



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LDL Y ANTIOXIDANTES EN EL
DILUYENTE PARA LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LA INTEGRIDAD
Y LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA**

Darío León González Romero

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2023

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON LDL Y ANTIOXIDANTES EN EL
DILUYENTE PARA LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN PORCINO EN LA INTEGRIDAD
Y LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA**

Darío León González Romero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Biotecnología

Director:
Giovanni Restrepo Betancur, PhD

Línea de investigación:
Biotecnología Animal

Grupo de investigación:
Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Medellín, Colombia
2023

Más adelante, tal vez, aparecerá alguien cuya inteligencia reduzca mis fantasmas a lugares comunes; una inteligencia más serena, más lógica y mucho menos excitable que la mía, capaz de ver en las circunstancias que temerosamente describiré, una vulgar sucesión de causas y efectos naturales

Edgar Allan Poe

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.

DARIO LEON GONZALEZ ROMERO

Fecha 10/02/2022

Agradecimientos

- A Maura Romero, Yaneth González y Stella González a quienes les debo todo agradecimiento por su ayuda personal y económica en el desarrollo de este proyecto de vida.
- A mi tutor Giovanni Restrepo, quien es el eje fundamental de todos los procesos del grupo de investigación, siempre dispuesto a colaborar en cada momento, siendo un referente en el país en el área de reproducción animal y de una excelente calidad humana.
- Al comité tutorial Dra. Alexandra Úsuga y Dr. Leonardo Hernández por sus valiosos aportes basados en la experiencia y rigurosidad académica.
- A Giovanni Grisales quien fue realmente importante para el desarrollo de esta investigación en el apoyo incondicional para todos y cada una de las personas que accedemos al laboratorio, siempre dispuesto y con la mejor actitud.
- A Juan David Montoya, un agradecimiento especial, puesto que fue fundamental para el desarrollo de la investigación, con un aporte desde el punto de vista administrativo de manera perfecta.
- A Kelly Vanessa, por su apoyo en el proceso investigativo en la fase de experimentación del proyecto
- A Don Jorge y Don Horacio que nos apoyaron en cada una de las colectas para poder realizar esta investigación

Resumen

La refrigeración de semen porcino es una herramienta biotecnológica que permite la conservación del material genético de cerdos con alto mérito para ser diseminado en labores como la inseminación artificial. La refrigeración podría causar efectos deletéreos en tiempo prolongado, por lo que es necesaria además de la reducción de su actividad metabólica, la mitigación de las alteraciones asociadas al estrés oxidativo de las células espermáticas, siendo la membrana plasmática una de las estructuras más afectadas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la suplementación con LDL, quercetina y resveratrol en el diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre el estado redox, la integridad y la funcionalidad espermática. Se empleó el semen de cinco machos reproductores (*Sus scrofa domesticus*) obteniendo 15 muestras seminales. El semen se llevó a refrigeración durante cinco días con cuatro tratamientos (1. diluyente comercial (control); 2. Suplementación LDL; 3. Suplementación Quercetina (10, 30 y 50 μM); 4. Suplementación Resveratrol (10, 30 y 50 μM)), luego se sometió a evaluaciones de cinética espermática y vitalidad en cinco momentos (0, 24, 48, 72 y 96 horas de refrigeración). Se realizaron pruebas de estado redox, capacidad antioxidante y citometría de flujo en los tratamientos a las 24 horas de refrigeración para determinar la estabilidad de membrana, actividad mitocondrial y la peroxidación lipídica. Se observaron diferencias significativas favoreciendo: la movilidad con la suplementación LDL, en la integridad de membrana con Q10 μM , en las especies reactivas de oxígeno con Q10 μM , Q50 μM y R50 μM , en capacidad antioxidante por método ABTS con R10 μM , en capacidad antioxidante por método FRAP con quercetina y resveratrol, en peroxidación lipídica con LDL y en potencial de membrana mitocondrial y vitalidad espermática con quercetina. Se concluye que el uso de LDL y resveratrol en el diluyente para la refrigeración del semen porcino, puede favorecer la conservación de los espermatozoides, mediante la mitigación de las alteraciones celulares y la modulación del estado redox y la capacidad antioxidante.

Palabras clave: radicales libres, antioxidantes, biotecnología, reproducción animal

EFFECT OF LDL AND ANTIOXIDANT SUPPLEMENTATION IN THE DILUENT FOR THE REFRIGERATION OF PIG SEMEN ON SPERM INTEGRITY AND FUNCTIONALITY

Abstract

Pig semen refrigeration is a biotechnological tool that allows the storage and conservation of the genetic material of pigs with high merit to be disseminated in routine tasks such as artificial insemination. However, refrigeration for a long time can affect the natural characteristics of spermatozoa, which is why, in addition to reducing their metabolic activity, it is necessary to mitigate the alterations associated with oxidative stress of sperm cells, being the membrane Plasma one of the most affected structures. For this reason, this research aimed to evaluate the effect of supplementation with LDL, quercetin and resveratrol in the extender for refrigeration of boar semen on redox status, integrity and sperm functionality. Semen from five breeding males (*Sus scrofa domesticus*) was used, obtaining 15 seminal samples. The semen was refrigerated for five days with four treatments (1. commercial extender (control); 2. LDL supplementation; 3. Quercetin supplementation (10, 30 and 50 μM); 4. Resveratrol supplementation (10, 30 and 50 μM), then they were subjected to sperm kinetics and vitality evaluations at five moments (0, 24, 48, 72 and 96 hours of refrigeration). In addition, redox status, antioxidant capacity, and flow cytometry tests were performed on the treatments after 24 hours of refrigeration to determine membrane stability, mitochondrial activity, and lipid peroxidation. Significant differences were observed to improve: mobility with LDL supplementation, in membrane integrity with Q10 μM reactive oxygen species with Q10 μM , Q50 μM , and R50 μM , in antioxidant capacity by ABTS method with R10 μM , in antioxidant capacity by FRAP method with quercetin and resveratrol, in lipid peroxidation with LDL and mitochondrial membrane potential and sperm vitality with quercetin. It is concluded that the use of LDL and resveratrol in the extender for the refrigeration of boar semen can favor the preservation of spermatozoa, by mitigating cell alterations and modulating the redox state and antioxidant capacity.

Keywords: free radicals, antioxidants, biotechnology, animal reproduction

Contenido

Resumen	VI
Abstract	VII
Lista de tablas	XI
Lista de figuras	XII
Lista de símbolos y abreviaturas	XIV
Introducción	15
Objetivos	20
Hipótesis	21
1. Marco teórico	22
1.1 Porcicultura en Colombia y el mundo.....	22
1.1.1. La producción porcina en el mundo	25
1.1.2 La producción porcina en Colombia	26
1.3 Importancia de la reproducción en porcinos.....	27
1.4 Congelación de semen porcino.....	27
1.5. Refrigeración de semen porcino	29
1.6. Diluyentes	29
1.7. Componentes de los diluyentes	30
1.8. Sustancias reactivas de oxígeno.....	31
1.9. Peroxidación lipídica (PL).	32
1.10. Efecto sobre las proteínas.	33
1.11. Efecto sobre el ADN.	34
1.12. Daño oxidativo sobre los espermatozoides.....	34
1.13. Antioxidantes	35
1.14. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema de huevo	38
1.15. Función de los antioxidantes a nivel seminal	39
1.16. Clasificación de los antioxidantes.	41
1.17. Antioxidantes naturales.....	42

1.17.1. Antioxidantes enzimáticos.....	42
1.17.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	44
1.18. Función antioxidante de los metales.....	46
1.19. Resveratrol.....	47
1.20. Quercetina.....	52
1.21. Determinación de la capacidad antioxidante.....	53
2. Materiales y métodos.....	55
2.1 Selección de reproductores.....	55
2.2 Recolección y procesamiento de semen.....	55
2.3. Preparación de los diluyentes.....	56
2.3.1. Obtención de las fracciones solubles e insolubles de la yema de huevo.....	57
2.3.2. Obtención de LDL y suplementación en el diluyente.....	57
2.4 Suplementación del diluyente con antioxidantes.....	57
2.5 Movilidad espermática y cinética de movimiento.....	58
2.5.1 Parámetro de Movilidad.....	58
2.5.2 Parámetros de la cinética del movimiento espermático.....	59
2.6 Metodología para la integridad de membrana.....	59
2.7. Determinación del estado redox.....	60
2.7.1. Determinación de especies reactivas de oxígeno.....	60
2.7.2. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS+.....	60
2.7.3. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método FRAP.....	61
2.8. Peroxidación lipídica de la membrana plasmática (LPO).....	61
2.9. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$ M).....	61
2.10. Vitalidad espermática.....	62
2.11 Análisis estadístico.....	62
3. Resultados.....	65
3.1. Movilidad espermática y cinética de movimiento.....	65
3.2. Integridad de membrana.....	70
3.3. Especies reactivas de oxígeno.....	71
3.4. Capacidad antioxidante en la suplementación del diluyente por el método del radical catiónico ABTS+.....	72
3.5. Capacidad antioxidante en la suplementación del diluyente por el método FRAP.....	73

3.6. Peroxidación lipídica de la membrana plasmática (LPO)	73
3.7. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_M$).....	75
3.8. Vitalidad espermática.....	78
4. Discusión	80
4.1. Movilidad espermática y cinética del movimiento.....	80
4.2. Integridad de la membrana	83
4.3. Especies reactivas de Oxígeno (EROS)	85
4.4. Capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS.....	86
4.5. Capacidad antioxidante por el método FRAP.....	88
4.6. Peroxidación lipídica de la membrana plasmática.....	89
4.7. Potencial de membrana mitocondrial	90
4.8. Vitalidad espermática.....	91
5. Conclusiones	93
6. Recomendaciones	94
7. Bibliografía.....	95

Lista de tablas

Tabla 1. Cinco primeras regiones del mundo productoras de carne de cerdo	25
Tabla 2. Composición de algunos diluyentes de semen porcino utilizados actualmente en inseminación artificial	31
Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes según su sitio de acción.....	41
Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes según su origen. (Reylli y Burkley, 1990).....	41
Tabla 5. Índices de velocidad media de la cabeza, rectilínea y curvilínea espermática. .	66
Tabla 6. Resultado de rectitud y linealidad.	69
Tabla 7. Bodipy día 1.....	74
Tabla 8. Bodipy día 5.....	74
Tabla 9. Vitalidad espermática Dia 1	78
Tabla 10. Vitalidad espermática Dia 5	78

Lista de figuras

Figura 1. Acción del antioxidante frente a los radicales libres. Se muestra la acción que ejercen los antioxidantes, cediendo electrones para estabilizar al radical libre y evitar su reacción con otras moléculas.	39
Figura 2. Estructuras químicas del resveratrol.....	47
Figura 3. Biosíntesis de una molécula de trans-resveratrol.....	48
Figura 4. Acción del resveratrol.....	49
Figura 5. Acción antioxidante del Resveratrol.....	50
Figura 6. Estructura química de la quercetina	52
Figura 7. Proceso de recolección de semen, evaluación y dilución. Error! Marcador no definido.	
Figura 8. Efecto de la suplementación con LDL, resveratrol y quercetina a diferentes concentraciones sobre la Movilidad Total (media \pm error estándar).	65
Figura 9. Efecto de la suplementación con LDL, resveratrol y quercetina a diferentes concentraciones sobre la movilidad progresiva (media \pm error estándar).	66
Figura 10. Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza	68
Figura 11. Índice de BCF.....	69
Figura 12. Test de integridad de Membrana.....	71
Figura 13. Producción de especies reactivas de oxígeno- EROS.....	72
Figura 14. Capacidad antioxidante en suplementación del diluyente por método radical catiónico ABTS+.....	72
Figura 15. Capacidad antioxidante de suplementación del diluyente por método FRAP. 73	
Figura 16. Porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial según la suplementación con LDL, quercetina o resveratrol a diferentes concentraciones	76
Figura 17. Porcentaje de espermatozoides con bajo potencial de membrana mitocondrial según la suplementación con LDL, quercetina o resveratrol a diferentes concentraciones	77

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AR	Acrosomas reaccionados
ALH	Amplitud lateral de la cabeza
BSA	Suero fetal bovino
CAT	Catalasa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
BCF	Frecuencia de batido de la cola
GPL	Glicerofosfolípidos
GPx / GR	Glutación peroxidasa/reductasa
IA	Inseminación artificial
IM	Integridad funcional de la membrana celular
MP	Membrana plasmática
MN	Morfología normal
MP	Móviles progresivos
MT	Móviles totales
LN ₂	Nitrógeno líquido
PL	Peroxidación lipídica
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
PMMIA	Potenciales de membrana mitocondrial interna alta
PMMIB	Potenciales de membrana mitocondrial interna baja
HOST	Prueba de inflamación hipoosmótica
SOD	Superóxido dismutasa
URF	Unidades relativas de fluorescencia
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad lineal
VAP	Velocidad media

Introducción

El cerdo doméstico (*Sus scrofa domesticus*), es un vertebrado, de la clase los mamíferos, del orden de los ungulados, del suborden artiodáctilos, y de la familia de los Suidos (Ruiz, 2013). Desde la época colonial se ha considerado a la porcicultura como una de las principales actividades, que han contribuido a satisfacer las necesidades alimenticias del pueblo colombiano. En la actualidad, esta actividad cobra mayor importancia debido al gran aumento de población que se presenta en nuestro país, generando una mayor demanda alimentaria (Villa, 2021). En el 2020, la producción nacional de carne de cerdo fue de 468.880 toneladas, creciendo un 5%, frente a la oferta del año anterior, a nivel nacional donde la producción radica en 22 departamentos y en 5 se concentra el 90% de la actividad productiva, que son en su orden de importancia: Antioquia (43%), Cundinamarca (17%), Valle del Cauca (15%), Meta (7%) y Risaralda (6%) (Villa,2021).

Según datos publicados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción de carne de cerdo en Colombia se encuentra catalogada como una de las principales producciones alimentarias al igual que la de la carne bovina, el pollo, la leche y los huevos. El departamento de Antioquia participa con un 49,3% de producción total seguidos de los por la región central con 15,4%, Valle del Cauca y Cauca con 13,6, un 11% en la región oriental, 7% en la región cafetera y solo un 4,1% en la Costa atlántica (Jaramillo, 2017).

Según el último censo en el año 2022, el beneficio de porcinos se consolidó 5.536.331 cabezas (cb), lo que refiere un crecimiento de 6,6% frente al total de 2021, donde el departamento de Antioquia fue calificado como el departamento con mayor producción en la industria nacional, que este departamento realizó un número de cabezas para sacrificio de un 45,5% del total de la producción del país (Departamento Administrativo Nacional de Estadística, 2022).

En el caso de la Porcicultura, la reproducción juega un papel importante la cual ha sido profundamente modificada a lo largo de los años en base a las mejoras obtenidas en las líneas genéticas, programas de alimentación, manejo y sanidad., esto se ve reflejado en parámetros productivos como el aumento del número de lechones destetados por cerda por año y esto es resultado al incremento de los lechones nacidos por camada, número de partos por cerda y año y a un descenso en el intervalo destete-cubrición (IDC) (Carrion y Medel, 2001). Diversos estudios reportan valores similares en la movilidad total del semen refrigerado en el primer día con valores cercanos al 85% (Guzmán, 2003; Cordova-Izquierdo et al., 2004; Bellido y Blanco 2013), y en la evaluación de la movilidad total en postdescongelacion se reportan en Diluyente tris y BTS con valores promedio de 45.91% y 35.97% respectivamente (Bellido 2013; Carpio et al., 2008) conjuntamente se reportan valores en número de lechones paridos en inseminación artificial y monta natural con valores promedio de 9.8 y 8.5 lechones respectivamente (Bellido y Blanco, 2013).

Estos aumentos en los parámetros reproductivos influyen directamente en el número de cerdos que después irán a sacrificio, es por eso que se entiende la reproducción en este tipo de explotaciones como un pilar para la producción porcina, ya que de esto depende la eficiencia, productividad y rentabilidad de las empresas del sector porcícola.

En casi todas las producciones porcinas la reproducción en los cerdos se realiza medio de la inseminación artificial (IA). Según las últimas estimaciones, en el mundo se realizan unos 19 millones de inseminaciones, de las cuales la totalidad (99%) se realiza con semen refrigerado a 15–20°C (Jhonson et al., 2000). Esta biotecnología de la IA, fue desarrollada en la ex Unión Soviética en los años 30. Se reportan trabajos realizados por Milovanov en 1932 y a partir de los años 60 se realiza en toda Europa, paralelamente se producen nuevos diluyentes como también técnicas de extracción y procesamiento del semen (Bailey et al., 2008).

La (IA) ha contribuido con la mejora genética de las porcícolas, esto debido a la utilización de ejemplares de mejor calidad genética, menor cantidad de machos por sistema de producción y la disminución de enfermedades transmitidas por monta directa (González M et al., 2004). Además, permite una mayor cobertura y disponibilidad del material genético de reproductores de alto interés para su conservación y distribución, lo cual va en pro del mejoramiento genético y el valor comercial de la especie para cruzamientos dirigidos (Restrepo G et al., 2014).

Entre los factores que han favorecido el desarrollo de esta técnica se encuentran las ventajas en la diseminación del material genético mejorado del verraco, unido a que los resultados obtenidos con esta técnica igualan, incluso mejoran los obtenidos en sistemas con monta natural (Gadea 2003).

La dilución y conservación del semen porcino (*Sus scrofa*) en refrigeración es una alternativa que brinda la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco, debido a que se obtiene de esta manera una mayor cantidad de lechones por reproductor durante la vida productiva. Para ello, el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA – suero fetal bovino), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (NaCl, KCl) y e inhibir el desarrollo microbiano (antibióticos) (Rueda et al., 2009). Gil et al, (2002) y Watson y Behan (2002) mencionan que inseminando 1×10^9 espermatozoides viables/dosis por medio de la inseminación intrauterina se obtienen niveles productivos de granja, estadísticamente iguales a los obtenidos por medio de una inseminación tradicional con 3×10^9 espermatozoides viables/dosis sin afectar los parámetros productivos.

Debido al problema del efecto deletéreo de los radicales libres sobre la calidad espermática del cerdo, en los últimos años se han realizado estudios acerca del uso de diferentes antioxidantes como es el caso de la vitamina C y la vitamina E, en los diluyentes durante la conservación espermática en diferentes especies y se han observado los efectos benéficos sobre la calidad seminal (Cordova, 2009).

Restrepo et al., 2015 ha reportado ampliamente el de uso algunos antioxidantes para determinar la capacidad antioxidante y calidad post-descongelación del semen equino criopreservado donde se evidenció que la ergotioneina y la quercetina incrementan la capacidad antioxidante e influyen sobre la movilidad y la cinética post-descongelación del semen.

Una alternativa para mitigar los daños ocasionados por los radicales libres sobre los espermatozoides porcinos en el proceso de refrigeración, es la suplementación con melatonina que puede incluso preservar la actividad de enzimas antioxidantes a nivel intracelular durante la conservación, estudios realizados demuestran que la melatonina tiene efecto antioxidante en semen de cerdo conservado a 16°C (Flores et al, 2018).

Diversos estudios han propuesto que la fracción de la yema huevo que contiene lipoproteínas de baja densidad (LDL), podrían ser en parte responsables de la resistencia contra el choque frío y de la mejora de la movilidad después del almacenamiento; además, se ha determinado que las LDL podrían adherirse a las membranas celulares durante el procesamiento del semen, preservando así las membranas de los espermatozoides. Es de vital importancia determinar el efecto de la suplementación de LDL sobre el diluyente seminal en porcinos y ver su efecto benéfico en las propiedades del semen en el proceso de refrigeración (Moussa et al 2002). Reportes muestran un efecto benéfico en la adición de LDL en el proceso de refrigeración donde mejoran las características de movilidad en diferentes tiempos (24, 48, 72 h) (Glover, 1987) este efecto se le ha asociado a la composición de las lipoproteínas que contienen núcleos de lípidos neutros de tamaño variable rodeados por una capa de lipovitelina compuesta principalmente de glicoproteína y fosfolípidos con grupos hidrófobos orientados al interior y grupos hidrófilos en la superficie generando un efecto benéfico sobre la membrana celular de las células espermáticas en refrigeración (Watson, 1981).

Es importante resaltar que el estudio de suplementación con LDL y antioxidantes en refrigeración de semen porcino se ha estudiado poco para la especie y es fundamental entender que estos pueden participar activamente en los procesos de conservación del semen debido a que se producen diversas especies reactivas de oxígeno (EROS), originando estrés oxidativo (EO) que provoca un efecto nocivo en el espermatozoide (Hu et al., 2010; Agarwal et al., 2014). Esto es debido a la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's) presentes en su membrana plasmática, siendo un blanco ideal para la peroxidación lipídica (PL), provocando alteraciones bioquímicas y funcionales en los espermatozoides (Tuncer et al., 2010, Baghshahi et al., 2014).

Se ha reportado que la suplementación del semen de toro con LDL, genera notables propiedades crioprotectoras para los espermatozoides en los procesos de congelación, y esto se ve reflejado en la obtención de mayores porcentajes de movilidad y mejores características de movimiento, que dan indicio de una mejor calidad del semen al momento de la descongelación (Moussa et al., 2002).

Las LDL extraídas de la yema de huevo tienen efecto protector sobre los espermatozoides de cerdo durante la congelación y descongelación. Varios grupos de investigación han reportado mejores resultados en protocolos que usan LDL en lugar de yema de huevo

entera para congelar el semen de caninos (Bencharif et al., 2008), en toros (Amirat et al., 2004) y en cerdos (Hu et al., 2006). El uso de LDL en semen de cerdo presenta un aumento de la resistencia del esperma frente al shock por frío, lo que resulta en una mejor movilidad del esperma después del almacenamiento de semen (Orrego et al., 2018).

Dicho esto, se generan las siguientes preguntas: ¿Existe un efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre la movilidad y la cinética espermática? ¿Hay un efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre la integridad, la estabilidad y la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides? ¿Existe una relación entre la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre la actividad mitocondrial de los espermatozoides?

En este sentido es notable la necesidad de estudiar el efecto de la suplementación con antioxidantes y LDLs sobre la integridad espermática y estado redox de semen porcino refrigerado.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la suplementación con LDL y antioxidantes (quercetina y resveratrol) en el diluyente para la refrigeración de semen porcino, sobre la integridad y la funcionalidad espermática.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino con LDLs (6%) y antioxidantes (quercetina y resveratrol), sobre la movilidad y la cinética espermática.
- Evaluar el efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino con LDLs (6%) y antioxidantes (quercetina y resveratrol), sobre la integridad, la estabilidad y la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides.
- Evaluar la relación de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino con LDLs (6%) y antioxidantes (quercetina y resveratrol), con la peroxidación lipídica y actividad mitocondrial de los espermatozoides.

Hipótesis

Hipótesis alternas

- Existe diferencia significativa positiva en el efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre la movilidad y la cinética espermática.
- Existe un efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre la integridad, la estabilidad y la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides.
- Existe una relación entre la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino y la peroxidación lipídica y la actividad mitocondrial de los espermatozoides.

Hipótesis nulas

- No existe diferencia significativa positiva en el efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre la movilidad y la cinética espermática. De nuevo:
- No existe un efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre la integridad, la estabilidad y la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides.
- No existe una relación entre la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino y la peroxidación lipídica y la actividad mitocondrial de los espermatozoides.

1. Marco teórico

1.1 Porcicultura en Colombia y el mundo

La producción de carne de cerdo ocupa el primer lugar dentro de la producción de carnes en el mundo, en el año 2021, se presenta un aumento de la carne producida en el mundo, para una producción de más de 122 millones de toneladas de carne, de esta forma, es la carne de cerdo la más consumida en el mundo y la principal fuente de proteína animal, se estima que de los 38.2 kg de carne consumida en el mundo por persona al año, 15.1 kg fueron de carne de cerdo (FAO, 2021).

En Colombia durante los últimos doce años, el recaudo de la Cuota de Fomento Porcícola ha mostrado una dinámica importante, al aumentar un 5,5% con un total de 5.200.204 cabezas sacrificadas para el año 2022, este aumento evidencia la expansión de la porcicultura, así como de los distintos ciclos productivos y económicos de la misma, traduciéndose en el largo plazo en una tasa de crecimiento positiva, mientras que en el corto plazo ha mostrado tasas de cambio anuales con una amplia variabilidad- (Fondo Nacional de la Porcicultura, 2018).

Este incremento en la productividad del sector porcícola requiere de una óptima eficiencia en los diferentes ciclos productivos de la producción, siendo fundamental los índices reproductivos. En Colombia han sido escasos y en algunos casos limitados los estudios que han evaluado efectividad de la cadena productiva de carne de cerdo, por lo tanto, es indispensable realizar un estudio que analice factores importantes que influirán en la competitividad de la industria porcícola. (MADR et al., 2011).

Por otra parte, el mercado de la carne de cerdo en Colombia representa una fuente importante de alimentación para la población, como fuente de proteína animal. Nuestro consumo por persona al año se encuentra aproximadamente en 7 Kg. entre consumo formal e informal.

Siendo la reproducción un pilar fundamental en la producción porcícola, la herramienta reproductiva más empleada es la inseminación artificial la cual ha evolucionado considerablemente en los últimos años, lo que ha permitido obtener óptimos resultados de fertilidad y prolificidad. No obstante, la capacidad de discernir entre eyaculados fértiles e infértiles para clasificar a los sementales según el grado de calidad seminal, constituye uno de los principales problemas actuales por tanto se ve la necesidad de investigar sobre nuevas técnicas que influyan en la calidad seminal (Acosta et al., 2007). En Colombia se han reportado estudios para la evaluación de la fertilidad mediante la valoración de parámetros seminales a través del tiempo de refrigeración, debido a que la IA se realiza con semen fresco diluido o refrigerado a 16 - 18°C, en el mismo día de extracción o almacenado por uno a cinco días donde a partir de las primeras 2 horas, se produce una merma en los parámetros de calidad seminal. Sin embargo, se espera una tasa de parición del 80-85 % cuando el semen se usa dentro de las 48 horas después de la recolección, pero a la H72 disminuye la integridad del ADN desmejorando su eficacia y a su vez su tasa de fecundación (Rodríguez-Rolón, 2020)

Uno de los factores de importancia en la cría de cerdos por medio de inseminación artificial, es la refrigeración del semen porcino, para beneficiar la capacidad fecundante del verraco, debido a que se obtiene una mayor cantidad de hembras servidas por cada macho, durante la época reproductiva del cerdo (Rugeles et al., 2013).

La dilución y conservación del semen porcino en refrigeración es una práctica que brinda a la industria porcina la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco, para ello, los diluyentes en donde se conserva el material seminal, deben proporcionar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA- suero fetal bovino) controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (NaCl, KCl) y los antibióticos para la inhibición del desarrollo microbiano (Rugeles et al., 2013).

Aleman, Alfaro y Hurtado, (2007) reportan que un 99% de las inseminaciones realizadas en cerdas, utilizan semen conservado de forma ideal a temperatura de 15 a 20°C por uno a cinco días. Cuando se conserva el semen en temperaturas por debajo de 14°C, se presentan alteraciones de la membrana del espermatozoide repercutiendo en el poder fecundante del mismo.

Es por eso que, hoy en día, los diluyentes comerciales utilizados en la industria porcina, se siguen modificando con el propósito de obtener semen con alta capacidad fecundante en procesos de (IA). Características como volumen total, concentración y movilidad son indicadores utilizados para valorar la calidad del semen y su respuesta a la manipulación, particularmente la movilidad debido a su asociación con el número total de lechones nacidos (Rugeles et al., 2013). Gil et al, (2002), Watson y Behan, (2002) mencionan que inseminando 1×10^9 espermatozoides viables/dosis por medio de la inseminación intrauterina se obtienen niveles productivos de granja, estadísticamente iguales a los obtenidos por medio de una inseminación tradicional con 3×10^9 espermatozoides viables/dosis sin afectar los parámetros productivos con un volumen para dosis inseminante de 80-100 ml totales.

La conservación del semen refrigerado depende principalmente del diluyente, ya que contribuye a preservar las características funcionales de las células espermáticas manteniendo el nivel de fertilidad del eyaculado. El semen refrigerado se puede conservar entre 15 y 18°C. Estas temperaturas son las más utilizadas tanto en los centros de IA como en las explotaciones porcinas. Además, el uso del diluyente permite mantener viable el material espermático a 17°C durante aproximadamente 5 días, con un porcentaje de preñez en muchos casos superior al 80% (Alemán, Alfaro y Hurtado, 2007).

El limitante de la conservación de semen porcino es la sensibilidad de los espermatozoides a temperaturas por debajo de 15°C, las cuales generan daños en la membrana plasmática y en el acrosoma, alterando la viabilidad y funcionalidad de la célula espermática; esto se ha relacionado con la producción excesiva de radicales libres (RL) en el espermatozoide que a altas concentraciones generan (EO) y alteraciones celulares como la lipoperoxidación de la membrana plasmática, situación a la que el espermatozoide es particularmente susceptible debido a las altas concentraciones de ácidos grasos polinsaturados en la membrana plasmática (Flores et al., 2018). Los espermatozoides porcinos son muy sensibles a los daños peroxidativos debido al alto contenido de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana plasmática y la relativa baja capacidad antioxidante del plasma seminal. Por otra parte, la disminución de la temperatura en los espermatozoides puede aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), produciendo daños en el ADN, alteraciones del citoesqueleto,

inhibición en la fusión espermato-óvulo y que afectan el axonema espermático que se asocia con la pérdida de la movilidad (Mejía, 2010).

Dentro del sistema antioxidante enzimático del semen, se destaca el superóxido dismutasa (SOD) y se ha podido constatar que, a lo largo de la curva de enfriamiento del proceso de conservación del semen, la concentración de esta enzima disminuye, dejando expuesto a los espermatozoides a la acción de los RL. En tal sentido, en los últimos años se han realizado estudios con el uso de diferentes suplementaciones en el diluyente como es el caso de los antioxidantes, para evitar el efecto deletéreo de los RL durante la conservación espermática en diferentes especies (Flores et al., 2018).

1.1.1 La producción porcina en el mundo

El cerdo doméstico (*Sus scrofa spp.*) es explotado en todo el mundo en los países cuya religión y cultura lo permiten. Según los datos para 2017 de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Iberoamericana de la Porcicultura (OIPORC) como se muestra en la Tabla 1, los cinco primeros productores de carne de cerdo en el mundo, en su orden, son:

Tabla 1. Cinco primeras regiones del mundo productoras de carne de cerdo

Región	Participación mundial %
China	49.4
Unión europea	21.8
Estados Unidos	9.9
Brasil	3.1
Rusia	2.2

Fuente: FAOSTAT (2017)

China es el país que más carne de cerdo demanda; a pesar de ser el mayor productor en el mundo, su nivel de consumo es tan alto que debe importar carne de cerdo para abastecer su mercado interno, comprándole carne a México, Canadá, Chile y la Unión Europea, entre otros (Dane, 2012)

El 81,2 % de la producción mundial de carne es consumida en cuatro regiones principalmente: China, Unión Europea, Federación de Rusia y Estados Unidos, quienes al igual que China, a pesar de ser grandes productores, requieren importar el producto para abastecer su mercado interno (FAO, 2012)

La producción mundial de carne de cerdo creció a una tasa promedio anual de 1.6 por ciento durante el periodo 2007-2016. Se espera que la producción para los años venideros se ubique en un máximo histórico de 111.0 millones de toneladas, lo que representa un incremento de 2.6 por ciento. (USDA, 2017)

China siendo el mayor productor mundial participó con 53.8 millones de toneladas en 2017, a pesar de la reducción de los apoyos gubernamentales y de las medidas ambientales más rigurosas en las provincias costeras para incentivar la reubicación de las operaciones de granjas porcinas hacia otras regiones donde el valor de la tierra es menor. Asimismo, el incremento en el precio de la carne de cerdo en ese país estimuló el crecimiento de la piara (se prevé que ésta registre un crecimiento mayor al 1.0% durante 2017). El crecimiento en la producción en China reportó mayor al crecimiento del consumo (3.3 por ciento), por lo que se estima que sus importaciones presenten una reducción anual de alrededor de 8.0%. (USDA-FAS. 2016).

Para la Unión Europea tiene una producción, que se ubicaría en 23.4 millones de toneladas, además en los últimos tiempos se ha visto la recuperación de los precios que se ha reflejado en la mejoría en las utilidades, además de la abundante disponibilidad de forrajes para alimentar la piara. Debido a la saturación del mercado doméstico y la fuerte dependencia del mercado en China, los productores europeos están en la busca de nuevos mercados. Cabe resaltar que en 2016 la producción de carne de cerdo en esta región alcanzó su nivel máximo histórico. Lo anterior, impulsado por una expansión en el número de vientres, combinado con mayor productividad. Así, el número de lechones aumentó principalmente en España, Dinamarca y Alemania. Destaca que las unidades de producción porcina tienden a ser de mayor escala y especialización. (USDA-FAS. 2016)

1..1.2 La producción porcina en Colombia

Vale la pena mencionar a partir del 2017, en Colombia, el beneficio de porcinos registró un nuevo récord histórico con más de 4 millones cien mil cabezas; y gracias al incremento en

productividad en granja y peso de los cerdos, la producción aumentó a razón del 4,2%, equivalente a 371 mil toneladas. (PORKCOLOMBIA, 2017).

1.2 Importancia de la reproducción en porcinos

Según las últimas estimaciones, en el mundo se realizan unos 19 millones de inseminaciones, de las cuales casi la totalidad (99%) se realiza con semen refrigera a 15-20°C. De estas inseminaciones más del 85% se realiza el mismo día de recogida o al día siguiente. Entre los factores que favorecen el desarrollo de esta técnica se encuentran las ventajas en la diseminación del material genético mejorado del verraco; los resultados obtenidos con esta técnica igualan, incluso mejoran, los obtenidos en sistemas con monta natural (Rueda, 2011).

La conservación a largo plazo del semen es económicamente importante y altamente deseable para mantener y conservar germoplasma, preservar la diversidad genética y mejorar la eficiencia reproductiva de los animales (Carpio et al., 2008); sin embargo, la utilización práctica de semen congelado de verraco es aún reducida. Su uso se ha limitado principalmente por la baja supervivencia espermática (30-40%) y a una fertilidad menor, comparadas con lo que se ha obtenido con la utilización de semen fresco (Córdova et al., 2006). El semen congelado de verraco ha sido utilizado principalmente para la introducción y mejoramiento genérico de núcleos de selección, y no tanto para el servicio de cerdas en las unidades de producción comerciales. Esto se debe principalmente a que los resultados de fertilidad son más bajos que los obtenidos con semen fresco o monta natural (Carpio et al., 2008).

1.3 Congelación de semen porcino.

El uso de semen porcino procesado se limita a la introducción de nuevo material genético de alto valor para inseminar cerdas puras en las granjas de selección, o bien se asocia a labores de investigación; este semen puede ser utilizado tanto refrigerado como criopreservado (Gadea, J. 2004).

La congelación de semen de cerdo permite conservar a los espermatozoides por un período de tiempo indefinido si es mantenido en nitrógeno líquido a -196°C (Cosme, 2005) temperatura en la que se detiene el metabolismo celular, y mantiene indefinidamente el

estado celular y la capacidad fecundante de los espermias una vez descongelados (Córdova et al., 2005; Mercado, 2011).

Los procedimientos de congelación y descongelación producen daños que disminuyen la capacidad fecundante de la célula espermática, debido a que hay una alta sensibilidad de los espermatozoides de cerdo al shock térmico y al desbalance colesterol/fosfolípidos de la membrana espermática que se desestabiliza por el proceso de congelación, afectando la homeostasis del calcio, y la integridad del acrosoma y del ADN (Mercado, 2011; Yeste, 2015).

Estas serían las condiciones de una baja vitalidad y viabilidad espermática en comparación con el semen fresco o refrigerado por consecuencia se data una reducida utilización del semen congelado de cerdo en la IA (Córdova et al., 2005).

Medrano, (2005) reporta que el espermatozoide porcino cuando está expuesto a bajas temperaturas, genera una capacitación espermática con cambios en la permeabilidad debido a modificaciones de la estructura lipídica de la membrana, y la presencia de una osmolaridad inadecuada durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación.

Tal daño celular se debe principalmente a la alta sensibilidad del espermia del cerdo al choque frío y al daño peroxidativo por la composición de su membrana plasmática, que contiene altos niveles de fosfolípidos insaturados y bajos niveles de colesterol (Casas y Flores 2013).

Como resultado, los procedimientos de refrigeración y congelación-descongelación inducen cambios en la membrana espermática que conducen a su desestabilización, con lo que se produce homeostasis cálcica, integridad del acrosoma y trastorno lipídico de la membrana. (Leahy y Gadella 2011; Vadnais y Althouse 2011). Yeste (2015) reportó tasas de parto tras IA con semen congelado entre el 75-80% realizando la inseminación intrauterina profunda y doble inseminación.

Hidalgo (2013), afirman que, en procesamiento del semen porcino, a medida que se reduce la temperatura se produce una modificación específica en la respuesta del calcio y está estrechamente relacionado con las concentraciones de bicarbonato, estos cambios en la fluidez de la membrana lipídica, pueden afectar también al movimiento de Ca^{+2} a través

de la membrana que, aunque esencial para el proceso de capacitación tiene efectos perjudiciales durante la conservación de los espermatozoides.

Ciertamente, elevaciones de los niveles de calcio intracelular parecen tener un efecto de detrimento sobre la motilidad espermática, y el AMPc asociado a la bomba cálcica de la membrana plasmática, en la regulación del contenido de este ion en la célula espermática es posible que la disminución en la motilidad que se observa esté relacionada con la inhabilidad de la membrana espermática dañada para el control de los niveles de calcio en el interior del espermatozoide. (Murase et al., 2007).

1.4. Refrigeración de semen porcino

La conservación y dilución del semen de porcino en el proceso de refrigeración es una posibilidad que tiene la industria para aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del macho.

Actualmente se reporta que alrededor de un 99% de las IA en cerdas, utilizan semen conservado de forma ideal a temperatura de 15 a 20°C por un lapso de 1 a 5 días. Cuando se almacena el semen en temperaturas menores de 14°C se presentan alteraciones de la membrana del espermatozoide disminuyendo en el poder fecundante del mismo. Por otra parte, temperaturas por encima de los 20°C disminuyen enormemente la vida útil del semen. (Alemán, Alfaro y Hurtado, 2007).

Características como volumen total, concentración y movilidad son indicadores utilizados para valorar la calidad del semen y su respuesta a la manipulación, particularmente la movilidad debido a su asociación con el número total de lechones nacidos (Rugeles et al., 2013).

1.5. Diluyentes

Un diluyente se considera aquella solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado preservando las características funcionales de los espermatozoides manteniendo un nivel de fertilidad adecuado (Valencia, 2006).

Para poder conservar los espermatozoides durante periodos prolongados es necesario que se reduzca la actividad metabólica de las células espermáticas mediante la dilución en un medio adecuado y reducción de la temperatura, Gadea (2003); para lograr este

propósito se realizan diversas investigaciones en la fabricación de diluyentes de corta o larga duración, que permitan conservar el semen por algún tiempo sin afectar sus características, sobre todo la fertilidad. También es necesario tomar en cuenta los datos en cuanto a temperatura de conservación se refiere, pues cuando se reduce la temperatura los movimientos de aquellos fosfolípidos que componen la membrana se ven reducidos y se producen separaciones de fases lipídicas, que a su vez repercuten en alteraciones irreversibles de las proteínas presentes en la membrana, por lo tanto, su funcionalidad y la viabilidad celular se ve comprometida (Condoy et al ,2017).

Condoy et al. (2017) aseguran que en el mundo alrededor del 99% de las IA emplean un método de preservación donde la temperatura va desde los 15 a 20 °C, durante 1 a 5 días, conservándose de manera ideal, algunos cambios de temperatura de 1 a 2 °C pueden afectar la calidad espermática, ya que el semen porcino es muy sensible a cambios de temperatura, ya está visto que se comporta de mejor manera a una temperatura de 17°C.

1.6. Componentes de los diluyentes

Glucosa, proporciona energía, y por su valor energético es la más utilizada, también se puede utilizar, fructosa, ribosa o trehalosa sin que los resultados hayan superado a los de la glucosa. Un estudio por Diaz (2006), demuestra que la glucosa es el monosacárido utilizado con mejor resultado para los espermatozoides de cerdo (tabla 2).

TES, HEPES, MOPS, TRIS, son sustancias taponadoras, aunque los más usados actualmente son HEPES y MOPS, pues tienen la capacidad de regular el pH seminal en un amplio rango, reducir el metabolismo energético de los espermatozoides y su mejorar su movilidad. Por otra parte, existen otros componentes, sustancias como bicarbonato y el citrato sódico que poseen capacidad tampón limitada. (Condoy, 2017)

Sales de iones inorgánicos, como el cloruro sódico y potásico, son empleadas como reguladoras de la presión osmótica, pues es conocido que una caída de la misma por debajo de los 200 mOsm representa una reducción significativa de la movilidad espermática (Alemán, 2015) (tabla 2).

Antibióticos, entre ellos se utilizan los aminoglicósidos principalmente gentamicina, neomicina, y la kanamicina en concentraciones próximas a los 200 mg/L. También se está

aplicando una nueva generación de antibióticos (ceftiofur, apramycina, entre otros), sin que existan aún resultados concluyentes sobre su uso (Admin, 2014) (tabla 2).

Tabla 2. Composición de algunos diluyentes de semen porcino utilizados actualmente en inseminación artificial

Ingredientes	BTS	KIEV	MODENA	ZORLESCO	ANDROHEP
Sustrato energético					
Glucosa(anhidra), g/l	37	66	27.50	11.70	--
Glucosa monohidrato, g/L	-	--	--	--	26.00
Sistema tampón					
Citrato sódico, g/L	6	3.75	6.90	11.70	8.00
EDTA (disodio), g/L	1.25	1.25	1.00	1.80	1.20
Cloruro de potasio, g/l	0.75	--	---	--	--
Ácido cítrico, g/l	-	--	2.90	3.80	--
Tris buffer g/l	--	--	5.65	6.50	--
Hepes, g/L	--	--	--	--	--
Estabilización de la membrana					
Cisteina g/l	--	--	--	0.10	--
BSA (fracción V)	--	--	--	--	2.50
Antibióticos					
Neomicina sulfato, g/l	--	--	--	0.10	--
Penicilina G (Na), g/l	0.60	0.60	0.60	--	0.60
Dihidrostreptomina, g/l	1	1	1	--	1

Fuente: Cuenca y Avellaneda, 2017

1.7 Sustancias reactivas de oxígeno.

Todas las células vivas producen, bajo condiciones aeróbicas, sustancias reactivas de oxígeno, las cuales se originan principalmente de funciones metabólicas normales de la misma célula (Brouwers et al., 2005). Son sustancias químicas, que tienen un electrón no apareado, lo que les convierte en altamente reactivas (Hicks, 2001). Para poder alcanzar la estabilidad, estas moléculas sustraen electrones de otras y este proceso provoca daño en las biomoléculas con las que reaccionan, las moléculas por las que tienen afinidad son sobre todo los ácidos poliinsaturados de las membranas plasmáticas, el colesterol, los carbohidratos, los nucleótidos en el ADN y las proteínas (Brouwers et al., 2005).

Dentro de las EROs se destacan principalmente el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($\cdot OH$), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El radical hidroxilo es altamente reactivo y es capaz de reaccionar con casi cualquier componente celular, aunque tienen gran afinidad por la alta cantidad de ácidos poliinsaturados que contiene la membrana de los espermatozoides sobre todo en la especie porcina. Una vez se producen estos radicales se da una serie de reacciones en cadena como la peroxidación lipídica (PL), que causa daño a moléculas de importancia biológica, ya sea por una alteración en su estructura y función, por una aceleración de la proteólisis endógena selectiva o por el incremento en la función enzimática (Zorrilla, 2002).

1.8. Peroxidación lipídica (PL).

Se precisa en el desequilibrio del balance óxido-reductor celular hacia la reducción, en el que incide la incapacidad de las defensas antioxidantes del organismo para compensar la cantidad de radicales libres lo que resulta en una proliferación de EROs, en esta situación es en la que se presentan las lesiones celulares. Como se ha mencionado antes, los radicales libres reaccionan preferentemente con los lípidos de la membrana, también reaccionan con proteínas, carbohidratos y ADN, por lo que pueden desencadenar una serie de problemas como disfunción mitocondrial excitotoxicidad y apoptosis si el daño es muy extenso (Hicks et al., 2006).

La iniciación de la PL es favorecida por algún tipo de iniciador, este puede ser cualquier molécula con la capacidad de extraer un átomo de hidrógeno de un radical metileno ($\cdot CH_2$), de esta manera se produce la formación de un radical orgánico y puede ocurrir en cualquier parte de la cadena de ácidos grasos poliinsaturados (Minotti y Aust, 1992; Ryan y Aust, 1992). Se ha considerado como uno de los principales iniciadores de esta cadena al radical hidroxilo que es el más reactivo, que se genera a partir de la reacción de Haber-Weiss, en la que participan el O_2^- y el Fe^{+3} (Minotti y Aust, 1987).

La segunda parte en esta cadena se conoce como la fase de propagación, en la que en primer lugar el radical orgánico sufre reacciones de combinaciones y adición con el oxígeno generando radicales peróxido orgánicos (ROO). La propagación se produce debido a la capacidad que los ROO poseen para unirse a un átomo de hidrógeno desde un enlace alílico de una molécula lipídica vecina, formando así hidroperóxidos (ROOH); a la fase de propagación le sucede la fase de terminación, en la cual se combinan los productos

iniciales de la peroxidación (radicales lipídicos) para dar origen a compuestos no radicales como en el malondialdehído (Minotti y Aust, 1987).

Se ha mencionado que es en los lípidos donde se provoca el mayor daño, por lo tanto, las estructuras de la membrana del espermatozoide porcino son muy susceptibles de sufrirlo, por tener mayor presencia de dichas moléculas en su estructura en comparación a otras especies (Hyang et al., 2000; Venereo 2002; Córdova et al., 2009). La PL se inicia cuando los EROs atacan un ácido graso poliinsaturado (AGPI) quitándole un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para poder formar un radical libre ácido graso, esta molécula incorpora rápidamente oxígeno y se transforma en radical libre (peroxilo ácido graso), que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros AGPI lo que inicia nuevas reacciones. Este mecanismo se facilita si existe presencia de iones de metales en transición y por la presencia de los dobles enlaces existentes en los AGPI. Por tanto, los productos finales de la PL son lípidos peroxidados, que al degradarse forman nuevos radicales libres y una serie de compuestos que son tóxicos para la célula, como son por ejemplo los aldehídos, entre ellos 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y el de principal interés el MDA (malondialdehído). Cuando los AGPI forman parte de las membranas celulares o intracelulares el daño en su estructura es más severo, puesto que se altera su fluidez, permeabilidad y metabolismo, lo que puede provocar la muerte celular (Cárdenas & Pedraza, 2006).

Los factores que intervienen en la intensidad con la que se presenta la PL son variados: por un lado la naturaleza del agente inicializador, la cantidad de AGPI contenidos en la membrana celular y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, la presencia de hierro, el contenido celular de antioxidantes como alfa-tocoferoles y glutatión entre otros y la activación de enzimas que pueden terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx) (Cerolini et al., 2001; Venereo, 2002).

1.9. Efecto sobre las proteínas.

Debido a que las reacciones en el caso de las proteínas son mucho más lentas, el daño provocado por las EROs no es tan severo como en el caso de los lípidos. Cárdenas y Pedraza, (2006) mencionaron que las EROs causan la oxidación de los residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas, lo que puede provocar la pérdida de las funciones enzimáticas, daños en la integridad de proteínas estructurales o alterar la regulación de las vías metabólicas. Las proteínas sufren

daños localizados en los sitios ligados a metales de transición, dichos sitios son especialmente sensibles debido a la facilidad con la que los metales reaccionan con el peróxido de hidrógeno para formar iones de hidroxilo, los que, posteriormente atacan a los aminoácidos adyacentes; dicha oxidación de las proteínas tiene como resultado la formación de peróxidos y carbonilos (Venereo, 2002; Córdova et al., 2009).

Kirchhoff (1998), Blokhina et al. (2003), Cárdenas y Pedraza (2006) indicaron que la reparación de las proteínas solo se limita a los residuos de la metionina, por lo tanto, las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas, evitando así su difusión en la red metabólica o su interacción con otras proteínas.

1.10. Efecto sobre el ADN.

El ADN también es un blanco para las EROs, sobre todo el mitocondrial; debido a su localización se encuentra expuesto a un número elevado de EROs que proceden de la cadena respiratoria, además de tener poca estabilidad debido a la falta de histonas en su estructura (Venereo, 2002; Tamer et al., 2005; Tejerina et al., 2008). Es el daño es provocado al reaccionar las EROs con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. Básicamente, el daño se refiere a que se provoca una fragmentación del ADN, ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina, por lo que se altera la regulación de la transcripción genética. Trisini et al., (2004), Cárdenas y Pedraza (2006) y Chihuailaf et al., (2002), mencionan que los mecanismos de reparación en este caso son menos eficientes como la acción de la SOD en contradicción al concepto que dice que cuando los EROs llegan al núcleo o se producen dentro de él, existen mecanismos de reparación que funcionan de manera eficiente, haciendo una revisión de la secuencia de bases lo que permite localizar los daños ya sea ruptura, entrecruzamiento o eliminación de bases, o en el caso de que el daño sea en un área más grande se realiza la total sustitución del segmento dañado por medio de la nucleasa, para ser reemplazados por la ADN polimerasa I y la ligasa.

1.11. Daño oxidativo sobre los espermatozoides.

Los espermatozoides producen y liberan EROs al medio extracelular, que son en su mayoría producidos por las mitocondrias, y son el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa (Kirchhoff 1998; Álvarez 2006).

La alta concentración de AGPI en la membrana plasmática de los espermatozoides y el pequeño tamaño de su citoplasma favorecen la producción de EROs, las cuales como se ha mencionado antes, perjudican funciones de la célula espermática, de gran importancia desde el punto de vista reproductivo, tales como la movilidad y la vitalidad, con su consecuente pérdida de la capacidad de fusión esperma-ovocito (Saezet et al., 1998; Castillo et al. 2001; Álvarez 2006).

Cummings et al. (1994) y Kumaresan et al. (2009) demostraron que las EROs inducen peroxidación de AGPI esterificados a fosfolípidos de membrana, lo cual produce alteraciones en la permeabilidad de la membrana, es decir, provoca la aparición de puntos (orificios), lo que conduce a una pérdida de la vitalidad, movilidad y capacidad fecundante del espermatozoide. La producción de energía (ATP) también se ve afectada por las EROs, al inactivar algunas enzimas glucolíticas que tienen como consecuencia la pérdida de movilidad por la falta de combustible para que la contracción de los microtúbulos flagelares del espermatozoide sea posible. La disminución de las funciones del espermatozoide durante su conservación se ha relacionado con el aumento en la formación de EROs durante el proceso; el daño provocado en la estructura de la membrana de la mitocondria puede ser uno de los factores de mayor importancia para explicar la pérdida de la fertilidad en semen criopreservado.

El daño que se produce sobre el acrosoma por efecto del estrés oxidativo es causado durante el transporte de los mismos a través del epidídimo, básicamente, por el peróxido de hidrógeno, que inhibe la inducción de la reacción acrosomal., también se ha comentado que el peróxido de hidrógeno daña la integridad del acrosoma, pero no afecta el correcto funcionamiento de la capacidad de movimiento del espermatozoide (Castillo et al., 2001; Álvarez 2006). Se ha señalado que el daño sobre el ADN de los espermatozoides se produce después de la espermiación, durante el viaje de las células maduras junto con las inmaduras desde los túbulos seminíferos, debido a que los espermatozoides inmaduros producen una mayor cantidad de EROs. (Castillo et al., 2001; Álvarez, 2006)

1.12. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que, cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones respecto a los sustratos oxidables, retrasan o anulan la oxidación de dicho sustrato (Faudale et al., 2008).

En el procesamiento de semen se disminuye la concentración de compuestos antioxidantes como alfa-tocoferol, ácido ascórbico, taurina, hipotaurina, entre otros presentes en el plasma en conjunto con los procesos de enfriamiento provocan alteraciones estructurales, reduciendo la permeabilidad selectiva de la membrana espermática; esto induce que se pierdan en el espermatozoide enzimas intracelulares responsables de la metabolización de las EROs, y que sucedan trastornos en el balance iónico, con posibles modificaciones en el metabolismo aeróbico y anaeróbico del glucógeno, comprometiendo todas aquellas funciones celulares energético-dependientes como la movilidad de igual manera por lo expuesto anteriormente se ocasiona pérdida del balance iónico del sodio, el zinc y el calcio, que se acumulan en el espacio intracelular, y del potasio y magnesio que salen masivamente de la célula en detrimento de una adecuada criopreservación del semen porcino (Domínguez et al., 2012).

Se sabe que parte de la reducción en la movilidad y fertilidad espermática asociada con la criopreservación podría ser debido al daño oxidativo por una excesiva e inapropiada formación de EROs, que potenciará el fenómeno de peroxidación lipídica en los espermatozoides funcionales, lo cual da lugar al “envejecimiento prematuro”, que provocará la muerte espermática en corto período de tiempo, que a su vez induciría un estrés funcional que terminará a corto plazo con la muerte de los espermatozoides (Vasco et al., 2007).

Para controlar los efectos de las EROs en la lipoperoxidación que podría ser uno de los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios espermáticos durante la criopreservación, se han venido utilizando antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que actúan mediante diferentes mecanismos, no obstante, las EROs son producidas por todas las células vivas bajo condiciones aeróbicas y en los espermatozoides requieren de este proceso fisiológico para que tenga lugar la capacitación y reacción acrosómica necesarios para la fertilización de los ovocitos (Vasco, et al., 2007; Bathgate, 2011).

Los AGPI son abundantes en la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos, por lo que se tornan muy susceptibles al ataque de los radicales del estrés oxidativo y esto se ve agravado por los mismos procesos de maduración espermática por la cual pierden una gran parte de su citoplasma, y con ello el conjunto de defensas enzimáticas que los protegen de los daños peroxidativos. Buscando reducir los daños por oxidación en el espermatozoide criopreservado se han utilizado algunos elementos como: plasma seminal,

sustancias con actividad similar a la superoxidodismutasa o catalasa, α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión, piruvato, taurina, hipotaurina, y albumina (Henao, 2008; Bathgate, 2011).

Hay dos métodos para la suplementación de los antioxidantes que tienden a utilizarse en el intento de mejorar la calidad de los espermatozoides posdescongelación; la primera es la suplementación dietética añadiendo antioxidantes no enzimáticos en el alimento del verraco, buscando aumentar los niveles de antioxidantes en el plasma seminal y los espermatozoides, que posteriormente irán a proteger al espermatozoides durante los procesos de criopreservación; y el segundo método es la suplementación con antioxidantes directamente a los medios de refrigeración, congelación y descongelación (Bathgate, 2011), como se ha observado con el licopeno extraído de tomate y que ejerce un efecto protector de los principales ácidos grasos (AG) no saturados de la membrana espermática frente a los procesos de lipoperoxidación espermática (Williams, 2013).

Los antioxidantes enzimáticos utilizados en la suplementación de medios de criopreservación son: la superóxido dismutasa (SOD) que neutraliza el anión superóxido y lo convierte en H_2O_2 y oxígeno. El H_2O_2 a partir de esta reacción es atrapado por la catalasa y la peroxidasa, para convertirlos en agua y oxígeno (Bathgate, 2011).

Se han utilizado sustancias antioxidantes como el hidroxitolueno butilado (BHT) que adicionado al medio de dilución espermática, incrementó la movilidad e integridad acrosómica tras un choque por frío a $5^{\circ}C$ y reduce considerablemente la peroxidación lipídica del semen criopreservado, permitiendo un mayor desarrollo embrionario; así también se han adicionado otras sustancias antioxidantes en el medio de enfriamiento, congelación y descongelación como son el α -tocoferol (vitamina E), el trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), glutatión (GSH) y la superóxido dismutasa con resultados satisfactorios (González, 2010; Bathgate, 2011).

Se han probado también antioxidantes naturales tales como tocoferoles, ácido ascórbico, ácido docosahexaenoico y otros aditivos como el extracto de romero, aceite de salvado de arroz, extractos de té verde y algunos flavonoides que a pesar de no ser definidos como antioxidantes, al ser añadidos a los medios de congelación ejercen un efecto protector sobre la membrana plasmática de los espermatozoides, conservando su actividad metabólica, funcionalidad y supervivencia al disminuir el estrés oxidativo, contrarrestan las lesiones y aumentan el sistema de defensa de los espermatozoides contra los

procesos oxidativos producto de la criopreservación espermática (Henao, 2008; Williams, 2013; Yeste, 2015).

Domínguez et al, (2012) demostraron que algunos polisacáridos del gel de sábila poseen propiedades antioxidantes y efectos protectores en células de origen animal. Mientras que Zakošek et al, (2017) reportan que la diálisis del semen y la adición de 200 μ M de α -tocoferol condujeron a una mayor movilidad progresiva, una mayor proporción de espermatozoides morfológicamente normales y un nivel significativamente inferior de espermatozoides reaccionados acrosómicamente en comparación con muestras de semen no dializadas después de 72 horas de almacenamiento.

La adición de 200 μ g / ml de α -tocoferol al diluyente de congelación podría proteger la membrana del espermatozoide del daño oxidativo y mejorar la movilidad de los espermatozoides, así como a reducir tanto la fosforilación de la tirosina y la capacitación espermática (Satorre et al., 2007).

Flores et al, (2018) estudiaron el efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdos a 16°C y afirman que la melatonina a 1,25 mM, tiene efecto antioxidante (días 0 y 1) en semen de cerdo conservado a 16°C. Así mismo, Funahashi et al 2005, afirman que la suplementación con glutatión y cisteína mejoraron la viabilidad y la integridad del semen cerdo en refrigeración con presencia de cisteína a 10°C durante 29 días.

1.13. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la yema de huevo

El uso de la yema de huevo en los diluyentes de semen se informó por primera vez por sus efectos beneficiosos sobre la fertilidad del toro por Phillips en 1939. La yema de huevo se adoptó rápidamente como un agente protector para ayudar a los espermatozoides a resistir el choque frío (Pillet et al, 2011).

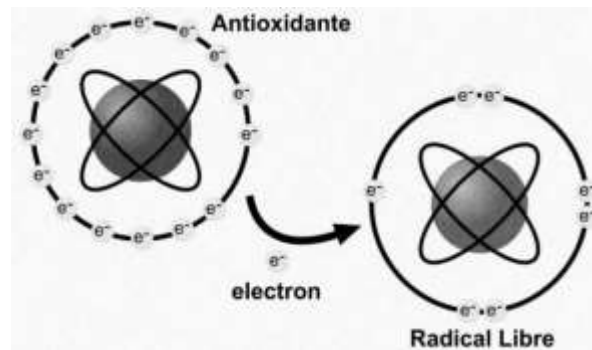
Sin embargo, encontrar moléculas alternativas para reemplazar la yema de huevo es difícil porque el mecanismo preciso por el cual la yema de huevo protege las células espermáticas durante la congelación permanece desconocido. Sin embargo, las propiedades protectoras de la yema de huevo se atribuyen ampliamente a sus lipoproteínas de baja densidad (LDL), los principales componentes de la yema de huevo (2/3 de la materia seca de la yema). De hecho, desde 1974 Pace y Graham, han purificado

yema de huevo utilizando ultracentrifugación y han observado que la fracción de baja densidad (LDL) tiene una acción protectora en los espermatozoides de toro. Muchas investigaciones confirmaron estos resultados en toros (Watson y Martin, 1975; Amirat et al, 2004; Hu et al, 2010), pero también en carneros (Watson y Martin, 1975), verracos (Jiang et al, 2007) y perros (Bencharif et al., 2008). Las LDL se consideran los principales contribuyentes a las propiedades protectoras de la yema de huevo. Son grandes partículas esféricas de aproximadamente 35 nm de diámetro con un núcleo de triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol rodeados por una capa de apoproteínas y fosfolípidos (Hu et al, 2010). Mediante centrifugación, la yema de huevo se puede separar en sus dos fracciones principales, plasma y gránulos. El plasma está compuesto por 85% de LDL y 15% de livetinas y ofrece la ventaja de ser fácil de producir a escala industrial mientras que, en la actualidad, LDL no puede obtenerse industrialmente. De manera similar a la yema de huevo, la composición lipídica del plasma puede cambiar con la dieta de la gallina, pero puede estandarizarse usando huevos del mismo lote, de gallinas alimentadas con una dieta bien conocida, siendo posible garantizar la esterilidad del plasma de yema de huevo mediante irradiación gamma (Pillet et al, 2011).

1.14. Función de los antioxidantes a nivel seminal

Los espermatozoides están equipados con sistemas de protección contra los efectos tóxicos de las EROs, por lo que la función de un antioxidante es ser donador de electrones para evitar una reacción en cadena de oxido-reducción (Hicks et al. 2001) (Figura 1), , además evitan alteraciones de moléculas tales como lípidos, proteínas, ADN, su acción se realiza ya sea en un medio hidrofílico como hidrofóbico, mantienen el equilibrio prooxidante-antioxidante obviamente favoreciendo este último, o simplemente como le mencionan algunos autores (Chihuailaf et al. 2002), son moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones.

Figura 1. Acción del antioxidante frente a los radicales libres. Se muestra la acción que ejercen los antioxidantes, cediendo electrones para estabilizar al radical libre y evitar su reacción con otras moléculas.



Fuente: Cordova, 2010

Chihuailaf et al., (2002) y Castillo et al., (2001) coinciden en mencionar que, para que la protección contra los radicales libres sea lo más eficiente posible, la acción de los antioxidantes plasmáticos e intracelulares debe ser integrados armónicamente. Los radicales libres se distribuyen preferentemente en organelos que, por la intensidad de su actividad metabólica generan un número mayor de radicales libres localizados tanto en membranas como en el citoplasma de las células.

La protección que los antioxidantes proveen a los organismos aerobios, tiene las siguientes funciones:

- Preventiva. Diversas proteínas con núcleos enlazados o coordinados a metales (albumina, metalotioneína y ceruloplasmina, cobre); ferritina, transferrina y mioglobina, así como hierro, que previenen la formación de EROs por encima de los niveles normales del organismo (Chihuailaf et al., 2002; Castillo et al., 2001).
- Reparadora. Como el nombre lo indica son enzimas que reparan o eliminan las biomoléculas que ya han sido dañadas por causa de los radicales libres, como son superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GP), glutatión reductasa y catalasa (Chihuailaf et al., 2002; Aitken y Krausz, 2001 y Castillo et al., 2001).
- Secuestradora. Su acción se basa en atrapar para limitar la exposición de las biomoléculas los iones Fe^{+3} y Cu^{+2} , ya que cuando se encuentran en exceso promueven la generación de radicales libres, las proteínas que ejercen esta función son ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina y carnosina, también se pueden incluir otros como tocoferol, betacaroteno, ácido ascórbico y flavonoides (Chihuailaf et al., 2002; Castillo et al., 2001).
- Un componente adicional de la red de antioxidantes, son las proteínas de almacenamiento y transporte de iones metálicos (Chihuailaf et al., 2002).

1.15. Clasificación de los antioxidantes.

De acuerdo con su sitio de acción se puede realizar una clasificación de los antioxidantes según Cordova, (2009) como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes según su sitio de acción

INTRACELULAR	MEMBRANA	EXTRACELULAR
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafanasa		Albúminas
Glutati6n reducido		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Fuente: Córdoba et al., 2009

Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes según su origen. (Reylli y Burkley, 1990).

ORIGEN	ACCIÓN
1. EXÓGENOS	
Vitamina E	Neutraliza al oxígeno singlete Captura de radicales libres de hidroxilo Captura O ₂ Neutraliza peróxidos
Vitamina	Neutraliza al oxígeno singlete Captura O ₂ Regenera la forma oxidada de la vitamina E
Betacarotenos, Flavonoides y licopenos	Neutraliza al oxígeno singlete
2. ENDÓGENOS	
Enzimáticos	

- 4 Efecto de la suplementación con LDL y antioxidantes en el diluyente para la refrigeración
2 de semen porcino en la integridad y la funcionalidad espermática

Superóxido dismutasa (SOD) Catalasa (CAT)	Cofactor Cobre, sodio y magnesio
Glutación Peroxidasa (GPx)	Hierro
3. NO ENZIMÁTICOS	
Glutación (GSH)	Selenio
Coenzima Q	
Ácido tioctico	Transportadores de metales (transferían y ceruloplasmina)

Según Hicks *et al.*, (2006), la clasificación de los antioxidantes más utilizadas establece las diferencias de acuerdo con su estructura química y función biológica, así pues, se dividen en naturales enzimáticos y no enzimáticos.

1.16. Antioxidantes naturales.

1.16.1. Antioxidantes enzimáticos.

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos, que son regulados de acuerdo a los requerimientos celulares; pueden ser inducidas, inhibidas o activadas por efectos endógenos (Hicks *et al.*, 2006). En el caso de los espermatozoides, en el epidídimo, estos son protegidos básicamente por 5 enzimas (Membrillo *et al.*, 2003):

- glutación peroxidasa (GPx)
- fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa (PHGPx)
- glutación reductasa (GR)
- superóxido dismutasa (SOD)
- catalasa (CAT)

Los antioxidantes enzimáticos, catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hasta los radicales libres, así pues, los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para poder ejercer nuevamente su función, este proceso se lleva a cabo sirviéndose del NADPH producidas en las diferentes rutas metabólicas.

El NADPH, que es muy importante para procesos fisiológicos, tiende a disminuir en presencia prolongada de EROs, pese a que algunos antioxidantes enzimáticos no consumen cofactores (Chihuailaf *et al.*, 2002).

La GPx es una selenoproteína; en las células animales se ubica en la matriz mitocondrial y en el citoplasma de los eritrocitos, lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a lipoperoxido (L-OOH). Esta enzima utiliza como agente reductor el GSH y los productos de esta reacción son el glutatión oxidado (GSSG) y el agua (Cárdenas y Pedraza, 2006). Se ha encontrado en tejido testicular y en espermatozoides de mamíferos (Ursini *et al.*, 1999) y desempeña un papel estructural en la capsula mitocondrial de la parte media y en el flagelo de los espermatozoides (Marín-Guzmán *et al.*, 2000a), cumpliendo de esta forma una función metabólica importante como antioxidante. Según Venereo (2002) y Cárdenas y Pedraza (2006), existen tres formas distintas de esta enzima tanto en su ubicación como en la afinidad hacia su sustrato; GPx-c clásica o forma celular, que se encuentra en casi todas las células y tiene una mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno, GPx -p plasmática o forma extracelular: muestra afinidad por el lipoperoxido y el peróxido de hidrógeno, se sintetiza en las células tubulares del riñón y GPx-PH fosfolípido hidroperóxido: muestra una afinidad específica por los lipoperoxidos, cuya función principal es proteger contra la lipoperoxidación reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo las oxidaciones de lipoproteínas de baja densidad (Marín-Guzmán *et al.*, 2000b; Venereo, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006). Chihuailaf *et al.* (2002) indicaron una cuarta forma de la GPx, que es la gastrointestinal y representa la principal peroxidasa dependiente de GSH en el tracto gastrointestinal.

La catalasa (CAT) es una proteína que cuenta con 4 grupos hemo, se localiza a nivel celular (mitocondrias, peroxisomas, citosol y eritrocitos); bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan las funciones de las peroxidases, mientras que las altas concentraciones de peróxido son catalizadas por esta enzima (Chihuailaf *et al.* 2002; Venereo, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Chihuailaf *et al.* (2002) menciona que la enzima superóxido dismutasa (SOD), que se encuentra presente en células aerobias y fluidos extracelulares y que tiene como función principal la protección contra el anión superóxido, debe su biosíntesis en gran medida a la concentración del sustrato sobre el que actúa (Blokhina *et al.*, 2003).

Blokhina et al. (2003); Cárdenas y Pedraza (2006) mencionan dos isoformas citosólicas de la enzima glutatión S-transferasa (GST), su función principal es catalizar la conjugación de GSH con una gran variedad de compuestos orgánicos. Las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutatión peroxidasa independiente del selenio, y además tiene la capacidad de detoxificar al 4-hidroxinonanal que es un producto de la peroxidación de los lípidos.

La enzima CAT ejerce dos funciones, la primera como catalizadora en la descomposición del peróxido de hidrógeno (proveniente de la disminución del superóxido) en agua y oxígeno, esta función la comparte con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores, la segunda función es peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante catalasa/superóxido dismutasa (CAT/SOD) que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Venereo, 2002).

1.17. Antioxidantes no enzimáticos.

Este grupo de antioxidantes está compuesto por moléculas hidrófobas e hidrófilas que tienen la capacidad de capturar radicales libres y que originan especies químicas que tienen un menor efecto dañino para la integridad celular. El mecanismo de acción de estas moléculas se basa en la donación de un electrón a un radical libre con la finalidad de estabilizarlo; las moléculas hidrófilas se localizan principalmente en el citoplasma, matriz mitocondrial y nuclear y en fluidos extracelulares (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Vitamina A. Por su conformación estructural son excelentes capturando radicales libres, ejercen su protección contra la lipoperoxidación, inducida por el sistema de la xantina oxidasa; también elimina el ion superóxido y radicales peroxilos, y de la misma forma que la vitamina C, se puede comportar como prooxidante, pueden causar estrés oxidativo mediante el incremento de los radicales libres. Aparentemente, cuando la presión del oxígeno es parcialmente alta, esta acción en parte depende de la presencia de otros carotenoides y de la interacción con otros antioxidantes como la vitamina E (Olguin *et al.*, 2004).

Vitamina C. Representa el antioxidante más importante en los líquidos extracelulares, es una sustancia hidrosoluble, reacciona de forma directa en contra de los radicales libres: superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos (Chihuailaf *et al.*, 2002). Esta

vitamina protege contra el daño oxidativo al ADN, proteínas y contra la peroxidación de los espermatozoides. La vitamina C ha tenido efectos protectores sobre la integridad de la membrana de espermatozoides almacenados a 5°C; sin embargo, no mejora significativamente el mantenimiento de la vitalidad espermática (Membrillo *et al.*, 2003).

Vitamina E. El nombre genérico de esta vitamina hace referencia a sus 8 isómeros. Estructuras de tocoferol de los cuales el α - es una vitamina hidrosoluble, principal antioxidante en las membranas celulares junto al γ -tocoferol se le considera esencial para la protección celular. El α -tocoferol posee un grupo OH unido a su porción hidrofóbica, cuyo H se puede remover con facilidad para funcionar como donador de electrones (Oldfield, 2003). La captura de los radicales superóxidos, hidroxilo y peroxilos lipídicos la desarrolla en membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplásmico liso) y detiene la propagación de la lipoperoxidación. Los radicales peroxilos generados durante la PL extraen el H de la molécula del tocoferol, el radical tocoferol resultante es poco reactivo por lo que detiene la reacción en cadena, dicho radical migra hacia la superficie de la membrana y se convierte en un radical libre tocoferoxilo, este se regenera a alfa tocoferol por reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A (Blokhina *et al.* 2003; Córdova *et al.*, 2009). La vitamina E, además de proteger contra la oxidación de los lípidos, protege el ADN, y reduce el nivel de mutación cromosómica en las células espermáticas (Fenech *et al.*, 1997 Córdova *et al.*, 2009).

Glutación. Es un compuesto antioxidante que se encuentra presente en el ambiente que rodea al espermatozoide. Blokhina *et al.* (2003) comunicaron que es un agente de bajo peso molecular que atrapa EROs. Su forma reducida (GSH) es un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y constituye el compuesto tiolico de bajo peso molecular más abundante en las células de los mamíferos. Sus propiedades químicas le permiten ejercer su acción frente a diversos compuestos oxidantes, tales como peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y especies reactivas del carbono; también realiza la función de reducir el radical libre tocoferoxilo y deshidroascorbato y lo reconvierte a su forma original (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olgún *et al.*, 2004).

Ácido úrico. Aunque siempre se le ha considerado como producto final del metabolismo de las purinas, posee funciones antioxidantes tanto intracelularmente como extracelularmente, dicha función se ha comenzado a valorar. Previene de la oxidación de

la vitamina C y forma complejos con los metales Fe y Cu (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006).

1.18. Función antioxidante de los metales.

Algunos minerales están relacionados con la protección contra el daño oxidativo, como es el caso de Zn, Se, Mn, Fe y Cu, a pesar de que su mecanismo de acción es a través de su participación en mecanismos enzimáticos, ya sea como componentes estructurales o activadores, también son capaces de ejercer actividad antioxidante por si solos (Chihuailaf *et al.*, 2002).

En este sentido el Zinc ejerce su actividad de dos maneras, la primera requiere una exposición prolongada a este mineral lo que desencadena en metalotioneínas, en último término, son las que ejercen la acción antioxidante. La otra forma se refiere a un efecto inmediato el cual se desarrolla a través de dos vías, reduciendo la formación de radicales hidroxilos a partir del peróxido de hidrógeno mediante la competencia con los iones Fe^{+2} y Cu^{+} que participan en la reacción de Fenton, o bien disminuyendo la susceptibilidad de los grupos sulfhídricos de las proteínas a la oxidación (Chihuailaf *et al.*, 2002; Córdova *et al.*, 2009).

La deficiencia del Se, se traduce en la disminución de la actividad de la GSH-Px y otras selenoenzimas; lo que deja a la célula expuesta al daño oxidativo de los EROs (Córdova *et al.*, 2009). De igual forma, las deficiencias de este mineral se han relacionado con problemas de fertilidad, donde se ha implicado al estrés oxidativo como un factor y un causante mayor que provoca la alteración de la calidad y viabilidad espermática (Tamer *et al.*, 2005). Se sabe que una dieta suplementada con selenio y vitamina E mejora la calidad espermática, sobre todo en el caso de la especie porcina, ya que la membrana de los espermatozoides de esta especie contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, lo que los predispone a la PL, daño oxidativo a la mitocondria y daño nuclear al ADN (Hyang Song *et al.*, 2000; Sellés, 2001; Cerolini *et al.*, 2001; Córdova *et al.*, 2009).

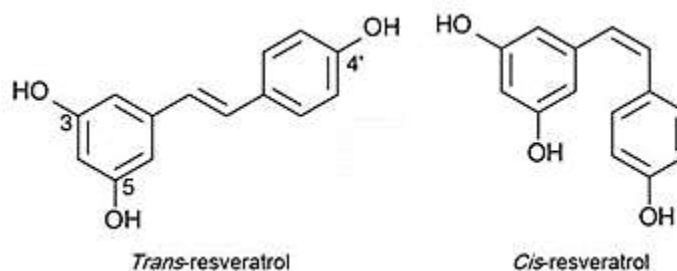
En el caso del Mg, aún no es claro del todo la función que desempeña. Estudios realizados le otorgan propiedades protectoras contra la lipoperoxidación en algunos tejidos, se presume que funciona como un capturador de radicales hidroxilo y superóxido, y también

como promotor de la síntesis de metalotioneínas (Chihuailaf et al., 2002; Olguín et al., 2004; Cádenas y Pedraza, 2006).

1.19. Resveratrol

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina (figura 2) presente en una amplia variedad de plantas como uvas, ciruelas, bayas y cacahuetes en respuesta a varios estímulos ambientales nocivos incluyendo la radiación ultravioleta (UV), las toxinas químicas, los hongos e infecciones bacterianas. La base de esta molécula consiste en dos anillos fenólicos unidos por un doble enlace estireno, el cual es el responsable de las distintas formas isoméricas (Higueruela, 2016; Truong, et al., 2018).

Figura 2. Estructuras químicas del resveratrol



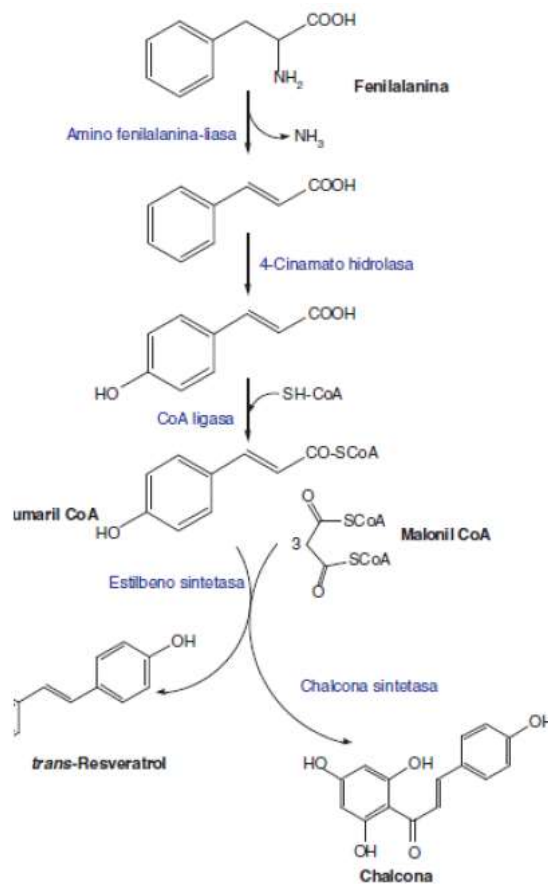
Fuente: Truong, et al., 2018

En la planta, la formación del resveratrol (más concretamente el *trans*-resveratrol) comienza a partir de la biotransformación del aminoácido fenilalanina: en primer lugar, se produce su desaminación, e inmediatamente tiene lugar una hidroxilación del anillo fenólico. El producto sufre luego una conjugación con una molécula de coenzima A, quedando como resultado, una molécula de cumaril-CoA, que se condensa con tres de malonil-CoA, en una reacción catalizada por el enzima resveratrol sintetasa 6 (figura 3). Esta proteína es un enzima perteneciente a la familia de las estilbeno sintetetas, que están codificadas por una familia multigénica con secuencias de homología alta. Cabe destacar que la síntesis de resveratrol disminuye a lo largo de la maduración de la uva, debido a una menor expresión del resveratrol sintetasa y de las estilbeno sintetetas. (Gambini, et al., 2016).

El resveratrol destaca por su actividad antioxidante que ejerce a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, puede aumentar la expresión de enzimas, como es el caso de la inducción de algunos genes por su función como fitoestrógeno, o a través de otras vías

que activan la transcripción de genes antioxidantes como la catalasa o la superóxido dismutasa (SOD). Además, el resveratrol puede neutralizar directamente los agentes oxidantes (*scavenger*) e incluso puede disminuir la actividad de enzimas prooxidantes. (Gambini, et al., 2016). También se ha demostrado que el resveratrol es un eliminador muy eficaz de una variedad de oxidantes, incluidos el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo, el oxígeno singlete, el óxido de nitrógeno y el peroxinitrito (Fig. 4).

Figura 3. Biosíntesis de una molécula de trans-resveratrol.

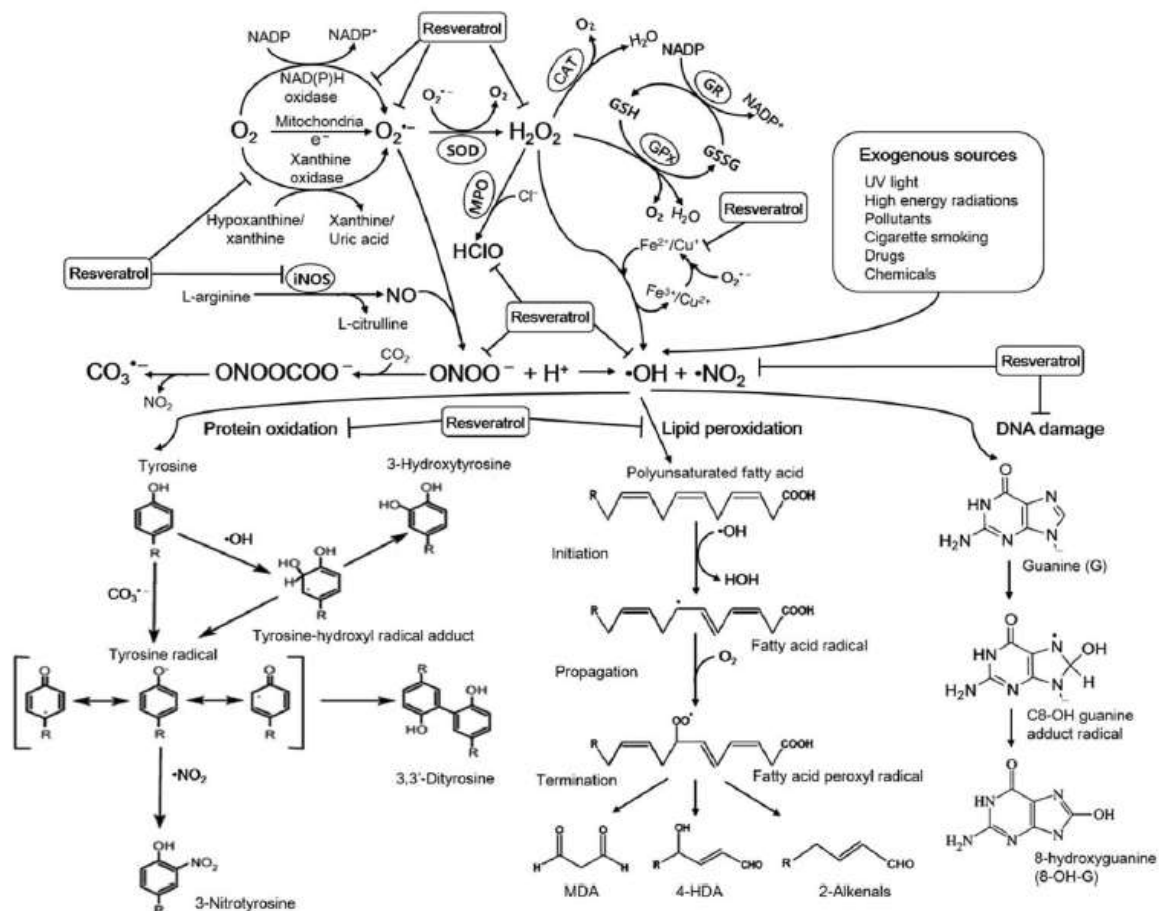


Fuente: Gambini, et al., 2016.

Las propiedades antioxidantes del resveratrol están asociadas a la presencia de anillos fenólicos con tres grupos hidroxilo en las posiciones 3, 4 y 5 y doble enlace conjugado, así como al potencial de deslocalización de electrones en la molécula estructural. El grupo 4-hidroxilo es más esencial para la actividad de eliminación de radicales del resveratrol, pero actúa sinérgicamente con los grupos 3 y 5-hidroxilo (Stivala et al., 2001) Los procesos de

transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia secuencial de electrones por pérdida de protones (SPLET) son los principales mecanismos responsables de la actividad de eliminación de radicales del resveratrol (Fig. 5) (Benayahoum et al., 2014).

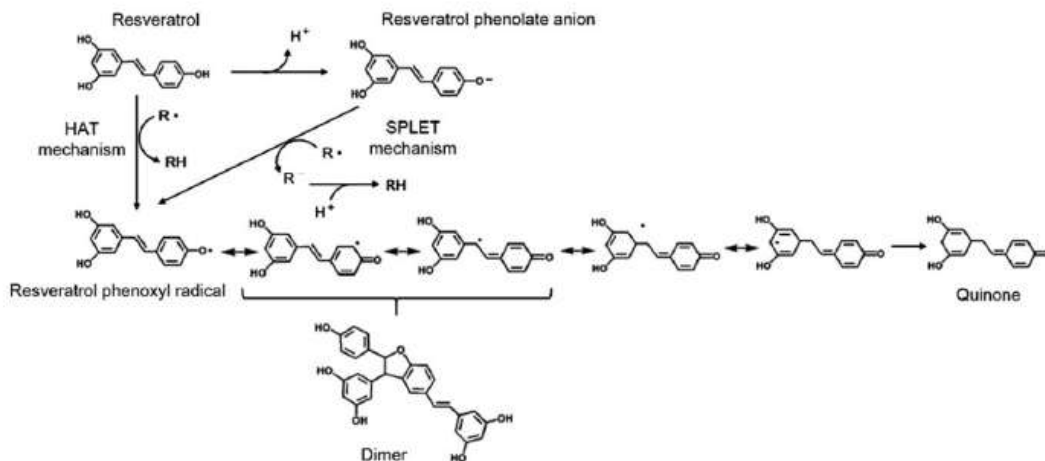
Figura 4. Acción del resveratrol



Fuente: Benayahoum et al., 2014

Las propiedades benéficas de los polifenoles están asociadas a su estructura química que es capaz de interactuar con las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que son los radicales libres más dañinos, mediante dos mecanismos: uno de transferencia de electrones (SET) y el otro de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT). En el mecanismo SET, el antioxidante ($ArOH$) puede donar un electrón al radical peróxido, formando entre los productos un anión peróxido y un catión radical del antioxidante ($ArO^{\bullet+}$); y en el mecanismo HAT, el antioxidante ($ArOH$) atrapa un radical peróxido por donación de átomos de hidrógeno, generando un hidroperóxido y un radical antioxidante más estable químicamente (ArO^{\bullet}). Los mecanismos se describen a continuación (figura 5):

Figura 5. Acción antioxidante del Resveratrol



Fuente: Benayahoum et al., 2014

Es bien sabido que los sustituyentes atractores de electrones, como el grupo fenilo, el grupo para- $CH=CH$ -fenol, aumentan la acidez del átomo de hidrógeno hidroxilo y disminuyen la energía de disociación del enlace fenólico OH , lo que contribuye a la actividad depuradora del resveratrol. La abstracción de protones del 4- OH produce anión fenolato, que transfiere fácilmente electrones a radicales para formar radicales fenoxilo (Shang et al., 2009). La actividad de eliminación de radicales del resveratrol a través de los mecanismos HAT y SPLET da como resultado la generación de radicales fenoxilo que pueden deslocalizar el electrón no apareado en la molécula completa para producir semiquinonas.

El radical resveratrol que contiene un electrón desapareado en la posición 4 cerca de los grupos hidroxilo 3 y 5 es la forma de resonancia más estable, lo que finalmente conduce a la estructura de resveratrol-quinona (Fabris, et al., 2008). Además, la combinación de semiquinonas intermedias, seguida del reordenamiento tautomérico y el ataque nucleofílico intracelular a la quinona intermedia, produce el dímero de dihidrofurano (Shang, et al., 2009). Utilizando la reacción de Fenton como fuente de radicales $\bullet OH$, se ha demostrado que el resveratrol es un eliminador eficaz de $\bullet OH$ en solución salina tamponada con fosfato (Leonard, et al., 2003). Además, se indicó que el resveratrol elimina los radicales O_2 utilizando el sistema xantina/xantina oxidasa como fuente de radicales O_2 (Leonard, et al., 2003).

Del mismo modo, et al., 2008 informaron que el resveratrol podría neutralizar directamente el O_2 en un sistema no enzimático (superóxido de potasio (KO_2) como fuente de superóxido) (Jia et al., 2008). Más importante aún, el resveratrol exhibió una mayor actividad depuradora cuando se usó xantina/xantina oxidasa para producir O_2 . La diferencia en la capacidad del resveratrol en estos dos sistemas sugiere el hecho de que el resveratrol ejerce propiedades duales que incluyen la actividad de captación de superóxido y la inhibición de la producción de O_2 mediada por la xantina oxidasa (Jia et al., 2008). En el sistema libre de células, el resveratrol tiene una actividad de captación de H_2O_2 , pero es menos eficaz que los compuestos estándar como el hidroxitolueno butilado (BHT), el hidroxianisol butilado (BHA), el α -tocoferol y el trolox (Gulcin et al., 2010).

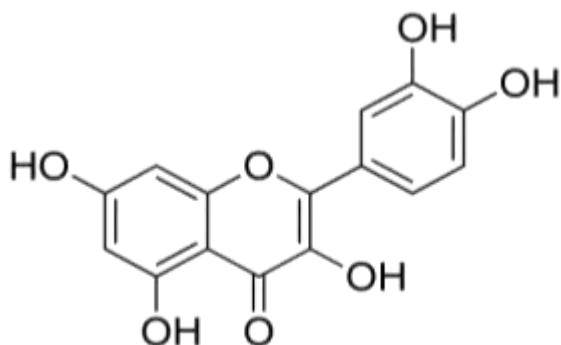
El resveratrol también actúa como eliminador de NO_2 y $NO\cdot$ en un pH ambiental de 10,5 (Mahal, et al., 2006). La capacidad de eliminación de NO del resveratrol es mayor que la de la catequina, la epicatequina, el galato de epigallocatequina, el kaempferol y la miricentina, pero menor que la del trolox, el ácido úrico y el ácido de la cafeína (Sueishi, et al., 2013). Además, el resveratrol elimina directamente el peroxinitrito en el sistema libre de células y, por lo tanto, suprime la nitración de la albúmina sérica bovina con más eficacia que la N-acetil-L-cisteína (Holthoff, et al., 2010).

La presencia de metales de transición como el hierro y el cobre en un sistema puede aumentar la tasa de oxidación a través de la producción de radicales hidroxilos por reacción de Fenton. Por lo tanto, el ion de metal de transición quelado puede perder sus propiedades prooxidantes y, por lo tanto, eliminar la oxidación inducida por metales (Gulcin et al., 2010). Se ha indicado que el resveratrol ejerce una actividad quelante al unirse a los iones metálicos para evitar la generación excesiva de radicales hidroxilos y un mayor proceso oxidativo (Hussein, 2016). Los grupos de función hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del resveratrol son responsables de unir los iones ferrosos. Dos moléculas de resveratrol quelan un ion ferroso para formar un complejo ferroso-resveratrol (Gulcin, 2012). La actividad quelante del resveratrol sobre el ion ferroso fue comparable a la de los quelantes del ion metálico como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), BHA, BHT y α -tocoferol (Gulcin et al., 2010). También puede quelar iones de cobre para prevenir daños asociados al estrés oxidativo. Los grupos hidroxilo espaciales del trans-resveratrol son más favorables para quelar el cobre que los del cis-resveratrol (Truong et al., 2017).

1.20. Quercetina

La quercetina es un flavonoide que abunda en muchas plantas, especialmente la cebolla y el té. La quercetina es una molécula versátil con muchas propiedades farmacológicas que incluyen antioxidantes, neurológicas, antivirales, anticancerígenas, cardiovasculares, antimicrobianas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, protectoras del sistema reproductivo y agentes antiobesidad (Maalik et al., 2014). Una molécula de quercetina contiene cinco grupos hidroxilo (figura 6), cuya presencia determina la actividad biológica del compuesto y la posible cantidad de derivados. La propiedad química más ampliamente investigada de los compuestos fenólicos es su actividad antioxidante (Materska, 2008).

Figura 6. Estructura química de la quercetina



Fuente: Materska, 2008

Los efectos beneficiosos de los flavonoides suelen atribuirse generalmente a su gran capacidad antioxidante. La quercetina y otros flavonoides son potentes captadores de EROs, como el O_2^- , grupos hidroxilo (OH^-) y H_2O_2 , a concentraciones micromolares (Ozgová et al., 2003). También se ha demostrado que los glucurónidos de quercetina tienen propiedades antioxidantes. Pero aparte de estas propiedades como scavenger de ROS, los flavonoides son capaces de inhibir numerosas enzimas generadoras de estas especies reactivas, lo que puede ser aún más importante. Entre éstas se incluyen la xantina oxidasa (XO) y la NAD(P)H oxidasa existente en la membrana celular (Galindo, 2012). También pueden estimular otras enzimas con capacidad antioxidante, como la catalasa y la SOD. Al disminuir las concentraciones celulares de O_2^- a través de estos mecanismos, los flavonoides protegen al NO y aumentan su actividad biológica (Galindo, 2012).

Las acciones de la quercetina sobre el NO son muy complejas y las condiciones del estrés oxidativo influyen fuertemente en su resultado. La quercetina puede ser oxidada por el oxígeno y generar O_2^- , el cual reacciona rápidamente con el NO inactivándolo (López-López et al., 2004), un efecto que no es compartido por los metabolitos glucuronizados y sulfatados de la quercetina (Lodi et al., 2008). También se ha observado que cuando la producción de NO se determina por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica, la quercetina tampoco aumenta el NO en dichas células (Stoclet et al., 1999). Por el contrario, en condiciones de alto nivel de O_2^- y por lo tanto, de acelerado metabolismo de NO, la quercetina puede proteger a dicho NO de diferentes maneras. En primer lugar, en los sistemas libres de células, cuando el O_2^- está incrementado enzimática o químicamente, la quercetina puede captar al O_2^- y proteger así al NO (López-López et al., 2004). En segundo lugar, en el interior de las células, la quercetina puede no sólo captar al O_2^- , sino también inhibir su fuente enzimática, como la XO y la NAD(P)H oxidasa (Busse et al., 1984; Tauber et al., 1984). Los metabolitos glucuronizados y sulfatados pueden prevenir, aunque menos efectivamente que la quercetina, el deterioro de la biodisponibilidad del NO en condiciones de alto estrés oxidativo (Lodi et al., 2008). En tercer lugar, debido a sus propiedades antioxidantes, los flavonoides pueden evitar potencialmente la oxidación de la tetrahidrobiopterina (BH4) y el desacoplamiento de la eNOS (Romero et al., 2009), lo que conduciría a esta enzima hacia la producción de O_2^- en lugar de NO. Finalmente, la quercetina puede inhibir las vías de señalización que conducen a la inducción de la p47phox, una subunidad citosólica de la NAD(P)H oxidasa que tras su fosforilación se trasloca a la membrana y aumenta la actividad de las subunidades catalíticas membranales (NOXs) (Galindo, 2012).

1.21. Determinación de la capacidad antioxidante

Los métodos más comúnmente utilizados para determinar la capacidad antioxidante total difieren en términos de sus principios de ensayo y condiciones experimentales, y se dividen en dos grupos principales: ensayos basados en una sola reacción de transferencia de electrones, monitoreada a través de un cambio de color a medida que se reduce el oxidante, y ensayos basados en una reacción de transferencia de átomos de hidrógeno, donde el antioxidante y el sustrato (sonda) compiten por los radicales libres (Huang et al., 2005).

Los ensayos de reacción de transferencia de electrones incluyen el ensayo de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (ABTS), el ensayo de capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP), el ensayo de reducción de cobre (CUPRAC), entre otros. Los ensayos de reacción de transferencia de átomos de hidrógeno incluyen el ensayo de blanqueo con crocina, el ensayo del parámetro antioxidante atrapante de radicales peroxilo total (TRAP) y el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005). De todos estos métodos, ABTS, DPPH y FRAP se encuentran entre los más utilizados. Los radicales ABTS⁺ y DPPH son ajenos a los sistemas biológicos.

El ensayo ABTS mide la capacidad relativa de los antioxidantes para eliminar el ABTS⁺ generado en una fase acuosa, en comparación con el estándar Trolox. El método generalmente se expresa como capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) (Lucas-Abellán et al., 2011). ABTS, tiene una relevancia limitada para los sistemas biológicos, sin embargo, este método mide la capacidad de los antioxidantes para proteger la fluoresceína (FL) del daño de los radicales libres. Consiste en medir la disminución de la fluorescencia de FL cuando sufre daño oxidativo provocado por una fuente de radical peroxilo (ROO) como es el diclorhidrato de 2,20-azobis(2-amidino-propano) (AAPH) (Lucas-Abellán et al., 2011).

2. Materiales y métodos

2.1 Selección de reproductores

Se utilizaron 5 verracos maduros entre 1 y 4 años de edad, de diferentes líneas genéticas (Pig 410, Landrace, Pietran) con fertilidad probada en campo, mantenidos en semi estabulación, alojados en corrales de 6m², con disponibilidad de agua a voluntad y con alimento balanceado nutricionalmente para reproductores, ubicados en el municipio de Rionegro departamento de Antioquia.

El proyecto fue aprobado ante el comité de Ética de la facultad de ciencias agrarias del Politécnico Jaime Isaza Cadavid, consignado en el aval con radicado No 21414401 – 202001006590 con fecha del 25 de diciembre de 2020

2.2 Recolección y procesamiento de semen

El protocolo a utilizar fue el propuesto por Peña et al., (2006). Se recogió la segunda fracción del semen eyaculado (rica en espermatozoides) hasta terminar su eyaculación, obteniéndose por el método manual (mano enguantada) y recibido en un recipiente termo aislado con filtro de tela no tejida.

Los eyaculados para ser incluidos en el trabajo tenían un mínimo de 70% de espermatozoides con movilidad individual (Saravia, et al., 2005), evaluado en el laboratorio de reproducción animal de la Universidad Nacional en la estación agraria de San Pablo

La concentración, fue estimada por medio del sistema CASA. El semen recolectado fue transportado en una nevera de termo regulada a 15°C hasta el Laboratorio de Reproducción Animal del Universidad Nacional.

Luego de llegar el semen al Laboratorio de Reproducción Animal, la movilidad individual fue estimada posterior a la dilución en diluyente comercial MRA, la muestra se precalentó a 37°C para su evaluación de movilidad por medio del software CASA (Hamilton Thorne Semen Analyser, HTM-IVOS versión 12.3, Hamilton Thorne Research, Massachusetts, USA), comprobando que no se afectó su movilidad inicial atemperado mediante una placa térmica a 37°C, y el software configurado en la opción CERDO, para muestras de semen con una concentración de 2×10^6 células/mL, y 5 campos de lectura o 500 espermatozoides.

El semen se diluyó hasta llevar a una concentración de 60 millones de espermatozoides basado en el protocolo establecido por Hernández et al., 2008 ajustado mediante la siguiente formula: $Concentracion1 \times Volumen1 = Concentracion2 \times Volumen2$; donde la concentracion1 fue la lectura del semen en fresco, el volumen1 fue 50ml, volumen2 es la cantidad de diluyente a adicionar y la concentración2 60millones por ml, garantizando una temperatura a 20°C posteriormente se empacó en tubos cónicos de 50 ml (Saravia, et al., 2005; Gadea, et al., 2005; Matás, et al., 2007; Eriksson, & Rodriguez-Martinez, 2000).

Una vez obtenido el semen diluido a la concentración ya mencionada, se procede a dividir en 8 alícuotas que corresponden a los tratamientos (control, quercetina a concentraciones de 10uM, 30uM, 50uM y resveratrol a concentraciones de 10uM, 30uM, 50uM y ldl 6% v/v), a cada uno de los tratamientos para la evaluación de la cinética se realizaron lecturas cada 24 horas durante 5 días, para cada uno de los reproductores. Además, se realizaron las evaluaciones mediante citometría de flujo para cada uno de los tratamientos por triplicado para cada lectura efectuada en los días 1 y 5 de refrigeración.

2.3. Preparación de los diluyentes

Para la suplementación con LDL se procedió a suplementar el diluyente mediante yema de huevos comerciales frescos que se separó mediante un papel absorbente para eliminar residuos de la membrana vitelina y las chalazas. Se rompió la membrana vitelina y se recogió la yema (Hu et al., 2006)

2.3.1. Obtención de las fracciones solubles e insolubles de la yema de huevo

Se realizó una mezcla de yema de huevo en agua ultrapura a una dilución 1:3 y luego se centrifugo a 10,000 x g durante 45 min a 4°C. Para la fracción soluble, el sobrenadante se centrifugo nuevamente en las mismas condiciones para la eliminación completa de los gránulos. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación a 10.000 xg a 4°C durante 45 min y se resuspendió a volumen inicial para su posterior utilización.

2.3.2. Obtención de LDL y suplementación en el diluyente

El residuo flotante, rico en LDL, se recolectó para ser dividido en alícuotas y se suplementó en fresco. Para los tratamientos que incluían LDL se utilizaron preparaciones de LDL al 6% (v/v) en diluyente comercial, para las evaluaciones de cinética espermática, estado redox y actividad mitocondrial.

2.4 Suplementación del diluyente con antioxidantes

A cada alícuota de semen se suplementó con el diluyente MRA[®] y a una alícuota de cada reproductor, se le añadió 10, 30 y 50 µM de quercetina, en 5 ml de semen diluido y para la suplementación con resveratrol 10, 30 y 50 µM a en 5 ml. La alícuota no suplementada se utilizó como control.

Estas muestras se almacenaron en recipientes de plástico cerrados a una temperatura de 15–17°C durante 96 h (día 5) . Para reducir la formación de grumos de esperma durante el almacenamiento, las muestras de semen fueron ligeramente agitadas (Rodríguez-Gil y Rigau, 1995).

Las variables evaluadas para el primer objetivo son: Movilidad y cinética espermática, para el segundo objetivo: Integridad y funcionalidad mediante el test HOS junto con las evaluaciones de capacidad antioxidante (EROS, ABTS; FRAP) y para el tercer objetivo: vialidad espermática, peroxidación lipídica de la membrana y potencial de membrana mitocondrial.

Para dar cumplimiento al objetivo específico 1 “Efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino para la evaluación de la movilidad y la cinética espermática”, se realizaron las siguientes evaluaciones.

2.5 Movilidad espermática y cinética de movimiento.

Las evaluaciones de movilidad se realizaron objetivamente mediante un sistema de análisis espermático computarizado (CASA) y utilizando un microscopio de contraste de fases. La captura de las imágenes fue mediante una cámara de video (Basler Vison Technologies A 312f, Alemania), operando a 25 imágenes por segundo (25Hz). Cada secuencia individual de esperma fue identificada dentro de 25 imágenes de video secuencial (correspondiendo a 1 segundo de movimiento). El radio de búsqueda fue 11'49 mm, y los espermatozoides con una velocidad media menor a 10 $\mu\text{m/s}$ son considerados inmóviles. Según el protocolo descrito por Hernández et al., (2008), el semen refrigerado y diluido fue diluido en MRA para lograr una concentración de 60×10^6 espermatozoides/mL. Para cada evaluación se utilizó 5 μL de muestra puestos en una cámara leja previamente calentada a 39°C en una placa térmica (HT400, Minitüb; Tiefenbach, Alemania).

Para cada muestra de semen, se analizaron un mínimo de 5 campos con al menos 100 espermatozoides por campo. Antes del análisis de los campos, se procedió a identificar y registrar la trayectoria de cada espermatozoide con la finalidad de eliminar falsas capturas (detritos) y disminuir el riesgo de trayectorias confusas. Se registró los siguientes parámetros de movilidad y de la cinética del movimiento espermático:

2.5.1 Parámetro de Movilidad

Porcentaje total de espermatozoides móviles (MT, %), se definió como el número de espermatozoides con una VAP (velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria media) superior a $20 \mu\text{m/s} \times 100$ / número total de espermatozoides evaluados.

Porcentaje total de espermatozoides progresivos (MP, %) se definió como el número de espermatozoides que se mueven activamente, ya sea de manera lineal o en un gran círculo, independiente de la velocidad.

2.5.2 Parámetros de la cinética del movimiento espermático

- a. Velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$): velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria real.
- b. Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$): velocidad media de la cabeza espermática a lo largo de la línea recta que une los puntos de partida y final de la secuencia.
- c. Linealidad (LIN, %): grado de disposición lineal de la trayectoria curvilínea ($VSL/VCL \times 100$).
- d. Rectitud (STR, %), cómo de curvilínea es la trayectoria media ($VSL/VAP \times 100$).
- e. Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm), amplitud de las variaciones de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto a la trayectoria media.
- f. Frecuencia de cruzamientos o batido de la cola (BCF, Hz) son los puntos en los que la trayectoria curvilínea intersecta la trayectoria promedio, y el número de tales intersecciones se denomina frecuencia de cruzamientos.
- g. Velocidad de trayectoria media (VAP, $\mu\text{m/s}$): Se calcula determinando la trayectoria promedio para calcular la velocidad promediada en el tiempo a lo largo de esta trayectoria

Estos parámetros de la cinética del movimiento, que se obtuvieron de cada uno de los espermatozoides móviles a evaluar, fueron utilizados para cada uno de los tratamientos.

Para dar cumplimiento al objetivo específico 2 “Evaluar el efecto de la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino sobre la integridad, la estabilidad y la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides”, se realizaron las siguientes evaluaciones:

2.6 Metodología para la integridad de membrana

La integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides fue evaluada empleando una modificación de la metodología del Test hiposmótico HOST (Castillo et al., 2018). Se utilizó una solución de 100 mosmol/l, compuesta por 2.5% (v/v) de fructosa en 100 ml de agua destilada. Se mezclaron 50 μl de semen en 1000 μl de solución y se incubó durante 30 minutos, los espermatozoides vivos, mantienen su membrana intacta, controlando la entrada y salida de sustancias y ante la presencia de la solución

hiposmótica, absorbe agua e hinchan su cola, enrollándose en forma de globo. Un espermatozoide muerto tiene una membrana desestructurada con zonas rotas que no reacciona y se mantiene recto sin enrollar su cola (Zubair et al., 2015). La lectura se realizó con microscopio de contraste de fase (200x con una lectura de 200 células espermáticas)

2.7. Determinación del estado redox

2.7.1. Determinación de especies reactivas de oxígeno

La determinación del estado redox se realizará mediante la medición de la producción de ERO (Especies Reactivas de Oxígeno) y de la peroxidación lipídica para los diferentes tratamientos. La detección de especies reactivas se realizará por la metodología propuesta por Guthrie y Welch (2006) utilizando la tinción de fluoresceína diacetato -FDA-, donde cada muestra contendrá 30 μ l de 40mM FDA, 240 μ l de solución buffer (pH 7.4), y 30 μ l de semen. Se emplearán condiciones controladas de temperatura a 37°C, pH 7.4, y como referencia el antioxidante Trolox® (Merck). Las lecturas se realizarán mediante un espectrofluorímetro LS 55 (Perkin Elmer), 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 serán expresados como unidades relativas de fluorescencia (URF).

2.7.2. 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 μ l de semen y 990 μ l de la solución del radical ABTS+. Luego de 30 minutos de reacción a 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 μ l de solución buffer y 990 μ l 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 longitud de onda de 732 nm y se comparó contra una curva patrón con Trolox®.

2.7.3. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método FRAP

Es la reducción del hierro férrico (Fe^{+3}) hasta su forma ferrosa (Fe^{+2}). El método FRAP, consiste en la reducción de iones férricos a ferrosos. 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_3 , 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).

Para dar cumplimiento al objetivo específico 3 “Relación entre la suplementación del diluyente para la refrigeración de semen porcino con la peroxidación lipídica y actividad mitocondrial de los espermatozoides”, se realizaron las siguientes evaluaciones:

2.8. Peroxidación lipídica de la membrana plasmática (LPO).

La peroxidación lipídica de la membrana plasmática se determinó mediante la sonda BODIPY 581/591 C11. Para este análisis, se modificó el protocolo descrito por Awda et al., (2019) (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 μM 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 (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 BODIPY 581/591 C11 y PI respectivamente. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

2.9. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{M}$).

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó mediante la sonda específica JC-1. 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 (MitoProbe^{MT}) a una concentración final de 0.4 μM y se incubó a 25°C durante 45 minutos. El $\Delta\psi\text{M}$ 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 de JC-1 se detectó a 530/30 nm. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

2.10. Vitalidad espermática

La vitalidad espermática fue evaluada mediante el kit de viabilidad LIVE/DEAD® Sperm Viability (Invitrogen Inc., Eugene, OR, EE. UU.). Para esta evaluación, se modificó el protocolo descrito por Merino et al., 2017 (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 μ M y 1 mg/mL respectivamente, y se incubó a una temperatura de 37°C durante 20 minutos. La VE 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 SYBR14 y PI respectivamente. Los datos fueron analizados utilizando el software FlowJo versión 7.6.2 (FlowJo, LLC, USA).

2.11 Análisis estadístico.

Para el cálculo del n del estudio se utilizó el procedimiento recomendado por Aguilar-Barojas (2005) para estudios cuya variable principal es de tipo cuantitativo y recomendado cuando se desconoce el total de unidades de observación que la integran o la población es mayor a 10.000, mediante la siguiente formula:

$$n = \frac{Z^2 S^2}{d^2}$$

En donde,

n = tamaño de la muestra

Z = nivel de confianza (para el estudio se empleó un 95% de nivel de confianza, lo cual corresponde a un Z=1.96)

S² = varianza de la población en estudio (que es el cuadrado de la desviación estándar y se obtuvo de estudios previos promediando la desviación estándar de las variables de calidad seminal estudiadas)

D = precisión (error máximo admisible en términos de proporción): para este caso fue de 0.05

Según lo anterior:

$$n = \frac{(1.96)^2 \times (12)^2}{(0.05)^2} = 221$$

En el estudio para la evaluación de cinética espermática se tuvo un n de 600 que se derivó de la inclusión de 5 porcinos x 3 eyaculados x 8 tratamientos x 5 tiempos. (unidad experimental), para la evaluación de integridad de membrana se tuvo un n de 240 que se derivó de la inclusión de 5 porcinos x 3 eyaculados x 8 tratamientos x 2 tiempos. (unidad experimental) y para las variables de especies reactivas de oxígeno, capacidad antioxidante por el método catiónico ABTS, capacidad antioxidante mediante el método FRAP, peroxidación lipídica de la membrana, potencial de membrana mitocondrial, vitalidad espermática se tuvo un n de 240 que se derivó de la inclusión de 5 porcinos x 3 repeticiones x 8 tratamientos x 2 tiempos. (unidad experimental).

Se ajustó un modelo medidas repetidas en el tiempo, para los parámetros de cinética espermática (variable dependiente), integridad de membrana, especies reactivas de oxígeno, capacidad antioxidante por el método catiónico ABTS, capacidad antioxidante mediante el método FRAP, peroxidación lipídica de la membrana, potencial de membrana mitocondrial, vitalidad espermática y se establecieron los tratamientos, control, Q10, Q30, Q50 (Quercetina a concentración de 10, 30 y 50 μ M respectivamente) y R10, R30 y R50 (Resveratrol a concentración de 10, 30 y 50 μ M respectivamente) en los tiempos de refrigeración de 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Dado el uso de pruebas paramétricas, la normalidad de los datos se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk, se realizaron transformaciones arco seno para las variables expresadas de manera porcentual y transformaciones logarítmicas para las demás variables con la finalidad de garantizar la normalidad de los datos, de tal manera, que las comparaciones de medias entre niveles se realizaron con la prueba de Tukey. El nivel de significación utilizado para todas las

evaluaciones fue $P < 0,05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el software SAS versión 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Se incluyó el cálculo un índice de movilidad seminal (SMI) mediante un análisis de componentes principales y un análisis de regresión lineal, con los parámetros de movilidad total (MT), movilidad progresiva (MP), y cinética espermática (VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR y LIN), mediante la siguiente fórmula:

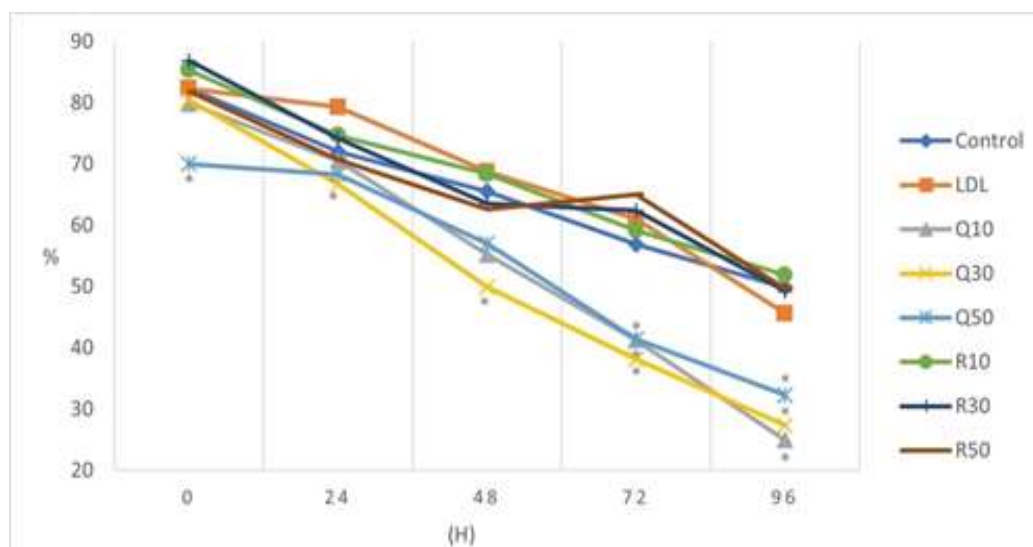
$$\text{SMI} = ((\text{MT} * 0.36) + (\text{MP} * 0.37) + (\text{VAP} * 0.39) + (\text{VSL} * 0.41) + (\text{VCL} * 0.39) + (\text{ALH} * 0.25) + (\text{BCF} * 0.29) + (\text{STR} * 0.21) + (\text{LIN} * 0.20))/100$$

3. Resultados

3.1. Movilidad espermática y cinética de movimiento

En el presente estudio los resultados de calidad en el proceso de refrigeración del semen porcino han sido variables. La movilidad total en los diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) se presentan en la Figura 8, donde no hubo diferencias significativas para MT en la hora 0 entre casi todos los tratamientos, a excepción del tratamiento Q50 donde se evidencia la disminución de la MT, similares tendencias se encuentran en los diferentes tiempos. Es de importancia resaltar en las horas 24, 48 y 72 se presentan diferencias significativas en la suplementación con LDL en tiempo de refrigeración aumentando la movilidad espermática total, presentándose a su vez, una disminución evidente de esta variable en los tratamientos con quercetina, especialmente con una concentración de 30 μM .

Figura 7. Efecto de la suplementación con LDL, resveratrol y quercetina a diferentes concentraciones sobre la Movilidad Total

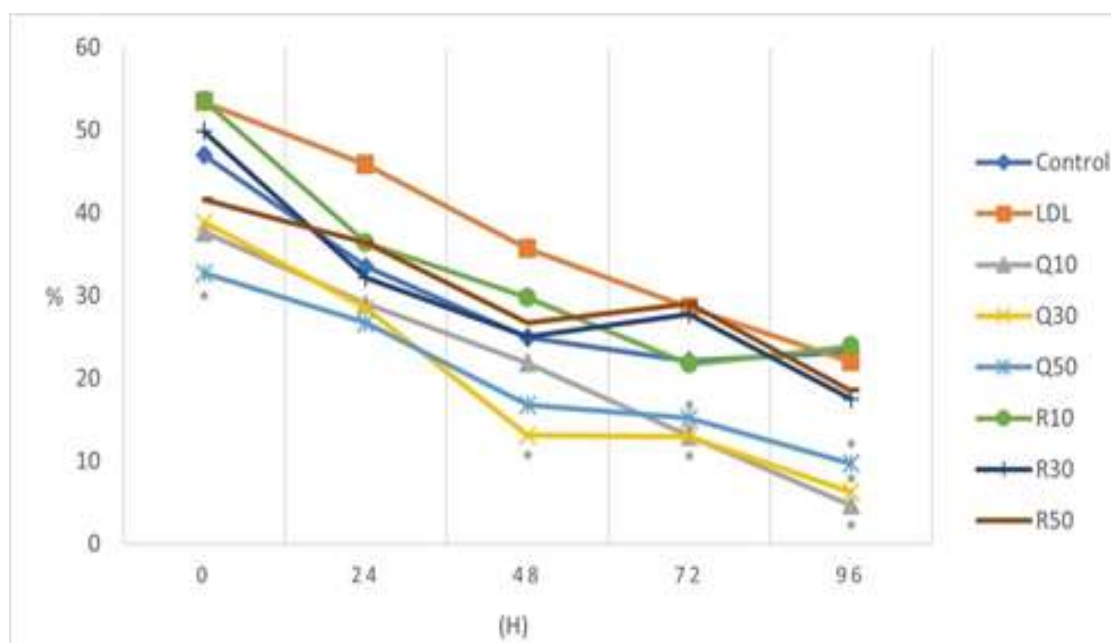


*Indica diferencia estadística en comparación con el tratamiento de control para cada tiempo de refrigeración ($p < 0,05$).

Con respecto a la movilidad progresiva (MP) que se presentan en la Figura 9, se puede observar la tendencia en todos los tiempos del efecto benéfico de la suplementación con

LDL en el diluyente siendo el mejor tratamiento en todas las evaluaciones de MP en las primeras 72 horas; sin embargo, la suplementación de Quercetina en las diferentes concentraciones mostró un efecto deletéreo sobre la MP a las 72 y 96 horas de refrigeración.

Figura 8. Efecto de la suplementación con LDL, resveratrol y quercetina a diferentes concentraciones sobre la movilidad progresiva.



*Indica diferencia estadística en comparación con el tratamiento de control para cada tiempo de refrigeración ($p < 0,05$).

Para los índices de velocidad espermática, velocidad media de la cabeza (VAP), velocidad rectilínea (VSL) y velocidad curvilínea (VCL), mostrados en la Tabla 5, se evidencia un aumento de los niveles de la cinética en general con la suplementación de LDL en las 0 y 24 horas; para el parámetro VSL hay una disminución con respecto al control en los tratamientos de Quercetina (30 y 50 μM) a las 24 horas, es de resaltar la disminución generalizada de VSL en la hora 96 h en los diferentes niveles de tratamiento con quercetina.

Tabla 5. Índices de velocidad media de la cabeza, rectilínea y curvilínea espermática.

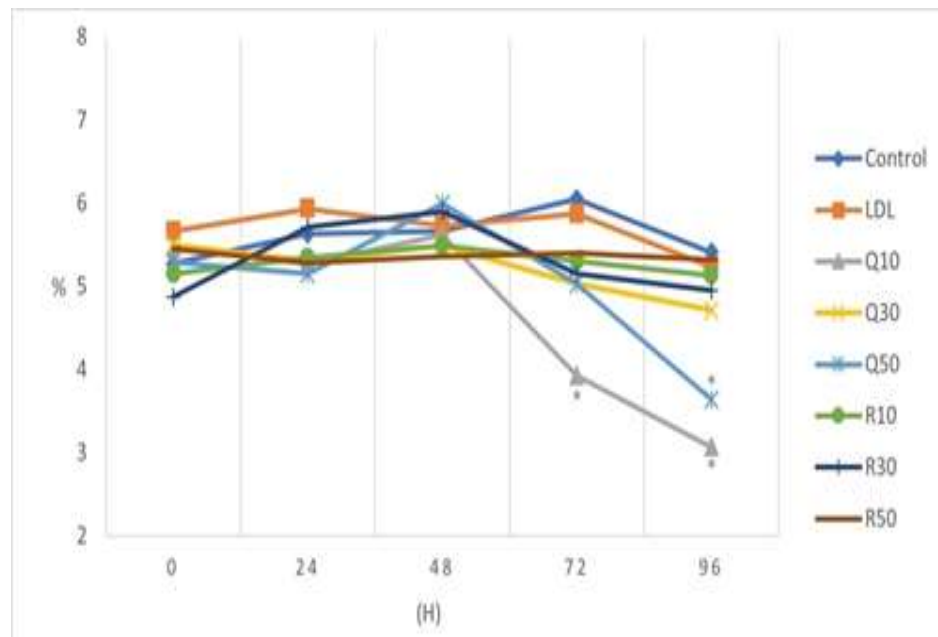
T	VAP	VSL	VCL
---	-----	-----	-----

Control		58,16 ± 4,88 ^{bc}	44,2 ± 3,4 ^a	101,57±7,02 ^b	
LDL		75,47 ± 5,90 ^a	52,91 ±2,96 ^a	128,59±11,41 ^a	
Q10		50,15 ± 2,70 ^{bc}	38,72±8,93 ^a	93,87 ± 4,84 ^b	
Q30	0	52,99 ± 3,17 ^{bc}	39,87± 2,4 ^a	96,17 ± 4,29 ^b	
Q50		47,49 ± 3,54 ^c	35,85 ±2,71 ^a	88,22 ± 4,51 ^b	
R10		58,52 ± 1,93 ^b	44,49 ±1,54 ^a	104,76± 4,22 ^b	
R30		54,67 ±- 2,3 ^{bc}	46,34 ±3,95 ^a	95,22 ± 3,94 ^b	
R50		54,3 ± 2,88 ^{bc}	40,63 ±2,05 ^a	101,11 ± 4,66 ^b	
Control			49,5 ± 2,89 ^b	35,88 ±1,84 ^b	96,12 ± 5,58 ^b
LDL			67,06 ± 4,02 ^a	48,94 ±2,79 ^a	120,48 ± 6,46 ^a
Q10			46,71 ± 2,72 ^b	35,25 ±1,98 ^b	86,16 ± 4,19 ^b
Q30	24	45,73 ± 3,24 ^b	33,22 ±2,18 ^b	90,57 ± 5,39 ^b	
Q50		44,5 ± 2,1 ^b	32,55 ± 1,44 ^b	86,75 ± 4,12 ^b	
R10		51,63 ± 3,58 ^b	37,27 ±2,04 ^b	97,02 ± 6,7 ^b	
R30		49,44 ± 3,29 ^b	35,71 ±2,04 ^b	98,73 ± 5,54 ^b	
R50		50,87 ± 3,2 ^b	37,94 ±2,47 ^b	94,4 ± 4,66 ^b	
Control			46,75± 3,99 ^a	34,69±3,19 ^{abcd}	91,93 ± 6,37 ^b
LDL			57,04 ± 18,4 ^a	42,04 ± 3,02 ^a	108,31 ± 7,75 ^a
Q10			44,01 ± 2,74 ^a	31,73±1,88 ^{bcd}	90,15 ± 5,62 ^b
Q30	48	37,53 ± 2,19 ^a	28,69 ± 1,52 ^{dc}	75,18 ± 6,11 ^c	
Q50		38,31 ± 2,58 ^a	28,31 ± 1,7 ^d	79,83 ± 4,73 ^{bc}	
R10		46,46 ± 2,61 ^a	34,8±1,74 ^{abcd}	90,71 ± 4,5 ^b	
R30		48,51 ± 4,21 ^a	37,37 ± 3,8 ^{ab}	91,63 ± 5,57 ^b	
R50		46,75 ± 2,94 ^a	35,99 ± 2,19 ^{abc}	87,03 ± 5,05 ^{bc}	
Control			47,25 ± 3,66 ^{ab}	34,01 ± 2,15 ^a	89,99 ± 7,77 ^{ab}
LDL			52,34 ± 7,03 ^{ab}	38,64 ± 5,13 ^a	97,43 ± 12,48 ^a
Q10			37,75 ± 4,4 ^b	29,37 ± 3,41 ^a	71,96 ± 8,55 ^b
Q30	72	38,51 ± 4,83 ^b	28,38 ± 3,41 ^a	75,53 ± 10,1 ^b	
Q50		40,54 ± 5,51 ^{ab}	47,37 ±18,54 ^a	81,88±11,23 ^{ab}	
R10		43,16 ± 3,3 ^{ab}	32,07 ± 2,67 ^a	85,83 ± 5,93 ^{ab}	
R30		58,78 ± 15,13 ^a	33,9 ± 3,27 ^a	86,77 ± 9,77 ^{ab}	
R50		49,07 ± 4,77 ^{ab}	35,48 ± 2,87 ^a	96,31 ± 9,06 ^a	
Control			47,66 ± 4,58 ^{ab}	36,67 ± 3,97 ^a	89,82 ± 6,23 ^{ab}
LDL			51,22 ± 8,51 ^a	36,08±5,49 ^{ab}	101,31±15,49 ^a
Q10			29,81 ± 4,91 ^c	21,69 ±3,47 ^d	60,82 ± 10,51 ^c
Q30	96	33,7 ± 4,71 ^c	23,81±3,39 ^{dc}	70,37±10,68 ^{bc}	
Q50		31,33 ± 4,68 ^c	22,87 ± 3,58 ^{dc}	67 ± 9,88 ^c	
R10		45,1 ± 4,22 ^{ab}	33,72 ±3,35 ^{ab}	90,33 ± 6,9 ^{ab}	
R30		38,27 ± 4,52 ^{bc}	28,55±3,52 ^{bdc}	75,84 ± 8,1 ^{bc}	
R50		39,63 ± 5,22 ^{bc}	29,63±3,87 ^{abc}	79,89±10,02 ^{bc}	

T: Tiempo (horas) VAP: velocidad media de la cabeza VSL: velocidad rectilínea VCL: velocidad curvilínea

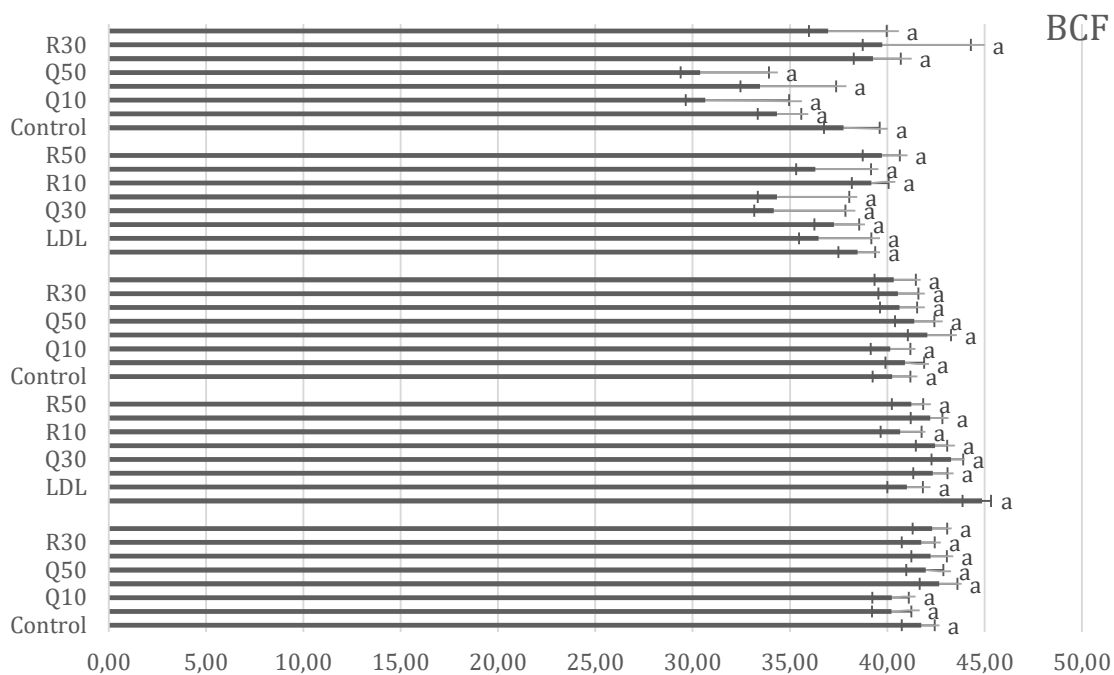
En el parámetro amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) en cada uno de los tiempos evaluados (Figura 10) se mantiene la tendencia del efecto favorecedor de la suplementación con LDL en el diluyente en el proceso de refrigeración de semen porcino, y es de resaltar que en el último día de evaluación (92h) se evidenció un efecto deletéreo con la suplementación de los diferentes niveles de quercetina.

Figura 9. Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH)



Indica diferencia estadística en comparación con el tratamiento de control para cada tiempo de refrigeración ($p < 0,05$).

En la frecuencia del batido de la cola (BCF) no se reportan diferencias significativas en ninguno de los niveles de suplementación con LDL, Quercetina y Resveratrol con respecto al control en todos los tiempos como se puede evidenciar en la figura 11.

Figura 10. Índice de BCF

Nota: Las líneas horizontales correspondientes a cada barra hacen referencia a la media \pm error estándar.

En relación de los índices de rectitud (STR) y Linealidad (LIN) que se muestra en la tabla 6 se observa de manera unificada en cada uno de los tiempos en los diferentes tratamientos que no hay diferencia significativa en estos parámetros ante la suplementación de las moléculas en estudio en la refrigeración de semen porcino.

Tabla 6. Resultado de rectitud y linealidad.

Tratamiento	Hora	STR	LIN
Control	0	76,80 \pm 2,16 ^a	46,53 \pm 2,36 ^a
LDL		73,33 \pm 3,05 ^a	46,93 \pm 3,34 ^a
Q10		75,00 \pm 1,58 ^a	42,13 \pm 1,58 ^a
Q30		76,40 \pm 0,89 ^a	43,20 \pm 1,21 ^a
Q50		76,27 \pm 1,03 ^a	41,87 \pm 1,39 ^a
R10		76,47 \pm 1,69 ^a	44,67 \pm 1,85 ^a
R30		77,87 \pm 1,52 ^a	46,33 \pm 1,76 ^a
R50		73,93 \pm 2,66 ^a	43,33 \pm 1,39 ^a
Control	24	73,80 \pm 1,73 ^a	40,53 \pm 1,54 ^a
LDL		73,67 \pm 1,57 ^a	42,13 \pm 2,27 ^a
Q10		76,73 \pm 1,48 ^a	43,33 \pm 2,17 ^a
Q30		73,87 \pm 1,81 ^a	38,20 \pm 1,53 ^a

7 Efecto de la suplementación con LDL y antioxidantes en el diluyente para la refrigeración
 0 de semen porcino en la integridad y la funcionalidad espermática

Q50		75,93 ± 1,52 ^a	41,00 ± 1,42 ^a
R10		74,33 ± 2,39 ^a	41,93 ± 2,25 ^a
R30		72,87 ± 1,48 ^a	38,47 ± 1,32 ^a
R50		75,73 ± 1,48 ^a	43,00 ± 1,96 ^a
Control		74,73 ± 1,77 ^a	43,53 ± 3,62 ^a
LDL		75,33 ± 1,79 ^a	42,00 ± 2,09 ^a
Q10		74,00 ± 2,21 ^a	39,60 ± 2,73 ^a
Q30	48	77,20 ± 1,59 ^a	40,73 ± 2,13 ^a
Q50		76,33 ± 1,28 ^a	39,47 ± 1,39 ^a
R10		75,87 ± 1,38 ^a	42,00 ± 2,27 ^a
R30		76,43 ± 1,80 ^a	42,00 ± 2,70 ^a
R50		77,73 ± 1,14 ^a	43,73 ± 1,74 ^a
Control		75,47 ± 2,82 ^a	45,53 ± 3,86 ^a
LDL		71,87 ± 5,50 ^a	41,40 ± 3,70 ^a
Q10		79,53 ± 2,29 ^a	46,33 ± 3,05 ^a
Q30	72	66,33 ± 7,40 ^a	36,87 ± 4,47 ^a
Q50		65,27 ± 7,16 ^a	36,00 ± 4,59 ^a
R10		75,13 ± 1,95 ^a	40,87 ± 2,23 ^a
R30		72,27 ± 5,66 ^a	41,53 ± 3,93 ^a
R50		75,40 ± 2,20 ^a	41,93 ± 2,54 ^a
Control		78,00 ± 1,88 ^a	45,60 ± 3,54 ^a
LDL		68,00 ± 5,50 ^a	35,00 ± 2,96 ^a
Q10		60,33 ± 8,49 ^a	33,67 ± 5,56 ^a
Q30		63,87 ± 7,28 ^a	34,13 ± 4,55 ^a
Q50	96	65,73 ± 7,31 ^a	35,67 ± 4,50 ^a
R10		76,13 ± 2,66 ^a	40,07 ± 2,53 ^a
R30		71,82 ± 5,59 ^a	38,47 ± 3,07 ^a
R50		71,87 ± 5,84 ^a	39,20 ± 4,28 ^a

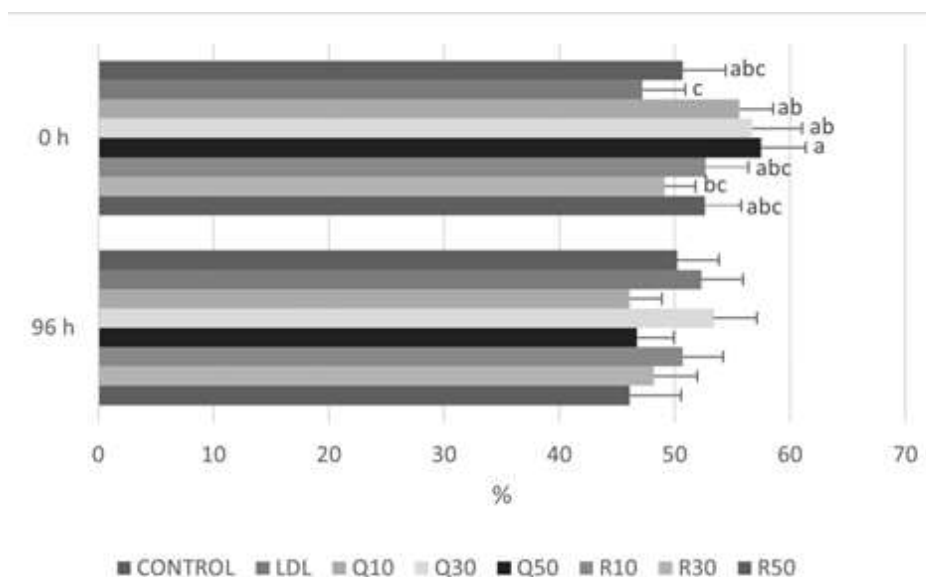
STR: índices de rectitud **LIN:** Linealidad

3.2. Integridad de membrana

La evaluación de la integridad de la membrana espermática no presentó diferencias significativas en el día 5, ya que la mayoría los tratamientos se comportaron de manera similar (figura 12). Sin embargo, es importante resaltar que en el caso de la suplementación

con quercetina a una concentración de 10 μ M en el diluyente para refrigeración de semen porcino, se provocó una disminución en el Test de la integridad de membrana.

Figura 11. Test de integridad de Membrana.

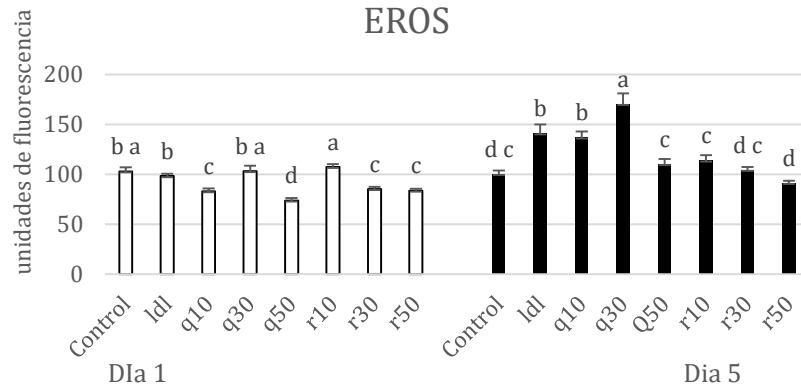


* a-c: Diferentes superíndices indican diferencias entre tratamientos para cada tiempo de refrigeración ($p < 0.05$)

3.3. Especies reactivas de oxígeno

Es posible observar que en el día 1, la suplementación con quercetina a una concentración de 10 μ M y 50 μ M generó una disminución en la producción de EROs, situación similar en la suplementación de resveratrol a concentraciones de 30 y 50 μ M (figura 13). Por otro lado, en el día 5 (figura 13), se observó una disminución significativa de EROs en la suplementación con Resveratrol a 30 y 50 μ M, seguidos de la suplementación de resveratrol a 10 μ M y quercetina 50 μ M ($P \leq 0,05$).

Figura 12. Producción de especies reactivas de oxígeno- EROS

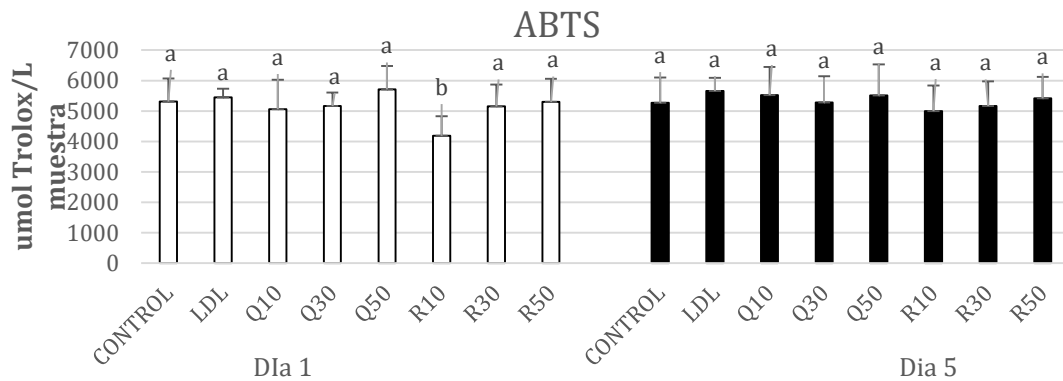


Nota: Las líneas verticales correspondientes a cada barra hacen referencia a la media \pm error estándar.

3.4. Capacidad antioxidante en la suplementación del diluyente por el método del radical catiónico ABTS+.

La actividad antioxidante se determinó por medio del método ABTS, los resultados se muestran en la Figura 14, donde no hay diferencia significativa entre los tratamientos en los dos tiempos (día 1 y día 5) a excepción de una disminución de la actividad antioxidante al día 1 en la suplementación con Resveratrol a una concentración de 10 μ M en el diluyente para refrigeración de semen porcino.

Figura 13. Capacidad antioxidante en suplementación del diluyente por método radical catiónico ABTS+

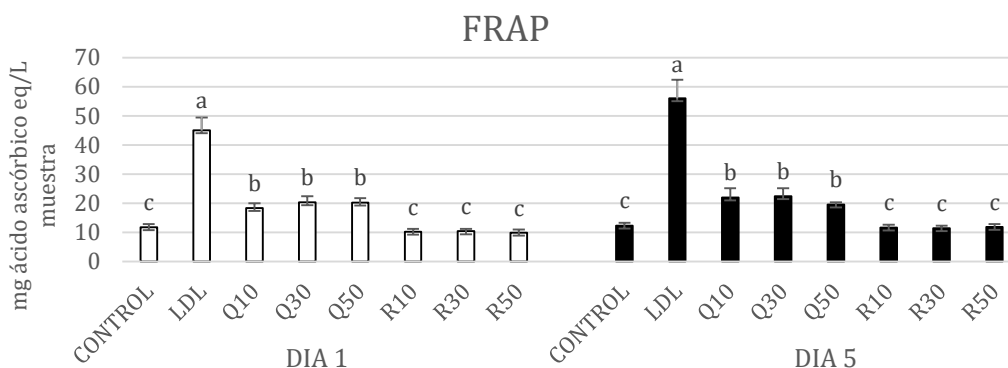


Nota: Las líneas verticales correspondientes a cada barra hacen referencia a la media \pm error estándar.

3.5. Capacidad antioxidante en la suplementación del diluyente por el método FRAP

Para la evaluación de la actividad antioxidante total presente en cada uno de los tratamientos mediante el método FRAP basado en la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} (Figura 15) se evidenció un aumento de la capacidad antioxidante con la suplementación con LDL al diluyente comercial. Por otra parte, se reportan diferencias significativas en los tratamientos con suplementación con quercetina a diferentes concentraciones (10, 30 y 50 μM) en comparación con los otros tratamientos, evidenciando un incremento en la capacidad antioxidante con respecto al control, pero no tan elevado como con la suplementación con LDL.

Figura 14. Capacidad antioxidante de suplementación del diluyente por método FRAP



Nota: Las líneas verticales correspondientes a cada barra hacen referencia a la media \pm error estándar.

3.6. Peroxidación lipídica de la membrana plasmática (LPO).

Los resultados de peroxidación lipídica de la membrana plasmática al día 1 de evaluación (Tabla 7) mediante la técnica Bodipy, indican que en cuanto a los espermatozoides vivos no peroxidados (Q4: PI- BD-) la suplementación con Resveratrol y Quercetina a sus diferentes inclusiones es la causante de la disminución de los valores de los espermatozoides vivos no peroxidados con respecto al tratamiento control.

En cuanto a los espermatozoides muertos no peroxidados y los espermatozoides vivos no peroxidados, es posible evidenciar diferencias significativas, ocasionadas por el aumento

en los valores de poblaciones celulares con todas las suplementaciones de resveratrol y quercetina en el semen de cerdo refrigerado al primer día de evaluación.

Tabla 7. Peroxidación lipídica y viabilidad del semen refrigerado Dia 1

Tratamiento	Q1: PI+BD-	Q2: PI+BD+	Q3: PI-BD+	Q4: PI-BD-
Control	12,47±6,80 ^a	7,38±1,46 ^{bc}	6,57±1,61 ^b	73,55±7,18 ^a
LDL	7,14±2,04 ^b	5,56±2,27 ^c	14,12±4,37 ^{ab}	73,19±7,09 ^a
Q10	5,87±3,09 ^b	15,20±4,68 ^a	14,77±2,89 ^a	64,16±6,3 ^b
Q30	5,41±2,40 ^b	16,12±5,18 ^a	13,20±1,74 ^{ab}	65,27±6,05 ^b
Q50	9,20±5,07 ^{ab}	12,35±2,69 ^{ab}	12,11±2,75 ^{ab}	66,34±6,30 ^b
R10	5,50±2,94 ^b	13,07±4,74 ^a	11,89±2,23 ^{ab}	69,52±7,13 ^{ab}
R30	8,74±4,26 ^{ab}	11,14±2,73 ^{ab}	12,93±2,36 ^{ab}	67,18±5,9 ^b
R50	7,75±3,87 ^{ab}	12,16±3,28 ^{ab}	10,51±2,09 ^{ab}	69,58±6,76 ^{ab}

PI+BD-: Muertos no peroxidados. **PI+BD+:** Muertos peroxidados **PI-BD-:** Vivos no peroxidados **PI-BD+:** Vivos peroxidados

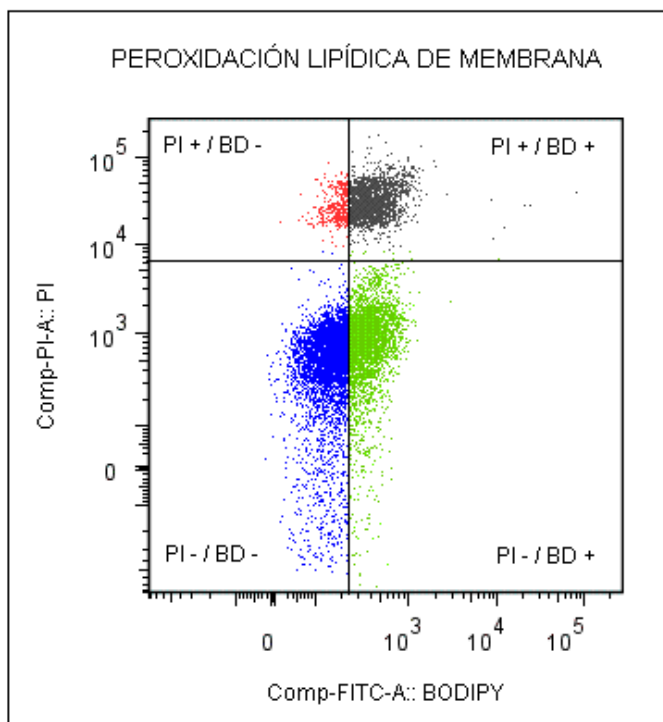
Referente al día 5 de evaluación (Tabla 8), es posible evidenciar una disminución en cuanto a los espermatozoides vivos no peroxidados (PI-BD-) con las suplementaciones de quercetina (10, 50 uM) y Resveratrol (10, 30, 50 uM), sin embargo, es posible observar un aumento de los espermatozoides vivos no peroxidados en la suplementación con LDL con respecto al control. Así mismo, se destaca el aumento de espermatozoides muertos no peroxidados en los tratamientos con suplementación de quercetina y resveratrol, situación opuesta al suplementar con LDL.

Tabla 8. Peroxidación lipídica y viabilidad del semen refrigerado Dia 5

Tratamiento	Q1: PI+ BD-	Q2: PI + BD +	Q3: PI - BD +	Q4: PI - BD -
Control	5,64±2,70 ^{ab}	12,87±4,15 ^b	28,86±4,60 ^{ab}	52,61±4,99 ^b
LDL	2,23±0,4 ^b	11,69±3,68	32,04±3,39 ^{ab}	54,05±6,16 ^a
Q10	5,25±2,40 ^{ab}	18,45±4,82 ^a	38,38±4,82 ^{ab}	37,91±3,77 ^{ab}
Q30	8,28±3,10 ^a	15,19±3,87 ^{ab}	39,05±5,14 ^a	37,50±4,12 ^c
Q50	7,87±3,10 ^a	14,26±4,05 ^b	34,28±5,82 ^{ab}	43,59±4,29 ^{bc}
R10	7,21±3,84 ^a	14,61±3,83 ^{ab}	29,38±6,90 ^{ab}	48,84±5,88 ^{ab}
R30	7,68±4,06 ^a	12,82±3,74 ^b	27,41±4,15 ^b	52,07±3,74 ^{ab}
R50	8,69±4,69 ^a	12,18±3,00 ^b	28,77±5,54 ^{ab}	50,35±4,47 ^{ab}

PI+BD-: Muertos no peroxidados. **PI+BD+:** Muertos peroxidados **PI-BD-:** Vivos no peroxidados **PI-BD+:** Vivos peroxidados

Figura 16. Poblaciones celulares correspondientes a la evaluación de peroxidación lipídica en el semen porcino refrigerado.



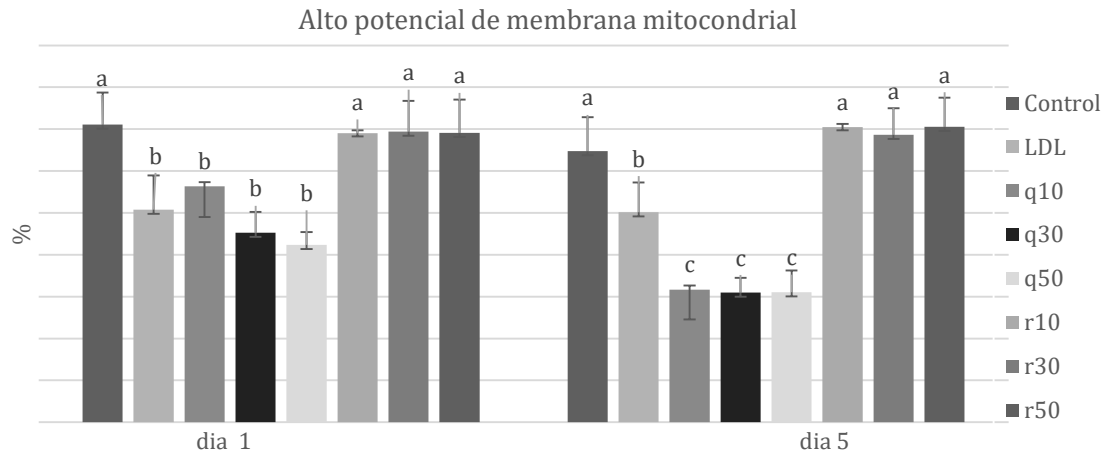
PI+BD-: Muertos no peroxidados. **PI+BD+:** Muertos peroxidados **PI-BD-:** Vivos no peroxidados **PI-BD+:** Vivos peroxidados

3.7. Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_M$).

Al comparar la intensidad media de fluorescencia de las poblaciones de espermatozoides se observó que el tratamiento control y las suplementaciones con resveratrol (10, 30 y 50 μM) no presentan diferencias significativas en la medición del potencial de membrana mitocondrial entre el día 1 y 5. Sin embargo, las suplementaciones con quercetina (10, 30 y 50 μM) y LDL presentaron una reducción en el porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial, situación inversa al hablar de los espermatozoides

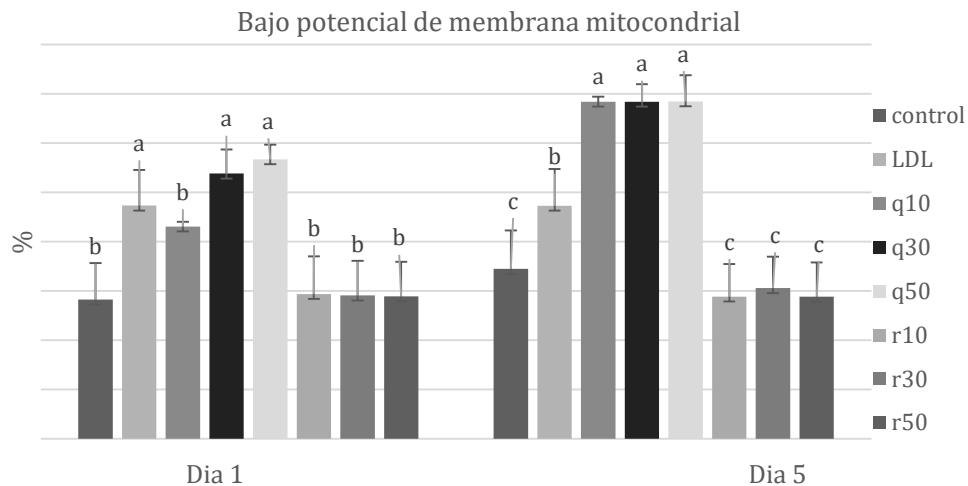
con bajo potencial de membrana mitocondrial en donde estas suplementaciones aumentan este porcentaje (véase figura 16 y 17).

Figura 17. Espermatozoides con alto potencial de membrana mitocondrial según la suplementación con LDL, quercetina o resveratrol a diferentes concentraciones



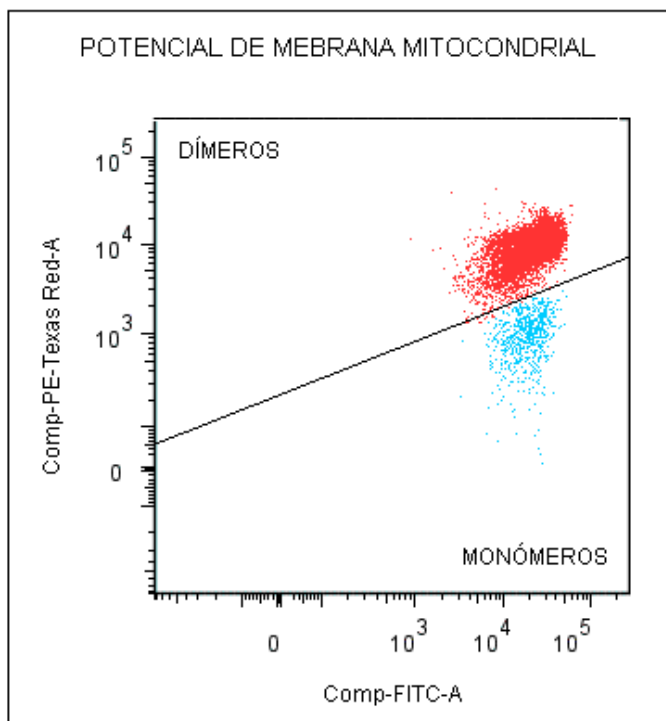
Nota: Las líneas verticales correspondientes a cada barra hacen referencia a la media \pm error estándar.

Figura 18. Espermatozoides con bajo potencial de membrana mitocondrial según la suplementación con LDL, quercetina o resveratrol a diferentes concentraciones



Nota: Las líneas verticales correspondientes a cada barra hacen referencia a la media \pm error estándar.

Figura 18. Poblaciones celulares correspondientes a la evaluación de potencial de membrana mitocondrial en el semen porcino refrigerado.



3.8. Vitalidad espermática

En la medición de la vitalidad espermática al día 1 (Tabla 9) se notó que no hay diferencia significativa con en los tratamientos de suplementación de LDL y Resveratrol (10, 30 y 50 uM) con respecto al control, pero fue diferente con la suplementación de Quercetina (10, 30 y 50 uM) donde se evidencia una disminución de la vitalidad espermática en el proceso de refrigeración de semen porcino.

Tabla 9. Vitalidad espermática del semen porcino refrigerado Dia 1

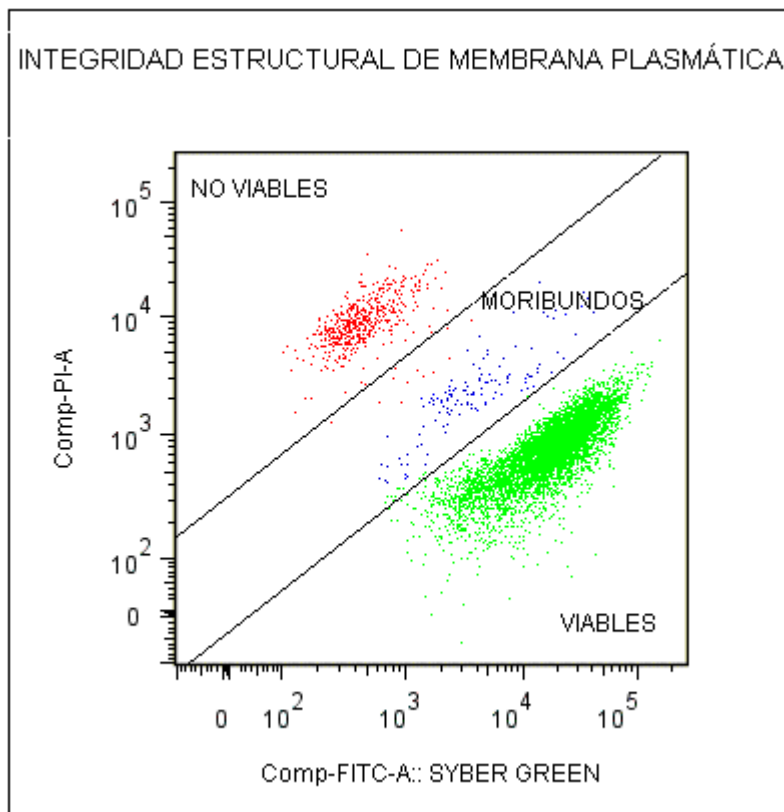
Tratamiento	Dia	Moribundos	Muertos	Vivos
Control	1	1,23 ± 0,23 ^a	14,85 ± 7,01 ^{abc}	83,85 ± 7,20 ^a
LDL		0,94 ± 0,39 ^a	12,625 ± 4,74 ^c	86,33 ± 4,74 ^a
q10		1,66 ± 0,51 ^a	16,76 ± 6,18 ^{ab}	81,44 ± 6,05 ^b
q30		1,38 ± 0,31 ^a	17,26 ± 6,47 ^a	81,15 ± 6,27 ^b
q50		1,28 ± 0,28 ^a	17,44 ± 6,66 ^a	81,19 ± 6,54 ^{ab}
r10		1,35 ± 0,23 ^a	14,57 ± 6,26 ^{bc}	83,99 ± 6,47 ^a
r30		1,54 ± 0,34 ^a	14,90 ± 6,33 ^{abc}	83,51 ± 6,58 ^a
r50		1,44 ± 0,27 ^a	14,89 ± 6,37 ^{abc}	83,57 ± 6,60 ^a

Por otro lado, en la evaluación de la vitalidad espermática del día 5 (Tabla 10) se presentaron diferencias significativas referentes a una disminución de los valores en los tratamientos con suplementación con Quercetina (10 y 30 uM) con respecto al control. No obstante, con respecto a los otros tratamientos de LDL y resveratrol fue posible observar diferencias significativas de la vitalidad espermática en la refrigeración de semen porcino.

Tabla 10. Vitalidad espermática del semen porcino refrigerado Dia 5

Tratamiento	Dia	Moribundos	Muertos	Vivos
Control	5	1,18 ± 0,35 ^b	16,01 ± 7,22 ^b	82,77 ± 7,54 ^a
LDL		2,02 ± 0,27 ^b	15,25 ± 4,63 ^b	82,74 ± 4,51 ^a
q10		5,33 ± 2,37 ^{ab}	20,03 ± 6,12 ^a	74,66 ± 7,10 ^b
q30		10,29 ± 4,76 ^a	19,51 ± 6,21 ^a	70,31 ± 8,35 ^b
q50		2,44 ± 0,67 ^b	18,62 ± 5,88 ^a	78,59 ± 6,32 ^{ab}
r10		1,38 ± 0,83 ^b	16,18 ± 7,09 ^b	82,5 ± 7,59 ^a
r30		1,37 ± 0,38 ^b	16,21 ± 7,21 ^b	82,43 ± 7,54 ^a
r50		1,01 ± 0,26 ^b	16,04 ± 6,99 ^b	82,92 ± 7,24 ^a

Figura 19. Poblaciones celulares correspondientes a la evaluación de vitalidad espermática en el semen porcino refrigerado.



4. Discusión

4.1. Movilidad espermática y cinética del movimiento

Al-Mutary et al. (2020), enmarcan la suplementación con resveratrol como beneficioso en el almacenamiento del semen y su repercusión positiva en la calidad de los espermatozoides provenientes de ganado, además de favorecer la movilidad, la viabilidad, la fertilidad y controlar la producción de EROs (Al-Mutary et al., 2020). Sin embargo, este compuesto muestra una dicotomía: las dosis bajas (10 a 33 μM) pueden mejorar la función celular mientras que las dosis altas (66 a 100 μM) aumentan la muerte celular con una disminución concomitante en la membrana mitocondrial en verracos (Martín-Hidalgo et al., 2013). En cuanto al sistema reproductor masculino, algunos estudios se han centrado en las acciones del resveratrol con resultados divergentes (Collodel et al. 2011, Silva et al., 2012).

Silva et al. (2016) en su estudio de suplementación con resveratrol en semen ovino posdescongelado, encontraron que no es posible evidenciar diferencias significativas para la MT para las inclusiones de 0, 15, 25, 50, 75 y 100 μM de resveratrol y quercetina en el diluyente, a excepción del índice de oscilación el cual se relacionó de manera positiva con la fecundidad. Sin embargo, otros estudios reportan posibles efectos nocivos de resveratrol sobre espermatozoides humanos, cuando se suplementa el medio con 100 μM , provocando casi un 100% de mortalidad espermática (Collodel et al., 2011). Estos análisis apoyan los resultados de la presente investigación en donde el proceso de refrigeración convencional para determinar la movilidad total del semen porcino no permite inferir si la adición de resveratrol mejora la conservación de las muestras almacenadas a 17°C o si provoca un efecto deletéreo.

Para la MT los resultados en la suplementación con resveratrol no presentaron diferencias significativas en los niveles de inclusión 10, 30 y 50 μM . Esto fue similar a lo observado por Martin-Hidalgo et al., (2016) en su estudio en semen porcino refrigerado con suplementación de resveratrol a concentraciones de 10, 33, 66 y 100 μM . En cuanto a la suplementación con quercetina se encontró una diferencia significativa en la disminución de la MT a las 0, 72 y 96 horas de evaluación, contrario a lo encontrado en reportes de suplementación con quercetina (0.1 mM) en el semen equino posdescongelación (Seifi-Jamadi et al., 2016) y quercetina (100 μM), aumentando la MP en el semen equino (Duque et al., 2017).

Es necesario destacar que los efectos deletéreos provocados por quercetina pueden ser resultado de los impactos prooxidantes que generan la reducción de la movilidad, integridad y vitalidad de los espermatozoides debido a la naturaleza de estos en generar estrés oxidativo por inhibición de los sistemas (Restrepo et al., 2016). Esta modificación de la movilidad provocada por la quercetina se puede relacionar a la disminución en la actividad de la enzima encargada de la regulación de la cantidad de los iones de calcio llamada Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (Khanduja et al., 2001).

Este proceso de regulación y transporte de iones de calcio por medio de las membranas de los espermatozoides, es necesario para mantener la movilidad durante el proceso de capacitación espermática potencializando la reacción del acrosoma, la señalización celular y la fertilidad (debido a la actividad en el aparato reproductor femenino) (Mendoza-Sánchez et al., 2020). Un ejemplo claro se presenta al hablar de los flagelos de los espermatozoides de hámsteres, en donde una baja concentración de calcio al interior de las células espermáticas es un punto relevante al hablar de la producción del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), mensajero involucrado en el ciclo celular; mientras que concentraciones elevadas pueden suprimir la movilidad de los espermatozoides por la reducción de AMPc y a su vez reducir la distribución de ATP (Si y Okuno, 1999).

Se encontraron valores mayores en MP en el tratamiento de suplementación del medio de refrigeración con LDL en el semen porcino, evidenciándose en las 24 y 48 horas de evaluación similar a lo encontrado en estudios realizados por Hu et al. (2006) en semen

porcino congelado. Esto podría deberse a que la adición de LDL a los diluyentes mejora la movilidad de los espermatozoides después del procesamiento y la actividad mitocondrial a través de la disminución de la peroxidación lipídica altamente estudiada en toros (Al-Mutary et al., 2020). Además, se menciona las LDL en el diluyente como el mejor tratamiento en las primeras 72 horas, situación apoyada por Snoeck et al. (2017) quienes observaron que las lipoproteínas de baja densidad presentan unas de las mejores características benéficas al hablar del mantenimiento de la calidad de la integridad y de la movilidad de los espermatozoides, puesto que no se observaron disminuciones en la movilidad posterior al proceso de congelación en las muestras con diluyente de LDL. Esto se da gracias a la potencialización de la actividad antioxidante de la glutatión y la catalasa, encargadas de proteger a los espermatozoides del estrés oxidativo, permitiendo de esta manera el aumento de la calidad espermática y por consiguiente de la integridad y movilidad de los espermatozoides (Varela et al., 2019).

Los parámetros de índice de velocidad espermática como VSL y VCL, no mostraron diferencias significativas, a excepción del tratamiento con Resveratrol (50 μM) a las 24 horas de evaluación haciendo referencia a lo reportado en el estudio de la suplementación de semen de porcino con altas dosis de resveratrol (66 a 100 μM), lo cual provoca una pequeña disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles totales, así como en las velocidades de los espermatozoides después de 4 y 7 días de almacenamiento, mientras que las dosis bajas de resveratrol no tienen ningún efecto sobre los parámetros de movilidad de los espermatozoides, situación generada por el contenido de ATP en los espermatozoides y la correlación negativa entre dicho contenido y las dosis de resveratrol empleadas, ocasionando una disminución significativa en la obtención de energía de los espermatozoides, reduciendo a su vez los índices de velocidad estudiados (Martin-Hidalgo et al., 2013). Este fenómeno es también presentado en el estudio de Silva et al. (2016), en donde los efectos de la adición de resveratrol no son evidenciados en la integridad de la membrana plasmática y en la movilidad espermática, concluyendo que los efectos visibles de este antioxidante pueden presentarse solo en algunos casos de estrés extremo.

En la evaluación de parámetros como BCF, ALH y LIN la suplementación con resveratrol y quercetina no arrojó diferencias significativas, situación similar a lo encontrado en estudios realizados en caninos, ovinos y porcinos en el procesamiento de semen bajo diferentes niveles del antioxidante (Silva et al., 2016; Martín-Hidalgo et al., 2013; Al-Mutary et al., 2020). Esta ausencia de diferencias significativas puede deberse a las concentraciones empleadas de los antioxidantes (10, 30 y 50 μM), puesto que en el estudio de El-Khawagah et al. (2020) con toros búfalo egipcio, se presentan efectos perjudiciales en ALH (con 40 μM de quercetina) y en BCF (con 80 μM de quercetina), disminuyendo de manera drástica, lo cual se atribuye principalmente a la capacidad prooxidante (inductores de estrés oxidativo) de las dosis elevadas de quercetina.

4.2. Integridad de la membrana

En la prueba Host o también llamada de hinchamiento hiposmótico, se evalúa si la integridad de la membrana se encuentra bioquímicamente funcional y si está activa (Echeverry et al., 2003). Aquí, las células espermáticas cuyas membranas estén intactas admiten una alta entrada de agua a nivel citosólico como resultado del equilibrio entre los fluidos extracelulares, lo cual produce una variabilidad en la morfología del flagelo asociada a la hinchazón a nivel del citosol, la dilatación y el enrollamiento de la cola (Sánchez y Zamora, 2016). Por lo contrario, las células espermáticas inviables no realizarán cambios a nivel morfológico del flagelo. Es importante tener en cuenta que la mortalidad de espermatozoides con acrosomas dañados es un parámetro indicador de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Sánchez y Zamora, 2016).

Los estudios de Restrepo et al. (2016) y Seifi-Jamadi et al. (2016), expresan que la quercetina no posee efecto sobre la integridad y funcionalidad de la membrana de los espermatozoides en comparación con las pruebas control, situación que se cumple en la presente investigación con las concentraciones de 30 μM y 50 μM . Sin embargo, en la suplementación del medio de refrigeración con quercetina a una concentración de 10 μM se presentan variaciones importantes evidenciando daños severos en la integridad membranal tanto en el día 1 como en el día 5, tomando como base la metodología estándar en bovinos. El resultado mínimo esperado era de 40% de espermatozoides reaccionantes,

donde los espermatozoides vivos reaccionan al shock osmótico produciendo el enrollamiento de la cola (Catena y Cabodevila, 1999).

Sin embargo, en el estudio de Bang et al. (2021), se encontró que quercetina si estimula el aumento en la integridad de la membrana plasmática en comparación con sus grupos control, haciendo visible el incremento porcentual en cantidad de espermatozoides con membranas intactas, destacando además, que únicamente las cantidades elevadas de quercetina (>100 μM) pueden afectar de manera negativa la integridad de la membrana lo cual es atribuido a la estructura espermática conservada de las muestras iniciales, al proceso de descongelación y al grupo a evaluar en el estudio.

En el caso de resveratrol, Longobardi et al. (2017) encontraron que una concentración de 50 μM es capaz de aumentar significativamente la integridad de la membrana en el día 1 al realizar la comparación con el control reduciendo los cambios similares a la capacitación. Estos resultados poseen relación con los obtenidos en esta investigación, puesto que, aunque el aumento en el porcentaje en el test de integridad de la membrana con resveratrol a 50 μM no es tan elevado como con la quercetina a 10 μM y 30 μM , sí es posible visualizar un aumento en comparación con el control.

En la mayoría de los estudios la reducción de la peroxidación lipídica promovida por estos compuestos fenólicos se observó después de la inducción de la oxidación. En esta investigación los parámetros de integridad de la membrana plasmática no se vieron afectados de manera negativa por la presencia de resveratrol o quercetina; es más, la adición de resveratrol (Sarlós et al., 2002) o quercetina (Moretti et al., 2012; Johnke et al., 2014) al semen de distintas especies se asocia a la prevención del daño oxidativo. Por lo tanto, es probable que el efecto protector de estos antioxidantes se haga visible en situaciones de estrés extremo, lo que no necesariamente refleja las condiciones fisiológicas a las que se expone el semen (Silva et al., 2016).

Referente al LDL, Snoeck et al. (2017) encontraron que las LDL son capaces de mantener la integridad de las membranas espermáticas hasta en lapsos de 120 días y a su vez preservar la movilidad de los espermatozoides posterior a la descongelación, convirtiéndolo en un diluyente importante al momento de hablar de conservación y refrigeración. Lo anterior, puede aproximarse a los resultados obtenidos, en donde a pesar

de que en el día 1 no fue posible visualizar el aumento en la integridad, con el pasar de los días fue posible denotar el incremento de la misma haciendo necesaria la implementación de más días de observación para concluir la presencia o ausencia de diferencias significativas.

4.3. Especies reactivas de Oxígeno (EROS)

Es necesario tener en cuenta que al hablar de especies reactivas de oxígeno el rol que cumplen ante la fertilidad masculina es dependiente de las concentraciones en las que se encuentren, puesto que además de ser moléculas derivadas del metabolismo del oxígeno, también son generadas como productos de las reacciones biológicas (Lucas-Abellán et al., 2011). Las EROS participan de manera positiva en importantes procesos fisiológicos como la capacitación espermática, la adquisición de la fertilidad, la reacción acrosomal y la fusión entre gametos al encontrarse en concentraciones moderadas (de Lamirande y Lamothe, 2009). Sin embargo, a concentraciones elevadas en donde solo se contempla la generación y no la eliminación de dichas especies, pueden convertirse en las causantes de la fragmentación mitocondrial de las membranas cromosómicas y plasmáticas del ADN de los espermatozoides influyendo de manera directa y negativa en la fertilidad y movilidad (Taylor et al., 2009; Lanconi et al., 2015).

Los sistemas orgánicos dependen de la participación de antioxidantes para mantener el equilibrio mediante la neutralización o atenuación de estos radicales libres. No obstante, cuando su producción es excesiva se produce una sobrecarga del sistema antioxidante de defensa celular. Esto conduce al estrés oxidativo, que da como resultado la lipoperoxidación de las membranas espermáticas, un proceso altamente perjudicial para los espermatozoides (Tironi et al., 2017). Estas afectaciones negativas podrían ser apaciguadas con ayuda de suplementaciones de antioxidantes como es el caso de la quercetina.

En la investigación, referente a la producción de especies reactivas de oxígeno se presentaron variaciones en los niveles evaluados. En la suplementación con Quercetina (10 y 50 μM) al día 1, se redujeron los niveles de EROs evidenciando una capacidad antioxidante de la quercetina similar a lo encontrado por Restrepo et al. (2016) en la

evaluación posdescongelación en semen equino; sin embargo, al pasar los días de refrigeración la suplementación con LDL y quercetina (10 y 30 μM) aumentó la cantidad de EROs evidenciando un efecto prooxidante.

Jiménez-Aguilar et al. (2022) en su estudio de adición de vitamina E y quercetina al semen ovino y su efecto sobre la fertilidad in vivo, expresan que la concentración de 200 μM empleada de quercetina posee una actividad captadora de especies reactivas de oxígeno más efectiva que otros antioxidantes, eliminando las EROs en exceso y mejorando la calidad del semen posdescongelación. Es por esto que, en el presente estudio, las concentraciones más elevadas de quercetina y resveratrol (30 μM y 50 μM) controlan la cantidad de EROs disminuyéndolas, evitando el exceso de las mismas.

Tanto la vitamina E como la quercetina pueden presentar variaciones en su efecto al encontrarse en presencia de azúcares y amortiguadores presentes en los diluyentes, razón por la que el resultado puede visualizarse como desfavorable a pesar de su naturaleza positiva en los procesos de integridad acrosomal de los espermatozoides (Sarlós et al., 2002). Es necesario tener en cuenta que la inhibición de la formación de EROs con ayuda de la quercetina puede darse mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos, destacando la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa reducida y la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) la cual se encuentra en las mitocondrias y en la membrana plasmática del espermatozoide, haciendo aún más relevante la acción del antioxidante (Walczak-Jedrzejowska et al., 2013).

4.4. Capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS

Los procesos de captación de radicales son indispensables teniendo en cuenta los daños que pueden ocasionar los radicales libres en los sistemas biológicos. En este orden de ideas, el método ABTS cobra importancia debido a su fortaleza en la determinación de la capacidad antioxidante de las muestras presentes en el estudio involucrando procesos de transferencia de electrones y permitiendo obtener valores importantes por medio de métodos espectrofotométricos como consecuencia de la generación de cationes radicales

(Gülçin, 2010). Además, el ensayo ABTS se encarga de medir la capacidad de los antioxidantes para poder llevar a cabo el proceso de eliminación de ABTS⁺ (resultante de la oxidación de ABTS y persulfato de potasio) generado en fase acuosa (Lucas-Abellán et al., 2011).

La evaluación de la capacidad antioxidante total del semen porcino refrigerado mediante la metodología ABTS⁺, arrojó diferencia significativa para los tratamientos control, quercetina y resveratrol a concentraciones 10, 30 y 50 μM respectivamente. Se observó diferencia en los niveles de resveratrol a concentración de 10 μM en el primer día de evaluación, siendo inferior con respecto del control ($P < 0,05$). En el estudio de Greifová et al. (2022), es posible observar disminuciones estadísticamente significativas en las muestras experimentales expuestas a dosis elevadas de resveratrol, lo que sugiere un efecto positivo en la capacidad antioxidante y situaciones de estrés oxidativo ante bajas dosis de resveratrol y que, en el caso inverso, las dosis más elevadas del antioxidante evidencian efectos negativos demostrando actividades biológicas dependientes de la dosis suministrada.

Se ha comprobado que por ejemplo en ratones, el resveratrol protege el tejido testicular contra la degeneración provocada por situaciones de estrés oxidativo, inhibiendo la disminución de la capacidad antioxidante por medio de la regulación de enzimas antioxidantes y los eliminadores de EROS; esto sucede dado que el resveratrol promueve la actividad de la enzima antioxidante GPx (encargada de catalizar el peróxido de hidrógeno o lipoperoxido) y la enzima antioxidante SOD (encargada de la reparación de células y reductora del daño de los superóxidos) (Avdatek et al., 2018; Golmohammadi et al., 2021).

En la actual investigación, dosis más pequeñas de resveratrol (10 μM) son competentes para alterar la capacidad antioxidante por el método del radical catiónico ABTS, por lo que es importante tener en cuenta que la disminución de la temperatura de células espermáticas produce un incremento en la producción de EROS. En el momento que la funcionalidad antioxidante es incapaz de mitigar el exceso de EROS se produce estrés oxidativo, esta condición induce cambios en las células espermáticas relacionados a la

fluidez de la membrana y alteración de la actividad enzimática, lo cual genera la reducción de la movilidad, la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Restrepo et al., 2016; Najafi et al. 2014; Tatone et al. 2010; Aitken 2006).

4.5. Capacidad antioxidante por el método FRAP

La capacidad antioxidante por el método FRAP se encarga de la determinación del poder antioxidante total por medio de la reducción del complejo férrico-tripiridil triazina ante la presencia de antioxidantes (Vizzari et al., 2021). Actualmente, no es posible encontrar informes sobre la actividad antioxidante de las LDL en la suplementación del semen porcino refrigerado. Sin embargo, es relevante destacar que el aumento de la capacidad antioxidante en el diluyente se deberá a su composición férrica lo cual hace que haya un aumento lo cual se evidencia en el número de células espermáticas peroxidadas (Dalal et al., 2020) como se evidencia en la Tabla 7.

En cuanto a la suplementación con resveratrol en sus diferentes niveles de suplementación (10, 30 y 50 μM) no se evidencian diferencias significativas en los dos momentos de evaluación (día 1 y día 5), aunque se ha reportado la actividad antioxidante del resveratrol en diferentes especies cabe señalar que esta depende de factores como la concentración y con respecto a esta premisa sus propiedades podrían asumir un perfil antioxidante, imparcial o prooxidante. De esa forma, otros factores a analizar son la composición del diluyente, la presencia de plasma seminal, la especie, la raza e incluso variabilidad individual (Carvalho, 2020).

Referente a quercetina, el estudio de Duque et al. (2017) presenta incrementos en la capacidad antioxidante ante el uso de la quercetina en comparación con el control al igual que en el presente estudio. Es necesario tener en cuenta que la quercetina posee la capacidad de impedir la creación de iones superóxido y quelatos de hierro, razón por la que la capacidad antioxidante por medio del método FRAP referente a la reducción de hierro tiende a aumentar ante la presencia de la quercetina (Gibb et al., 2013).

4.6. Peroxidación lipídica de la membrana plasmática

De manera general, el proceso de congelación puede provocar daños en los espermatozoides a nivel de formación de EROs y de peroxidación lipídica de la membrana influyendo de manera directa en la fertilidad, siendo la razón por la que se evalúa la refrigeración para la conservación del semen con ayuda de antioxidantes (Nair et al., 2006). El proceso de peroxidación lipídica en los espermatozoides se puede ver reducido con la implementación de la quercetina y el resveratrol evitando la capacitación prematura que puede provocar la reducción en la vida de los espermatozoides, su capacidad de fecundación y reacciones acrosomales de manera espontánea (Bailey et al., 2008). En el caso de los porcinos, los espermatozoides poseen fosfolipasas A2, enzimas encargadas del hidrólisis de los enlaces éster, las cuales pueden alterarse por acción de la peroxidación aumentando la actividad y provocando modificaciones de estructura que ocasionan la muerte celular por el exceso de actividad (Shier, 1979).

El método de suplementación al medio de refrigeración de semen porcino con quercetina (10, y 50 μM) mejoró con éxito la incidencia dañina de la peroxidación lipídica (tabla 7). Estos resultados sugieren que la peroxidación lipídica puede no ser un factor clave que influya en la cinética espermática durante los procesos de enfriamiento o congelación (Johinke et al., 2014). En suma, Tvrdá et al. (2016) expresan que concentraciones más elevadas de quercetina (entre 50 y 100 μM) pueden ser aún más efectivas, proporcionando efectos protectores a nivel de movilidad y actividad mitocondrial, actuando de manera eficiente ante los posibles daños provocados por la peroxidación lipídica de la membrana plasmática ocasionada por el exceso de especies reactivas de oxígeno.

Los resultados demuestran tanto en el día 1 como en el día 5 un aumento de los espermatozoides vivos y muertos peroxidados en comparación con el control en presencia de quercetina y resveratrol, sin embargo, en todos los casos se disminuye la capacidad de peroxidación lipídica, permitiendo la naturalización del estrés oxidativo en la membrana plasmática, en especial teniendo en cuenta la susceptibilidad al daño oxidativo como consecuencia del alto contenido de ácidos grasos polinsaturados en las membranas plasmáticas, provocando a su vez indicios de infertilidad (Ourique et al., 2013). Es

necesario resaltar que quercetina es un antioxidante que evita la generación de iones superóxido y de quelatos de hierro, lo que explica la capacidad para disminuir los procesos de peroxidación lipídica y de esta manera retrasar la capacitación prematura de los espermatozoides a lo largo del proceso de refrigeración y congelación (McNiven y Richardson, 2006).

4.7. Potencial de membrana mitocondrial

El JC-1 es óptimo para la evaluación del estado energético de la membrana mitocondrial de los espermatozoides, porque produce un cambio sensible al potencial de membrana en el patrón de color, el color cambia de verde a rojo anaranjado a medida que aumenta la polarización de la membrana (Varner y Johnson, 2007). Esto se debe a la formación reversible de agregados JC-1 rojo-naranja en un estado de potencial de membrana alto, en comparación con monómeros verde de JC-1 en un estado de bajo potencial de membrana (Boni et al., 2017).

A diferencia de otras fluorescencias como la PI (yoduro de propidio) y la FITC-PSA (Aglutina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína) en donde solo permiten la visualización de espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado, respectivamente, la tinción con JC-1 en espermatozoides de verraco permite visualizar la membrana plasmática intacta y dañada, acrosoma intacto y dañado y potencial mitocondrial alto y bajo, convirtiéndolo en la mejor tinción para identificar el potencial de la membrana mitocondrial en conjunto con otras membranas importantes en la motilidad, fertilidad y vitalidad (de Andrade et al., 2007).

El estado mitocondrial se relaciona de manera directa con la motilidad y la viabilidad celular, por lo que buenos índices de motilidad en conjunto con altos valores de velocidad se asocian con un alto potencial de membrana (Martínez-Pastor et al., 2004). Además, Silva et al. (2012) demostraron que el potencial de la membrana mitocondrial se relaciona de manera directa con las especies radicalarias (especies moleculares con entidad propia a pesar de poseer electrones sin pareja) al usar el suplemento de quercetina con una

concentración de 20 μM reduciendo hasta el 8% este potencial, situación que es posible visualizar en el presente estudio con las membranas que poseen alto potencial, en donde la quercetina se encarga de disminuir este potencial. Este proceso puede atribuirse a la naturaleza de captura de radicales formados de este antioxidante, provocando que la acción frente a especies no radicales sea considerada como ineficaz (Moreno-Irusta et al., 2020).

En suma, Jofré (2019) destaca que en su estudio relacionado al potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides refrigerados de cerdo, en donde se comparaban antioxidantes como la Catequina, Quercetina, Kaempferol y Miricetina, la Quercetina no ocupa el primer lugar en el mantenimiento de la estabilidad de las poblaciones con alto potencial de la membrana mitocondrial, sin embargo, sí representa un lugar importante en el aumento del potencial de la membrana en el caso de aquellas poblaciones con bajo potencial, en la protección contra la disfunción mitocondrial, la capacidad de ingreso celular y acumulación en la mitocondria, investigación que apoya los resultados obtenidos en este estudio.

Es importante tener en cuenta que hay estudios que afirman la correlación inversa entre los niveles de EROs y el potencial de la membrana mitocondrial puesto que las mitocondrias son el hospedero principal en la creación de estos EROs. Es por esto, que un aumento en la formación de EROs puede afectar el transporte por fosforilación oxidativa de electrones (formación de ATP por transferencia de electrones y desprendimiento energético) en los espermatozoides, aumentando el porcentaje de espermatozoides carentes de mitocondrias (Armstrong et al., 1999).

4.8. Vitalidad espermática

En la investigación, es posible visualizar como en la vitalidad espermática no se presentan diferencias significativas en el tratamiento con LDL y resveratrol, sin embargo, el tratamiento de quercetina mostró la reducción de la vitalidad espermática en el proceso de refrigeración. Es de resaltar que el daño del acrosoma en los espermatozoides puede ocasionar la incapacidad del proceso de fertilización, haciendo necesaria la integridad de

la membrana para la protección de lesiones en la refrigeración y para mantener la vitalidad de los mismos (Martínez-Pastor et al., 2004).

Los resultados obtenidos en la vitalidad espermática difieren notablemente de lo obtenido por Jiménez-Aguilar et al. (2019) dado que, en la experimentación realizada por dichos autores, los resultados demuestran que la implementación de la quercetina aumenta la vitalidad de los espermatozoides reduciendo el número de espermatozoides muertos en comparación con el control. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que la aplicación de la quercetina en el estudio nombrado fue de 200 μM , a diferencia de la presente investigación en donde las concentraciones fueron de 10,30 y 50 μM , situación que puede explicar la disparidad de los resultados.

Por otro lado, en el estudio de Seifi-Jamadi et al. (2016) en donde se empleó una concentración de 100 μM de quercetina en semen preservado de equino no se presentaron efectos significativos en la vitalidad, explicando la influencia de la concentración de quercetina en la mortalidad y vitalidad de los espermatozoides, siendo las concentraciones elevadas ($>150 \mu\text{M}$) las más efectivas en el daño reducido de la integridad de la membrana en comparación con otras concentraciones ($<50 \mu\text{M}$) (Ahmed et al., 2019).

5. Conclusiones

Los datos obtenidos en el presente estudio permiten concluir que la suplementación con LDL mejora la movilidad y cinética espermática en el proceso de refrigeración. Además, permite entender que la inclusión con quercetina en concentraciones en los últimos días de evaluación posee efectos negativos sobre la movilidad total y progresiva de los espermatozoides, lo cual es consecuencia de los impactos prooxidantes que generan aumento del estrés oxidativo en los espermatozoides generando un efecto negativo en la movilidad de los espermatozoides porcinos en el proceso de refrigeración.

Las cantidades elevadas de quercetina ($>30 \mu\text{M}$) son capaces de afectar de manera negativa la integridad membrana de los espermatozoides como resultado del proceso metabólico y su interacción con la disminución de la temperatura y la estructura espermática conservada. A su vez, concentraciones de resveratrol elevadas pueden favorecer la integridad de la membrana debido al control ejercido en el proceso de capacitación. Situación similar a la suplementación con LDL en donde se mantiene la integridad por lapsos largos de tiempo posterior al proceso de preservación.

La capacidad antioxidante de los espermatozoides puede verse favorecida ante la presencia de resveratrol como consecuencia de la reducción de estrés oxidativo al hablar del método ABTS. Sin embargo, al incluir al método FRAP, es la quercetina la encargada de incrementar esta capacidad antioxidante por medio de la facultad de impedir la creación de iones superóxido y hierro, que son los encargados de generar el estrés en las células.

La vitalidad espermática puede verse reducida ante la suplementación con quercetina durante el proceso de refrigeración, mostrando un efecto deletéreo sobre las células seminales. Los resultados de la suplementación con dicho antioxidante pueden variar en relación a la concentración, puesto que en el contraste bibliográfico fue posible identificar que concentraciones elevadas reducen el número de espermatozoides muertos y reducen los daños de la integridad de la membrana espermática.

6.Recomendaciones

Se recomienda a futuros investigadores determinar asociaciones de diferentes niveles de Resveratrol con Quercetina para determinar el efecto combinado de ambos antioxidantes sobre los diferentes parámetros de interés y la posibilidad de continuar en el proceso de Inseminación Artificial para ver el efecto sobre el número de lechones vivos al momento del parto como parámetro de interés zootécnico

7. Bibliografía

- Acosta, M., Rueda, M., Perdigón, R. (2007). Comparación de dos técnicas en la determinación de morfoanomalías del semen porcino. *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 25, 32-39.
- ADMIN. Características del diluyente de semen porcino. [Online].; 2014. Disponible en: [http://cidosanet.net/noticias/caracteristicas-del-diluyente-desemen- Porcino](http://cidosanet.net/noticias/caracteristicas-del-diluyente-desemen-Porcino)
- Agarwal, A., Gupta, S., Sharma, R. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive biology and endocrinology*, 3(1), 28.
- Ahmed, H., Jahan, S., Salman, M. M., & Ullah, F. (2019). Stimulating effects of quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and in vivo fertility of Buffalo (*bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology*, 134, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.012>
- Aitken R. (2006). Sperm function test and fertility. *Int J Androl*, 9:69-75.
- Aitken, R., Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, 122(4), 497-506.
- Aleman D., Alfaro, M., Hurtado, E. (2007). Efecto de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de cerdas. *Zootecnia Tropical*. 71-75. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3597/Articulosporcino-archivo/Efecto-de-la-temperatura-del-semen-sobre-la-respuestareproductiva-de-cerdas.html>
- Al-Mutary, M., Al-Ghadi, M., Ammari, A., Al-Himadi, A., Al-Jolimeed, A., Arafah, M., Swelum, A. (2020). Effect of different concentrations of resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5° C for up to 168 h. *Theriogenology*, 152, 139-146.

-
- Alvarez, J. (2006) Estrés oxidativo, fisiología espermática y reproducción asistida. Rev Iberoamericana de fertilidad. XXVI Congreso Nacional SEF. Zaragoza, España.
- Armstrong, J. S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. J., & Sikka, S. C. (1999). Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and Energy Metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 869–880. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00275-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00275-5)
- Avdatek, F., Birdane, Y., Türkmen, R. & Demirel, H. (2018). Ameliorative effect of resveratrol on testicular oxidative stress, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats. *Andrología*, 50, (7). DOI: 10.1111/and.13036. Epub 2018 May 14. PMID: 29761542.
- Awda, B., Mackenzie-Bell, M., Buhr, M. (2009). Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of reproduction*, 81(3), 553-561.
- Baghshahi, H., Riasi, A., Mahdavi, A., Shirazi, A. (2014). Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology*, 69(3), 482-487.
- Bailey, J. L., Lessard, C., Jacques, J., Brèque, C., Dobrinski, I., Zeng, W., & Galantino-Homer, H. L. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*, 70(8), 1251–1259. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.014>
- Bang, S., Qamar, A. Y., Tanga, B. M., Fang, X., Seong, G., Nabeel, A. H., Yu, I.-J., Saadeldin, I. M., & Cho, J. K. (2021). Quercetin improves the apoptotic index and oxidative stress in Post-Thaw Dog Sperm. *Environmental Science and Pollution Research*, (13). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-863422/v1>
- Bathgate, R. (2011). Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. PubMed Journals, Vol. 43(2), pp 43-45, The University of Sydney, Australia: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884272
- Bellido, E., & Blanco, H. (2013). *Efecto de dos dilutores sobre la criopreservación de semen de verraco* (tesis). Universidad Nacional de Huancavelica, Huancavelica, Perú.

- Benayahoum, A., Amira-Guebailia, H., Houache, O. (2014). Homolytic and heterolytic O–H bond cleavage in trans-resveratrol and some phenantrene análogos: A theoretical study. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1037, 1-9.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., ... & Tainturier, D. (2008). The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 70(9), 1478-1488
- Benzie, I., Strain, 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>
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of botany*. 91:179-194.
- Brouwers, J., Silva, P., Gadella, B. (2005). New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*. 63: 458-469.
- Cárdenas, R., Pedraza, C. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*. 17(2):164-173.
- Carpio, M., Cadillo, J., Mellisho, E. (2008). Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 19(1), 15-19.
- Carrión, D., Medel, P. (2001). Interacción nutrición reproducción en ganado porcino. XVII Curso de Especialización FEDNA. 42p.
- Carvalho, N. (2020). Efeito do Resveratrol na criopreservação de sêmen de garanhões da Raça Crioula.
- Casas, I., Flores, E. (2013) Gene banking: the freezing strategy. In: Bonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M (eds), *Boar Reproduction*. Springer, Berlin, pp. 551–588.

-
- Castillo, C., Benedito, L., López-Alonso, M., Miranda, M., Hernández, J. (2001). Importancia del estrés oxidativo en el ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch. Med. Vet.* 33 (1): 204 – 218
- Castillo, M., Cerutti, D., Gómez, M., Cisale, H. (2018). Aplicación del Test de Endósmosis en la evaluación del semen de carnero preservado en condiciones de campo. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 26(3), 111-118.
- Catena, M., Cabodevila, J., (1999). EVALUACIÓN DE SEMEN BOVINO CONGELADO. Tandil.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T. (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121: 395-401.
- Chihuailaf, R., Contreras, P., Wittwer F. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*. 33(3).
- Collodel, G., Federico, M., Geminiani, M., Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., Figura, N., Moretti, E. (2011). Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reprod Toxicol.*, 31(2), 239-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.11.010>
- Condoy, M., Cevallos, J. (2017). Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(9), 1-11.
- Córdova-Izquierdo, A., Pérez-Gutiérrez, J. F., & Martín-Rillo, S. (2004). Fases previa y postcongelación del semen de verraco en pajillas de 5 ml y capacidad de fecundación de los espermatozoides. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 20(40), 61-68.
- Córdova, A., Córdova, S., Córdova, A., Pérez, J., Martín, S. (2005). Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante in vitro de los espermatozoides. Recuperado de [Redalyc.org](http://www.redalyc.org), vol. 12(3), pp. 271-274, Universidad Autónoma del Estado de México: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10412306>
- Córdova, A., Ruiz, C., Córdova, C., Córdova, M., Guerra, J., Arancibia, K. (2009). Oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 3(1), 01-38

- Cosme, W. (2005). Agua de coco (*Cocos nucifera*), suero fetal bovino, aloe vera y sus combinaciones para la criopreservación de semen ovino. Obtenido de Dialnet, Vol. 55, pp 101-104, Universidad Autónoma de Chihuahua, México: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1430499>.
- Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vázquez, J., Martínez, E. (2005). Kinematic Changes During the Cryopreservation of Boar Spermatozoa. *J Androl* 26, 610–618.
- Cuenca, Mercy., Avellaneda Juan. (2017) "Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina." REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria 18.9 .1-11.
- Cummins, J. (1994). Diagnostic use and techniques of acrosome reaction evaluation. Male Factor in Human Infertility. *Frontiers in Endocrinology*, 8 (1), 101-153.
- Dalal, J., Chandolia, K., Pawaria, S., Kumar, A., Kumar, D., Selokar, N. L., ... & Kumar, P. (2020). Low-density lipoproteins protect sperm during cryopreservation in buffalo: Unraveling mechanism of action. *Molecular Reproduction and Development*, 87(12), 1231-1244.
- DANE. Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE,(2022). Boletín mensual Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria, no 4.
- de Andrade, A., de Arruda, R ., Celeghini, E., Nascimento, J., Martins, S., Raphael, C., & Moretti, A. (2007). Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(2), 190–194. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00751.x>
- de Lamirande, E., & Lamothe, G. (2009). Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(4), 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.004>
- Díaz, M., Arévalo, A. (2006) Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación de semen refrigerado. [Online]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=5328>

-
- Dominguez, R., Arzate, I., Chanona, J., Welti, J. (2012). El gel de aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. Publicado por la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, Extraído de: www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665.
- Duque, J., Rojano, B., Restrepo, G. (2017). Criotolerancia de Semen Equino Congelado con Aditivos en el Diluyente. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 120-129.
- Echeverry, N. A. B., Araque, N. V., Rey, M. R., Londoño, G. C., & Aramburo, L. E. T. (2003). Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 56(2).
- El-Khawagah, A, Kandiel, M., & Samir, H. (2020). Effect of quercetin supplementation in extender on sperm kinematics, extracellular enzymes release, and oxidative stress of Egyptian buffalo bulls frozen–thawed semen. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.604460>
- Eriksson, B., Rodriguez-Martinez, H. (2000). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Animal reproduction science*, 63(3), 205-220.
- Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. Giovanni Restrepo Betancur, Alexandra Usuga Suarez, Juan David Montoya Páez, Álvaro David Celis, Andrés Antonio Henao
- Fabris, S., Momo, F., Ravagnan, G., Stevanato, R . (2008) Antioxidant properties of resveratrol and piceid on lipid peroxidation in micelles and monolamellar liposomes. *Biophys. Chem*, 135, 76–83.
- FAO. 2021. Meat Market Review: Emerging trends and outlook, December 2021. Rome. Faudale, M., Viladomat, F., Bastida, J., Poli, F., Codina C. (2008) Anti- . Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *J Agric Food Chem*. 26(6):1912-20.

- Flores, C., Meléndez, C., Mendoza, C., Márquez, Y., Vilanova, L. (2018). Efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdo. *Revista veterinaria*, 29(1), 13-17.
- Funahashi, H., Sano, T. (2005) Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 C. *Theriogenology*. 9,63(6), 1605-1616
- Gadea J. (2003). Los diluyentes de inseminación artificial porcina, *Spanish Journal of Agricultural Research*.p. 17-27. Disponible en:
- Gadea, J. (2004). El uso del semen porcino congelado, Departamento Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia, revisión disponible en www.um.es/grupo-fisiovet, www.produccion-animal.com.ar
- Gadea, J., Garcia-Vázquez, F., Matas, C., Gardon, I., Canovas, S., Gumbao D. (2005). Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *Journal of Andrology*, (26),396-404.
- Galindo, P. (2012). Biodisponibilidad y efecto antihipertensivo de quercetina. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- Gallardo, P. (2012). Biodisponibilidad y efecto antihipertensivo de quercetina. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- Gambini, J., López-Grueso, R., Olaso-González, G., Inglés, M., Abdelazid, K., El Alami, M., ... Viña, J. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista española de geriatría y gerontología*, 48(2), 79-88.
- Gibb, Z., & Aitken, R. (2016). The impact of sperm metabolism during in vitro storage: The stallion as a model. *BioMed Research International*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/9380609>
- Glover, T. E., & Watson, P. F. (1987). The effects of egg yolk, the low density lipoprotein fraction of egg yolk, and three monosaccharides on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa stored at 5 C. *Animal Reproduction Science*, 13(3), 229-237.

-
- Gonzalez, M., Acosta, M., Williams, S., Crudeli, G. (2004). Inseminación artificial en porcinos: variación en el tiempo y método de entrenamiento en verracos de diferentes edades en el Noroeste Chaqueño. Informe Preliminar. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste.
- González, R. (2010). Valoración de la capacidad de criopreservación espermática del semen porcino mediante técnicas de choque a frío y termoresistencia. Tesis doctoral, 416p. Universidad de León, León, España: <https://buleria.unileon.es/handle/10612/843?show=full>
- Golmohammadi, M. G., Khoshdel, F., & Salimnejad, R . (2021). Protective effect of resveratrol against bisphenol A-induced reproductive toxicity in male mice. *Toxin Reviews*, 41(3), 959–967. <https://doi.org/10.1080/15569543.2021.1965625>
- Greifová, H., Jambor, T., Tokárová, K., Knížatová, N., & Lukáč, N. (2022). In vitro effect of resveratrol supplementation on oxidative balance and intercellular communication of leydig cells subjected to induced oxidative stress. *Folia Biologica*, 70(1), 19–32. https://doi.org/10.3409/fb_70-1.03
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002>
- Gulcin, I. (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.* 86, 345–391
- Guo, H., Gong, Y., He, B., Zhao, R . (2017). Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. *Theriogenology*, 87, 276-283.
- Guthrie, H., Welch, G. (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.
- Guzmán Aldrete, L. (2003). Evaluación de una técnica para la crioconservación del semen porcino.
- Henao, G. (2008). Efecto del antioxidante trolox sobre la integridad de membrana de espermatozoides porcinos congelados. Tesis de grado, 36 pp. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional de Colombia:

http://bdigital.ces.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/486/1/Efecto_antioxidantetrol_ox.pdf

- Hernández, M. (2008). Criopreservación espermática en la especie porcina: variabilidad individual (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia).
- Hernández, P. J. E., Fernández, R. F., & Mejía, R. A. I. (2008). Efecto de la monta natural y el uso de diferentes tipos de semen sobre la productividad de la cerda. *Revista de Salud Animal*, 30(2), 98-102.
- Hicks, J. (2001) Bioquímica Especial. Parte V. En: Bioquímica. 2da Ed. McGraw- Hill. México: 900. <http://www.agrodigital.com/upload/gadea%20sjar2003-espa%C3%B1ol.pdf>
- Hicks, J., Torres-Ramos, Sierra-Vargas, M. (2006). Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y nutrición*, 14(4), 223-226.
- Higueruela, L. (2016). Efecto Cardioprotector del Resveratrol. Mecanismos Implicados.
- Holthoff, J., Woodling, K., Doerge, D., Burns, S., Hinson, J., Mayeux, P. (2010). Resveratrol, a dietary polyphenolic phytoalexin, is a functional scavenger of peroxynitrite. *Biochemical pharmacology*, 80(8), 1260-1265.
- Hu, J., Li, Q., Chen, X., Zhang, S., Wang, L. (2006). The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 19(4), 486-494.
- Hu, J., Li, Q., Zan, L., Jiang, Z., An, J., Wang, L., Jia, Y. (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing–thawing. *Animal reproduction science*, 117(1-2), 11-17.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Hussein, M., Mahfouz, M. (2016). Effect of resveratrol and rosuvastatin on experimental diabetic nephropathy in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 685-692.

- Hyang, J., Fujimoto, K., Miyazawa, T. (2000). Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J. Nutr*, 130: 3028 – 3033.
- Jia, Z., Zhu, H., Misra, B., Mahaney, J., Li, Y., Misra, H. (2008) EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. *Mol. Cell. Biochem.* 313, 187–194.
- Jiang, Z., Li, Q., Hu, J., Li, W., Zhao, H., Zhang, S. (2007).Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low-density lipoprotein in diluents. *Cryobiology*, 54(3), 301-304.
- Jiménez-Aguilar, E., Quezada-Casasola, A., Prieto-Caraveo, M., Orozco-Lucero, E., Itzá-Ortiz, M., & Carrera-Chávez, J. (2021). Evaluación de la adición de quercetina y vitamina e al medio de criopreservación de semen ovino sobre la fertilidad in vivo. *Abanico Veterinario*, (11), 1–14. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.36>
- Jofré, I. (2019). Análisis metabólico y funcional de un extracto acuoso de *Ugni molinae* Turcz. sobre espermatozoides refrigerados de cerdo. Chile: Universidad de la frontera
- Johinke, D., De Graaf, S., Bathgate, R . (2014). Quercetin reduces the in vitro production of H₂O₂ during chilled storage of rabbit spermatozoa. *Animal reproduction science*, 151(3-4), 208-219.
- Johnson, L., Weitze, K., Fiser,P., Maxwell, W. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62:143-172
- Juan, M., Gonzalez-Pons, E., Munuera, T., Ballester, J., Rodriguez-Gil, J., Planas, J. (2005). trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J. Nutr.*, 135(4), 757-760.
- Juárez, J. (2009). Efecto de la velocidad de crecimiento en la congelabilidad de los espermatozoides en porcino. [Online]. Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/14361/TesinaMaster_JorgeJuarez.pdf?sequence=1

- Khanduja, K. L., Verma, A., & Bhardwaj, A. (2001). Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. *Andrología*, 33(5), 277–281. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2001.00432.x>
- Kirchhoff, C. (1998). Molecular characterization of epididymal proteins. *Reviews of Reproduction*, 3: 86 – 95.
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K., Bardoloi, R., Das, A., Kumar, S., Naskar, S. (2009). Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *A. Reprod. Science*. 110: 162–171.
- L. Amirat, D. Tainturier, L., Jeanneau, C., Thorin, O., Gerard, J., Courtens, M., Anton. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender *Theriogenology*, 61, 895
- Lanconi, R., Celeghini, E., Bianchi-Alves, M., Santos, G., Florez-Rodriguez, S., Leite, T., & Arruda, resveratrol. (2015). Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved equine sperm. *Anim Reprod*, 12(3), 555–559.
- Leahy, T., Gadella, B. (2011). Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. *Reprod Domest Anim* 46(Suppl 2), 7–13.
- León, C. (2006). Elaboración de diluyente de semen porcino. Tesis de Licenciatura. QUITO/EPN/2006.
- Lodi, F., Jiménez, R., Menendez, C., Needs, P., Duarte, J., Perez-Vizcaino, F. (2008). Glucuronidated metabolites of the flavonoid quercetin do not auto-oxidise, do not generate free radicals and do not decrease nitric oxide bioavailability. *Planta médica*, 74(07), 741-746
- Longobardi, V., Zullo, G., Salzano, A., De Canditiis, C., Cammarano, A., De Luise, L., Puzio, M. V., Neglia, G., & Gasparrini, B. (2017). Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*, 88, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.046>

-
- Lopez-Lopez, G., Moreno, L., Cogolludo, A., Galisteo, M., Ibarra, M., Duarte, J., ...Perez-Vizcaino, F. (2004). Nitric oxide (NO) scavenging and NO protecting effects of quercetin and their biological significance in vascular smooth muscle. *Molecular pharmacology*, 65(4), 851-859.
- Lucas-Abellán, C., Mercader-Ros, M. T., Zafrilla, M. P., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2011). Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1255-1260.
- Maalik, A., Khan, F., Mumtaz, A., Mehmood, A., Azhar, S., Atif, M., ... Tariq, I. (2014). Pharmacological applications of quercetin and its derivatives: a short review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1561-1566.
- MADR. (2011). *Minagricultura Radica Proyecto de Ley que Crea el "Sistema Nacional de Identificación Información y Trazabilidad Animal"*. Bogotá, Colombia. Boletín de Prensa No. 135. Pp. 4. (2011).
- Mahal, H., Mukherjee, T. (2006) Scavenging of reactive oxygen radicals by resveratrol: antioxidant effect. *Res. Chem. Intermed.* 32, 59–71.
- Marin-Guzman, J., Mahan, D., Whitmoyer, R. (2000). Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *Journal of Animal Science*, 78(6), 1544-1550.
- Martin, W., Augustyniak, J., Cook, W. (1964). Fractionation and characterization of the low-density lipoproteins of hen's egg yolk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Lipids and Related Subjects*, 84(6), 714-720.
- Martin-Hidalgo, D., de Llera, A., Henning, H., Wallner, U., Waberski, D., Bragado, M., Garcia-Marin, L. (2013). The effect of resveratrol on the quality of extended boar semen during storage at 17° C. *Journal of Agricultural Science*, 5(8), 231.

- Martinez-Pastor, F., Johannisson, A., Gil, J., Kaabi, M., Anel, L., Paz, P., & Rodriguez-Martinez, H. (2004). Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed Ram Semen. *Animal Reproduction Science*, *84*(1-2), 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.006>
- Matás, C., García, F., Sansegundo, M., Coy, J., Ruiz, S. (2007). Estudio de la capacitación espermática in vitro en espermatozoides eyaculados y epididimarios. ITEA información técnica económica agraria, *28*, 30-32.
- Materska, M. (2008). Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity-a review. *Polish journal of food and nutrition sciences*, *58*(4).
- McNiven, M. A., & Richardson, G. F. (2006). Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preservation Technology*, *4*(3), 169–177. <https://doi.org/10.1089/cpt.2006.4.169>
- Medrano, A. (2005). Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación del semen refrigerado. Tesis doctoral, 257pp, Universidad Autonoma de Barcelona: <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2005/tdx-0627106-150205/aamd1de1.pdf>
- Mejía Mejía, A. M. (2010). Efecto de la concentración espermática de semen porcino sobre sus características post-descongelamiento. Facultad de Ciencias
- Membrillo, A., Córdova, A., Hicks, J., Olivares-Corichi, I., Martínez, V., Valencia, J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, *28*(12), 699-704.
- Mendoza-Sánchez, J., Arenas-Ríos, E., Chávez-Zamora, J., León-Galván, M., & Rodríguez-Tobón, A. (2020). Participación de los canales de Ca²⁺ en la capacitación espermática. *Revista Iberoamericana De Ciencias*, *7*(3), 51–58.
- Mercado, E. (2011). Caracterización de la congelabilidad y mejora de los diluyentes de crioconservación espermática en porcino ibérico. E-Prints Complutense; Tesis de

posgrado, pp 245; Universidad Computense de Madrid:
<http://eprints.ucm.es/14442/1/T33326.pdf>

Merino, O., Figueroa, E., Cheuquemán, C., Valdebenito, I., Isachenko, V., Isachenko, E., ... Risopatrón, J. (2017). Short-term storage of salmonids semen in a sodium alginate-based extender. *Andrologia*, 49(5), e12661.

Minotti, G., Aust, S. (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lip.* 44: 199-208.

Minotti, G., Aust, S. (1992). Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, 27(3), 219-226.

Moreno-Irusta, A., Dominguez, E. M., Marín-Briggiler, C. I., Matamoros-Volante, A., Lucchesi, O., Tomes, C. N., Treviño, C. L., Buffone, M. G., Lascano, R., Losinno, L., & Giojalas, L. C. (2020). Reactive oxygen species are involved in the signaling of equine sperm chemotaxis. *Reproduction*, 159(4), 423–436. <https://doi.org/10.1530/rep-19-0480>

Moretti, E., Mazzi, L., Terzuoli, G. (2012). Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod. Toxicol.*, v.34, p.651-657.

Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695-1706.

Murase, T., Imaeda, N., Yamada, H., & Miyazawa, K. (2007). Seasonal changes in semen characteristics, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore A23187 in Large White boars. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4), 853-865.

Nair, S. J., Brar, A. S., Ahuja, C. S., Sangha, S. P. S., & Chaudhary, K. C. (2006). A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Animal Reproduction Science*, 96(1-2), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.11.002>

Najafi, A., Daghigh, H., Mohammadi, H., Najafib, H., Zanganehb, Z., Sharafib, M., Martinez, F., Adeldust, H. (2014). Different concentrations of cysteamine ergothioneine improve

- microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology*, 69:68-73.
- Olguín, G., Meléndez, G., Zúñiga, A., Pasquetti, A. (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de endocrinología y nutrición*, 12(4), 199-206.
- Ourique, G. M., Finamor, I. A., Saccol, E. M. H., Riffel, A. P. K., Pês, T. S., Gutierrez, K., Gonçalves, P. B. D., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., & Barreto, K. P. (2013). Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reproductive Toxicology*, 37, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.01.006>
- Ozgová, Š., Heřmánek, J., Gut, I. (2003). Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate-and Fe-microsomal systems. *Biochemical pharmacology*, 66(7), 1127-1137.
- Pace, M., Graham, E. (1974). Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing *J Anim Sci*, 39 . 1144-1149
- Pedraza, J., Cárdenas Rodríguez, N. (2018). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes. Aspectos básicos. *Educación química*, 17(2), 164-173.
- Peña, F., Saravia F., Núñez I., Johannisson A., Wallgren M., Rodriguez H. (2006). ¿Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?. *Animal Reproduction Science*, 93, 101–113.
- Perry, R. (1996). Limitantes al mejoramiento de la productividad y de la competitividad en la cadena de fabricación de alimentos balanceados para animales (No. D-0825). FONADE.
- Pillet, E., Duchamp, G., Batellier, F., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Magistrini, M. (2011). Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 75(1), 105-114.
- Pipan, M., Mrkun, J., Svete, A., Zrimšek, P. (2017). Improvement of liquid stored boar semen quality by removing low molecular weight proteins and supplementation with α -tocopherol. *Animal reproduction science*, 186, 52-61.

-
- Prior, R . L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Restrepo, G., Montoya, J., Rojano, B. (2016). Capacidad antioxidante y calidad post-descongelación del semen equino criopreservado con quercetina y ergotioneina. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 63(3), 167-178.
- Restrepo, G., Usuga, A., Montoya, J., Celis, Á., Henao, A. (2014). Evaluación de dos diluyentes para la criopreservación de semen de caballos de la raza criollo colombiano. *Revista Lasallista de investigación*, 11(2), 63-70.
- Rodríguez-Rolón, E. G. (2020). Evaluación de dos diluyentes alternativos para la preservación de semen porcino refrigerado en el trópico bajo colombiano.
- Romero, M., Jiménez, R ., Sánchez, M., López-Sepúlveda, R ., Zarzuelo, M., O'Valle, F., ... Duarte, J. (2009). Quercetin inhibits vascular superoxide production induced by endothelin-1: Role of NADPH oxidase, uncoupled eNOS and PKC. *Atherosclerosis*, 202(1), 58-67.
- Rueda, M. (2011). Diluyentes para la conservación de semen porcino. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 19-26. Disponible en: http://www.iip.co.cu/R CPP/181/181_02artresMRueda.pdf
- Rueda, M., Perdigón, R., Arias, T., Mendoza, D., Benítez, J., Lemus, S.,(2009). Diluyentes Cubanos de semen porcino. *Revista Computarizada de Producción Porcina*. 26-29. Disponible en:http://www.iip.co.cu/R CPP/161/161_03artMRueda.pdf
- Rueda, M., Perdigón, R ., Arias, T., Mendoza, D., Benítez, J., Lemus-Flores, C., Tosar, M. (2009). Optimización de la conservación del semen porcino con el diluyente cubano dicip.
- Rugeles-Pinto, Clara; Caicedo-Toro, Ramiro; Almentero-Suárez, Carlos; Linares-Arias, Juan., Vergara, Oscar. (2013). Viabilidad de semen porcino refrigerado con diluyente MRA®. *Nota técnica Revista Científica*, vol. XXIII, núm. 3, mayo-junio. 206-210 Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela
- Ruiz, M.,(2013). La porcicultura en Argentina, a traves de la historia de una empresa exitosa. 2,3.

- Ryan, T., Aust, S. (1992). The role of iron in oxygen mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.* 22: 119–141.
- Saezet, F., Motta C., Boucher, D. Grizard, G. (1998). Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. *Molecular Human Reproduction.* 4(7): 667–672.
- Sánchez R ., A., & Zamora D., P. (2016). Efecto del Medio Hipoosmótico sobre la vitalidad espermática en semen canino. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 27(2), 288. <https://doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11649>
- Santaella, J., Pintus, E. (2017). Uso del extracto de rooibos (*Aspalathus linearis*) para la conservación del semen porcino. *Suis*, (143), 14-18.
- Saravia, F., Wallgren, M., Nagy, S., Johannisson, A., Rodríguez, H. (2005). Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, 63,1320-1333.
- Sarlós, P., Molnár, A., Kókai, M. (2002). Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet. Hung.*, v.50, p.235-45,
- Satorre, M., Breininger, E., Beconi, M., Beorlegui, N. (2007). α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, 68(7), 958-965.
- Schmidt, H., Kamp, G. (2004). Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128, 171–179.
- Seifi-Jamadi, A., Kohram, H., Shahneh, A., Ansari, M., Macías-García, B. (2016). Quercetin ameliorate motility in frozen-thawed Turkmen stallions sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 45, 73-7
- Sellés, S. (2001). Estudio de diferentes factores que afectan a la calidad y capacidad fecundante de los espermatozoides crioconservados en la especie porcina. Cátedra de fisiología animal (Doctoral dissertation, Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Departamento de biología animal, Universidad de Murcia, España).

-
- Shang, Y.-J., Qian, Y.-P., Liu, X.-D., Dai, F., Shang, X.-L., Jia, W.-Q., Liu, Q., Fang, J.-G., Zhou, B. (2009) Radical-scavenging activity and mechanism of resveratrol-oriented analogues: Influence of the solvent, radical, and substitution. *J. Org. Chem.* 74, 5025–5031.
- Shier, W. T. (1979). Activation of high levels of endogenous phospholipase A2 in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 195–199. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.195>
- Si, Y., & Okuno, M. (1999). Regulation of microtubule sliding by a 36-KDA phosphoprotein in hamster sperm flagella. *Molecular Reproduction and Development*, 52(3), 328–334. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199903\)52:3<328::aid-mrd11>3.0.co;2-n](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199903)52:3<328::aid-mrd11>3.0.co;2-n)
- Silva, E., Arruda, L., Silva, S., Souza, H., Guerra, M. (2016). High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68, 1237-1243.
- Snoeck, P., Moura, L., Silva, M., Machado-Neves, M., Melo, M., Heneine, L., & Henry, M. (2017). Effect of storage conditions on the LDL effectiveness in ovine sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 75, 88–90. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.01.007>
- Stivala, L., Savio, M., Carafoli, F., Perucca, P., Bianchi, L., Maga, G., ... Vannini, V. (2001). Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22586-22594.
- Sueishi, Y., Hori, M. (2013). Nitric oxide scavenging rates of solubilized resveratrol and flavonoids. *Nitric Oxide*, 29, 25-29.
- Tamer, M., Ashok, A., Rakesh, K., Anthony, J., Sikka, C. (2005). Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertility and Sterility*. 83:95–103.
- Tatone, C., Di Emidio, G., Vento, M., Ciriminna, R., Artini, P. (2010). Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol*. 26:563-567

- Taylor, K., Roberts, P., Sanders, K., & Burton, P. (2009). Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(2), 184–189. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60254-4](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60254-4)
- Tejerina, F.; Buranaamnuay K.; Saravia, F.; Wallgren, M.,Rodriguez-Martinez, H. (2008). Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology*. 69: 1129–1138.
- Tironi, S., Gomes, D.,Martinez, A. (2017). Capacidade antioxidante da quercetina na qualidade seminal de bovinos. *Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública*, 4, 089-094.
- Torres, J., Sierra, R . (2006). Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 14(4), 223-226
- Torres, P., Fischman, M., Acerbo, M., Garcia, C., Miguez, M., Dominguez, J. (2014). Análisis de diluyentes comerciales de semen porcino refrigerado durante 4 días. [Online]. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/azoo/v63n243/nota2.pdf>
- Trisini, T., Narendra, B., Singh, P., Susan, M. Duty., Russ, H. (2004). Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertility and Sterility*. 82: 1623 – 32.
- Truong, V., Jun, M., Jeong, W. (2018). Role of resveratrol in regulation of cellular defense systems against oxidative stress. *Biofactors*, 44(1), 36-49.
- Tuncer, P., Bucak, M., Büyükleblebici, S., Sariözkan, S., Yeni, D., Eken, A., Gündoğan, M. (2010). The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*, 61(3), 303-307.
- Tvrda, E., Tušimová, E., Kováčik, A., Paál, D., Libová, L., & Lukáč, N. (2016). Protective effects of quercetin on selected oxidative biomarkers in bovine spermatozoa subjected to ferrous ascorbate. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 524–537. <https://doi.org/10.1111/rda.12714>
- USDA, E. (2017). Food access research atlas.

- Vadnais ML, Althouse GC, (2011). Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology* 76, 1508–1516.
- Valencia, E. (2006). Elaboración de diluyentes de semen porcino. [Online]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/2640>
- Varela, E., Rojano, B. A., & Restrepo, G. (2019). Efecto de las lipoproteínas de baja densidad y la trehalosa sobre la actividad enzimática antioxidante del semen bovino criopreservado. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(1), 256–264. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15680>
- Vasco, D., Hernández Meroño, M., Vásquez, J., Martínez, E., Roca, J. (noviembre de 2007). Sustancias reactivas al oxígeno (ROS) en semen congelado-descongelado de Porcino. Recuperado el 10 de octubre de (2016), de: www.uteq.edu.ec:ttp://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_articulo5.pdf
- Venereo, G. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes. *Rev cubana Med Milit.* 31(2): 126-33.
- Vila-Flórez, C. (2021). *Índice de Competitividad del Sector Porcícola en Colombia* (tesis). Colegio de Estudios Superiores de Administración CESA, Bogotá D.C.
- Vizzari, F., Massányi, M., Knížatová, N., Corino, C., Rossi, R., Ondruška, L., Tirpák, F., Halo, M., & Massányi, P. (2021). Effects of dietary plant polyphenols and seaweed extract mixture on male-rabbit semen: Quality traits and antioxidant markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 1017–1025. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.043>
- Walczak–Jedrzejowska, R., Wolski, J. K., & Slowikowska–Hilczner, J. (2013). The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, 65, 60–67. <https://doi.org/10.5173/cej.2013.01.art19>
- Watson, P. F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 C by egg-yolk lipoprotein. *Reproduction*, 62(2), 483-492.
- Watson, P., & Behan, J. (2002). Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, 57(6), 1683-1693.

- Watson, P., & Martin I. (1975). The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C Aust J Biol Sci, 28. 145152
- Williams, S. (2013). Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas., de Rev. bras. reprod. anim, 37(2), pp 207-212, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, Recuperado el 18 de diciembre de 2015: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag207-212%20\(RB474\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag207-212%20(RB474).pdf)
- Yeste, M. (2015). Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. *Reproduction in Domestic Animals*, Vol 50(2), pp71- 79. Recuperado el 16 de Diciembre de 2015, de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/261749>
- Zakošek, M., Mrkun, J., Nemeč, A., Zrimšek, P. (2017). Improvement of liquid stored boar semen quality by removing low molecular weight proteins and supplementation with α -tocopherol. *Animal reproduction science*, 186, 52-61.
- Zorrilla, G. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev. Cubana. Invest. Biomed.* 21(3): 178-185.
- Zubair, M., Ahmad, M., & Jamil, H. (2015). Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test. *Andrologia*, 47(7), 744-750