SILIB60	44,64 ± 3,38 ^{bc}	31,33 ± 2,27 ^b	91,93 ± 5,05 ^{abc}	6,26 ± 0,19 ^a	39,61 ± 0,89 ^{abc}	71,46 ± 1,40 ^{bc}	36,86 ± 1,41 ^d	28,13 ± 4,99
	SILIC10	47,43 ± 2,77 ^{abc}	34,93 ± 2,25 ^{ab}	93,35 ± 3,97 ^{abc}	5,63 ± 0,24 ^{ab}	41,05 ± 0,98 ^{ab}	74,76 ± 1,56 ^{abc}	39,69 ± 1,68 ^{abcd}	39,30 ± 5,94
	SILIC20	48,10 ± 2,81 ^{abc}	35,49 ± 2,48 ^{ab}	96,04 ± 4,09 ^{abc}	5,74 ± 0,28 ^{ab}	39,95 ± 1,16 ^{abc}	73,66 ± 1,35 ^{abc}	38,66 ± 1,50 ^{bcd}	36,06 ± 6,54
	SILIC40	44,27 ± 3,54 ^c	32,81 ± 2,79 ^{ab}	88,80 ± 5,33 ^{bc}	5,94 ± 0,34 ^{ab}	38,64 ± 1,24 ^{bc}	74,60 ± 1,45 ^{abc}	38,53 ± 1,61 ^{bcd}	29,13 ± 5,98
	SILIC60	43,84 ± 3,56 ^c	33,02 ± 2,28 ^{ab}	85,47 ± 6,74 ^c	5,56 ± 0,48 ^{ab}	39,84 ± 0,92 ^{abc}	77,00 ± 1,92 ^a	42,07 ± 1,87 ^{ab}	29,00 ± 5,47
	SILID10	47,85 ± 3,69 ^{abc}	34,76 ± 2,37 ^{ab}	93,31 ± 5,58 ^{abc}	5,46 ± 0,23 ^b	40,62 ± 1,10 ^{abc}	74,00 ± 1,48 ^{abc}	39,61 ± 1,46 ^{abcd}	39,38 ± 6,95
	SILID20	51,95 ± 3,40 ^{ab}	37,82 ± 2,66 ^a	102,48 ± 5,71 ^a	5,84 ± 0,27 ^{ab}	41,32 ± 0,89 ^a	72,60 ± 1,65 ^{bc}	38,66 ± 1,36 ^{bcd}	40,00 ± 6,01
	SILID40	45,70 ± 2,97 ^{abc}	33,38 ± 2,09 ^{ab}	91,36 ± 5,33 ^{abc}	5,70 ± 0,15 ^{ab}	40,63 ± 0,87 ^{abc}	73,53 ± 1,49 ^{abc}	38,73 ± 1,66 ^{bcd}	30,93 ± 5,94
	SILID60	49,75 ± 2,45 ^{abc}	35,67 ± 1,82 ^{ab}	99,29 ± 4,16 ^{ab}	6,00 ± 0,24 ^{ab}	40,86 ± 0,75 ^{ab}	71,60 ± 1,44 ^{bc}	37,60 ± 1,46 ^{dc}	37,46 ± 4,42
	SILIM20	49,53 ± 3,22 ^{abc}	35,58 ± 1,91 ^{ab}	96,46 ± 5,89 ^{abc}	5,71 ± 0,27 ^{ab}	40,20 ± 1,13 ^{abc}	73,53 ± 1,43 ^{abc}	39,73 ± 1,42 ^{abcd}	39,13 ± 4,96
	SILIM40	52,17 ± 2,55 ^a	37,63 ± 1,65 ^a	103,16 ± 3,98 ^a	5,68 ± 0,27 ^{ab}	41,51 ± 0,92 ^a	72,60 ± 1,38 ^{bc}	38,46 ± 1,21 ^{bcd}	40,53 ± 4,69
SILIM60	48,18 ± 2,87 ^{abc}	34,20 ± 1,81 ^{ab}	95,95 ± 4,98 ^{abc}	5,89 ± 0,28 ^{ab}	40,43 ± 0,63 ^{abc}	72,13 ± 1,65 ^{bc}	37,80 ± 1,29 ^{bcd}	34,00 ± 4,57	
48 h	CONTROL	44,94 ± 3,25 ^{ab}	33,40 ± 2,54	90,07 ± 5,77	5,68 ± 0,29 ^{abc}	38,94 ± 1,30	74,60 ± 1,72	39,60 ± 1,58 ^b	29,80 ± 5,02 ^{abc}
	DMSO	41,48 ± 2,98 ^{ab}	31,49 ± 2,25	84,02 ± 6,63	5,65 ± 0,22 ^{abc}	22,86 ± 4,19	77,53 ± 1,70	41,46 ± 2,08 ^{ab}	25,26 ± 4,45 ^{bc}
	SILIB20	47,49 ± 3,30 ^{ab}	34,21 ± 2,15	95,20 ± 5,86	5,94 ± 0,35 ^{abc}	41,03 ± 0,74	73,60 ± 1,44	39,13 ± 1,33 ^b	32,60 ± 4,46 ^{ab}
	SILIB40	46,18 ± 2,56 ^{ab}	35,44 ± 2,06	86,56 ± 3,86	5,27 ± 0,27 ^{bc}	40,29 ± 1,57	77,60 ± 1,06	43,40 ± 1,57 ^{ab}	34,80 ± 4,88 ^{ab}
	SILIB60	47,08 ± 2,69 ^{ab}	34,25 ± 1,98	92,69 ± 5,07	6,27 ± 0,27 ^a	40,39 ± 0,68	73,60 ± 1,67	39,26 ± 1,39 ^b	34,46 ± 5,38 ^{ab}
	SILIC10	43,74 ± 2,81 ^{ab}	33,03 ± 1,86	82,20 ± 5,48	5,06 ± 0,34 ^c	39,80 ± 1,31	77,53 ± 1,68	46,61 ± 3,56 ^a	35,46 ± 5,40 ^{ab}
	SILIC20	47,44 ± 2,33 ^{ab}	35,68 ± 1,78	93,76 ± 4,33	5,88 ± 0,24 ^{abc}	39,46 ± 0,89	75,60 ± 1,19	40,60 ± 1,83 ^b	33,53 ± 4,51 ^{ab}
	SILIC40	42,54 ± 1,92 ^{ab}	33,11 ± 1,64	81,64 ± 2,26	5,34 ± 0,18 ^{bc}	41,67 ± 1,07	77,73 ± 0,94	42,00 ± 1,41 ^{ab}	24,93 ± 3,31 ^{bc}
	SILIC60	40,87 ± 2,80 ^b	31,69 ± 2,36	81,41 ± 3,99	5,32 ± 0,31 ^{bc}	40,72 ± 1,02	77,86 ± 1,12	41,33 ± 1,87 ^{ab}	20,93 ± 4,07 ^c
	SILID10	48,91 ± 3,42 ^a	35,63 ± 2,48	94,55 ± 6,70	5,55 ± 0,26 ^{abc}	40,05 ± 1,47	74,38 ± 1,98	41,30 ± 2,01 ^{ab}	36,84 ± 4,89 ^a
	SILID20	44,34 ± 2,53 ^{ab}	33,59 ± 1,87	85,52 ± 3,96	5,42 ± 0,27 ^{abc}	41,38 ± 1,28	76,93 ± 1,46	42,40 ± 1,27 ^{ab}	28,73 ± 4,68 ^{abc}

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

	SILID40	46,10 ± 2,69 ^{ab}	35,43 ± 2,05	87,20 ± 5,51	5,25 ± 0,27 ^{bc}	39,03 ± 1,35	77,60 ± 1,65	43,80 ± 2,60 ^{ab}	32,20 ± 4,57 ^{ab}
	SILID60	46,02 ± 3,13 ^{ab}	33,91 ± 2,33	88,60 ± 5,12	5,58 ± 0,21 ^{abc}	39,70 ± 1,16	76,00 ± 1,50	42,13 ± 1,69 ^{ab}	31,53 ± 5,63 ^{abc}
	SILIM20	46,40 ± 2,89 ^{ab}	33,51 ± 2,00	94,10 ± 4,63	6,12 ± 0,25 ^{ab}	40,52 ± 0,98	73,53 ± 1,35	38,53 ± 1,0 ^b	29,60 ± 4,78 ^{abc}
	SILIM40	45,49 ± 3,31 ^{ab}	32,88 ± 1,97	90,44 ± 7,20	6,24 ± 0,29 ^a	40,18 ± 0,87	74,66 ± 2,17	41,26 ± 2,26 ^{ab}	28,66 ± 4,71 ^{abc}
	SILIM60	48,93 ± 3,01 ^a	35,68 ± 2,67	95,93 ± 5,52	5,83 ± 0,39 ^{abc}	40,60 ± 1,30	74,26 ± 1,88	39,86 ± 1,72 ^b	32,33 ± 4,84 ^{ab}
72 h	CONTROL	46,15 ± 3,55 ^{bcd}	32,92 ± 2,01 ^{bc}	91,08 ± 7,76 ^{abc}	6,25 ± 0,37 ^a	36,20 ± 2,10	73,86 ± 2,87 ^{ab}	43,800 ± 3,867	26,53 ± 5,82 ^{def}
	DMSO	51,32 ± 4,59 ^{abc}	38,42 ± 3,98 ^{ab}	95,73 ± 7,47 ^{abc}	5,05 ± 0,51 ^b	38,37 ± 1,17	75,14 ± 2,15 ^{ab}	43,500 ± 3,341	24,88 ± 6,65 ^{abcd}
	SILIB20	45,82 ± 3,40 ^{bcd}	35,32 ± 2,48 ^{bc}	88,93 ± 7,00 ^{bcd}	5,63 ± 0,25 ^{ab}	39,42 ± 0,78	78,86 ± 1,98 ^{ab}	44,133 ± 2,090	32,60 ± 4,69 ^{abcd}
	SILIB40	46,63 ± 2,91 ^{bcd}	36,01 ± 2,08 ^{bc}	87,92 ± 6,16 ^{bcd}	5,46 ± 0,31 ^{ab}	38,58 ± 0,64	78,33 ± 2,19 ^{ab}	44,933 ± 2,594	32,46 ± 4,59 ^{abcd}
	SILIB60	46,13 ± 3,98 ^{bcd}	34,69 ± 2,56 ^{bc}	88,60 ± 7,35 ^{bcd}	5,22 ± 0,45 ^{ab}	40,22 ± 0,90	77,73 ± 2,32 ^{ab}	43,200 ± 2,299	27,67 ± 4,41 ^{cdef}
	SILIC10	58,89 ± 7,74 ^a	45,69 ± 7,46 ^a	106,23 ± 9,18 ^a	5,86 ± 0,36 ^{ab}	39,22 ± 2,02	76,54 ± 2,42 ^{ab}	44,000 ± 3,261	40,81 ± 6,08 ^a
	SILIC20	50,13 ± 2,50 ^{abc}	37,65 ± 1,67 ^b	98,80 ± 5,06 ^{abc}	5,80 ± 0,23 ^{ab}	39,76 ± 0,81	75,61 ± 1,35 ^{ab}	40,538 ± 1,328	30,76 ± 4,81 ^{abcde}
	SILIC40	43,18 ± 3,68 ^{dc}	33,88 ± 2,72 ^{bc}	84,06 ± 7,81 ^{cd}	5,43 ± 0,50 ^{ab}	38,60 ± 2,19	79,80 ± 1,43 ^a	43,800 ± 2,613	22,46 ± 5,25 ^{ef}
	SILIC60	37,43 ± 3,84 ^d	28,42 ± 2,69 ^c	73,96 ± 8,10 ^d	5,34 ± 0,62 ^{ab}	36,92 ± 1,19	79,06 ± 2,19 ^{ab}	43,267 ± 2,523	17,40 ± 4,54 ^f
	SILID10	55,51 ± 3,99 ^{ab}	41,09 ± 2,18 ^{ab}	103,83 ± 8,26 ^{ab}	5,37 ± 0,55 ^{ab}	37,26 ± 1,94	76,23 ± 2,27 ^{ab}	43,846 ± 1,964	39,92 ± 6,96 ^{ab}
	SILID20	52,04 ± 2,69 ^{abc}	39,30 ± 2,27 ^{ab}	98,80 ± 5,52 ^{abc}	5,80 ± 0,23 ^{ab}	38,00 ± 2,25	74,33 ± 1,87 ^{ab}	41,867 ± 2,019	36,20 ± 4,51 ^{abcd}
	SILID40	54,04 ± 3,85 ^{ab}	37,81 ± 2,08 ^b	103,07 ± 7,74 ^{ab}	5,57 ± 0,35 ^{ab}	40,05 ± 1,29	73,40 ± 2,42 ^{ab}	40,800 ± 2,351	38,60 ± 5,89 ^{abc}
	SILID60	47,78 ± 3,16 ^{bc}	36,96 ± 2,26 ^b	89,10 ± 7,51 ^{bcd}	4,84 ± 0,49 ^b	40,49 ± 1,35	79,21 ± 2,44 ^{ab}	47,214 ± 4,066	29,78 ± 4,83 ^{abcde}
	SILIM20	52,05 ± 3,21 ^{abc}	37,09 ± 2,44 ^b	97,47 ± 6,64 ^{abc}	5,50 ± 0,30 ^{ab}	39,06 ± 1,77	76,07 ± 2,01 ^{ab}	43,571 ± 2,101	36,50 ± 5,96 ^{abcd}
	SILIM40	48,37 ± 5,47 ^{bc}	36,54 ± 3,87 ^b	91,51 ± 9,33 ^{abc}	4,92 ± 0,45 ^b	40,12 ± 1,13	77,33 ± 1,60 ^{ab}	42,467 ± 1,740	29,20 ± 6,30 ^{bcde}
SILIM60	44,01 ± 3,82 ^{cd}	33,94 ± 3,02 ^{bc}	84,64 ± 7,65 ^{cd}	5,15 ± 0,45 ^{ab}	37,99 ± 3,05	72,07 ± 5,64 ^b	40,071 ± 3,412	23,63 ± 2,93 ^{ef}	
96 h	CONTROL	45,55 ± 3,36 ^{ab}	34,08 ± 2,92 ^{ab}	89,67 ± 4,66 ^{abc}	5,62 ± 0,30	39,10 ± 1,11	76,14 ± 1,82 ^{ab}	40,57 ± 1,77 ^{abc}	24,07 ± 6,55 ^{abcde}
	DMSO	46,92 ± 4,34 ^{ab}	33,97 ± 3,37 ^{ab}	88,52 ± 6,61 ^{abc}	5,32 ± 0,53	38,55 ± 1,15	74,57 ± 2,24 ^{ab}	41,21 ± 2,21 ^{abc}	26,21 ± 5,90 ^{abcd}
	SILIB20	48,78 ± 1,97 ^a	36,29 ± 1,97 ^a	93,80 ± 3,42 ^{ab}	5,87 ± 0,25	36,23 ± 1,36	74,71 ± 1,88 ^{ab}	41,14 ± 1,99 ^{abc}	26,57 ± 3,61 ^{abcd}
	SILIB40	40,81 ± 2,86 ^{abc}	30,51 ± 2,45 ^{ab}	83,55 ± 6,06 ^{abcd}	5,50 ± 0,54	38,57 ± 0,98	76,64 ± 2,44 ^{ab}	41,64 ± 2,66 ^{abc}	19,00 ± 3,27 ^{abcdef}
	SILIB60	42,50 ± 4,28 ^{abc}	33,65 ± 3,76 ^{ab}	81,59 ± 7,00 ^{abcd}	5,15 ± 0,49	38,67 ± 1,47	78,35 ± 1,56 ^a	43,92 ± 2,24 ^{abc}	14,42 ± 3,36 ^{ef}
	SILIC10	46,80 ± 4,22 ^{ab}	36,16 ± 3,41 ^a	83,47 ± 6,67 ^{abcd}	4,59 ± 0,48	38,96 ± 2,15	78,23 ± 2,31 ^a	46,46 ± 2,41 ^{ab}	22,61 ± 5,04 ^{abcde}
	SILIC20	43,09 ± 3,21 ^{abc}	34,08 ± 2,65 ^{ab}	78,25 ± 6,06 ^{abcd}	4,58 ± 0,52	37,24 ± 1,46	80,35 ± 2,19 ^a	48,50 ± 3,51 ^a	18,21 ± 4,98 ^{bcdef}
	SILIC40	38,05 ± 3,04 ^{bc}	29,25 ± 2,47 ^{ab}	73,21 ± 6,55 ^{cd}	5,08 ± 0,67	37,05 ± 1,87	78,85 ± 2,88 ^a	45,78 ± 3,84 ^{abc}	16,42 ± 3,86 ^{cdef}
	SILIC60	35,34 ± 4,91 ^{bc}	27,58 ± 3,98 ^b	70,02 ± 9,62 ^d	4,66 ± 0,76	35,02 ± 2,97	74,57 ± 6,26 ^{ab}	41,50 ± 4,54 ^{abc}	11,00 ± 3,56 ^f
	SILID10	49,06 ± 3,75 ^a	36,71 ± 2,51 ^a	94,12 ± 8,35 ^{ab}	5,74 ± 0,49	39,10 ± 1,44	76,30 ± 2,33 ^{ab}	42,23 ± 2,32 ^{abc}	28,30 ± 5,90 ^{ab}
	SILID20	48,20 ± 4,40 ^a	34,22 ± 2,78 ^{ab}	95,57 ± 8,08 ^a	5,06 ± 0,47	40,51 ± 1,17	74,64 ± 2,31 ^{ab}	39,64 ± 1,62 ^{abc}	27,50 ± 5,04 ^{abc}
	SILID40	43,35 ± 3,93 ^{abc}	32,72 ± 2,72 ^{ab}	83,26 ± 7,29 ^{abcd}	4,89 ± 0,60	38,33 ± 1,11	77,85 ± 2,50 ^a	44,71 ± 2,96 ^{abc}	22,00 ± 5,00 ^{abcde}
	SILID60	44,98 ± 3,61 ^{ab}	30,74 ± 2,34 ^{ab}	91,37 ± 7,22 ^{abc}	5,01 ± 0,61	40,68 ± 1,64	72,42 ± 2,88 ^{ab}	39,07 ± 3,04 ^{bc}	23,85 ± 4,42 ^{abcde}
	SILIM20	47,15 ± 3,06 ^{ab}	35,08 ± 3,02 ^{ab}	94,83 ± 4,31 ^a	5,27 ± 0,53	39,72 ± 1,25	74,14 ± 2,24 ^{ab}	38,85 ± 2,94 ^{bc}	23,57 ± 3,89 ^{abcde}
	SILIM40	45,42 ± 4,97 ^{ab}	33,70 ± 3,84 ^{ab}	90,30 ± 9,16 ^{abc}	5,68 ± 0,53	36,50 ± 3,00	69,50 ± 5,63 ^{ab}	37,00 ± 3,16 ^{bc}	29,85 ± 5,26 ^a
SILIM60	39,58 ± 5,17 ^{abc}	29,79 ± 4,07 ^{ab}	75,65 ± 9,53 ^{bcd}	4,92 ± 0,59	34,40 ± 3,94	66,63 ± 7,70 ^b	37,71 ± 4,75 ^{bc}	15,85 ± 2,67 ^{def}	

Los resultados son expresados como el valor medio ± el error estándar de la media. a-f: Diferentes superíndices en la misma columna en un mismo tiempo de refrigeración, indican diferencias entre los tratamientos (p < 0,05). La columna TTO lista los tratamientos evaluados. 0h, 24h, 48h, 72h y 96h se refieren las horas de enfriamiento. VAP: Velocidad media,

VSL: Velocidad lineal, VCL: Velocidad curvilínea, ALH: Amplitud lateral de la cabeza, BCF: Frecuencia de batida, STR: Índice de rectitud, LIN: Índice de linealidad. Ausencia de superíndice indica no diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos para un parámetro en un mismo tiempo de refrigeración

La tabla anterior (**tabla 1.3**), muestra que a partir del tiempo 72 de refrigeración se empiezan a observar mayores diferencias entre tratamientos. Del mismo modo, es posible apreciar que, aunque SILIM60 evidencia un efecto negativo sobre la cinética espermática a la hora 72, SILIC60 sigue presentando esa tendencia de afectar negativamente las variables evaluadas, cuando los tratamientos tienen mayor tiempo de refrigeración (96 h).

El comportamiento de la cinética espermática, también permite observar que, aunque los tratamientos SILID10, SILID20 y SILIM40 mostraron superioridad en los primeros tiempos de evaluación (hora 0 y 24), dicha superioridad disminuye a medida que pasan las horas de refrigeración. Solo hasta la hora 96 de conservación se hace posible determinar de manera más clara que los tratamientos SILIB20, SILIC10, SILID10 y SILID20 son los que presentan un mayor impacto positivo sobre la cinética espermática a más tiempo de almacenamiento.

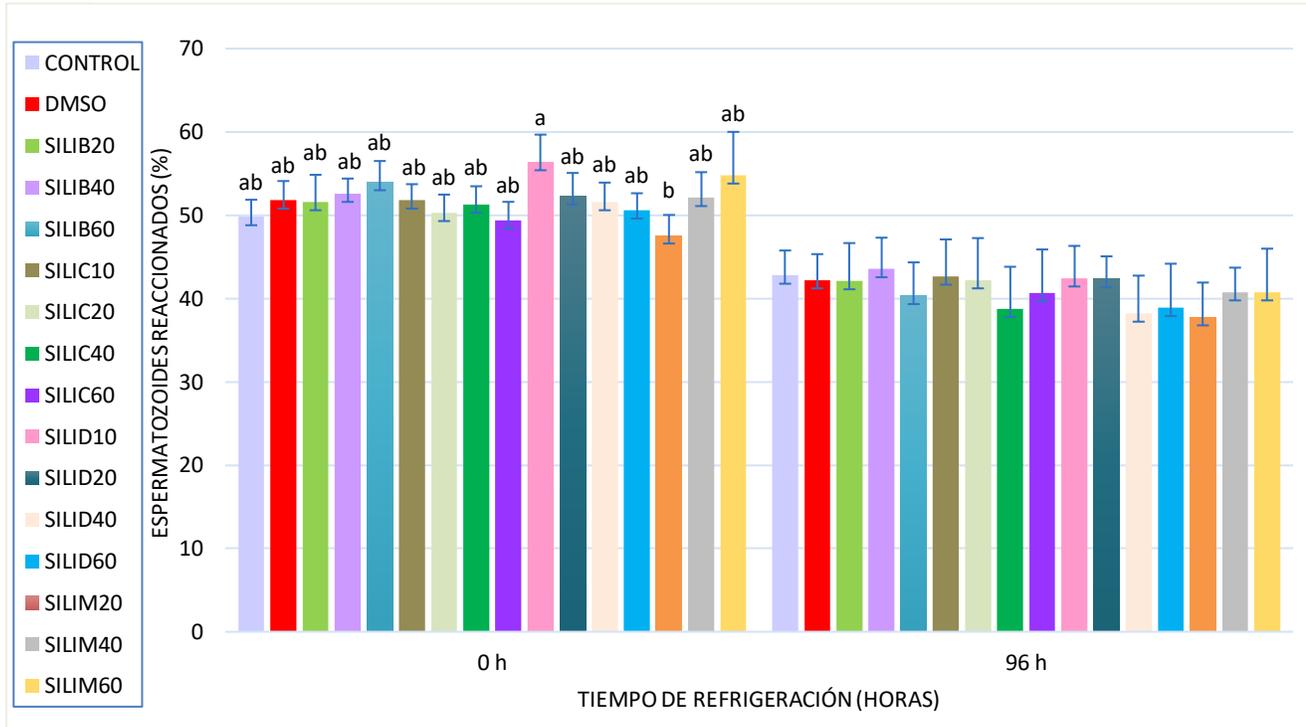
Es importante mencionar que los tratamientos DMSO y control no presentaron diferencias entre sí en los parámetros evaluados durante todo el tiempo de refrigeración, a excepción de algunos parámetros en la hora 72 de refrigeración.

1.3.4. Integridad funcional de membrana plasmática

En la **figura 1.3**, es posible observar el estado funcional de la membrana plasmática y su comportamiento durante la refrigeración a 16°C. En este sentido, se muestran los resultados de las evaluaciones, las cuales fueron realizadas solo en la hora 0 y 96 de conservación.

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Figura 1.3 Integridad funcional de membrana en 0 y 96 horas de refrigeración



a-b: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos, dentro de un mismo tiempo de evaluación ($p < 0,05$). 0h y 96h hace referencia a las horas de refrigeración a 16°C en las que se realizaron dichas evaluaciones. Ausencia de superíndice indica no diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos en un mismo tiempo de refrigeración

En la **figura 1.3**, se evidencia que a la hora 0 de refrigeración, solo se presentaron diferencias significativas entre SILID10 y SILIM20, mostrando que el primer tratamiento exhibió una integridad funcional de membrana mayor (% de células reaccionadas) al resto de tratamientos. No obstante, a la hora 96 de conservación ningún tratamiento mostró alguna tendencia que indicara que su adición pudiera mantener o afectar la funcionalidad de la membrana plasmática.

1.3.5. Análisis de Regresión lineal

En la **tabla 1.4**, se muestran las medias y el error estándar de los índices de calidad espermática (SQi) para cada tratamiento basados en las variables de movilidad y cinética obtenidos con el CASA IVOS. Mientras que en la parte derecha de la tabla se observan

los resultados del análisis de regresión, que pueden ser interpretados como el aumento o la disminución de la calidad espermática por hora de refrigeración en todos los tratamientos.

Los valores p de todos los tratamientos fueron significativos ($p < 0,05$), confirmando que existe una asociación lineal para la pérdida de calidad espermática entre los antioxidantes suplementados y las horas de refrigeración. Con valores de R^2 entre 5.6% y 27.8%.

Tabla 1.4. Análisis de regresión lineal, tratamiento - tiempo de refrigeración

Tratamiento	SMI	ANÁLISIS DE REGRESIÓN LÍNEAL			
	Media \pm EE	Intercepto β_0	coeficiente regresión β_1	R2	valor p
CONTROL	1,1254 \pm 0,0431 ^{bcd}	1.3275	-0.0043	0.1527	0.0006
DMSO	1,1212 \pm 0,0440 ^{bcd}	1.2474	-0.0027	0.0592	0.0381
SILIB20	1,1392 \pm 0,0375 ^{abcd}	1.2460	-0.0023	0.0563	0.0418
SILIB40	1,1304 \pm 0,0407 ^{bcd}	1.3363	-0.0043	0.1775	0.0002
SILIB60	1,0849 \pm 0,0442 ^{cde}	1.3106	-0.0048	0.1811	0.0002
SILIC10	1,1615 \pm 0,0466 ^{abc}	1.2949	-0.0028	0.0693	0.0371
SILIC20	1,1182 \pm 0,0411 ^{bcd}	1.3035	-0.0040	0.1516	0.0007
SILIC40	1,0088 \pm 0,0442 ^{ef}	1.2554	-0.0052	0.2164	<0,0001
SILIC60	0,9370 \pm 0,0487 ^f	1.2452	-0.0065	0.2780	<0,0001
SILID10	1,2248 \pm 0,0500 ^a	1.3834	-0.0033	0.0788	0.0236
SILID20	1,1826 \pm 0,0415 ^{ab}	1.3190	-0.0029	0.0750	0.0182
SILID40	1,1285 \pm 0,0450 ^{bcd}	1.2839	-0.0033	0.0828	0.0129
SILID60	1,1204 \pm 0,0415 ^{bcd}	1.2720	-0.0032	0.0957	0.0077
SILIM20	1,1702 \pm 0,0398 ^{abc}	1.3235	-0.0033	0.1064	0.0049
SILIM40	1,1647 \pm 0,0465 ^{abc}	1.3690	-0.0043	0.1341	0.0013
SILIM60	1,0517 \pm 0,0417 ^{de}	1.2628	-0.0045	0.1840	0.0002

SMI: Corresponde a los índices de calidad por tratamiento expresados en medias \pm error estándar. a-f: Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias entre los tratamientos ($p < 0,05$). β_1 : se refiere al aumento o disminución de la calidad espermática por hora de almacenamiento, expresada en % (0-100). R2: Coeficiente de determinación del modelo de regresión. Los resultados con valores p menores a 0,05 indican significancia.

En esta última tabla (**tabla 1.4**) es posible observar que, en términos del índice de calidad seminal, la media de SQi fue superior en el tratamiento SILID10, es decir, Silidianina a una

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

concentración de 10 μM mantiene de mejor manera la movilidad y cinética espermática durante el período de refrigeración, mientras que el valor más bajo de SQi lo presentó SILIC60, evidenciando un mayor impacto negativo de este tratamiento sobre los parámetros tenidos en cuenta a la hora de calcular el índice.

Los coeficientes de regresión (β_1) descritos en la **tabla 1.4** indican que el tratamiento SILIB20 presenta mayor capacidad para mantener la calidad espermática durante la refrigeración, mostrando menores pérdidas de calidad por hora de almacenamiento. Por el contrario, SILIC60 evidenció mayor disminución de la calidad por hora de refrigeración.

También, es importante mencionar que, entre el control y el DMSO no se presentaron diferencias en los índices de calidad, no obstante, en el análisis de regresión se evidencia que el primero disminuye en casi dos veces su calidad espermática respecto al segundo, quien muestra una mayor capacidad de mantener la calidad por hora de refrigeración.

De la misma manera, es posible observar que las menores concentraciones de cada molécula son los tratamientos que conservan en mayor proporción la calidad espermática por hora de almacenamiento, mostrando incluso, una protección mayor a la obtenida en el control, en este sentido a medida que aumenta la concentración de los antioxidantes, las pérdidas de calidad durante estos períodos se incrementan.

Es importante resaltar, que la Silidianina en todas sus concentraciones, mostró un impacto mayor a la hora de conservar la calidad espermática, apreciándose en la **tabla 1.4**, que todos los tratamientos de esta molécula obtuvieron pérdidas de la calidad espermática por hora de refrigeración inferiores al control.

1.4. Discusión

En los últimos años, la práctica de la inseminación artificial en la porcicultura ha evidenciado un gran aumento dadas sus múltiples ventajas respecto a la monta natural (fertilidad, prolificidad, genética y sanidad), además de favorecer el proceso de industrialización de este sector (Hidalgo, 2013). Esta práctica puede ser realizada con semen congelado o refrigerado, sin embargo, la elección del método de conservación depende de aspectos técnicos y económicos propios de la especie y el sector (Rodríguez-Gil, 2006).

En ese sentido, la mayoría de las inseminaciones realizadas en la especie porcina utilizan semen refrigerado a 15-17°C (Cuevas et al., 2003), no obstante, la calidad de las dosis seminales refrigeradas tiende a disminuir, afectando especialmente parámetros como la movilidad y la cinética espermática (Pezo et al., 2019; Yeste, 2017).

Tal como ocurrió en la presente investigación al presentarse una reducción gradual del movimiento espermático durante el tiempo de refrigeración. Diversos autores, han demostrado este mismo comportamiento, con estudios que detallan disminuciones en la movilidad durante el almacenamiento (Feng et al., 2020; Tian et al., 2019), incluso desde el primer día de refrigeración (Hidalgo et al., 2011), y otros que reportan la dilución y refrigeración de semen porcino, con reducciones en la motilidad total y en la progresiva durante el almacenamiento (Namuncura et al., 2020). Dichas investigaciones, aunque pueden diferir en el método de evaluación de la movilidad, coinciden en el comportamiento de esta característica.

La disminución de estos parámetros durante la conservación puede ser explicada por dos factores. Inicialmente, se encuentran las características del espermatozoide porcino, que, al ser una célula que posee una membrana plasmática con bajo contenido de colesterol y alta proporción de ácidos grasos insaturados : saturados en los fosfolípidos, presenta una importante susceptibilidad al choque frío (Yeste, 2017), En este sentido, la célula está expuesta a sufrir alteraciones en la movilidad, viabilidad y permeabilidad de membrana durante el almacenamiento (Waterhouse et al., 2004).

Explicando de esta manera los resultados del presente estudio, donde la funcionalidad de membrana plasmática evidenció una leve reducción tras el almacenamiento. No obstante,

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

es importante resaltar que en esta investigación no se presentaron diferencias entre suplementar con uno u otro flavonolignano o molécula antioxidante, es decir, ningún tratamiento mejoró o redujo la integridad funcional de membrana respecto al control.

En efecto, el estrés oxidativo constituye el segundo factor explicativo a los impactos negativos sufridos por la célula espermática. Varios autores han reportado que parte de la reducción de la fertilidad ocurrida durante el almacenamiento, se debe a esta condición, informando que la formación de especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno, puede llegar a ocasionar en el espermatozoide la peroxidación de los lípidos de su membrana (Awda et al., 2009; Cordova et al., 2009; Hidalgo et al., 2011), produciendo a su vez, la reducción en los niveles de ATP celular y la disminución del movimiento espermático (Gogol et al., 2009).

En tal sentido, se ha estudiado el efecto de adicionar antioxidantes con el fin de reducir los daños generados por el estrés oxidativo durante la refrigeración, por lo tanto, suplementar con estas moléculas se considera una alternativa interesante y prometedora, además de ser ampliamente utilizada cuando se pretende mejorar la calidad del semen almacenado (Tian et al., 2019).

En efecto, la Silimarina ha sido dada a conocer como un excelente antioxidante debido al éxito mostrado en los últimos años al ser utilizada como tratamiento de enfermedades hepáticas (Surai, 2015). De manera similar, en su adición a células espermáticas, la Silimarina ha generado buenos resultados, siendo reconocida como una molécula capaz de mejorar la viabilidad, conservar el porcentaje de espermatozoides con membranas intactas y preservar el movimiento espermático (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017).

En el presente estudio, la Silimarina se mostró como un antioxidante cuya menor concentración (20 μM) permitió preservar de mejor manera la calidad espermática, revelando un SQi superior al obtenido en el control y en las otras concentraciones de esta molécula, al tiempo que evidenció menores pérdidas por hora de refrigeración. Adicionalmente, una concentración de 40 μM mostró mayores movilidades espermáticas a las 96 h de conservación. Sugiriendo que, suplementar una concentración de Silimarina entre 20 μM y 40 μM trae beneficios sobre la calidad espermática en el semen porcino sometido a refrigeración.

El único reporte encontrado hasta el momento, donde se ha suplementado Silimarina al semen porcino, fue realizado a nivel terapéutico, sin someter las dosis seminales a refrigeración y con una evaluación subjetiva de la movilidad, sin embargo, fue posible confirmar en este trabajo, que el movimiento espermático aumentó en función de la concentración de Silimarina (Jang et al., 2011), coincidiendo con el aumento de movilidad presentado en la actual investigación, al aumentar de 20 a 40 μM .

No obstante, el estudio de Jang et al. (2011), utilizó concentraciones de Silimarina entre 50 y 200 μM , valores realmente altos comparados con los suplementados en el presente estudio, donde la movilidad espermática disminuyó drásticamente al intentar suplementar dosis mayores a 60 μM . De igual manera, se han encontrado reportes de la adición de este antioxidante en espermatozoides de otras especies, donde las concentraciones suplementadas difieren a las adicionadas en células espermáticas porcinas.

Dos de estos estudios encontrados han evaluado el efecto de la Silimarina en espermatozoides humanos. El primer estudio en humanos muestra que esta molécula a 2 μM logró atenuar biomarcadores de estrés oxidativo en células espermáticas previamente tratadas con Cadmio, por lo que permitió mejorar su calidad, compensado así, los efectos adversos generados por este compuesto tóxico (Etemadi et al., 2022). Mientras que en el segundo, la suplementación de 0.5 – 1 μM de esta molécula, permitió mitigar los daños del cloruro de Aluminio sobre la movilidad y la membrana plasmática de los espermatozoides (Aghashahi et al., 2020).

La Silimarina también ha sido estudiada en espermatozoides de rata, evaluando el efecto terapéutico de administrar 100 mg/kg de Silimarina en animales diabéticos. Dicho reporte, la muestra como una molécula efectiva en el tratamiento de infertilidad generado por la diabetes, al mejorar parámetros espermáticos como la integridad de ADN y la viabilidad, además de disminuir las alteraciones histopatológicas testiculares (Pourheydar et al., 2021). Del mismo modo, la administración de 160 mg/Kg de Silimarina logró modular el mecanismo antioxidante en ratas tratadas con acrilamida, al prevenir déficits e índices reproductivos alterados inducidos por esta última, mostrando a la Silimarina como un antioxidante capaz de proteger el aparato reproductivo y mejorar la fertilidad (Ahmed et al., 2022).

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Aunque los estudios mencionados anteriormente son basados en la suplementación de Silimarina y su efecto a nivel terapéutico, sus resultados coinciden con el presente estudio, al evidenciar que la Silimarina puede proteger el sistema reproductor y mejorar las características espermáticas de diversas especies, aún si son tratadas o suplementadas en concentraciones diferentes.

Adicionalmente, también se encuentran estudios de la adición de Silimarina en células espermáticas de animales en producción, entre los que se encuentra que la suplementación de esta molécula en semen bovino a concentraciones entre 0.36 – 0.72 mg/mL permitió obtener movilidades superiores al control por un período de más de 6 días de refrigeración (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017). Similar a su adición en células de ovino, donde se mejoró la movilidad y cinética espermática a las 72 horas de refrigeración con una concentración de 100-150 $\mu\text{g/mL}$ (Roostaei-Ali Mehr & Parisoush, 2016). Resaltando de este modo que, estos estudios al igual que la actual investigación, coinciden en la mejora de la movilidad espermática con la adición de Silimarina en diferentes concentraciones.

Lo anterior, puede atribuirse a las propiedades de oxidorreducción y a la capacidad que presentan los polifenoles como la Silimarina, de absorber y neutralizar las especies reactivas de oxígeno (Roostaei-Ali Mehr & Parisoush, 2016), de eliminar radicales libres (Etemadi et al., 2022) o reaccionar con ellos y convertirlos en compuestos con menos toxicidad (Pourheydar et al., 2021). Además de ser un antioxidante capaz de estimular la actividad de enzimas que constituyen los principales mecanismos fisiológicos de defensa contra los radicales libres, como lo son la superóxido dismutasa y Glutación peroxidasa, mecanismo de acción confirmado en células sanguíneas (Wellington & Jarvis, 2001).

La Silimarina, también actúa como captador de radicales libres y mejora la acción de otras enzimas como la Catalasa. Al tiempo que optimiza la cadena de electrones y reduce la fuga de estos, además, disminuye la actividad de enzimas mitocondriales productoras de EROs como la α -cetoglutarato deshidrogenasa, y actúa sobre la permeabilidad de la membrana celular, aumentando su estabilidad (Taleb et al., 2018).

Todas estas propiedades, hacen de la Silimarina, una muy buena alternativa para la conservación de la calidad del semen porcino refrigerado, siempre y cuando, esta sea

adicionada en concentraciones adecuadas (20 μM – 40 μM), cuyo efecto, permite disminuir los efectos negativos generados por el estrés oxidativo sobre la calidad seminal.

Como segunda molécula en estudio se encuentra la Silibinina, componente principal del extracto de semillas de cardo mariano (Mohammad et al., 2020). En la presente investigación, la menor concentración de Silibinina (20 μM), constituyó el tratamiento con menores pérdidas de calidad espermática por hora de refrigeración respecto al resto de moléculas y concentraciones evaluadas, sugiriendo su buena capacidad protectora. Esta molécula, ha mostrado buenos resultados en diferentes tipos de células donde se ha estudiado su efecto protector y su acción contra el estrés oxidativo, por lo que es posible encontrar estudios con este flavonolignano en células cardíacas (Chen et al., 2020), neuronales (Wang et al., 2016) y principalmente en hepatocitos (Haddad et al., 2011).

Hasta el momento, se han encontrado algunas investigaciones donde se ha evaluado el efecto de la Silibinina en espermatozoides. Aunque son experimentos diferentes a lo planteado en esta investigación, ya que las células espermáticas son recuperadas directamente de los epidídimos de ratas macho sacrificadas, esta molécula evidenció efectos positivos, logrando mejorar la movilidad de los espermatozoides, compensar los daños ocasionados con el Sulfato de Níquel (Temamogullari et al., 2021) y mitigar los efectos tóxicos del metotrexato (Oufi & Al-Shawi, 2014). Estos, a pesar de ser estudios con énfasis terapéutico, coinciden con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde la suplementación de Silibinina 20 μM mostró valores altos de movilidad espermática durante el tiempo de refrigeración.

Este efecto protector de la Silibinina, puede ser atribuido a la capacidad que presenta esta molécula para disminuir la peroxidación lipídica, reducir la liberación de O_2 e influir en los niveles de Glutación reducido (Haddad et al., 2011). Adicionalmente, puede constituir una excelente alternativa, dado que el glutatión reducido es uno de los antioxidantes que se encuentra presente en el ambiente que rodea a la célula espermática (Membrillo Ortega et al., 2003), siendo posible potenciar la actividad de defensa del espermatozoide frente a los daños deletéreos ocasionados por las EROs y el estrés oxidativo.

El campo investigativo está sesgado a atribuir las propiedades beneficiosas de la Silimarina a la Silibinina, su principal componente. No obstante, la Silimarina está compuesta por

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

hasta 10 flavonolignanos según la planta y el método de extracción utilizado, los cuales, no están tan ampliamente estudiados (Biedermann et al., 2016) y cuya información sobre su capacidad antioxidante es bastante limitada (Pyszková et al., 2016). Es el caso de la Silicristina, el segundo flavonolignano más abundante de la Silimarina, después de la Silibinina (Biedermann et al., 2016), y que para esta investigación demostró ser la molécula cuyo efecto evidencia de manera más clara la importancia de la concentración a la hora de suplementar el semen porcino.

En este sentido, el efecto de la Silicristina fue inversamente proporcional a la concentración suplementada, evidenciando que, el mayor beneficio sobre la calidad espermática se obtuvo entre 10 y 20 μM . Sugiriendo de este modo, que la Silicristina suplementada a concentraciones bajas, puede tener una gran capacidad protectora sobre la movilidad espermática y menores pérdidas por hora de refrigeración, incluso mejor que la Silimarina. De esta manera, es posible confirmar el poder antioxidante que posee esta molécula, al tener la capacidad de reducir los niveles de EROs (Qin et al., 2017), que pueden generar los descensos en la calidad espermática.

Por el contrario, la concentración más alta de Silicristina presentó mayor reducción de la movilidad y cinética espermática respecto a los demás tratamientos. Dicha disminución se hace más evidente a medida que avanza el tiempo de refrigeración, especialmente en MT, MP, VAP, VCL y VSL. Lo anterior, sugiere que concentraciones superiores a Silicristina 60 μM , pueden estar generando un efecto citotóxico en espermatozoides porcinos similar al reportado en células pancreáticas (Qin et al., 2017). Esta reducción asociada a la adición de un antioxidante en altas concentraciones, coincide con lo reportado por Zhang et al. (2015) con pérdidas de la calidad y descensos en la motilidad espermática durante la refrigeración.

Por último, se encuentra la Silidianina, otro de los flavonolignanos con poca información a nivel investigativo. No obstante, en el presente estudio corresponde a la molécula que presentó mayor impacto sobre la calidad espermática, destacando sus menores concentraciones como los tratamientos que generaron mejores beneficios en movilidad y mayor influencia sobre parámetros cinéticos, respecto al resto de antioxidantes. Al tiempo que, como molécula, independiente de su concentración, evidenció una protección de la calidad espermática superior a la del control.

Lo anterior, puede ser atribuido a la capacidad que presenta este antioxidante de inhibir de manera eficaz la producción y la liberación de radicales libres, actividad ya reportada en otro tipo de células, como los neutrófilos (Zielińska-Przyjemska & Wiktorowicz, 2006), por lo tanto, al suplementar esta molécula en el diluyente porcino, es posible disminuir el impacto generado por el estrés oxidativo sobre la calidad espermática durante su conservación a 16°C.

Adicionalmente, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas entre el control (sin antioxidante) y el tratamiento con DMSO durante el tiempo de refrigeración, a excepción de MP y ALH en la hora 72 de conservación, algo importante, teniendo en cuenta que el DMSO es comúnmente usado como crioprotector, pero cuyo estudio en la refrigeración de semen porcino es escaso (Singh et al., 2018). Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren de lo reportado por Singh et al. (2018), donde la adición de diferentes porcentajes de DMSO a diversos tipos de diluyentes, no generó ningún efecto positivo sobre la capacidad de conservación de semen porcino a 15°C, disminuyendo parámetros como motilidad y HOST.

En términos generales, la Silimarina es un producto natural con actividad hepatoprotectora, antiproliferativa y antioxidante, utilizado desde la antigüedad en diversas aplicaciones medicinales. No obstante, se hace necesario ampliar el campo investigativo referente a esta molécula y sus flavonolignanos, dada su acción prometedora y su capacidad protectora demostrada en algunos estudios e investigaciones, además de la poca información disponible sobre la evaluación de estos últimos compuestos en células espermáticas.

1.5. Conclusiones

- La suplementación del diluyente espermático con Silimarina y sus flavonolignanos, puede modificar y mejorar la movilidad y cinética espermática del semen porcino refrigerado, logrando proteger de manera eficiente los espermatozoides porcinos, siempre y cuando, estos sean adicionados en bajas concentraciones.
- La suplementación del diluyente con Silimarina y sus flavonolignanos tiene la capacidad de mitigar la reducción de la calidad del semen porcino durante el tiempo de almacenamiento en condiciones de refrigeración a 16°C.
- Entre los flavonolignanos evaluados, la Silidianina brinda la mejor protección de la calidad espermática en el semen porcino refrigerado, mientras que, la Silicristina reduce la movilidad y la cinética espermática, y puede ejercer un efecto deletéreo en los espermatozoides, en función de su concentración.

1.6. Bibliografía

- Aghashahi, M., Momeni, H. R., & Darbandi, N. (2020). Impact of aluminium toxicity on vital human sperm parameters—Protective effects of silymarin. *Andrologia*, April, 1–10. <https://doi.org/10.1111/and.13742>
- Ahmed, H., Amin, H., Clement, A. (2022). Silymarin abrogates acrylamide-induced oxidative stress-mediated testicular toxicity via modulation of antioxidant mechanism, DNA damage, endocrine deficit and sperm quality in rats. *Andrologia*, 54(9). <https://doi.org/10.1111/and.14491>
- Awda, B. J., Mackenzie-Bell, M., & Buhr, M. M. (2009). Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of Reproduction*, 81(3), 553–561. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076471>
- Basioura, A., Boscós, C. M., Parrilla, I., Tsousis, G., & Tsakmakidis, I. A. (2018). Effect of astaxanthin on the quality of boar sperm stored at 17°C, incubated at 37°C or under in vitro conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 463–471. <https://doi.org/10.1111/RDA.13133>
- Beconi M.T., Francia C.R., Mora N.G., Affranchino M.A. (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40841-851
- Biedermann, D., Buchta, M., Holečková, V., Sedlák, D., Valentová, K., Cvačka, J., Bednářová, L., Křenková, A., Kuzma, M., Škuta, C., Peikerová, Ž., Bartůněk, P., & Křen, V. (2016). Silychristin: Skeletal Alterations and Biological Activities. *Journal of Natural Products*, 79(12), 3086–3092. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00750>
- Chen, Y.-H., Lin, H., Wang, Q., Hou, J.-W., Mao, Z.-J., & Li, Y.-G. (2020). Protective role of silibinin against myocardial ischemia/reperfusion injury-induced cardiac dysfunction. *International Journal of Biological Sciences*, 16(11), 1972–1988. <https://doi.org/10.7150/ijbs.39259>
- Cordova, A., Ruiz, C., Córdova, C., Córdova, M., Eulogio, J., Guerra, J., Rodríguez, B., & Salinas, K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Computense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 1–38.
- Cuevas, M., Romero, F., & Parodi, J. (2013). Reactive oxygen species can alter physiological parameters of sperm; the future of macromolecules in boar semen dilutions. *International Journal of the Bioflux Society*, 3(2), 40–49.
- El-Sheshtawy, R., & El-Nattat, W. (2017). Impact of silymarin enriched semen extender on bull sperm preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 6(2), 81–84. <https://doi.org/10.12980/apjr.6.20170206>
- Eskandari, F., & Momeni, H. R. (2016). Protective effect of silymarin on viability, motility and mitochondrial membrane potential of ram sperm treated with sodium arsenite. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(6), 397–402. <https://doi.org/10.29252/ijrm.14.6.397>

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

- Etemadi, T., Reza, H., & Asghar, A. (2020). Impact of silymarin on cadmium-induced apoptosis in human spermatozoa. *Andrologia*, 52(11), 1-9. <https://doi.org/10.1111/and.13795>.
- Etemadi, T., Reza, H., Darbandi, N., & Hussein, M. (2022). Silymarin modulates cadmium-induced oxidative stress in human spermatozoa. *Andrologia*, 52(11), 1-9. <https://doi.org/10.1111/and.14475>
- Fair, S., & Romero-Aguirregomezcorta, J. (2019). Implications of boar sperm kinematics and rheotaxis for fertility after preservation. *Theriogenology*, 137, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.032>
- Fang, Q., Wang, J., Hao, Y. Y., Li, H., Hu, J. X., Yang, G. S., & Hu, J. H. (2017). Effects of iodine methionine on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 1061–1066. <https://doi.org/10.1111/RDA.13024>
- Feng, T. Y., Lv, D. L., Zhang, X., Du, Y. Q., Yuan, Y. T., Chen, M. J., Xi, H. M., Li, Y., Han, N., & Hu, J. H. (2020). Rosmarinic acid improves boar sperm quality, antioxidant capacity and energy metabolism at 17°C via AMPK activation. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(12), 1714–1724. <https://doi.org/10.1111/rda.13828>
- Flores, C., Meléndez, C., Mendoza, C., Márquez, Y., & Vilanova, L. T. (2018). Efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdo. *Revista Veterinaria*, 29(1), 13. <https://doi.org/10.30972/vet.2912780>
- Funahashi, H., & Sano, T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology*, 63(6), 1605–1616. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>
- Gogol, P., Szczesniak-Fabiańczyk, B., & Wierchoś-Hilczer, A. (2009). The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reproductive Biology*, 9(1), 39–49. [https://doi.org/10.1016/S1642-431X\(12\)60093-X](https://doi.org/10.1016/S1642-431X(12)60093-X)
- Haddad, P. S., Haddad, Y., Vallerand, D., & Brault, A. (2011). Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.1093/ECAM/NEP164>
- Hidalgo, D. M. (2013). Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. In *Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado*. [Universidad de Extremadura]. <https://dehesa.unex.es:8443/handle/10662/799?mode=full>
- Hidalgo, D. M., Barón, F. J., Bragado, M. J., Carmona, P., Robina, A., García-Marín, L. J., & Gil, M. C. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology*, 75(8), 1550–1560. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.021>

- Jang, H.-Y., Kong, H. S., Choi, B.-Y., Shin, J.-S., Cheong, H.-T., Kim, J.-T., Park, I.-C., Park, C.-K., & Yang, B.-K. (2011). Protective Effects of Silymarin against the Toxicity of Bisphenol A (BPA) on Boar Sperm Quality. *Journal of Embryo Transfer*, 26(4), 257–263.
- Li, H., Zhang, X. G., Fang, Q., Liu, Q., Du, R. R., Yang, G. S., Wang, L. Q., & Hu, J. H. (2017). Supplemental effect of different levels of taurine in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17°C. *Animal Science Journal* (Vol. 88, Issue 11, pp. 1692–1699). <https://doi.org/10.1111/asj.12865>
- Membrillo Ortega, A., Córdova Izquierdo, A., Hicks Gómez, J. J., Olivares-Corichi, I. M., Martínez Torres, V. M., & Valencia Mendez, J. D. J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, 28(12).
- Mohammad, A., Shifa, B., Ababneh, Q., El-Elimat, T., Qinna, N., & Alzoubi, K. H. (2020). Silibinin attenuates adipose tissue inflammation and reverses obesity and its complications in diet-induced obesity model in mice. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 21(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S40360-020-0385-8/FIGURES/5>
- Namuncura, C., Sánchez, R., Pezo, F., Uribe, P., Navarro, P., & Zambrano, F. (2020). Rest days and storage of boar semen at 17°C: Effect on motility and sperm concentration. *Andrologia*, 52, 1–6. <https://doi.org/10.1111/and.13578>
- Neild, D. M., Chaves, M. G., Flores, M., Miragaya, M. H., Gonzalez, E., & Agüero, A. (2000). The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*, 32(6), 351–355. <https://doi.org/10.1046/J.1439-0272.2000.00357.X>
- Núñez-Martínez, I., Moran, J. M., & Peña, F. J. (2006). A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: Changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 41, 408–415. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00685.x>
- Oufi, H. G., & Al-Shawi, N. N. (2014). The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice. *European Journal of Pharmacology*, 730(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.02.010>
- Pascual, C., Gonz, R., Armesto, J., & Muriel, P. (1993). Effect of silymarin and silybinin on oxygen radicals. *Drug Development Research*, 29(1), 73–77. <https://doi.org/10.1002/ddr.430290109>
- Pezo, F., Romero, F., Zambrano, F., & Sánchez, R. S. (2019). Preservation of boar semen: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 423–434. <https://doi.org/10.1111/rda.13389>
- Pourheydar, B., Azarm, F., Farjah, G., Karimipour, M., & Pourheydar, M. (2021). Effect of silymarin and metformin on the sperm parameters and histopathological changes of testes in diabetic rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 19(12), 1091–1104. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i12.10060>

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

- Pyszková, M., Biler, M., Biedermann, D., Valentová, K., Kuzma, M., Vrba, J., Ulrichová, J., Sokolová, R., Mojović, M., Popović-Bijelić, A., Kubala, M., Trouillas, P., Křen, V., & Vacek, J. (2016). Flavonolignan 2,3-dehydroderivatives: Preparation, antiradical and cytoprotective activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 90, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.014>
- Qin, N., Hu, X., Li, S., Wang, J., Li, Z., Li, D., Xu, F., Gao, M., & Hua, H. (2017). Hypoglycemic effect of silychristin A from *Silybum marianum* fruit via protecting pancreatic islet β cells from oxidative damage and inhibiting α -glucosidase activity in vitro and in rats with type 1 diabetes. *Journal of Functional Foods*, 38, 168–179. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.09.013>
- Rodriguez-Gil, J. E. (2006). Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(SUPPL. 2), 11–20. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00765.x>
- Roostaei-Ali Mehr, M., & Parisoush, P. (2016). Effect of different levels of silymarin and caproic acid on storage of ram semen in liquid form. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 569–574. <https://doi.org/10.1111/rda.12721>
- Singh, B., Bonia, K. K., Tamuli, M. K., Sinha, S., Tamuly, S., Sarma, A. K., & Bhuyan, G. (2019). Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on preseservability of boar semen at 15°C. *Indian Journal of Animal Research*, 53(7), 870–873. <https://doi.org/10.18805/ijar.B-3603>
- Surai, P. F. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204–247. <https://doi.org/10.3390/antiox4010204>
- Taleb, A., Ahmad, K. A., Ihsan, A. U., Qu, J., Lin, N., Hezam, K., Koju, N., Hui, L., & Qilong, D. (2018). Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102(January), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.140>
- Temamogullari, F., Atessahin, A., Cebi Sen, C., Yumusak, N., & Dogru, M. (2021). Protective role of silibinin over nickel sulfate-induced reproductive toxicity in male rats. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 24(1), 29–34. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.135817>
- Tian, X., Li, D., He, Y., Zhang, W., He, H., Du, R., Pang, W., Yang, G., & Yu, T. (2019). Supplementation of salvianic acid A to boar semen extender to improve seminal quality and antioxidant capacity. *Animal Science Journal*, 90(9), 1142–1148. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13263>
- Torres, P., Fischman, M. L., Acerbo, M., García, C., Míguez, M., Domínguez, J., & Cisale, H. (2014). Análisis de diluyentes comerciales de semen porcino refrigerado durante 4 días: resultados preliminares. *Archivos de Zootecnia*, 63(243), 547–550. <https://doi.org/10.4321/s0004-05922014000300015>
- Wang, M., Li, Y.-J., Ding, Y., Zhang, H.-N., Sun, T., Zhang, K., Yang, L., Guo, Y.-Y., Liu, S.-B., Zhao, M.-G., & Wu, Y.-M. (2016). Silibinin Prevents Autophagic Cell Death upon Oxidative Stress in Cortical

Neurons and Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 932–943.
<https://doi.org/10.1007/S12035-014-9062-5/FIGURES/9>

Waterhouse, K. E., de Angelis, P. M., Haugan, T., Paulenz, H., Hofmo, P. O., & Farstad, W. (2004). Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology*, 62(9), 1638–1651.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.001>

Wellington, K., & Jarvis, B. (2001). Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders.

Williams, S. (2013). Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37(2), 207–212.

Yeste, M. (2017). State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, 14(1), 69–81. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>

Zhang, X. G., Yan, G. J., Hong, J. Y., Su, Z. Z., Yang, G. S., Li, Q. W., & Hu, J. H. (2015). Effects of Bovine Serum Albumin on Boar Sperm Quality During Liquid Storage at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 263–269. <https://doi.org/10.1111/rda.12481>

Zielińska-Przyjemska, M., & Wiktorowicz, K. (2006). An In vitro Study of the Protective Effect of the Flavonoid Silydianin against Reactive Oxygen Species. *Phytother. Res*, 20, 115–119.
<https://doi.org/10.1002/ptr.1812>

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Capítulo enfocado al cumplimiento de los objetivos específicos 2 y 3: 2. Determinar el efecto de la adición de Silimarina y sus componentes en la capacidad antioxidante, el estado redox y la peroxidación lipídica en el semen porcino refrigerado / 3. Evaluar el efecto de la refrigeración de semen porcino suplementado con Silimarina y otros flavonolignanos (Silidianina, Silicristina y Silibinina) sobre la actividad mitocondrial de los espermatozoides

Capítulo 2: efecto de la Silimarina y sus componentes sobre el perfil oxidativo/antioxidante y la actividad mitocondrial del semen porcino refrigerado

Resumen

La reducción de la calidad espermática ocurrida durante la refrigeración es explicada por el estrés oxidativo que sufre el espermatozoide. Esta condición se ha atribuido al estrés osmótico, químico y térmico, que generan en la célula la disminución de la movilidad, pérdida de la actividad mitocondrial, oxidación de los lípidos y la reducción en la integridad de la membrana plasmática. Dichas alteraciones, comprometen a su vez la funcionalidad de la célula y su capacidad fertilizante. Una alternativa interesante y prometedora para mitigar estos daños mencionados, es la adición de antioxidantes al diluyente de semen porcino. El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la Silimarina (SILIM), Silidianina (SILID), Silicristina (SILIC) y Silibinina (SILIB) sobre la capacidad antioxidante total (CAT), el estado redox, la peroxidación lipídica (LPO) y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_M$) del semen porcino refrigerado. Para ello, quince eyaculados de cinco cerdos (*Sus scrofa domestica*) fueron diluidos en MRA ® KUBUS, suplementado con las cuatro moléculas antioxidantes y refrigerado a 16°C durante cinco días. Los efectos de los tratamientos fueron analizados a las 0 y 96 h de refrigeración, mediante la evaluación de la producción de EROs y la CAT por espectrofluorimetría, para los ensayos FRAP y ABTS^{•+}; y la peroxidación lipídica y la actividad mitocondrial mediante citometría de flujo. La suplementación con Silidianina en todas sus concentraciones generó una menor producción de EROs ($p < 0,05$), mientras Silibinina (20 y 60 μM) produjo la mayor cantidad de EROs a las 96 h de refrigeración ($p < 0,05$). Silidianina 60 μM (ABTS^{•+}) y Silibinina 20 μM (FRAP) incrementaron la CAT a las 96 h de refrigeración. Adicionalmente, Silibinina 40 μM y Silimarina 60 μM exhibieron una menor velocidad (cinética) en la producción de

EROs. No se presentaron diferencias entre tratamientos para la LPO ($p > 0,05$). Se observó un incremento del $\Delta\psi_M$ para Silidianina 20 μM y DMSO, y una mayor integridad estructural de la membrana para Silidianina 20 μM , mientras que Silicristina 20 μM redujo estos dos parámetros. Se concluye que la Silimarina y sus flavonolignanos pueden reducir, según su concentración, la generación de EROs, incrementar la CAT y modificar el $\Delta\psi_M$ del semen porcino refrigerado.

Palabras clave:

Estrés oxidativo, semen porcino, Silibinina, Silicristina, Silidianina, Silimarina.

Abstract

The reduction in sperm quality that occurs during refrigeration is explained by the oxidative stress of the spermatozoa. This condition has been attributed to osmotic, chemical and thermal stresses, resulting in decreased cell motility, loss of mitochondrial activity, lipid oxidation and reduced plasma membrane integrity. These alterations, in turn, compromise the functionality of the cell and its fertilizing capacity. An interesting and promising alternative to mitigate these damages is the addition of antioxidants to the boar semen diluent. The aim of this chapter was to evaluate the effect of Silymarin (SILIM), Silydianin (SILID), Silychristin (SILIC) and Silybinin (SILIB) on total antioxidant capacity (TAC), redox state, lipid peroxidation (LPO) and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_M$) of refrigerated boar semen. For this purpose, fifteen ejaculates from five swine (*Sus scrofa domestica*) were diluted in MRA ® KUBUS, supplemented with the four antioxidant molecules and refrigerated at 16°C for five days. Treatment effects were analyzed at 0 and 96 h of cooling by assessing EROs production and CAT by spectrofluorimetry, for FRAP and ABTS^{•+} assays; and lipid peroxidation and mitochondrial activity by flow cytometry. All concentrations of Silydianin generated lower EROs production ($p < 0,05$), while silybinin (20 and 60 μM) produced the highest amount of EROs at 96 h of refrigeration ($p < 0,05$). Silydianin 60 μM (ABTS^{•+}) and silybinin 20 μM (FRAP) increased CAT at 96 h of refrigeration. Furthermore, Silybinin 40 μM and Silymarin 60 μM exhibited a slower rate (kinetics) of EROs production. No differences were found between treatments for LPO ($p >$

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silydianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

0,05). Increased $\Delta\psi M$ was observed for Silydianin 20 μM and DMSO, and greater membrane structural integrity for Silydianin 20 μM , while Silychristin 20 μM reduced these two parameters. It is concluded that Silymarin and its flavonolignans can reduce, depending on their concentration, EROs generation, increase CAT and modify the $\Delta\psi M$ of refrigerated boar semen.

Keywords:

Silybinin, silychristin, silydianin, silymarin, oxidative stress, swine semen.

2.1. Introducción

La inseminación artificial (IA) es la técnica más utilizada a nivel mundial para la reproducción porcina (Fair & Romero-Aguirregomezcorta, 2019). Siendo implementada en mayor medida con semen refrigerado a una temperatura de 15 - 17 °C, y conservado durante un período corto de tiempo, generalmente de 1 a 5 días (Pezo et al., 2019). Este método de conservación, aunque es más simple y práctico, genera la reducción de la calidad espermática, impidiendo el almacenamiento de las dosis seminales durante períodos de tiempo más prolongados (Tian et al., 2019).

Diversos métodos de conservación producen estrés oxidativo en la célula, un estado definido como el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, que crea una condición a favor de los oxidantes y genera un potencial destructivo y patogénico (Potra et al., 2021), En ese sentido, la conservación tanto en refrigeración como congelado pueden hacer que la células experimenten este estado, evidenciando un desequilibrio a favor de los radicales libres como consecuencia del agotamiento en el nivel de antioxidantes (Bollwein & Bittner, 2018; Faudale et al., 2008).

El espermatozoide es una célula altamente susceptible al daño oxidativo debido al bajo contenido de citoplasma, a la alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana plasmática y al débil sistema antioxidante que posee (Aitken et al., 2016). Al sufrir este estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno empiezan a ejercer un papel negativo sobre las células al agotar los sistemas antioxidantes, promover la peroxidación de los lípidos de la membrana, reducir el potencial de membrana mitocondrial, ocasionar la desnaturalización de las proteínas, el deterioro del ADN y la pérdida de la movilidad espermática (Khoi et al., 2021).

En este sentido, la adición de moléculas antioxidantes al diluyente espermático porcino, en busca de mitigar los efectos deletéreos generados por el estrés oxidativo durante la refrigeración, es considerada una alternativa prometedora y ha sido ampliamente estudiada en el campo de la reproducción animal (Funahashi & Sano, 2005; Tian et al., 2019).

En los últimos años, se ha investigado el efecto de gran cantidad de moléculas sobre la calidad y la capacidad antioxidante de las células espermáticas, aumentando el interés de

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

innovar y dar preferencia a productos naturales, que sean amigables con el medio ambiente y sobresalgan por su capacidad protectora (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017).

Entre los antioxidantes alternativos con resultados prometedores que han sido estudiados, se encuentra la Silimarina, un flavonoide extraído de la planta *Silybum marianum* (cardo mariano), y que ha sido estudiado en células cardiacas, hepáticas, y en espermatozoides de ratas (Pourheydar et al., 2021; Ahmed et al., 2022), bovinos (El-Sheshtawy & El-Nattat, 2017), humanos (Aghashahi et al., 2020; Etemadi et al., 2020; Etemadi et al., 2022), ovinos (Eskandari & Momeni, 2016) y porcinos (Jang et al., 2011).

La Silimarina, como producto natural, posee gran cantidad de actividades biológicas, es hepatoprotectora, antiproliferativa y antioxidante (Abouzid & Ahmed, 2013). Además, de estar compuesta de varios flavonolignanos, principalmente Silidianina, Silicristina y Silibinina (Pascual et al., 1993), que también poseen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes (Surai, 2015).

En este sentido, el presente capítulo plantea como objetivo, evaluar el efecto de la adición de Silimarina, Silicristina, Silibinina y Silidianina sobre la capacidad antioxidante, el estado redox, la peroxidación lipídica y la actividad mitocondrial del semen porcino refrigerado a 16°C.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Localización

Esta investigación se llevó a cabo en la Estación Agraria San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Un centro de producción ubicado en el municipio de Rionegro, vereda el Tablacito, zona Oriental del Departamento de Antioquia, con una extensión de 27.67 hectáreas dedicadas a la producción e investigación en porcinos y que cuenta con un laboratorio para el procesamiento de semen. Este centro de producción, se caracteriza por presentar una temperatura promedio entre 12 y 18°C, está ubicado a una altura aproximada de 2100 metros sobre el nivel del mar y presenta una precipitación de 2280 mm al año y una humedad relativa de 75.5%.

El material de investigación (semen porcino) se recolectó de los cerdos pertenecientes a esta granja, cuyas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Reproducción Animal ubicado en esta misma estación agraria y evaluadas en Medellín, en el Laboratorio de Citometría de Flujo de la Universidad de Antioquia (SIU) y el laboratorio de Ciencias de los alimentos de la Universidad Nacional de Colombia (Núcleo el volador).

2.2.2. Recolección y procesamiento del material de investigación

Para esta investigación se colectaron cinco machos porcinos (Landrace Belga, Pietrán y PIC410, entre 3 y 5 años de edad), un eyaculado por animal, para un total de cinco eyaculados. La recolección del semen se realizó mediante el método de mano enguantada (Feng et al., 2020), donde empleando guantes de polivinilo y sobre un “potro” sólido o maniquí, se realizó la colecta de los eyaculados. Posterior a la eyaculación, se removió por filtración y de manera inmediata, la primera parte del eyaculado o fracción gel que carece de espermatozoides y puede afectar la conservación del eyaculado. Dentro de los siguientes 15 minutos siguientes a la colecta, el material seminal fue sometido a una temperatura de 37°C en un baño maría.

Al semen colectado le fue medida la concentración en fresco mediante un fotómetro minitube SDM1, con el software previamente configurado en especie porcina y con una

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

gota de 30 μL de semen puro. Además, se evaluaron los parámetros de volumen y movilidad, mediante una probeta graduada y un sistema CASA (HTM-IVOS versión 12.3 by HAMILTON THORNE). Solo se procesaron los eyaculados con mínimo 60% de movilidad.

Posteriormente, se realizó la dilución en MRA ® diluyente porcino de KUBUS (Kubus S.A, Madrid, Spain) hasta alcanzar una concentración de 60 millones de espermatozoides/mL, se midió nuevamente la movilidad en sistema CASA después de la dilución y se depositaron 1 mL de este semen diluido en tubos eppendorf, para la suplementación con el antioxidante respectivo de las 4 moléculas planteadas (Silimarina, Silidianina, Silicristina y Silibinina). También se analizó un control sin adición de antioxidante (Control) y un control con Dimetilsulfoxido (DMSO), en un volumen representativo de la cantidad utilizada en la disolución de cada molécula, dado que este crioprotector constituyó el medio de dilución de los antioxidantes trabajados. Lo anterior se especifica en las tablas **2.1** y **2.2**.

Para las evaluaciones de capacidad antioxidante total (CAT) y producción de especies reactivas (EROs) por espectrofluorimetría, se suplementaron las mismas moléculas y concentraciones del **capítulo 1** de la presente tesis, lo cual se muestra en la tabla **2.1**.

Tabla 2.1. Tratamientos suplementados para las evaluaciones de la Capacidad antioxidante total y la generación de especies reactivas de Oxígeno

Antioxidante	Stock	Concentración	Tratamiento
-	-	-	CONTROL
Silibinina	5,18 mM	20 μM	SILIB20
		40 μM	SILIB40
		60 μM	SILIB60
Silicristina	2,47 mM	10 μM	SILIC10
		20 μM	SILIC20
		40 μM	SILIC40
		60 μM	SILIC60
Silidianina	20,73 mM	10 μM	SILID10
		20 μM	SILID20
		40 μM	SILID40

		60 μ M	SILIC60
Silimarina	20,73 mM	20 μ M	SILIM20
		40 μ M	SILIM40
		60 μ M	SILIM60

Todas las moléculas del presente estudio, fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Para la evaluación mediante citometría de flujo, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi M$), peroxidación lipídica de membrana (LPO) e integridad estructural de membrana plasmática (VE), solo fueron suplementados y analizados los tratamientos con mejores índices de calidad seminal (SQi), obtenidos en el **capítulo 1** de la presente investigación (Capítulo 1, tabla 1.4, variable SMI, expresada en Media \pm EE del SQi). Especificado en la **tabla 2.2** mostrada a continuación:

Tabla 2.2. Tratamientos suplementados para las evaluaciones de Potencial de membrana mitocondrial, vitalidad espermática y peroxidación lipídica

Antioxidante	Stock	Concentración	Tratamiento
-	-	-	CONTROL
Silibinina	5,18 mM	20 μ M	SILIB20
		40 μ M	SILIB40
Silicristina	2,47 mM	10 μ M	SILIC10
		20 μ M	SILIC20
Silidianina	20,73 mM	10 μ M	SILID10
		20 μ M	SILID20
Silimarina	20,73 mM	20 μ M	SILIM20
		40 μ M	SILIM40

Todas las moléculas del presente estudio, fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Para ambos ensayos, el semen fue previamente diluido y suplementado con la molécula antioxidante, para finalmente ser trasladado al laboratorio respectivo, donde fueron evaluados y sometidos a refrigeración en una nevera modificada, a una temperatura de 16°C durante 5 días consecutivos. Esto último, teniendo en cuenta que la refrigeración de semen porcino es realizada a una temperatura de 15 a 17°C (Torres et al., 2014), como

principal método de conservación espermática para la implementación de la inseminación artificial en porcinos (Hidalgo, 2013). Todos los reactivos utilizados en el presente estudio fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

2.2.3. Análisis mediante espectrofluorimetría

Las siguientes evaluaciones fueron realizadas a la hora 0 y 96 de refrigeración a 16°C, en el Laboratorio de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Núcleo el volador).

- **Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS^{•+}.**

La prueba ABTS se realizó de acuerdo a lo descrito por Arts et al. (2004). Se emplearon 10 µL de semen y 990 µL de la solución del radical ABTS^{•+}. Luego de 30 minutos de reacción la temperatura ambiente y en la oscuridad, se midió en un espectrofotómetro (Jenway 6405 UV/Vis), el cambio en la absorbancia respecto a una solución referencia, compuesta por 10 µL de solución buffer y 990 µL de la solución del radical ABTS^{•+}. El radical fue generado por oxidación de 3,5 mM de ABTS con 1,25 mM de persulfato de potasio. Después de 24 horas de reacción, se ajustó la absorbancia con PBS a pH 7,4 hasta 0,70 unidades, a una λ de 732 nm y se comparó contra una curva patrón con Trolox®.

- **Evaluación de la capacidad antioxidante por el método FRAP, reducción del hierro férrico (Fe⁺³) hasta su forma ferrosa (Fe⁺²).**

El método FRAP, consiste en la reducción de iones férricos a ferrosos, para ello. Esta prueba, se realizó mediante la adición de 50 µL de muestra a 900 µL de solución FRAP, compuesta por buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3.4), TPTZ y FeCl, en relación 10:1:1. Luego de 30 minutos de reacción se midió la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway, Burlington, USA). El valor encontrado fue comparado con una curva de referencia construida con ácido ascórbico (Benzie & Strain, 1996).

- **Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs).**

La detección de especies reactivas se realizó por la metodología de la fluoresceína diacetato -FDA- (Guthrie & Welch, 2006), donde cada muestra fue preparada con 30 μ L de 40 mM FDA (Intervet), 240 μ L de solución buffer (pH 7.4), y 30 μ L del semen. Se emplearon condiciones controladas de temperatura a 37°C, pH 7.4, y como referencia el antioxidante Trolox® (Merck). Las lecturas se realizaron mediante un espectrofluorímetro LS 55 (PerkinElmer), a una λ de excitación 490 nm y slit de excitación 10, y una λ de emisión 530 nm y slit de emisión 15. Los resultados fueron expresados como unidades relativas de fluorescencia (URF).

2.2.4. Análisis mediante citometría de flujo

Las siguientes evaluaciones fueron realizadas a la hora 0 y 96 de refrigeración a 16°C, en el laboratorio de Citometría de flujo de la Universidad de Antioquia, ubicado en la Sede de Investigación Universitaria (SIU), Medellín.

- **Peroxidación lipídica de la membrana plasmática (LPO).**

La peroxidación lipídica de la membrana plasmática se determinó mediante la sonda BODIPY 581/591 C11, la cual emite fluorescencia naranja en su estado no oxidado con excitación a 581 nm y emisión 591 nm, cambiando a fluorescencia verde cuando hay peroxidación, con una excitación a 500 nm y emisión a 510 nm (Martínez et al., 2010). Para este análisis, se modificó el protocolo descrito por Awda et al. (2009), diluyendo una muestra de semen en solución HANKS' Balanced salt solution a una concentración de 1×10^6 /mL, posteriormente, se adicionó BODIPY 581/591 C11 (Molecular Probes, Inc.) a una concentración final de 0.004 μ M y se incubó a 25°C durante 30 min. Cumplido este período, se adicionó Yoduro de Propidio (PI), a una concentración final de 1 mg/mL y se incubó por 15 minutos a la misma temperatura. La LPO se evaluó mediante citometría de flujo (LSRFortessa™, BD Biosciences). Las muestras se excitaron utilizando un láser de fase sólida de 488 nm, y la fluorescencia se detectó a 530/30 y 610/20 nm para BODIPY

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

581/591 C11 y PI respectivamente. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

- **Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi M$).**

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó mediante la sonda específica JC-1, donde las mitocondrias que presentan alto $\Delta\psi M$, son expresadas como dímeros, con emisión a 590 nm cuando se excitan a 549 nm, mientras que, en las mitocondrias con bajo $\Delta\psi M$, el JC-1 está presente como monómeros que emiten a 525 nm cuando se excitan a 488 nm (Guo et al., 2017). Para esta evaluación, se modificó el protocolo descrito por Guo et al. (2017), diluyendo una muestra de semen en solución HANKS' Balanced salt solution a una concentración de 1×10^6 /mL, posteriormente, se adicionó JC-1 (MitoProbeMT) a una concentración final de $0.4 \mu\text{M}$ y se incubó a 25°C durante 45 minutos. El $\Delta\psi M$ se midió mediante citometría de flujo (LSRFortessaTM, BD Biosciences). Las muestras se excitaron utilizando un láser de fase sólida de 488 nm, y la fluorescencia de JC-1 se detectó a 530/30 nm. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

- **Integridad estructural de membrana plasmática (Vitalidad espermática, VE).**

La Vitalidad espermática (VE) fue evaluada mediante el kit de viabilidad LIVE/DEAD® Sperm Viability (Invitrogen Inc., Eugene, OR, EE. UU.), que consiste en la combinación de Yoduro de Propidio (PI, sonda impermeable a la membrana) y SYBR14 (Sonda de unión a ácidos nucleicos, permeable a la membrana) (Martínez et al., 2010). El uso de ambos fluorocromos permite discriminar entre células viables y no viables, donde los núcleos de los espermatozoides vivos emiten una fluorescencia verde (SYBR-14) y las células que han perdido la integridad de su membrana se tiñen de rojo (PI) (Gillan et al., 2005). Para esta evaluación, se modificó el protocolo descrito por Merino et al. (2017), diluyendo una muestra de semen en solución HANKS' Balanced salt solution a una concentración de 1×10^6 /mL, posteriormente, se adicionaron SYBR14 y PI, a una concentración final de $0.002 \mu\text{M}$ y 1 mg/mL respectivamente, y se incubó a una temperatura de 37°C durante 20 minutos. La VE se midió mediante citometría de flujo (LSRFortessaTM, BD Biosciences). Las muestras se excitaron utilizando un láser de fase

sólida de 488 nm, y la fluorescencia se detectó a 530/30 y 610/20 nm para SYBR14 y PI respectivamente. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

2.2.5. Análisis estadístico

Para evaluar la actividad de los antioxidantes en la refrigeración del semen porcino, se ajustaron modelos lineales generalizados con el fin de determinar el efecto del tratamiento en las variables dependientes (Capacidad antioxidante total, producción de especies reactivas, potencial de membrana mitocondrial, peroxidación de los lípidos de membrana e integridad estructural de membrana plasmática).

Para cada una de las variables dependientes se usó el efecto fijo anidado del eyaculado dentro del porcino y el efecto fijo del tratamiento. La comparación de las medias entre los tratamientos fue realizada mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan. El nivel de significancia considerado para todas evaluaciones fue $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el software SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Mediante un análisis de regresión lineal, se complementó la evaluación de la producción de especies reactivas de oxígeno, con el propósito de estimar la cinética de la producción de EROs, estimada como la cantidad de unidades relativas de fluorescencia (URF) producida por minuto, para todos los tratamientos.

2.3. Resultados

Todos los modelos ajustados fueron significativos ($p < 0,05$) para las diferentes variables en los dos tiempos de evaluación (0 y 96 horas de refrigeración), evidenciando a la hora 0, coeficientes de determinación (R^2) de 84,38% para ABTS, 88,44% para FRAP, 37,04% para EROs, 94% para $\Delta\#M$ (dímeros y monómeros), entre 35% y 74% para LPO y entre 56% y 95% para VE. Mientras que, para la hora 96 de refrigeración se obtuvieron valores de R^2 de 92,71% para ABTS, 73,04% para FRAP, 37,26% para EROs, 94% para $\Delta\#M$ (dímeros y monómeros), entre 94% y 74% para LPO y entre 44% y 95% para VE.

El efecto del porcino, anidado en el eyaculado mostró significancia para los dos tiempos de evaluación en todas las variables (CAT, EROs, LPO, $\Delta\#M$ y VE), presentando valores p inferiores a 0,05. Mientras que, para el efecto del tratamiento, ningún tiempo en específico presentó un número superior de diferencias ($p < 0,05$).

A continuación, se presentan gráficas y tablas que muestran los resultados obtenidos en las diferentes variables evaluadas mediante espectrofluorimetría y citometría de flujo.

2.3.1. Espectrofluorimetría

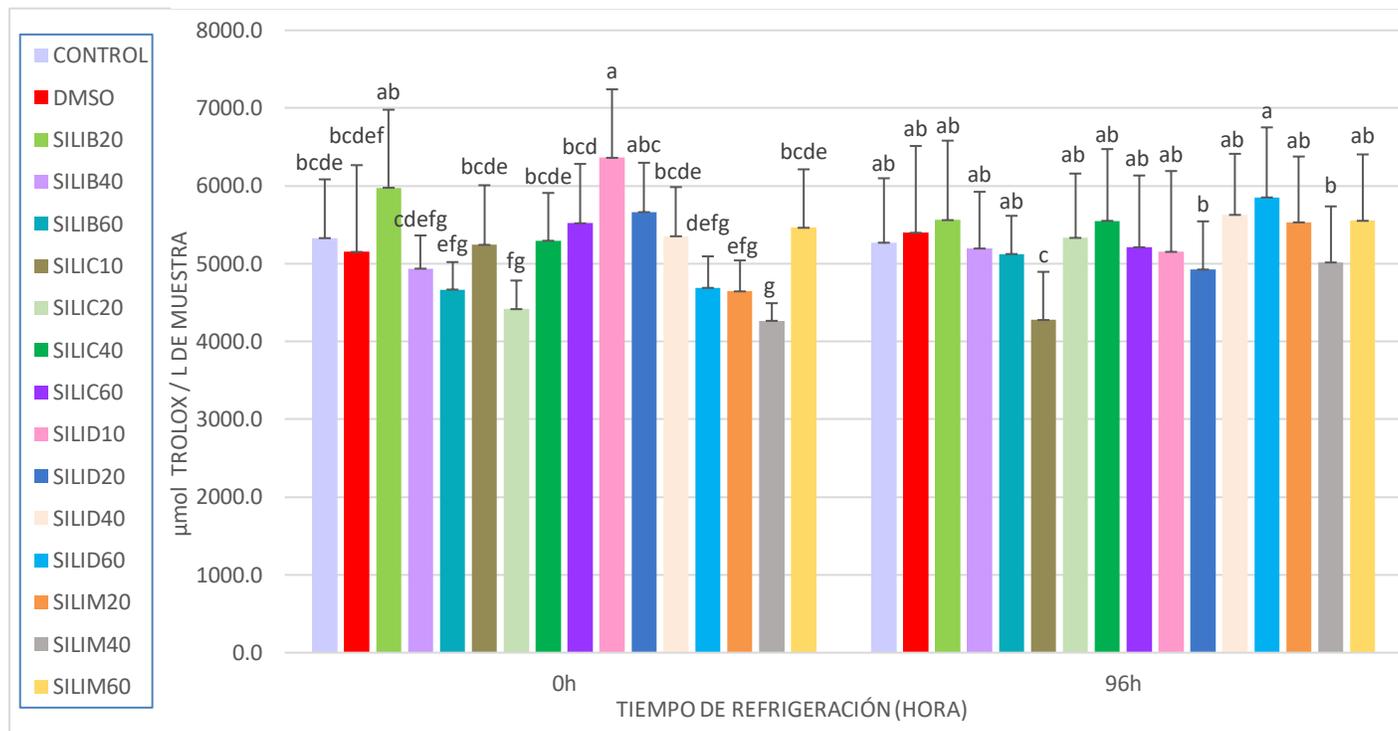
- **Capacidad antioxidante total (CAT)**

La **figura 2.1** y **2.2** muestran el comportamiento de la capacidad antioxidante total evaluada por dos técnicas de espectrofluorimetría (ABTS y FRAP) a las 0 y 96 h de refrigeración.

En la **figura 2.1**, es posible apreciar que en la técnica de ABTS^{•+}, a la hora 0 de refrigeración, el tratamiento SILID10 aumentó la CAT respecto al control, mientras que, SILIC20 y SILIM20 generaron una reducción de este parámetro. Adicionalmente, es importante mencionar que no se presentaron diferencias entre el control y DMSO para este mismo tiempo de refrigeración.

Similarmente, a la hora 96 de refrigeración (**figura 2.1**), se observa que SILID60 presentó mayor capacidad antioxidante total respecto al control y los demás tratamientos, mientras SILIC10 exhibió el valor más bajo.

Figura 2.1 Capacidad antioxidante total mediante ensayo ABTS ●+

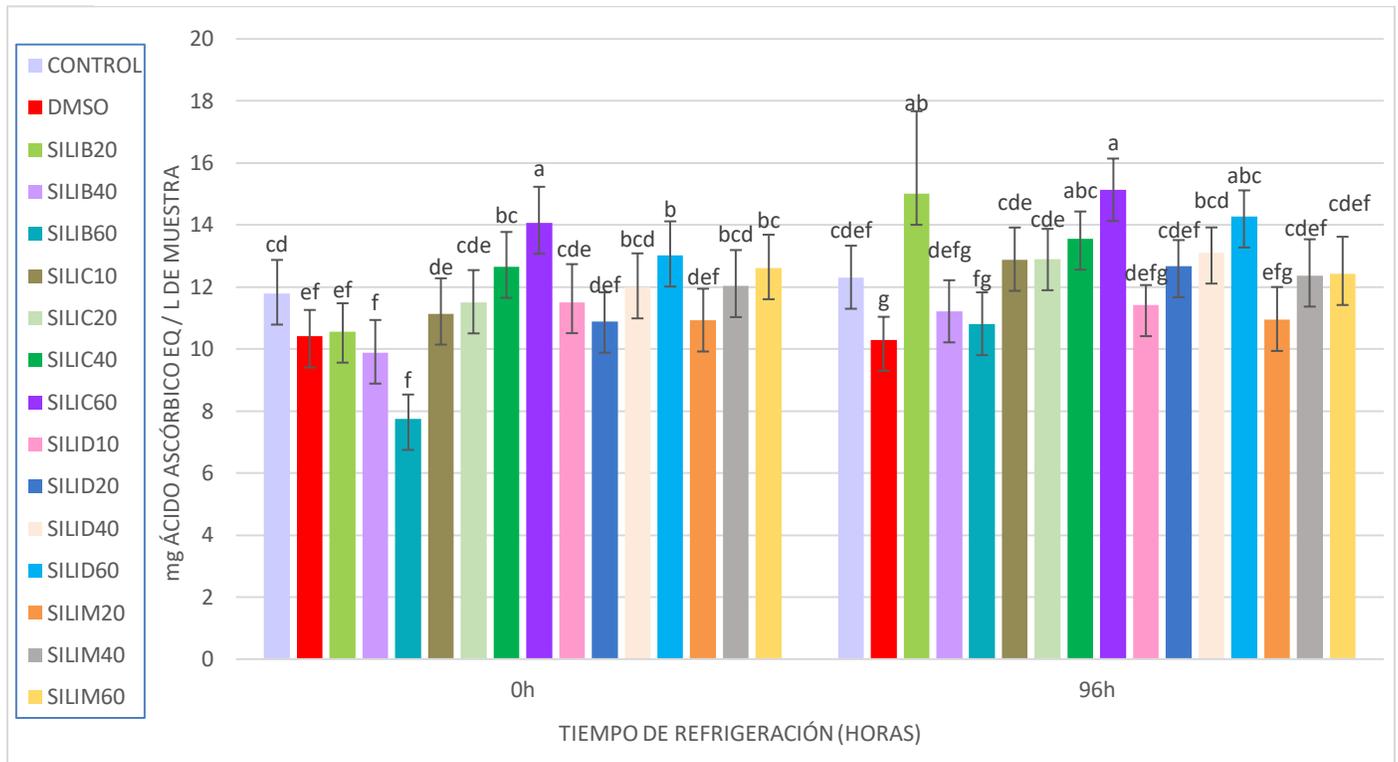


Los valores de Capacidad antioxidante total (CAT), evaluados mediante el ensayo ABTS, están expresados en $\mu\text{mol Trolox} / \text{L de muestra} \pm$ el error estándar. a-g: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos, dentro de un mismo tiempo de evaluación ($p < 0,05$). 0h y 96h hace referencia a las horas de enfriamiento a 16°C .

Respecto a la **figura 2.2**, donde se muestran los resultados de CAT obtenidos por el método FRAP, se observan comportamientos más dependientes de la concentración suplementada, evidenciado que, los valores de CAT aumentan al adicionar mayor cantidad del antioxidante. En este sentido, a la hora 0 de refrigeración, las mayores concentraciones de SILIC, SILID, y SILIM exhibieron incrementos en la CAT, mientras que SILIB60 redujo considerablemente este parámetro. Adicionalmente, se encontraron diferencias ($p < 0,05$) entre el control y el DMSO para ambos tiempos de refrigeración (hora 0 y 96).

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Figura 2.2 Capacidad antioxidante total mediante ensayo FRAP



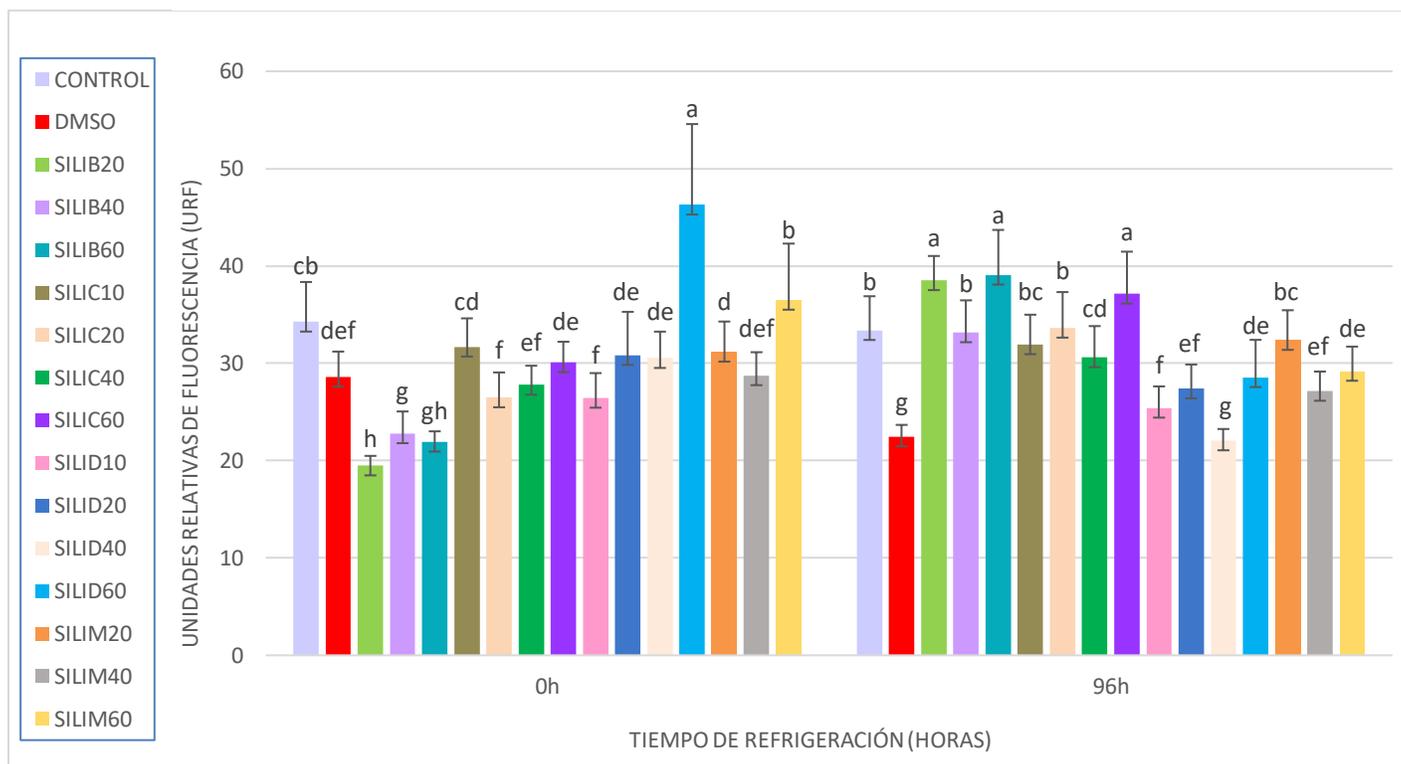
Los valores de Capacidad antioxidante total (CAT), evaluados mediante el ensayo FRAP, están expresados en mg de ácido ascórbico / L de muestra \pm el error estándar. a-g: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos, dentro de un mismo tiempo de evaluación ($p < 0,05$). 0h y 96h hace referencia a las horas de enfriamiento a 16°C.

En dicha figura (2.2), también es importante mencionar que a la hora 96 de refrigeración, SILIB20 y SILIC60 presentaron la mayor CAT respecto al control y los tratamientos restantes. Mientras que, SILID60 y SILIM60 aumentaron la capacidad antioxidante en comparación a las demás concentraciones de su misma molécula, pero no tuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) con el control.

- **Producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)**

La figura 2.3, muestra la producción de especies reactivas de oxígeno por minuto al tiempo 0 y 96 de refrigeración, en ella se encuentran resultados relevantes, teniendo en cuenta la poca información encontrada sobre la suplementación de estas moléculas en células espermáticas.

Figura 2.3 Producción de especies reactivas de oxígeno



La producción de especies reactivas de Oxígeno por minuto, está expresada en Unidades relativas de Fluorescencia \pm el error estándar. a-h: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos, dentro de un mismo tiempo de evaluación ($p < 0,05$). 0h y 96h hace referencia a las horas de enfriamiento a 16°C.

En dicha figura (2.3), a las 0 h de refrigeración, la mayoría de tratamientos, a excepción de SILIC10 y SILIM60, mostraron diferencias significativas respecto al control, no obstante, SILID60 exhibió la mayor cantidad de EROs producidas, mientras SILIB, en sus tres concentraciones, mostró las producciones más bajas. En esta evaluación, el control también presentó diferencias significativas con el DMSO ($p < 0,05$) para ambos tiempos de refrigeración.

En este mismo análisis, a la hora 96 de refrigeración, se destacan DMSO, SILIC40, SILID en todas sus concentraciones y SILIM 40 y 60, como los tratamientos que generaron menor cantidad de EROs producidas respecto al control. Por el contrario, SILIB20 y 40, y SILIC60 exhibieron incrementos en este parámetro.

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

- Análisis de regresión lineal: Cinética - producción de EROs**

La **tabla 2.3**, presenta los resultados del análisis de regresión, interpretados como el aumento o disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno por tiempo de lectura para todos los tratamientos, es decir, cinética o velocidad de producción de EROs por minuto.

Tabla 2.3. Análisis de regresión para la producción de Especies Reactivas de Oxígeno por Tratamiento y Tiempo

TRATAMIENTO	ANÁLISIS DE REGRESIÓN							
	HORA 0				HORA 96			
	Intercepto β_0	Coefficiente regresión β_1	R^2	valor p	Intercepto β_0	Coefficiente regresión β_1	R_2	valor p
CONTROL	71.5993	0.0072	0.0857	<0.0001	81.7700	0.0043	0.0400	0.0012
DMSO	58.0968	0.0064	0.1671	<0.0001	46.7800	0.0047	0.4300	<0.0001
SILIB20	39.6206	0.0044	0.5214	<0.0001	92.5150	0.0053	0.1252	<0.0001
SILIB40	50.0385	0.0042	0.0974	<0.0001	77.1950	0.0052	0.0673	<0.0001
SILIB60	47.1811	0.0043	0.4395	<0.0001	96.8410	0.0047	0.0288	0.0066
SILIC10	69.5935	0.0059	0.1124	<0.0001	70.1240	0.0059	0.1042	<0.0001
SILIC20	53.1123	0.0061	0.1539	<0.0001	76.0850	0.0057	0.0635	<0.0001
SILIC40	60.8488	0.0052	0.1912	<0.0001	67.1258	0.0057	0.0864	<0.0001
SILIC60	64.7601	0.0059	0.2128	<0.0001	94.3337	0.0040	0.0229	0.0156
SILID10	52.8170	0.0061	0.1587	<0.0001	42.3850	0.0078	0.3481	<0.0001
SILID20	67.1231	0.0059	0.0479	0.0004	57.1728	0.0058	0.1508	<0.0001
SILID40	68.0326	0.0054	0.1097	<0.0001	44.9159	0.0049	0.4698	<0.0001
SILID60	115.1804	0.0055	0.0120	<0.0001	64.6927	0.0049	0.0437	0.0008
SILIM20	69.4433	0.0056	0.0878	<0.0001	77.8392	0.0045	0.0582	<0.0001
SILIM40	64.5041	0.0050	0.1227	<0.0001	64.0956	0.0040	0.1112	<0.0001
SILIM60	87.6416	0.0051	0.0211	0.0203	71.2232	0.0038	0.0632	<0.0001

Hora 0 y hora 96 corresponden al tiempo de refrigeración, donde se realizaron las evaluaciones. β_1 : se refiere al aumento en la producción de EROs por minuto, expresada en % (0-100). R^2 : Coeficiente de determinación del modelo de regresión. Los resultados con valores p menores a 0.05 indican significancia.

Los coeficientes de regresión (β_1) descritos en la **tabla 2.3**, muestran que todos los tratamientos tanto a la hora 0 como a la hora 96 de refrigeración, presentan un aumento en la producción de EROs en el tiempo, por lo que en ninguno se reduce dicha cinética.

A las 0 h de refrigeración, es evidente que el control presenta una cinética mayor de producción de EROs respecto al DMSO y a los tratamientos restantes. Mientras que, para SILIM y sus tres flavonolignanos, la menor velocidad de producción de especies reactivas se presentó en 40 μM .

Por el contrario, a la hora 96 de refrigeración, se destacan SILIC60, SILIM40 y 60 como los tratamientos con menor velocidad de producción de EROs por minuto, incluso menor al valor obtenido en el control. Mientras que, la cinética de producción de los demás tratamientos fue superior a este último.

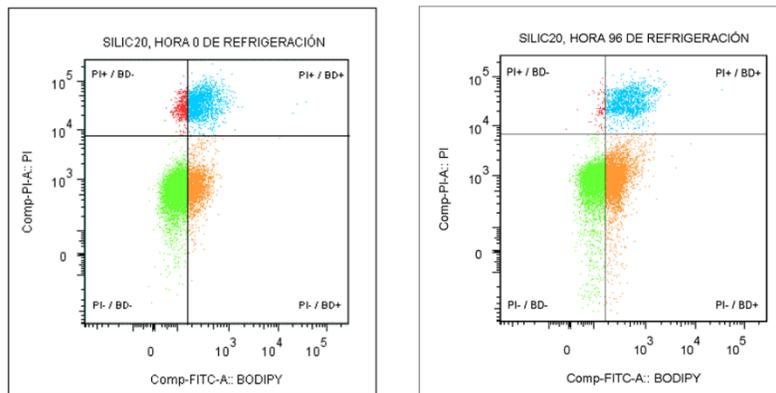
Además, también es importante resaltar que en el tiempo 0 se presentaron valores de β_1 superiores respecto a la hora 96, indicando que, a las 0 h de refrigeración, la producción de EROs por minuto fue mayor comparado con el tiempo 96, donde los incrementos de β_1 se dieron en menor escala, excepto en SILIB, SILIC40 y SILID10.

2.3.2. Citometría de flujo

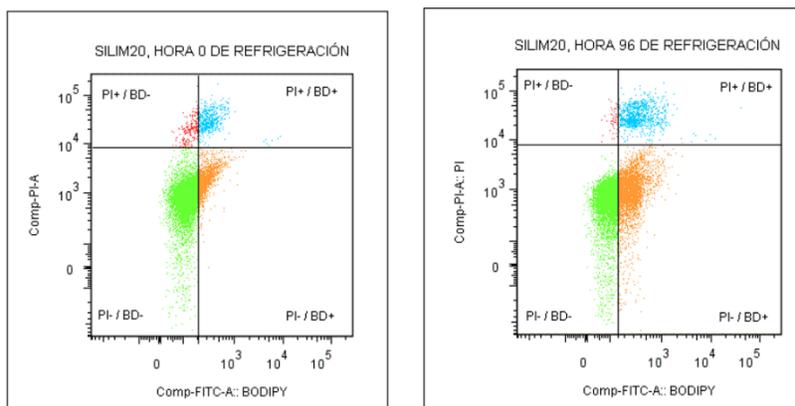
- **Peroxidación lipídica de la membrana plasmática**

La **figura 2.4** evidencia la distribución de las cuatro poblaciones según la viabilidad celular y el estado de oxidación de los lípidos de membrana, obtenidos mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

Figura 2.4 Análisis representativo por citometría de flujo de la peroxidación de los lípidos de membrana plasmática



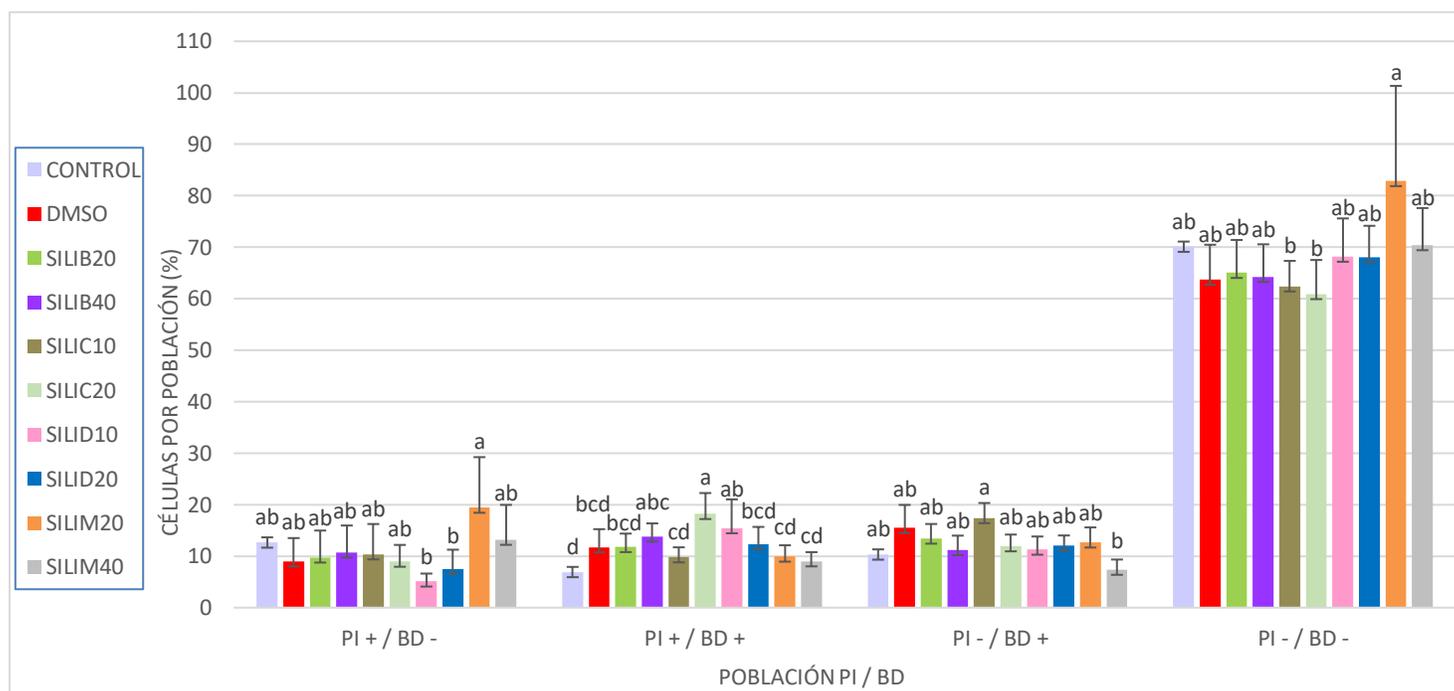
Representación esquemática de los datos de SILIC10 (Mayor peroxidación lipídica) a la hora 0 y 96 de refrigeración, obtenidos por citometría de flujo y analizados mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA)



Representación esquemática de los datos de SILIM20 (Menor peroxidación lipídica) a la hora 0 y 96 de refrigeración, obtenidos por citometría de flujo y analizados mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA)

La **figura 2.5** y **2.6**, muestran la LPO de la membrana plasmática a las 0 y 96 h de refrigeración, mediante la clasificación de células en cuatro poblaciones según su fluorescencia.

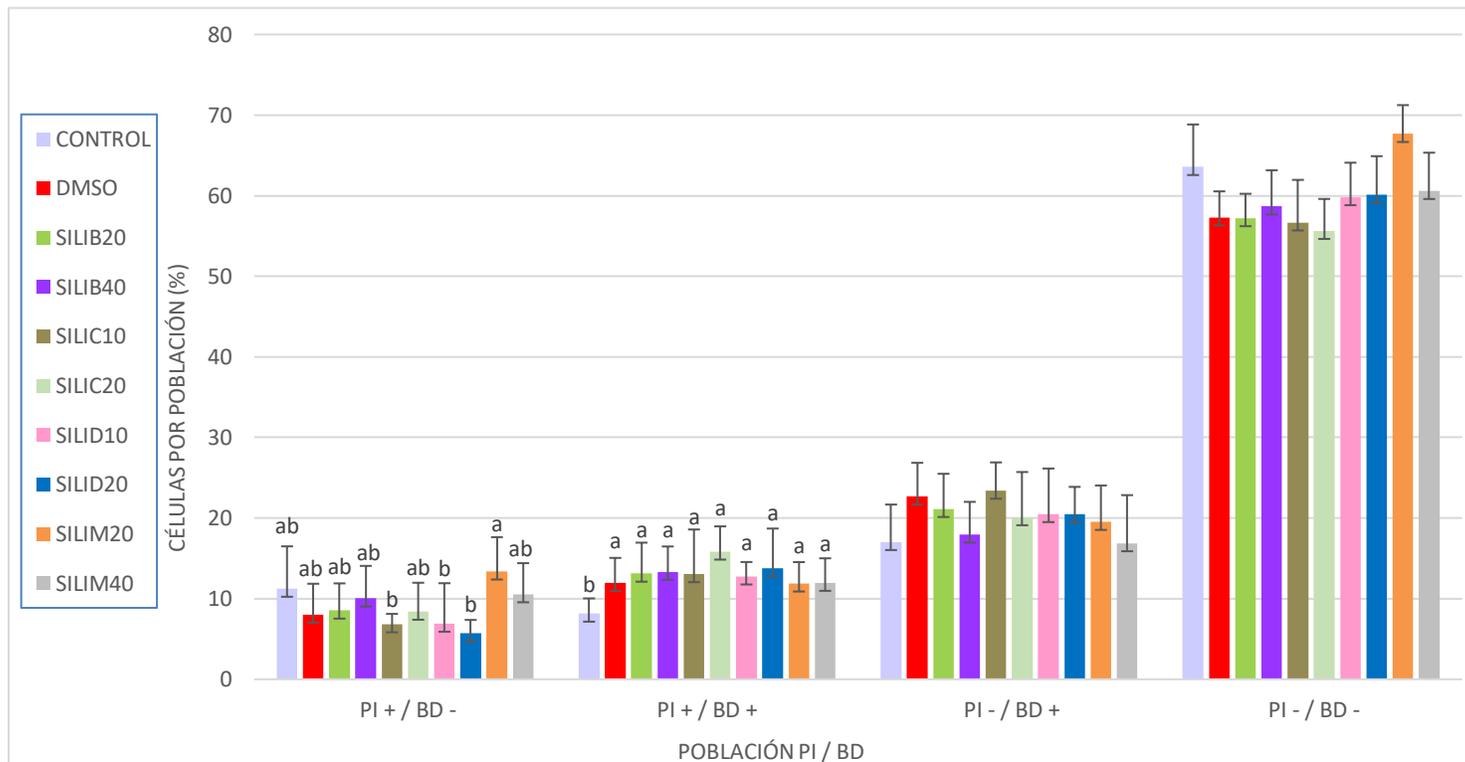
Figura 2.5 Peroxidación de los lípidos de membrana a la hora 0 de refrigeración



En la peroxidación de los lípidos de membrana (LPO) a las 0 horas de refrigeración, las células fueron clasificadas en cuatro poblaciones (PI / BD) según la tinción presentada, así: PI+ / BD-: Células muertas no peroxidadas; PI+ / BD+: Células muertas peroxidadas; PI- / BD-: Células vivas no peroxidadas; PI- / BD+: Células vivas peroxidadas. La cantidad de células de cada población está expresada en porcentaje (%) \pm el error estándar. a-d: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos dentro de una misma población ($p < 0,05$). Ausencia de superíndice indica no diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos en un mismo tiempo de refrigeración.

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Figura 2.6 Peroxidación de los lípidos de membrana a la hora 96 de refrigeración



En la peroxidación de los lípidos de membrana (LPO) a las 96 horas de refrigeración, las células fueron clasificadas en cuatro poblaciones (PI / BD) según la tinción presentada, así: PI+ / BD-: Células muertas no peroxidadas; PI+ / BD+: Células muertas peroxidadas; PI- / BD-: Células vivas no peroxidadas; PI- / BD+: Células vivas peroxidadas. La cantidad de células de cada población está expresada en porcentaje (%) ± el error estándar. a-b: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos dentro de una misma población ($p < 0,05$). Ausencia de superíndice indica no diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos en un mismo tiempo de refrigeración.

Ambas gráficas (2.5 y 2.6) permiten observar una reducción en la población de PI-/BD- a la hora 96 respecto las 0 h, lo que indica que esta refrigeración genera un aumento en la oxidación de los lípidos de membrana. En este sentido, se evidencia que tanto a la hora 0 como a la hora 96, ningún tratamiento presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al control en PI-/BD-, sin embargo, es válido resaltar la tendencia de SILIM20 a incrementar esta población y la de SILIC a reducirla, lo cual es visible en ambos tiempos de evaluación, aún sin mostrar diferencias estadísticas con el control.

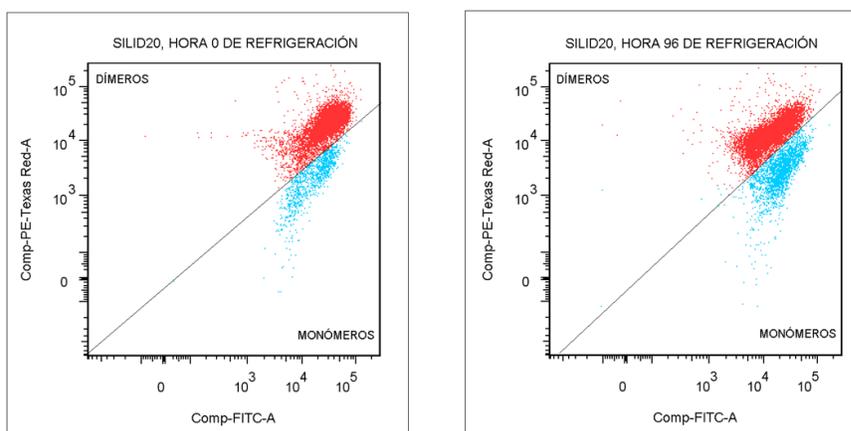
De manera similar, en PI-/BD+ tampoco se presentaron diferencias de los tratamientos vs el control en los dos tiempos de refrigeración, no obstante, sin ser estadísticamente

diferentes, se observó que SILIC10 y DMSO exhibieron una tendencia a incrementar esta población de células vivas peroxidadas.

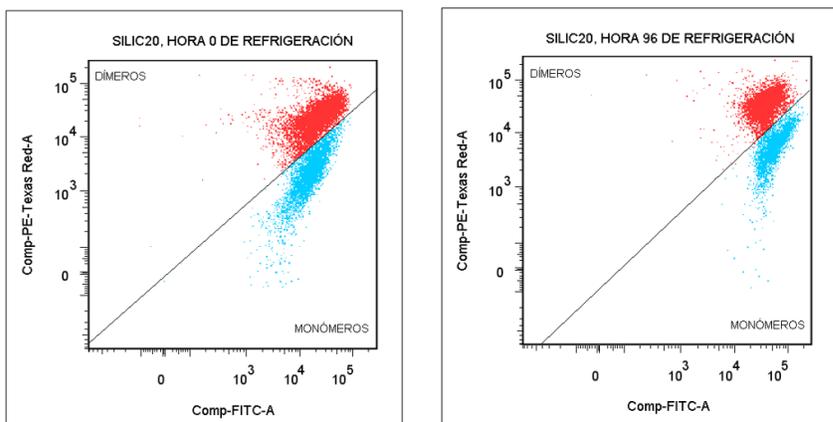
- **Potencial de membrana mitocondrial**

La **figura 2.7** muestra las dos poblaciones según el potencial de membrana mitocondrial, obtenidos mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

Figura 2.7 Análisis representativo por citometría de flujo del potencial de membrana mitocondrial



Representación esquemática de los datos de SILID20 (Mayor $\Delta\psi_M$) a la hora 0 y 96 de refrigeración, obtenidos por citometría de flujo y analizados mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA)



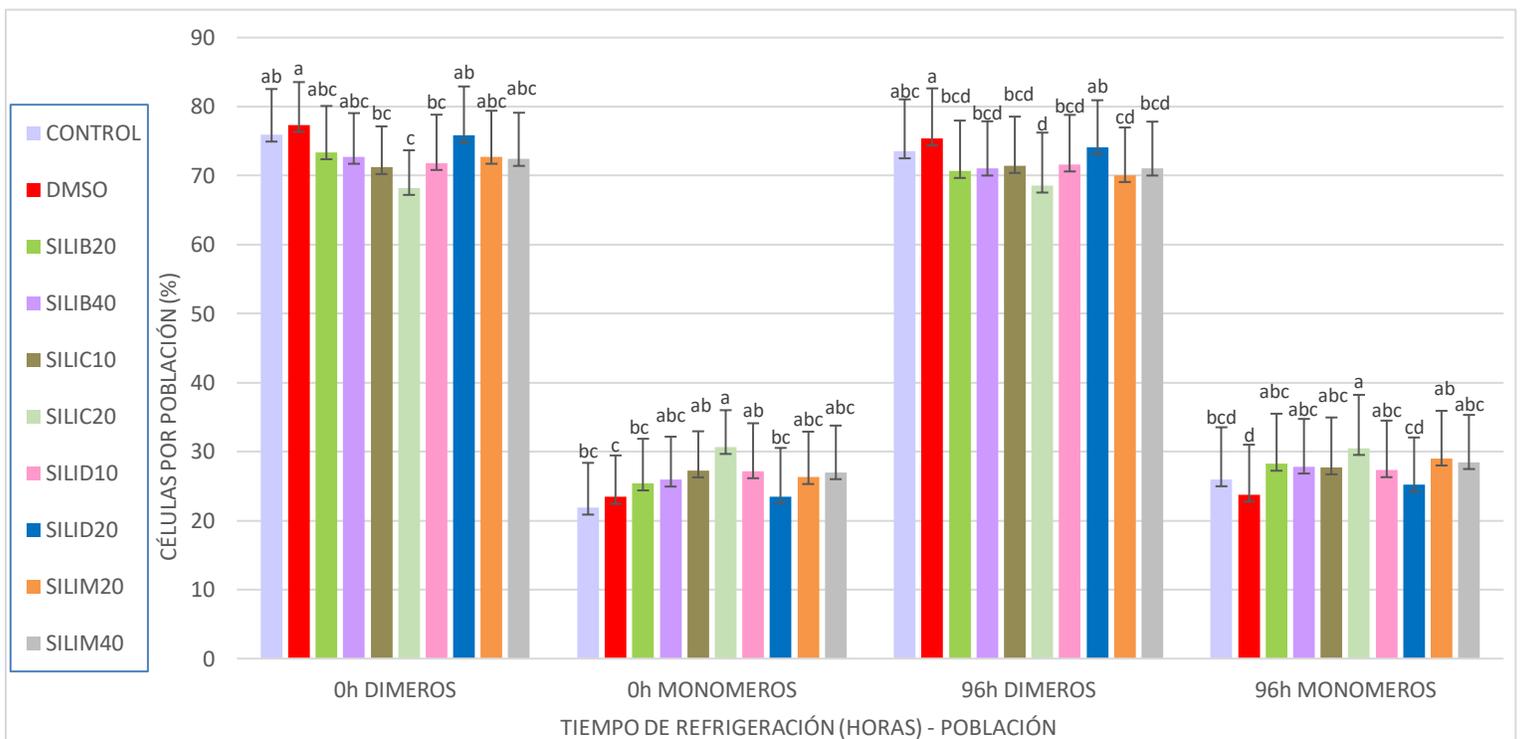
Representación esquemática de los datos de SILIC20 (Menor $\Delta\psi_M$) a la hora 0 y 96 de refrigeración, obtenidos por citometría de flujo y analizados mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA)

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

En la **figura 2.8**, se pueden observar las poblaciones obtenidas en los dos tiempos de evaluación, evidenciando el comportamiento propio del JC-1 al formar monómeros o dímeros según el potencial de membrana mitocondrial presentado por los espermatozoides.

En la gráfica **2.8**, es posible observar que, desde las 0 h de refrigeración, la SILIC20 es el único tratamiento estadísticamente diferente ($p < 0,05$) al control, además de reducir la población de dímeros, es decir en las células que presentan un alto $\Delta\psi_M$, al tiempo que presenta un incremento en la cantidad de monómeros (bajo $\Delta\psi_M$).

Figura 2.8 Potencial de membrana mitocondrial evaluada mediante JC-1



En potencial de membrana mitocondrial, las células fueron clasificadas en dos poblaciones por tiempo de refrigeración según el comportamiento del JC-1, así: Monómeros: Células con bajo potencial de membrana mitocondrial; Dímeros: Células con alto potencial de membrana mitocondria. La cantidad de células de cada población está expresada en porcentaje (%) \pm el error estándar. a-d: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos dentro de una misma población en un tiempo determinado de refrigeración ($p < 0,05$).

De manera similar, a las 96 h de refrigeración, el tratamiento SILIC20 exhibió el mismo comportamiento descrito anteriormente, difiriendo estadísticamente al control ($p < 0,05$) y mostrando la mayor cantidad de monómeros y la menor proporción de dímeros de todos los tratamientos evaluados.

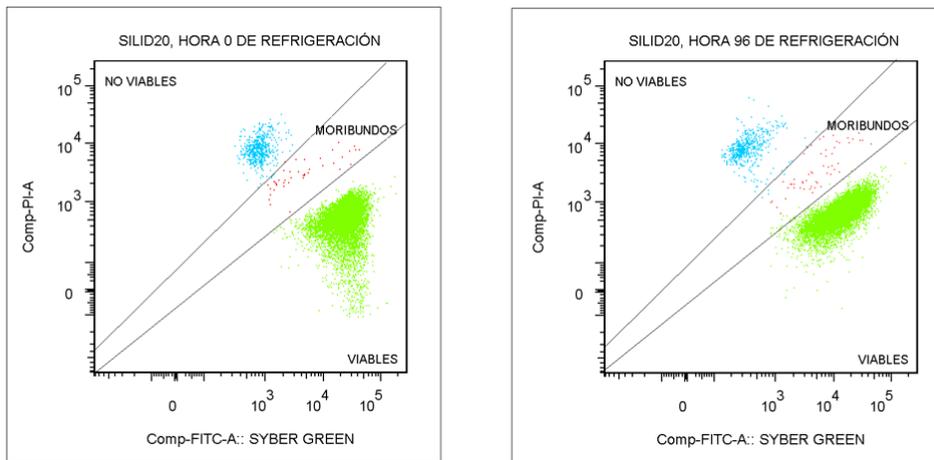
Además, es importante mencionar que en este parámetro ($\Delta\%M$), el control y el DMSO no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguna población ($\Delta\%M$ alto y bajo) en ambas horas de evaluación.

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

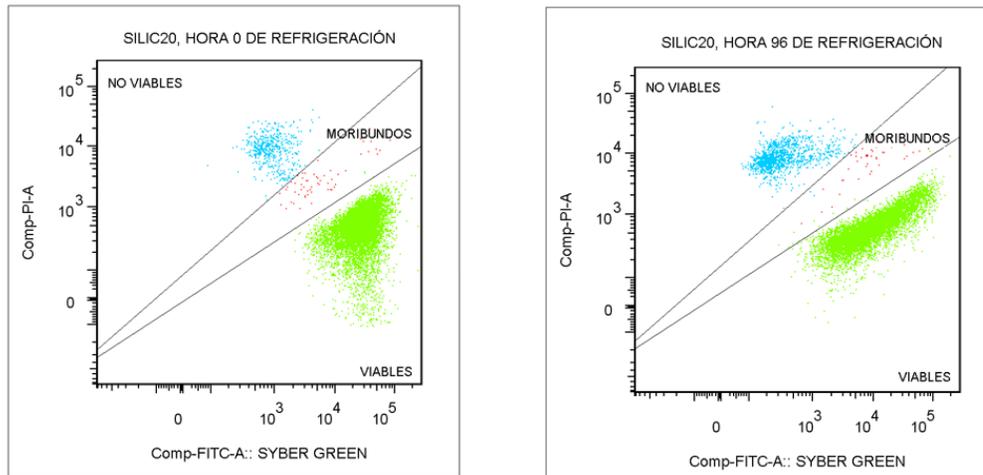
- **Integridad estructural de la membrana plasmática**

La **figura 2.9** evidencia las tres poblaciones según la viabilidad o vitalidad espermática, obtenidas mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

Figura 2.9 Análisis representativo por citometría de flujo de la vitalidad espermática



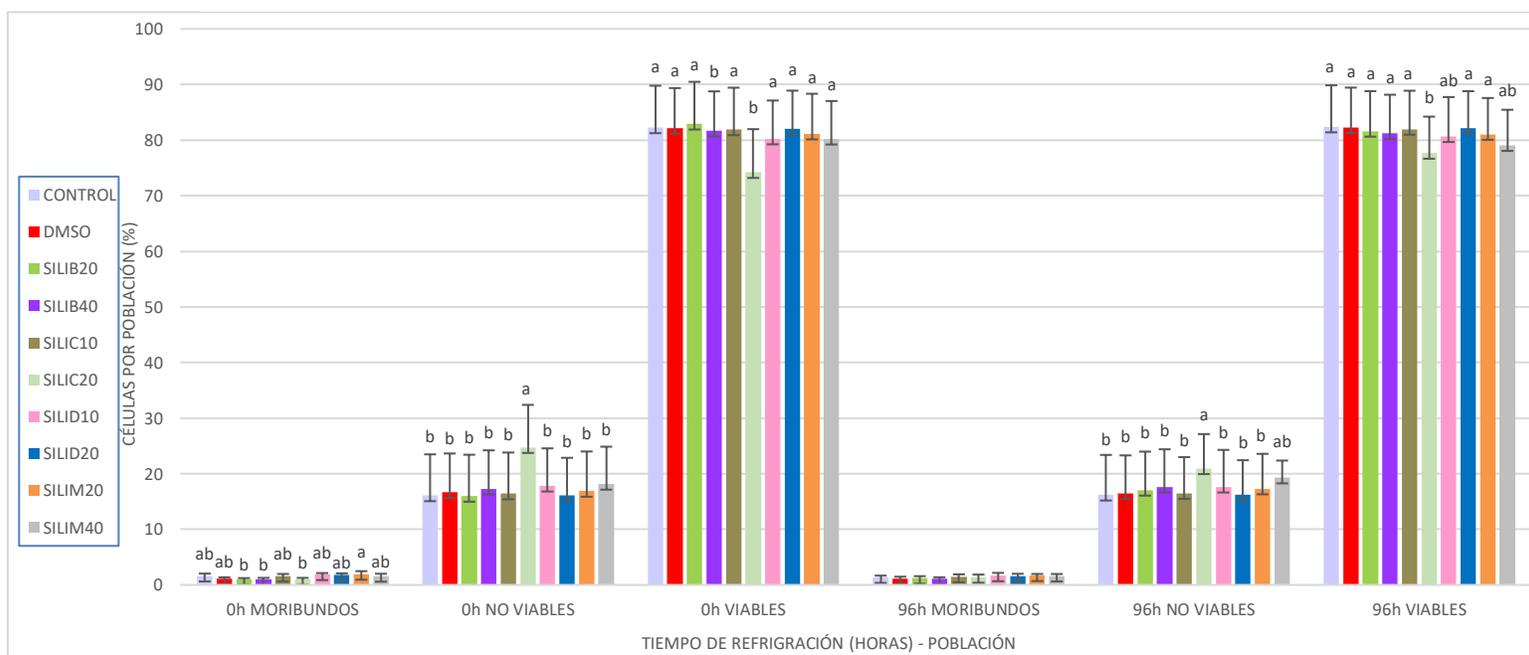
Representación esquemática de los datos de SILID20 (Mayor VE) a la hora 0 y 96 de refrigeración, obtenidos por citometría de flujo y analizados mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA)



Representación esquemática de los datos de SILIC20 (Menor VE) a la hora 0 y 96 de refrigeración, obtenidos por citometría de flujo y analizados mediante el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA)

En la **gráfica 2.10**, se presentan las poblaciones según la integridad estructural de la membrana plasmática, donde aquellos espermatozoides que incorporaron PI y emitieron su fluorescencia durante la evaluación, fueron tomados como células no viables, cuya membrana presentó algún daño estructural.

Figura 2.10 Integridad estructural de membrana plasmática mediante kit live/dead



En integridad estructural de membrana plasmática, las células fueron clasificadas en tres poblaciones por tiempo de refrigeración según la fluorescencia presentada (muertos, vivos y moribundos). La cantidad de células de cada población está expresada en porcentaje (%) \pm el error estándar. a-b: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos dentro de una misma población en un tiempo determinado de refrigeración ($p < 0,05$). Ausencia de superíndice indica no diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos en un mismo tiempo de refrigeración.

En la **figura 2.10** es evidente que la población de moribundos en ambos tiempos de evaluación (0 y 96 h), no presentó diferencias estadísticas entre ningún tratamiento y el control. No obstante, el tratamiento SILIC20 evidenció tanto a la hora 0 como a la hora 96, una reducción de los espermatozoides viables, y, por ende, un incremento en los no viables. Los tratamientos restantes, no presentaron diferencias estadísticas con el control ($p > 0,05$). Entretanto, la refrigeración no generó ningún impacto sobre la integridad estructural de la membrana plasmática, dado que, ninguna población (moribundos, viables y no viables), sufrió disminuciones drásticas en sus medias a la hora 96 respecto a la hora 0 de refrigeración.

2.4. Discusión

En el **capítulo 1** de la presente investigación se mostraron a la temperatura de conservación y al estrés oxidativo como los principales factores que generaron una reducción en la calidad espermática (membrana, movilidad y cinética espermática) durante el almacenamiento de estas muestras a 16°C. Lo anterior, teniendo en cuenta que en el presente estudio se conservó el semen porcino a esta temperatura, coincidiendo con otros artículos donde el material seminal fue refrigerado en las mismas condiciones (Hidalgo et al., 2011; Martín-Hidalgo et al., 2013; Teixeira et al., 2015; Pereira et al., 2018), mostrando así, a la refrigeración (15-17°C) como mecanismo de conservación mayormente utilizado en la especie porcina.

En ese sentido, este capítulo 2 se enfocó a determinar las alteraciones en el espermatozoide porcino ocasionadas por el estrés oxidativo, mediante evaluaciones alternativas más específicas y de mayor precisión.

Inicialmente, se tiene que el diluyente espermático utilizado no previene la totalidad de estos daños, haciendo necesaria la búsqueda de alternativas que permitan mitigar esos efectos deletéreos generados durante el almacenamiento. Es por esto que, la suplementación con antioxidantes es considerada en la actualidad, una alternativa interesante y bastante prometedora cuando de conservar dosis inseminantes y reproducir animales de manera eficaz y rentable se trata, dado que al agregar cierta cantidad de antioxidante se puede mejorar la calidad del semen preservado (Funahashi & Sano, 2005).

Después de la eyaculación y durante la conservación, las células espermáticas experimentan estrés oxidativo (EO) como resultado de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y las defensas antioxidantes, reduciendo así, su funcionalidad y su capacidad fertilizante (Cordova et al., 2009). Por lo tanto, el éxito de esta opción radica en que los antioxidantes tienen la capacidad de retrasar o prevenir la oxidación, al eliminar EROs, inhibir su producción o regular las defensas antioxidantes, mitigando de esta manera, los daños ocasionados por esta condición (Gulcin, 2020).

Actualmente, existen diversos métodos para determinar la capacidad antioxidante de una muestra específica (Gulcin, 2020). En la presente investigación, fueron estudiadas dos técnicas (ABTS+• y FRAP), encontrando que, mediante ABTS+•, varios tratamientos

disminuyeron su CAT a la hora 96 de refrigeración, similar a lo sucedido en otro estudio con la suplementación de ácido Salviánico en semen porcino refrigerado (Tian et al., 2019). Sin embargo, otras muestras suplementadas exhibieron una mejor protección, como sucedió con Silidianina 60 μM , que presentó una mayor capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) respecto a los demás tratamientos.

Lo anterior, coincide con el estudio basado en las propiedades redox y antioxidantes de los flavonolignanos, donde el uso de esta misma técnica evidenció una superioridad en la capacidad antioxidante de la Silidianina respecto al resto de moléculas, no obstante, en la presente investigación, el tratamiento Silicristina 10 μM presentó menor capacidad antioxidante, diferente al mismo artículo de Pyszková et al. (2016), donde el TEAC más bajo correspondió a Silibinina.

Es importante resaltar que, en esta investigación fue primordial tener en cuenta la concentración suplementada de cada molécula, dado que por esta técnica de medición de CAT (ABTS+•), a la hora 96 de refrigeración, Silidianina 60 μM y Silimarina 60 μM evidenciaron mejor CAT que el resto de concentraciones y el control, mientras que, para los antioxidantes restantes fue superior la TEAC en Silibinina 20 μM y Silicristina 40 μM . En este sentido, al suplementar la mayor concentración de las últimas dos moléculas mencionadas, su capacidad para potenciar este parámetro se redujo.

Mientras que en FRAP, se presentó un comportamiento de CAT dependiente de la dosis suplementada, en este sentido, solo Silibinina presentó un comportamiento similar al descrito anteriormente, donde al aumentar la concentración suplementada, el valor de CAT a las 96 h de refrigeración disminuyó. Diferente a lo sucedido en Silidianina, Silicristina y Silimarina, donde la mayor concentración (60 μM) exhibió la mejor capacidad antioxidante respecto al resto de concentraciones suplementadas de la molécula respectiva.

En el estudio realizado por Pyszková et al. (2016), se revelaron diferencias entre las técnicas de evaluación de CAT utilizadas, tal como sucedió en la presente investigación, donde los resultados obtenidos mediante el ensayo FRAP exhibieron una CAT superior en Silicristina 60 μM , seguida de Silibinina 20 μM y Silidianina 60 μM , presentando una jerarquía distinta a la obtenida en ABTS+•.

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

Estas diferencias entre ABTS+• y FRAP, pueden ser explicadas por los diversos mecanismos que poseen las dos evaluaciones para desactivar radicales libres, bien sea mediante métodos de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o a través de métodos de transferencia de un solo electrón (SET) (Gulcin, 2020). En este sentido, la primera técnica implica tanto HAT como SET, mientras que la segunda se basa solo en SET (Gulcin, 2020; Munteanu & Apetrei, 2021)

No obstante, se ha encontrado que el mecanismo HAT (Transferencia de átomos de Hidrógeno) es el mecanismo más eficaz para la eliminación de radicales en estos compuestos, aunque al mismo tiempo, este estudio realizado por Reina & Martínez, (2016) concluyó que por este mecanismo (HAT) ningún compuesto de Silimarina presentó una actividad antirradical significativamente mayor a los demás, difiriendo de lo obtenido en la presente investigación con semen porcino, mediante ABTS+•, que también involucra el mecanismo HAT.

Vinculado a esto, se tiene que la producción excesiva de EROs puede generar un daño oxidativo gradual, afectar la función celular y, ocasionar alteraciones en el ADN, las proteínas y los lípidos (Gulcin, 2020). Es por ello que analizar este parámetro durante la refrigeración es de suma importancia, especialmente cuando se adicionan moléculas con el fin de mitigar estos daños generados, como lo reportado por Pourheydar et al. (2021), donde la adición de Silimarina disminuyó el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN en ratas diabéticas, al tiempo que mejoró la CAT evaluada por FRAP en suero, atribuyendo estos beneficios a la Silimarina y su propiedad antioxidante y de protección de los espermatozoides contra las EROs inducidas por diabetes.

El presente estudio, mostró que varios tratamientos aumentaron la producción de EROs a la hora 96 vs las 0 h, coincidiendo con lo reportado en otra investigación, donde el monitoreo de las EROs durante la refrigeración de semen porcino, indicó un incremento en la producción de estas moléculas a partir de la hora 72 de almacenamiento (Khoi et al., 2021).

Este aumento en la producción de EROs se puede explicar dado que estas moléculas son generadas a partir de espermatozoides dañados, inmóviles, morfológicamente anormales, y normales, pero no funcionales, estados comúnmente generados por las condiciones de la refrigeración, como la temperatura (Hidalgo, 2013; Juarez, 2009). Adicionalmente,

características propias de las células espermáticas como lo son el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y la poca cantidad de citoplasma, propician la producción de estas moléculas (Juarez, 2009).

En este parámetro se evidenció el mismo comportamiento dependiente de la cantidad suplementada, donde las mayores concentraciones de cada flavonolignano, incrementaron la producción de EROs por minuto. En ese sentido, la menor producción de EROs a las 96 h de refrigeración, para todos los antioxidantes suplementados (Silidianina, Silicristina, Silimarina y Silibinina) se presentó en 40 μM , elevándose este valor en los tratamientos de 60 μM .

En este sentido, la Silimarina (40 y 60 μM) evidenciaron una disminución en la generación de EROs, coincidiendo con su capacidad de reaccionar contra estas especies reactivas, eliminar los radicales libres y mejorar el sistema de defensa antioxidante (Pourheydar et al., 2021).

Así mismo, la Silibinina (20 y 60 μM), demostraron una mayor producción de EROs, mientras la Silidianina, como molécula (en todas las concentraciones estudiadas), influyó de manera más positiva, al reducir la producción de EROs a las 96 h de refrigeración. En efecto, aun cuando se reporta que la Silibinina posee una buena capacidad protectora al reducir la liberación de O_2 e influir en los niveles de Glutación reducido (Haddad et al., 2011), la Silidianina se mostró como una molécula más eficaz en dicha protección, confirmando lo indicado en otro estudio, donde es presentada como un buen inhibidor de la producción y liberación de radicales libres (Zielińska-Przyjemska & Wiktorowicz, 2006b).

Esto último, es un resultado bastante relevante, dado que la Silidianina como molécula antioxidante, ha sido poco estudiada, siendo uno de los flavonolignanos con menos información a nivel investigativo y con una búsqueda nada exitosa de su implementación en células espermáticas. Diferente a lo sucedido con Silibinina, el componente principal de la Silimarina y que ha sido mayormente estudiado en diferentes campos investigativos (Biedermann et al., 2016), incluido el reproductivo (Oufi & Al-Shawi, 2014; Temamogullari et al., 2021).

Paralelamente se encuentra la peroxidación lipídica, la cual consiste en el deterioro oxidativo de los PUFA que se encuentran presentes en la membrana celular (Juarez,

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

2009). En esta investigación, se presentó un aumento en las células peroxidadas, una disminución en las no peroxidadas y por ende, un incremento en la peroxidación lipídica a la hora 96 respecto a la hora 0, coincidiendo con lo manifestado en otro estudio donde la refrigeración produjo un aumento en la LPO de la célula espermática (Kumaresan et al., 2009).

En este sentido, el incremento de la LPO ocurrido durante la refrigeración, es explicado por la acumulación de EROs, que, aunque son moléculas producidas normalmente por la fisiología y el metabolismo celular, también pueden propiciar el inicio de la oxidación de los PUFA esterificados en los fosfolípidos de la membrana, generar la acumulación de estos lípidos peroxidados, producir la pérdida de integridad, fluidez, permeabilidad, funcionalidad de la membrana, y ocasionar la muerte de la célula (Gülçin, 2010; Hidalgo, 2013).

Sin embargo, es importante mencionar que, aunque es visible que los tratamientos con antioxidantes muestran menor LPO respecto al control a la hora 96 y que solo SILIM20 lo supera en ambos tiempos, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre suplementar o no, con uno u otro flavonolignano.

En términos generales, las especies reactivas de oxígeno responsables de todos los efectos deletéreos mencionados anteriormente, son producidas principalmente en las mitocondrias, organelas implicadas en el metabolismo energético de las células espermáticas (Cordova et al., 2009; Feng et al., 2020). Adicionalmente, el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi M$) constituye un indicador de la funcionalidad de estas estructuras celulares.

En el presente estudio, se alcanza a percibir una leve disminución en la cantidad de células con alto potencial de membrana mitocondrial (dímeros) durante el período de refrigeración, es decir a la hora 96 respecto la hora 0, aunque no es una reducción muy drástica, coincide con otro artículo donde también se reportó el descenso del $\Delta\psi M$ durante la refrigeración de semen porcino suplementado con ácido rosmarínico (Feng et al., 2020). Este comportamiento es atribuido principalmente a las EROs, dado que estas moléculas poseen un importante efecto deletéreo sobre las mitocondrias (Gulcin, 2020).

Asimismo, el estrés oxidativo puede generar en los espermatozoides, el desacoplamiento del transporte de electrones y la disminución en la eficiencia de la fosforilación oxidativa,

reduciendo de esta manera las células con alto potencial de membrana mitocondrial, parámetro fundamental para producir ATP y generar el movimiento espermático (Cordova et al., 2009). En este sentido, la presente investigación mostró a Silidianina 20 μM como el tratamiento con mayor cantidad de dímeros a la hora 96 de refrigeración, además del DMSO, mientras que, Silicristina 20 μM exhibió la mayor cantidad de monómeros (células con bajo $\Delta\psi\text{M}$).

Lo expuesto anteriormente, demuestra cómo los impactos negativos que pueden ocurrir durante la refrigeración, están altamente relacionados con el estrés oxidativo y la acumulación de especies reactivas de oxígeno que se presenta. En ese sentido, cobra gran importancia la adición de moléculas antioxidantes que permitan prevenir o mitigar los daños causados a los espermatozoides cuando son sometidos a estas condiciones.

En los últimos años, los antioxidantes naturales han tomado fuerza e interés al exhibir mayor seguridad y ser más saludables que las moléculas sintéticas (Gulcin, 2020). Por tanto, la Silimarina y sus flavonolignanos fueron considerados en la presente investigación, como una alternativa interesante para la refrigeración de semen porcino, debido a sus potentes capacidades antioxidantes presentadas en otras células y ante los pocos estudios sobre la suplementación de moléculas alternativas en la preservación del semen de cerdo.

De los resultados analizados y discutidos anteriormente, se puede inferir que, la Silidianina, en términos generales, redujo la producción de EROs, incrementó la CAT (ABTS \bullet +), el $\Delta\psi\text{M}$ y la integridad estructural de membrana a las 96 h de refrigeración, mientras que, la Silicristina, aun cuando puede tener una gran capacidad para potenciar la CAT (FRAP), exhibe las reducciones más visibles en el $\Delta\psi\text{M}$ y la VE.

En este sentido, es importante destacar cómo los componentes de la Silimarina que han sido menos estudiados, presentan los efectos de mayor contraste en la refrigeración de semen porcino. La falta de estudio de estas dos moléculas radica principalmente en que su aislamiento y purificación son ciertamente más complejos y poco practicados, limitando su uso en el campo investigativo (Biedermann et al., 2016, 2019). Siendo importante resaltar que, hasta el momento no se han encontrado estudios donde se haya investigado su efecto en células espermáticas de ninguna especie.

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

En primer lugar, los buenos resultados obtenidos en VE, $\Delta\psi M$, CAT (ABTS●+) y EROs con la suplementación de Silidianina y su capacidad de modificar estos parámetros, pueden ser explicados a partir del efecto producido por esta molécula en otro tipo de células como los neutrófilos polimorfonucleares, donde se reportó su potencial para inhibir la producción de radicales libres y generar una reducción en el metabolismo oxidativo (Zielińska-Przyjemská & Wiktorowicz, 2006b).

De igual manera, la Silidianina tiene la capacidad de proteger a la célula de la generación de EROs y del agotamiento del Glutatión reducido (GSH), al tiempo que también se ha reportado que puede aumentar el nivel de este tripéptido en fibroblastos (Rajnochová et al., 2019), algo que puede ser fundamental a la hora de preservar el semen porcino, teniendo en cuenta que el GSH participa en la protección contra los daños oxidativos que pueden experimentar los espermatozoides (Luberda, 2005).

Esta capacidad de la Silidianina, adquiere mucha más importancia para la refrigeración de semen, al considerar que, aunque la cantidad de GSH en la célula espermática porcina tiende a ser muy baja, este tripéptido está presente en el plasma seminal del eyaculado del cerdo (Luberda, 2005), algo fundamental para el actual experimento donde no se removió el plasma seminal para la refrigeración del material de investigación. No obstante, todos estos efectos descritos anteriormente al suplementar Silidianina en semen porcino, son posibles sólo si se adiciona la cantidad adecuada del flavonolignano en mención.

En segunda instancia, se tiene que el efecto de la Silicristina en la presente investigación fue altamente dependiente de la dosis suplementada para las variables VE y $\Delta\psi M$, disminuyendo estos dos parámetros al aumentar la cantidad adicionada de esta molécula. De este modo, es importante resaltar el efecto de Silicristina 20 μM sobre la integridad estructural de la membrana plasmática, cuyo comportamiento exhibió una menor población de espermatozoides viables desde el momento de su suplementación (hora 0) respecto a los tratamientos restantes.

Lo anterior, sugiere que a partir de esta concentración (Silicristina 20 μM), las células espermáticas porcinas parecen experimentar un nivel de deterioro mayor al resto de tratamientos, como consecuencia de la cantidad de antioxidante adicionada, tal como sucedió en el capítulo 1 de la presente tesis, donde concentraciones superiores a 20 μM de Silicristina, evidenciaron disminuciones en la movilidad y cinética espermática. Aunque

en dicho capítulo la reducción fue más drástica en 60 μM , esta se venía presentando a partir del tratamiento 20 μM .

Por el contrario, la suplementación de Silicristina 40 μM logró mitigar la producción de EROs a las 0 y 96 h de refrigeración, mientras que, a 40 y 60 μM consiguió potenciar la CAT (FRAP), coincidiendo con el efecto de esta molécula reportado en fibroblastos, donde la Silicristina estimuló una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno dependiente de la concentración (Rajnochová et al., 2019). En este último estudio mencionado, Rajnochová et al. (2019) también informó que la Silicristina tiene la capacidad de mejorar el GSH, similar a la Silidianina.

Admitiendo de esta manera que, aun cuando Silicristina puede presentar efectos tan positivos al incrementar la CAT y reducir la producción de EROs, también puede llegar a generar posibles daños que ocasionen la reducción en otras variables como la integridad estructural de membrana plasmática y el potencial de membrana mitocondrial, las cuales, son igual de fundamentales para la capacidad fertilizante del espermatozoide, con resultados en estos parámetros que pueden verse incluso más afectados que el control que no presenta adición de antioxidantes.

En tercer lugar, se encuentra el flavonolignano Silibinina, aquella molécula que exhibió un efecto menos contrastante respecto al control y que, al igual que los anteriores antioxidantes, evidenció un comportamiento dependiente de la concentración suplementada en algunos parámetros evaluados. En efecto, la Silibinina en su menor concentración aumentó la CAT en las dos técnicas utilizadas, lo cual puede ser atribuido a que esta molécula tiene la capacidad de proporcionar protección contra los grupos de oxígeno libre y de regular los niveles de glutatión (Temamogullari et al., 2021).

Como se indicó anteriormente, Silibinina 20 y 60 μM presentaron la mayor producción de EROs a la hora 96 de refrigeración, evidenciando que solo a una concentración de 40 μM se logra disminuir este parámetro. Sin embargo, la generación de estas especies reactivas en 40 μM es muy similar al control y su reducción no es tan visible como la lograda por las otras moléculas estudiadas.

En ese sentido, la Silibinina, aunque es un eliminador directo de radicales libres, que puede quelatar hierro y cobre, y tener un efecto inhibitor sobre las enzimas que participan en la

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

producción de EROs (Baeri et al., 2018), no logró mitigar de manera importante la generación de estas especies en el semen porcino refrigerado. Vinculado a esto, sus tratamientos tampoco presentaron cambios considerables en $\Delta\%M$, ni en VE, como si sucedió en otro estudio, donde la Silibinina influyó de manera positiva, al ser utilizado como tratamiento terapéutico ante la toxicidad de Sulfato de Níquel en espermatozoides de ratas macho (Temamogullari et al., 2021).

Finalmente, se encuentra la Silimarina, compuesta por los flavonolignanos mencionados anteriormente, además de otros que no se evaluaron en la presente investigación. De esta molécula se han realizado diversos estudios en espermatozoides con resultados de protección muy interesantes, como el reportado en la conservación de semen de carnero, donde se logró compensar los daños ocasionados por arsenito de sodio y mejorar la viabilidad y el $\Delta\%M$ con la adición de Silimarina en células espermáticas (Eskandari & Momeni, 2016).

No obstante, el comportamiento reportado en espermatozoides de carnero, fue diferente al obtenido en la presente investigación, donde suplementar con esta molécula exhibió valores inferiores al control en VE y en $\Delta\%M$ a la hora 96 de refrigeración, no obstante, ambos resultados no presentaron diferencias significativas. Coincidiendo de esta manera con otro estudio en el que la suplementación con Silimarina no presentó diferencias en el potencial de membrana mitocondrial, sin embargo, si disminuyó significativamente la integridad estructural de membrana plasmática en espermatozoides humanos tratados y no tratados con Cloruro de Aluminio (Aghashahi et al., 2020).

En paralelo, los tratamientos 40 y 60 μM de Silimarina, lograron disminuir la producción de EROs, siendo superados en eficiencia de mitigación solo por Silidianina y DMSO. Además, estas dos concentraciones mostraron una cinética de producción inferior al resto de tratamientos a las 96 h de refrigeración. Lo anterior se puede atribuir a la capacidad que tiene la Silimarina para absorber y neutralizar las EROs (Roostaei-Ali Mehr & Parisoush, 2016), disminuir la actividad de enzimas mitocondriales productoras de especies reactivas de oxígeno (Taleb et al., 2018) y estimular la acción de enzimas de defensa como la Superóxido dismutasa y la Glutatión peroxidasa (Wellington & Jarvis, 2001).

Siendo esto último un aspecto de gran importancia, que debería ser evaluado en estudios donde se suplementen antioxidantes, especialmente moléculas como la Siliimarina,

teniendo en cuenta su capacidad para potenciar enzimas antioxidantes, tal como lo reportó Etemadi et al. (2022), en cuyo estudio, la Silimarina logró disminuir el Malondialdehído e incrementar la SOD, la catalasa y la GPx en espermatozoides humanos con toxicidad por Cadmio.

En definitiva, la Silimarina y sus componentes demuestran ser moléculas muy interesantes para la conservación de las células espermáticas porcinas, si se logra determinar y suplementar la dosis adecuada, no obstante, los escasos estudios en ciertos flavonolignanos y la falta de información en espermatozoides impiden de cierta manera conocer a profundidad los efectos protectores y capacidades antioxidantes de estas moléculas en diferentes campos investigativos.

2.5. Conclusiones

- La Silimarina y sus flavonolignanos pueden, según su concentración, reducir la generación de EROs, disminuir su cinética de producción, incrementar la CAT y modificar el $\Delta\%M$ del semen porcino refrigerado.
- La Silidianina tiene la capacidad de mitigar la producción de EROs en el semen porcino refrigerado, exhibiendo una mayor capacidad reductora respecto a la Silimarina y los demás flavonolignanos.
- La Silicristina presenta un efecto dosis dependiente en el semen porcino refrigerado, donde las concentraciones más altas, tienen la capacidad de incrementar la CAT del semen, pero paralelamente pueden disminuir la vitalidad y el $\Delta\%M$ de los espermatozoides.
- La Silimarina, según su concentración, puede disminuir la cinética de producción de EROs en el semen porcino sometido a refrigeración durante largos periodos.
- La Silimarina y sus componentes no exhiben efecto alguno sobre la LPO del semen porcino refrigerado.

2.6. Bibliografía

- Abouzid, S., & Ahmed, O. M. (2013). Silymarin flavonolignans: Structure-activity relationship and biosynthesis. *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 40, pp. 469–484). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00014-X>
- Aghashahi, M., Momeni, H. R., & Darbandi, N. (2020). Impact of aluminium toxicity on vital human sperm parameters—Protective effects of silymarin. *Andrologia*, 1–10. <https://doi.org/10.1111/and.13742>
- Ahmed, H., Amin, H., Clement, A. (2022). Silymarin abrogates acrylamide-induced oxidative stress-mediated testicular toxicity via modulation of antioxidant mechanism, DNA damage, endocrine deficit and sperm quality in rats. *Andrologia*, 54(9). <https://doi.org/10.1111/and.14491>
- Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., & Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in Spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1071/RD15325>
- Arts, M., Dallinga, J., Voss, H., Haenen, G., & Bast, A. (2004). A new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. *Food Chemistry*, 88(4), 567–570. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.02.008>
- Awda, B. J., Mackenzie-Bell, M., & Buhr, M. M. (2009). Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of Reproduction*, 81(3), 553–561. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076471>
- Baeri, M., Mohammadi-Nejad, S., Rahimifard, M., Navaei-Nigjeh, M., Moeini-Nodeh, S., Khorasani, R., & Abdollahi, M. (2018). Molecular and biochemical evidence on the protective role of ellagic acid and silybin against oxidative stress-induced cellular aging. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 441(1–2), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3172-0>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292>
- Biedermann, D., Buchta, M., Holečková, V., Sedlák, D., Valentová, K., Cvačka, J., Bednářová, L., Křenková, A., Kuzma, M., Škuta, C., Peikerová, Ž., Bartůněk, P., & Křen, V. (2016). Silychristin: Skeletal Alterations and Biological Activities. *Journal of Natural Products*, 79(12), 3086–3092. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00750>
- Biedermann, D., Moravcová, V., Valentová, K., Kuzma, M., Petrásková, L., Císařová, I., & Křen, V. (2019). Oxidation of flavonolignan silydianin to unexpected lactone-acid derivative. *Phytochemistry Letters*, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.01.006>
- Bollwein, H., & Bittner, L. (2018). Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. *Animal Reproduction*, 15, 703–710. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0041>

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

- Cordova, A., Ruiz, C., Córdova, C., Córdova, M., Eulogio, J., Guerra, J., Rodríguez, B., & Salinas, K. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Computense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 1–38.
- El-Sheshtawy, R., & El-Nattat, W. (2017). Impact of silymarin enriched semen extender on bull sperm preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 6(2), 81–84. <https://doi.org/10.12980/apjr.6.20170206>
- Eskandari, F., & Momeni, H. R. (2016). Protective effect of silymarin on viability, motility and mitochondrial membrane potential of ram sperm treated with sodium arsenite. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(6), 397–402. <https://doi.org/10.29252/ijrm.14.6.397>
- Etemadi, T., Reza, H., & Asghar, A. (2020). Impact of silymarin on cadmium-induced apoptosis in human spermatozoa. *Andrologia*, 52(11), 1-9. <https://doi.org/10.1111/and.13795>.
- Etemadi, T., Reza, H., Darbandi, N., & Hussein, M. (2022). Silymarin modulates cadmium-induced oxidative stress in human spermatozoa. *Andrologia*, 52(11), 1-9. <https://doi.org/10.1111/and.14475>
- Fair, S., & Romero-Aguirregomezcorta, J. (2019). Implications of boar sperm kinematics and rheotaxis for fertility after preservation. *Theriogenology*, 137, 15–22. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.032>
- Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., & Codina, C. (2008). Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1912–1920. <https://doi.org/10.1021/jf073083c>
- Feng, T. Y., Lv, D. L., Zhang, X., Du, Y. Q., Yuan, Y. T., Chen, M. J., Xi, H. M., Li, Y., Han, N., & Hu, J. H. (2020). Rosmarinic acid improves boar sperm quality, antioxidant capacity and energy metabolism at 17°C via AMPK activation. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(12), 1714–1724. <https://doi.org/10.1111/rda.13828>
- Funahashi, H., & Sano, T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology*, 63(6), 1605–1616. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Guo, H., Gong, Y., He, B., & Zhao, R. (2017). Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. *Theriogenology*, 87, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.005>

- Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, 84(8), 2089–2100. <https://doi.org/10.2527/JAS.2005-766>
- Haddad, P. S., Haddad, Y., Vallerand, D., & Brault, A. (2011). Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. Evidence-Based *Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.1093/ECAM/NEP164>
- Hidalgo, D. M., Barón, F. J., Bragado, M. J., Carmona, P., Robina, A., García-Marín, L. J., & Gil, M. C. (2011). The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. *Theriogenology*, 75(8), 1550–1560. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.021>
- Hidalgo, D. M. (2013). Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. In Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. [Universidad de Extremadura]. <https://dehesa.unex.es:8443/handle/10662/799?mode=full>
- Jang, H.-Y., Kong, H. S., Choi, B.-Y., Shin, J.-S., Cheong, H.-T., Kim, J.-T., Park, I.-C., Park, C.-K., & Yang, B.-K. (2011). Protective Effects of Silymarin against the Toxicity of Bisphenol A (BPA) on Boar Sperm Quality. *Journal of Embryo Transfer*, 26(4), 257–263.
- Juarez, J. D. (2009). Efecto de la velocidad de enfriamiento en la congelabilidad de espermatozoides porcinos. [Universidad de Murcia]. <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/14316>
- Khoi, H. X., Shimizu, K., Yoneda, Y., Minagawa, I., Abe, Y., Kuwabara, Y., Sasanami, T., & Kohsaka, T. (2021). Monitoring the reactive oxygen species in spermatozoa during liquid storage of boar semen and its correlation with sperm motility, free thiol content and seasonality. *Andrologia*, 53(11), e14237. <https://doi.org/10.1111/AND.14237>
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K. M., Bardoloi, R. K., Das, A., Kumar, S., & Naskar, S. (2009). Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 110, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.006>
- Luberda, Z. (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. *Reproductive Biology*, 5(1), 5–17.
- Martín-Hidalgo, D., Hurtado de Llera, A., Henning, H., Wallner, U., Waberski, D., Bragado, M. J., Gil, M. C., & García-Marín, L. J. (2013). The Effect of Resveratrol on the Quality of Extended Boar Semen During Storage at 17°C. *Journal of Agricultural Science*, 5(8), 231–242. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n8p231>
- Martínez, F., Mata, M., Álvarez, M., Álvarez, M., Anel, L., & de Paz, P. (2010). Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(SUPPL. 2), 67–78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>

Actividad antioxidante de la Silimarina y sus componentes (Silidianina, Silicristina y Silibinina) y su efecto sobre la conservación de semen porcino (*Sus scrofa*) refrigerado

- Merino, O., Figueroa, E., Cheuquemán, C., Valdebenito, I., Isachenko, V., Isachenko, E., Sánchez, R., Farías, J., & Risopatrón, J. (2017). Short-term storage of salmonids semen in a sodium alginate-based extender. *Andrologia*, 49(5), 1–5. <https://doi.org/10.1111/and.12661>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>
- Oufi, H. G., & Al-Shawi, N. N. (2014). The effects of different doses of silibinin in combination with methotrexate on testicular tissue of mice. *European Journal of Pharmacology*, 730(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.02.010>
- Pascual, C., Gonz, R., Armesto, J., & Muriel, P. (1993). Effect of silymarin and silybinin on oxygen radicals. *Drug Development Research*, 29(1), 73–77. <https://doi.org/10.1002/ddr.430290109>
- Pereira, B. A., Rocha, L. G. P., Teles, M. C., Silva, W. E., Barbosa, J. A., Rabelo, S. S., Uchoa, A. S., Rodriguez-Gil, J. E., Pereira, L. J., & Zangeronimo, M. G. (2019). Addition of chlorogenic acid and caffeine during the processing of cooled boar semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 71(2), 489–499. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10415>
- Pezo, F., Romero, F., Zambrano, F., & Sánchez, R. S. (2019). Preservation of boar semen: An update. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 423–434. <https://doi.org/10.1111/rda.13389>
- Potra, G., Babes, P., Calniceanu, H., Popa, A., Ciavoi, G., Iova, G., Ganea, M., & Scrobotă, I. (2021). Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Carvacrol and Magnolol, in Periodontal Disease and Diabetes Mellitus. *Molecules*, 26(22), 6899. <https://doi.org/10.3390/molecules26226899>
- Pourheydar, B., Azarm, F., Farjah, G., Karimipour, M., & Pourheydar, M. (2021). Effect of silymarin and metformin on the sperm parameters and histopathological changes of testes in diabetic rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 19(12), 1091–1104. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v19i12.10060>
- Pyszková, M., Biler, M., Biedermann, D., Valentová, K., Kuzma, M., Vrba, J., Ulrichová, J., Sokolová, R., Mojović, M., Popović-Bijelić, A., Kubala, M., Trouillas, P., Křen, V., & Vacek, J. (2016). Flavonolignan 2,3-dehydroderivatives: Preparation, antiradical and cytoprotective activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 90, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.014>
- Rajnochová, A., Gabrielová, · Eva, Ulrichová, J., Zálešák, B., Biedermann, · David, & Vostálová, J. (2019). A pilot study of the UVA-photoprotective potential of dehydrosilybin, isosilybin, silychristin, and silydianin on human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research*, 311, 477–490. <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01928-7>
- Reina, M., & Martínez, A. (2016). Is Silybin the Best Free Radical Scavenger Compound in Silymarin? *Journal of Physical Chemistry B*, 120(20), 4568–4578. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.6b02807>
- Roostaei-Ali Mehr, M., & Parisoush, P. (2016). Effect of different levels of silymarin and caproic acid on storage of ram semen in liquid form. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 569–574. <https://doi.org/10.1111/rda.12721>

- Surai, P. F. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204–247. <https://doi.org/10.3390/antiox4010204>
- Taleb, A., Ahmad, K. A., Ihsan, A. U., Qu, J., Lin, N., Hezam, K., Koju, N., Hui, L., & Qilong, D. (2018). Antioxidant effects and mechanism of silymarin in oxidative stress induced cardiovascular diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 102(January), 689–698. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.140>
- Temamogullari, F., Atessahin, A., Cebi Sen, C., Yumusak, N., & Dogru, M. (2021). Protective role of silibinin over nickel sulfate-induced reproductive toxicity in male rats. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 24(1), 29–34. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2020.135817>
- Teixeira, S. M. P., Chaveiro, A., & Moreira da Silva, F. (2015). Effect of Conjugated Linoleic Acid on Boar Semen Quality After Long-term Refrigeration at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(4), 604–610. <https://doi.org/10.1111/rda.12535>
- Tian, X., Li, D., He, Y., Zhang, W., He, H., Du, R., Pang, W., Yang, G., & Yu, T. (2019). Supplementation of salvianic acid A to boar semen extender to improve seminal quality and antioxidant capacity. *Animal Science Journal*, 90(9), 1142–1148. <https://doi.org/10.1111/ASJ.13263>
- Torres, P., Fischman, M. L., Acerbo, M., García, C., Míguez, M., Domínguez, J., & Cisale, H. (2014). Análisis de diluyentes comerciales de semen porcino refrigerado durante 4 días: resultados preliminares. *Archivos de Zootecnia*, 63(243), 547–550. <https://doi.org/10.4321/s0004-05922014000300015>
- Wellington, K., & Jarvis, B. (2001). Silymarin: A review of its clinical properties in the management of hepatic disorders.
- Zielińska-Przyjemska, M., & Wiktorowicz, K. (2006). An In vitro Study of the Protective Effect of the Flavonoid Silydianin against Reactive Oxygen Species. *Phytother. Res*, 20, 115–119. <https://doi.org/10.1002/ptr.1812>

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

- La Silimarina y sus componentes tienen la capacidad de modificar y en muchos casos mejorar, las características de calidad espermática del semen porcino refrigerado, como son la movilidad y cinética espermática, el potencial de membrana mitocondrial, la capacidad antioxidante total y la generación de EROs.
- La suplementación del diluyente espermático porcino con Silimarina y sus componentes, puede proteger los espermatozoides porcinos de los daños generados durante la refrigeración, siempre y cuando, éstos sean adicionados en las concentraciones apropiadas de cada molécula.

Recomendaciones

- Ante la falta de investigaciones donde se implemente la suplementación de la Silimarina y sus componentes en diluyentes espermáticos, y en vista de los buenos resultados que se pueden obtener al adicionar la concentración indicada de cada flavonolignano, se recomienda realizar más estudios con estos antioxidantes, no solo en semen porcino, si no en espermatozoides de diferentes especies, continuando así, con el estudio de estas moléculas a nivel reproductivo, buscando mejorar la conservación de células espermáticas y la eficiencia en la producción.
- Se recomienda realizar evaluaciones complementarias donde se pueda determinar la actividad de las enzimas antioxidantes del semen y su posible interacción con la Silimarina y sus flavonolignanos. Además, se sugieren estudios donde se realicen evaluaciones de adherencia a zona pelúcida y fertilización *in vitro* que permitan determinar el efecto de estos flavonolignanos sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos sometidos a refrigeración.