

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

**“EFECTO DEL USO DE LA C-FICOCIANINA, COMO AGENTE ANTIOXIDANTE, DURANTE EL
ALMACENAMIENTO DE ESPERMATOZOIDE DE CERDO (*SUS SCROFA*), EN UN DILUYENTE
DECORTA DURACIÓN, A UNA TEMPERATURA DE 16°C.”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

MVZ. MARÍA ISABELLA BERBER ARANDA

2203801649

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Edith Arenas Ríos

JURADO:

Presidente:

Dr. Ernesto Rodríguez Tobón

Secretario:

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Vocal:

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana.

Vocal:

M. en C. Pedro Cuapio Padilla.

Iztapalapa, Ciudad de México a 12 de junio de 2023

helio180@hotmail.com

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 25 de mayo de 2023

Comisión Académica del Posgrado

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

Presente

La que suscribe María Isabella Berber Aranda alumna con número de matrícula 2203801649, del posgrado Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "Efecto del uso de la C-Ficocianina, como agente antioxidante, durante el almacenamiento de espermatozoide de cerdo (*Sus scrofa*), en un diluyente de corta duración, a una temperatura de 16°C" a desarrollar en la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



MVZ María Isabella Berber Aranda

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe **María Isabella Berber Aranda**, alumna del posgrado en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autora de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **Efecto del uso de la C-Ficocianina, como agente antioxidante, durante el almacenamiento de espermatozoide de cerdo (*Sus scrofa*), en un diluyente de corta duración, a una temperatura de 16°C.**

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 25 de mayo de 2023.

Atentamente



MVZ María Isabella Berber Aranda

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Edith Arenas Ríos

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Correo electrónico: editharenas2000@yahoo.com.mx

ASESORES

Dr. Ernesto Rodríguez Tobón.

Departamento de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Correo electrónico: rotoern@xanum.uam.mx

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Correo electrónico: avalosr@correo.xoc.uam.mx

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dr. Ernesto Rodríguez Tobón.

Departamento de Biología de la Reproducción.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Correo electrónico: rotoern@xanum.uam.mx

Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez

Departamento de Producción Agrícola y Animal.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Correo electrónico: avalosr@correo.xoc.uam.mx

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Correo electrónico: reyna@xanum.uam.mx

M. en C. Pedro Cuapio Padilla

Responsable del Laboratorio de Andrología, Banco de Semen, Calidad e
Investigación, Hisparep.

Clínica de Reproducción Asistida del Hospital Español.

Correo electrónico: cuapiopp@yahoo.com.mx

Este proyecto se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Morfofisiología y Bioquímica del Espermatozoide del Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

El programa de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad. Programa 003797 del CONACyT. Número de CVU 370054.

Los miembros del jurado designado por la Comisión Académica de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “Efecto del uso de la C-Ficocianina, como agente antioxidante, durante el almacenamiento de espermatozoide de cerdo (*Sus scrofa*), en un diluyente de corta duración, a una temperatura de 16°C”, que presentó la MVZ María Isabella Berber Aranda.

MIEMBROS DEL JURADO

FIRMA

Dr. Ernesto Rodríguez Tobón.



Dr. Alejandro Ávalos Rodríguez



Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana.



M. en C. Pedro Cuapio Padilla.



INDICE

I.	Glosario	10
II.	Resumen	12
III.	Abstract	13
IV.	Introducción	14
	a. Radicales Libres y Estrés Oxidante	16
	b. Antioxidantes	17
	c. C-Ficocianina	21
	d. Diluyentes	22
V.	Antecedentes	25
VI.	Justificación	29
VII.	Pregunta de Investigación	30
VIII.	Hipótesis	30
IX.	Objetivo General	30
X.	Objetivos Particulares	30
XI.	Diseño Experimental	31
XII.	Material y Métodos	31
	a. Calidad Espermática	32
	b. Fisiología Espermática	33
XIII.	Análisis Estadístico	35
XIV.	Resultados y Discusión	36
XV.	Conclusiones	55

XVI. Perspectivas	55
XVII. Bibliografía	56

I. GLOSARIO

ADN – Ácido Desoxirribonucleico.

AMPC – Monofosfato Cíclico de Adenosina.

ATP – Trifosfato de Adenosina.

CAT – Catalasa.

CTC – Clortetraciclina.

DCFH-DA – Diacetato de Diclorofluoresceína.

ERO – Especies Reactivas de Oxígeno.

Fd – Ferredoxina.

FLPA – Fosfolipasa A.

GDH – Glutamato Deshidrogenasa.

GGT – Gamma Glutamil Transferasa.

GPx – Glutación Peroxidasa.

GR – Glutación Reductasa.

GSH – Glutación Reducido.

GSSG – Disulfuro de Glutación.

GST – Glutación S-Transferasa.

H₂O₂ – Peróxido de Hidrógeno.

IA – Inseminación Artificial.

IAA – Inseminación Artificial Intrauterina.

IAC – Inseminación Artificial Cervical.

IDH₂ – Isocitrato Deshidrogenasa.

ME – Enzima Máfica.

MnSOD Superóxido Dismutasa de Manganeso.

MTG – MitoTracker® Green.

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato.

NNT – Nicotinamida Nucleótido Transhidrogenasa.

NOX5 – NADPH Oxidasa 5.

O₂⁻ – Anión Superóxido.

OH• - Radical Hidroxilo

PcyA – Ferredoxina Oxidorreductasa.

PKA – Proteína Cinasa A.

PKC – Proteína Cinasa C.

PKT – Proteína Tirosina Cinasa.

PMM – Potencial de Membrana Mitocondrial.

PON-1 – Para-Oxonasa Tipo 1.

PRDX – Peroxiredoxina.

PRx – Sistema peroxiredoxina.

SOD – Superóxido Dismutasa.

TRD – Tioredoxina Reductasa.

TRX – Tioredoxina.

TRxR – Sistema Tioredoxina.

II. RESUMEN

El balance de especies reactivas de oxígeno (ERO) es un proceso fundamental para que el espermatozoide adquiera su capacidad fecundante, sin embargo, es común que las ERO se produzcan durante el manejo de la célula para las distintas técnicas de reproducción asistida, lo cual puede resultar contraproducente. Debido a lo anterior, los medios utilizados para la conservación del espermatozoide, mejor conocidos como diluyentes, son suplementados con antioxidantes como la C- Ficocianina, para hacer frente a los efectos causados por una excesiva producción de ERO.

Por tal motivo, se evaluaron diferentes concentraciones de C-Ficocianina, como agente antioxidante, evaluando su efecto en la calidad (movilidad, vitalidad y daño al ADN) y fisiología espermática (potencial de membrana mitocondrial, ERO, capacitación espermática y reacción acrosomal). Para lo cual, se hicieron diferentes concentraciones (0, 138, 150 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), evaluándose a las 0, 24, 48 y 72 horas de almacenamiento en un diluyente de corta duración a 16°C; encontrando que la movilidad total aumentó a las 24 horas de almacenamiento con 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de concentración y a las 24 y 48 horas de almacenamiento con 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esto en comparación con el control a esos mismos tiempos ($p < 0.05$), para los demás tiempos y concentraciones, las pruebas estadísticas no muestran diferencia significativa; así mismo en concentraciones de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, al tiempo de almacenamiento inicial (0 horas), así como a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y a 48 horas de almacenamiento, aumentó el número de células con reacción acrosomal, respecto al control ($p < 0.05$). En cuanto a la vitalidad, integridad del ADN, potencial de membrana mitocondrial, ERO, capacitación espermática y reacción acrosomal, no se encontraron diferencias significativas. Por lo anterior, se puede decir que la C- Ficocianina mejora la movilidad total a las 24 horas de almacenamiento a 16°C con 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de concentración y a las 24 y 48 horas con 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$; del mismo modo, mejora la reacción acrosomal en concentraciones de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, al tiempo de almacenamiento inicial (0 horas) y a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a las 48 horas de almacenamiento a 16°C.

III. ABSTRACT

The balance of reactive oxygen species (ROS) is a fundamental process for the sperm to acquire its fertilizing capacity; however, it is common for ROS to occur during cell handling for different assisted reproductive techniques, which can be counterproductive. Due to the above, the media used for sperm preservation, better known as extenders, are supplemented with antioxidants such as C-Phycocyanin, to deal with the effects caused by excessive ROS production.

For this reason, different concentrations of C-Phycocyanin, as an antioxidant agent, were evaluated, evaluating its effect on quality (motility, vitality and DNA damage) and sperm physiology (mitochondrial membrane potential, ROS, sperm capacitation and acrosomal reaction). For which, different concentrations were made (0, 138, 150 and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$), being evaluated at 0, 24, 48 and 72 hours of storage in a short-term diluent at 16°C; finding that the total mobility increased at 24 hours of storage with 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of concentration and at 24 and 48 hours of storage with 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$, this in comparison with the control at those same times ($p < 0.05$), for the other times and concentrations, the statistical tests do not show a significant difference; Likewise, in concentrations of 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, at the initial storage time (0 hours), as well as at 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 48 hours of storage, the number of cells increased with acrosomal reaction, compared to the control ($p < 0.05$). Regarding vitality, DNA integrity, mitochondrial membrane potential, ROS, sperm capacitation and acrosomal reaction, no significant differences were found. Due to the above, it can be said that C-Phycocyanin improves total mobility after 24 hours of storage at 16°C with a concentration of 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and at 24 and 48 hours with 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$; in the same way, it improves the acrosomal reaction in concentrations of 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, at the initial storage time (0 hours) and at 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ after 48 hours of storage at 16° c.

IV. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es un proceso biotecnológico de reproducción animal asistida, que involucra la colección de semen de animales con características zootécnicas deseables, su procesamiento [1, 2] y conservación [3] de acuerdo con las necesidades del productor para posteriormente ser depositado en el aparato reproductor de la hembra; para la fecundación del ovocito [1].

En la reproducción porcina, la IA es ampliamente utilizada a nivel mundial y mantiene la salud de la piara, evitando la introducción de enfermedades, y a su vez favoreciendo el mejoramiento genético de la misma [4]. La IA ha alcanzado un alto grado de eficiencia en la mayoría de los principales países productores de carne de cerdo [4], siendo China el primer lugar en producción de esta proteína animal con un total de 55 millones de toneladas, seguido de Estados Unidos con 11 millones de toneladas y, en tercer lugar, Alemania con 6 millones de toneladas [5]. Ahora bien, México se encuentra, a nivel mundial, en el décimo tercer lugar a nivel mundial de los países productores de este producto con una producción de 250 mil toneladas [6] y en donde los principales productores de carne de cerdo a nivel nacional son: Jalisco, con 380,076 toneladas; Sonora, con 311,006 toneladas y Puebla, con 181,660 toneladas [6].

Actualmente, las técnicas de IA más utilizadas en la industria porcina son, la inseminación artificial cervical (IAC) y la inseminación artificial intrauterina (IAI), también conocida como inseminación artificial post-cervical [7]; el uso de la IAI permite utilizar dosis de inseminación con una menor cantidad tanto de volumen (40-50 mL), así como de espermatozoides (1-2 billones de células), situación contraria en la IAC (70-100 mL, con 1.3-4 billones de células espermáticas) [8, 9]; cabe señalar que la ventaja antes señalada de la IAI en comparación con la IAC, no altera la eficiencia reproductiva en la cerda [7-9].

Un componente clave involucrado en la IA, es la evaluación del macho, esta tiene como finalidad determinar el desarrollo estructural normal del cerdo, su conducta y potencial para la reproducción; del mismo modo, se debe llevar a cabo un examen macroscópico y microscópico del semen, con el objetivo de evaluar la calidad del mismo, para posteriormente procesarlo de manera adecuada y poder ser almacenado a corto,

mediano o largo plazo [10, 11].

Durante el procesamiento del semen, las células espermáticas deben ser diluidas en un medio apropiado a fin de prolongar su viabilidad y tiempo de almacenamiento, por lo que, el uso de diluyentes ayuda a mantener la integridad y la capacidad fecundante del espermatozoide hasta que se lleve a cabo la IA [12]; sin embargo, durante este procesamiento el espermatozoide está expuesto a condiciones oxidantes, tales como: luz, incremento de concentración de oxígeno, cambios en el pH, temperatura, proceso de dilución y condiciones de almacenamiento [13, 14], lo que puede dañar la integridad de la célula.

Respecto a lo anteriormente mencionado, en el espermatozoide, la causa principal de daño son las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) producidas a partir del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que se genera a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial [15-19]. Bajo condiciones normales, estas ERO son controladas por los antioxidantes que mantienen el balance óptimo en el espermatozoide, en donde la superóxido dismutasa (SOD), convierte el $O_2^{\cdot-}$ en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y, posteriormente, a través de la catalasa y glutatión peroxidasa, se transforma en agua y oxígeno, que son moléculas más estables [16, 19].

Por lo tanto, la suplementación con antioxidantes es considerada una estrategia para hacer frente a los efectos causados por una excesiva producción de las ERO durante el manejo del espermatozoide y de esta manera mejorar su integridad estructural y funcional, minimizando el daño a proteínas, lípidos y ADN [20-22].

Diversos grupos de antioxidantes, tales como la melatonina [22], el butilhidroxitolueno [22], la C-Ficocianina [23-25], el α -tocoferol [21], el ácido ascórbico [26], proantocianidinas [27], cisteína [28], ácido rosmarínico [29], extracto de espirulina [30] y el ácido salviánico [31]; han mostrado buenos efectos contra las ERO, resultando en un mejoramiento de la viabilidad, movilidad, integridad del acrosoma y de la membrana plasmática, así como en la capacidad fecundante del espermatozoide.

a. Radicales Libres y Estrés Oxidante.

Alrededor del núcleo de los átomos, se encuentran los electrones en regiones llamadas orbitales y cada orbital puede contener un máximo de dos electrones, en donde uno de los electrones está estabilizando el campo magnético del otro mediante sus giros (*spin*) opuestos, de esta manera se da estabilidad a los átomos y moléculas [18, 32], cuando los electrones están en pares se suele decir que están apareados [18, 32].

Ahora bien, cuando un electrón no está siendo neutralizado por otro electrón, ya sea porque hay un solo electrón en el orbital [16, 18, 33] o porque tienen giros opuestos [18], se dice que se encuentran desapareados y en este caso el átomo o molécula recibe el nombre de radical libre [18].

Debido a lo anterior y para que un radical libre logre su estabilidad, éste puede donar su electrón a otra molécula o puede tomar un electrón de otra molécula para formar un par electrónico, de esta manera logra su neutralidad y deja de ser radical libre [32,34].

Sin embargo, cuando los radicales libres no se estabilizan, tienden a generar reacciones en cadena o a reaccionar con otros radicales [18]. En el primer caso, un radical toma o dona un electrón de otra molécula, de tal manera que la molécula receptora o donadora, se transforma en un radical libre, es decir, un radical genera otro radical y así sucesivamente [18, 32, 34]; en el segundo caso, ambos radicales que reaccionan anulan entre sí su campo magnético [18].

Ahora bien, las ERO incluyen radicales libres y moléculas derivadas del oxígeno que tienen alta capacidad reactiva [19]. Pueden ser producidos por vía endógena (a través de las mitocondrias, peroxisomas y procesos inflamatorios) o por vía exógena (a través de rayos ultravioleta o radiación ionizante) [14]. Las ERO incluyen al radical hidroxilo (OH^*) y el O_2^- , así como el H_2O_2 [14, 19].

En condiciones de homeostasis, las ERO participan en señalizaciones celulares, por ejemplo: expresión de genes, fosforilación de proteínas, síntesis de ADN y proliferación celular [35]; en el caso del espermatozoide tienen efectos sobre la maduración [36], hiperactivación [36, 37], capacitación [16, 36-38], reacción acrosomal [36, 37] y fusión del espermatozoide con el ovocito [36, 39].

Cuando la producción excesiva de ERO sobrepasa la capacidad antioxidante, se pierde la homeostasis y entonces se presenta el estrés oxidante [14, 19, 32, 40, 41]. Este proceso puede dañar macromoléculas, tales como: lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos [33] y provocar la pérdida de la integridad de la membrana celular por peroxidación lipídica, esto se debe a que la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo contiene gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados (presencia de dobles enlaces) [42, 43], los cuales son susceptibles al daño oxidante provocado por las ERO [39], pudiendo causar en la célula un incremento en la permeabilidad [19], así como pérdida en la fluidez y daño en los procesos de transporte [39].

Otro daño que pueden generar estas moléculas, es la inactivación enzimática [33] y daño al ADN (daño oxidante en sus bases nitrogenadas, fragmentación o ruptura de la cadena y rearreglo cromosómico) [18, 19].

Ahora bien, debido al daño que se presenta en la membrana, algunos procesos pueden verse afectados, como la capacitación, la reacción acrosomal y la fusión del espermatozoide con el ovocito [18]; alterando la funcionalidad del espermatozoide, por ejemplo, en la movilidad [18, 19, 40] y la viabilidad [40]. Adicionalmente, el aumento en la producción de las ERO, puede llegar a ser uno de los principales factores de infertilidad en el hombre [19, 40, 41].

b. Antioxidantes.

Para poder mantener a las ERO dentro de niveles que no afecten la funcionalidad celular, los organismos han desarrollado mecanismos antioxidantes [32], éstos tienen la capacidad de minimizar el daño que causan las ERO a las proteínas, lípidos y ADN [21, 22].

Los antioxidantes son de dos tipos: enzimáticos y no enzimáticos [32]. Los enzimáticos comprenden a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión S-transferasa (GST), la peroxiredoxina (PRDX), la tioredoxina (TRX) y la tioredoxina reductasa (TRD) [13, 21,44]; mientras que los no enzimáticos son glutatión reducido (GSH), coenzima Q10, vitamina C, vitamina E,

polifenoles, carnitina, uratos, albumina, taurina e hipotaurina [13, 44, 45]

El sistema primario de defensa, está a cargo de las enzimas antioxidantes: SOD, CAT y GPX [45, 46], cabe señalar que la enzima CAT se encuentra disminuida en la célula espermática de cerdo [45-47]. Esta disminución es compensada con una mayor cantidad de GPX [45].

Sin embargo, aunque cuente con las enzimas antes señaladas para su protección, el espacio citoplasmático es extremadamente pequeño para que las acciones enzimáticas permitan contrarrestar eficazmente la oxidación [28, 45], es por ello que, el espermatozoide depende en gran medida de la protección del plasma seminal [21, 41, 43, 45, 46], que contiene además de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, también encontramos: glutatión reductasa, GST, hidroperóxido de fosfolípido, glutatión peroxidasa, gamma glutamil transferasa (GGT), para-oxonasa tipo-1 (PON- 1) [48], así como ácido ascórbico, tocoferol, urato, taurina e hipotaurina [45].

En el espermatozoide, la principal ERO producida es el O_2^- , que se genera a través de la cadena de transporte electrónico mitocondrial; bajo condiciones normales, las ERO son controladas por los antioxidantes que mantienen el balance óptimo en el espermatozoide [19], en donde esta especie se dismuta rápidamente a H_2O_2 por la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) localizada en la matriz mitocondrial y por la SOD de cobre/zinc ubicada en el espacio intermembrana (figura 1), que se encuentra en bajas concentraciones [49].

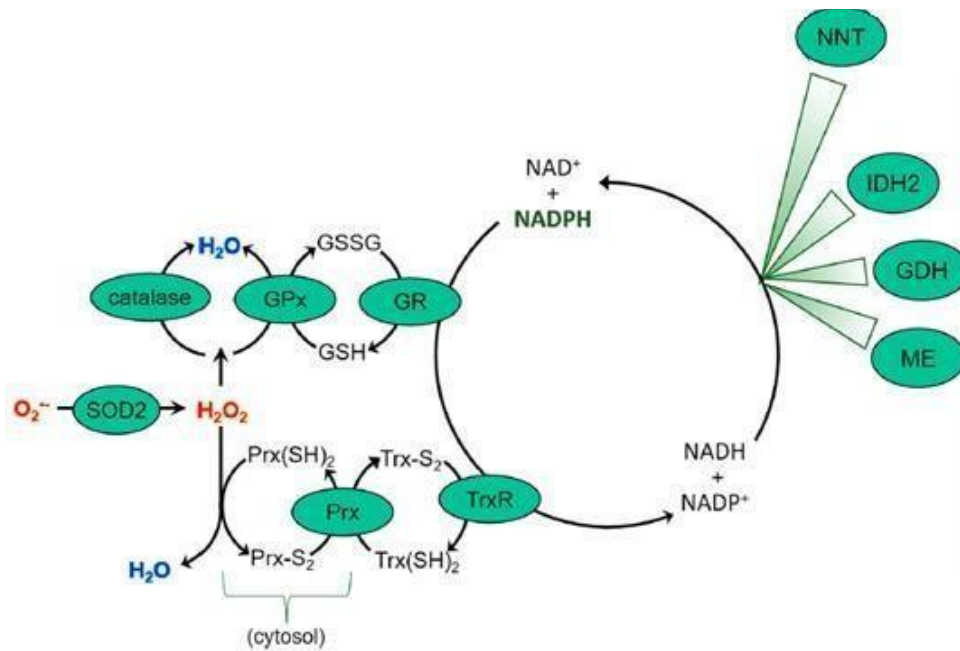


Figura 1. Sistema antioxidante en la mitocondria. Dentro de la matriz mitocondrial se encuentra el sistema de glutatió peroxidasa (GPx)/glutatió reductasa (GR) y la catalasa. El sistema peroxirredoxina (Prx)/tiorredoxina (TrxR) se superpone entre el citosol y la matriz mitocondrial. NADPH/NADP⁺ renueva estos sistemas antioxidantes con su potencial reductor. Las enzimas de la matriz mitocondrial (enzima málica (ME), glutamato deshidrogenasa (GDH) e isocitrato deshidrogenasa (IDH2)), y la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT) asociada a la membrana interna de la mitocondria, regeneran el conjunto de NADPH.

Abreviaturas: anión superóxido, O_2^- ; peróxido de hidrógeno, H_2O_2 ; agua, H_2O ; glutatió, GSH; disulfuro de glutatió, GSSG; glutatió peroxidasa, GPx; GR; tiorredoxina reductasa, TR; tiorredoxina reducida, Trx (SH)₂; tiorredoxina oxidada Trx-S₂; peroxirredoxina, Prx; peroxirredoxina reducida, Prx (SH)₂; peroxirredoxina oxidada, Prx-S₂; enzima málica, ME; glutamato deshidrogenasa, GDH; Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺, IDH2, y nicotinamida nucleótido transhidrogenasa, NNT. (Tomado y modificado de Nolfi- Donegan [49]).

La concentración de H_2O_2 está regulada por 2 principales sistemas antioxidantes [49]:

- El sistema glutatió (glutatió peroxidasa/glutatió reductasa) y la catalasa.

- El sistema tioredoxina/peroxiredoxina.

Dentro de la matriz mitocondrial encontramos el sistema glutatión peroxidasa (GPx)/glutatión reductasa (GR) y la catalasa; así como el sistema tioredoxina (TrxR). Mientras que el complemento del sistema tioredoxina (TrxR), es decir el sistema peroxiredoxina (PRx) se localiza en el citosol (figura 1) [49].

En la figura 1 se observa que el Glutatión (GSH) es oxidado por el H_2O_2 para formar el disulfuro de glutatión (GSSG), esta reacción es catalizada por la glutatión peroxidasa (GPx), posteriormente GSSG es reducido a GSH por la glutatión reductasa (GR) [49].

El H_2O_2 oxida un residuo de cisteína en el sitio catalítico de peroxiredoxina (PRx), el cual forma un puente disulfuro junto a la cisteína [$PRx(SH)_2$]. El poder reductor de la tioredoxina (TrxR) reduce Peroxiredoxina (PRx) a través de una reacción de intercambio de disulfuro y tioredoxina (TRx) luego se reduce por la tioredoxina reductasa (TR) [49].

Ambos sistemas requieren NADPH para su actividad reductora, este recurso se mantiene por las enzimas de la matriz mitocondrial: enzima mállica (ME), glutamato deshidrogenasa (GDH) e isocitrato deshidrogenasa (IDH2), y la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (NNT) asociada a la membrana (figura1) [49].

La NNT es particularmente importante en el mantenimiento del recurso de NADPH, ya que a través de su función de bombear protones dentro de la matriz mitocondrial, genera NADPH, esto acoplado a la oxidación de NADPH a la reducción de $NADP^+$ [49]. La capacidad del NNT para renovar el conjunto de NADPH disponible depende del potencial de membrana ($\Delta\Psi$). Los estados de $\Delta\Psi$ baja disminuyen la cantidad de NADPH reducido disponible, que luego disminuye la cantidad de glutatión y tioredoxina reducidos para amortiguar el H_2O_2 [49].

Además del sistema mencionado anteriormente, existen otros tipos de antioxidantes no enzimáticos que ayudan a mantener las ERO controladas, por ejemplo: el ácido ascórbico [26], el tocoferol [21] y la C-Ficocianina [24, 50].

c. C-Ficocianina.

Las ficobilinas son pigmentos fotosintéticos accesorios en muchas cianobacterias, en algas rojas, en criptofitas y en glaucofitas [25, 51, 52], son pigmentos accesorios ya que absorben la luz que la clorofila no alcanza a absorber [25].

Las ficobilinas se unen covalentemente a holoproteínas de cadenas múltiples y entonces se denominan ficobiliproteínas [25, 53] y éstas generalmente están organizadas en ficobilisomas en la membrana tilacoide presente en el citoplasma de las cianobacterias o en los cloroplastos de las células eucarióticas [25].

En el caso de *Arthrospira maxima*, que es una cianobacteria, su ficobiliproteína más abundante es la C-Ficocianina [24, 25, 50, 54, 55] y dentro de la estructura química de este biopigmento, se encuentra la ficocianobilina [25]. Las tres ficobiliproteínas más comunes son: Ficoeritrina con cromóforos de ficoeritrobilina, C-Ficocianina y Aloficocianina con cromóforos de ficocianobilina [53].

La ficocianobilina (figura 2), que es tanto la ficobilina, así como el grupo prostético de la C-Ficocianina [56, 57], consiste en cuatro anillos pirroles de cadena abierta [25, 53].

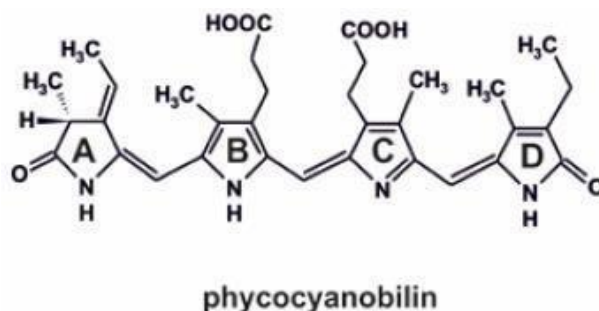


Figura 2. Estructura química de la ficocianobilina. La ficocianobilina es el grupo prostético de la C-Ficocianina y se compone de cuatro anillos pirroles de cadena abierta, denotados con las letras A-D, que dan lugar a un compuesto con insaturaciones conjugadas. La estructura está conformada por dos grupos carboxilos y contiene varias insaturaciones, cuenta con grupos aminas en los anillos centrales (B y C) y grupos amidas en los extremos (A y D) (Tomado de Mysliwa y Solymosi [25] y Llópiz [56]).

En el anillo A o D de la ficocianobilina, se une covalentemente un grupo específico de cisteína de proteínas hidrofílicas a través de un enlace tioéter y de esta manera se forman las ficobiliproteínas [25].

En cianobacterias, las ficobiliproteínas están formadas por dos subunidades, mismas que generan un heterodímero α y β , que se suman a hexámeros (α y β); en el caso de la C-Ficocianina (figura 3) puede adquirir estructura de anillos [25].

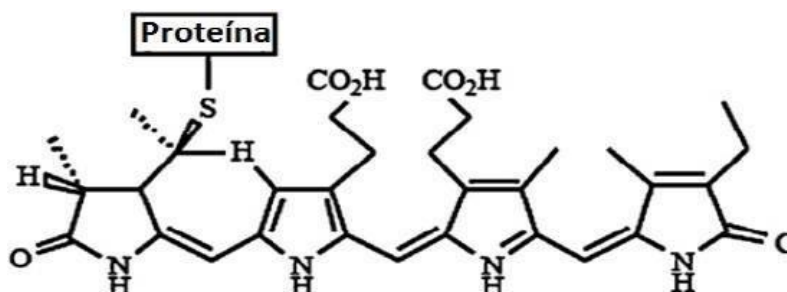


Figura 3. Estructura química de la C-Ficocianina. La C-Ficocianina se compone de la unión de la ficocianobilina (grupo prostético) y su proteína a través de un enlace tioéter en el carbono 3' del anillo A del grupo prostético (tomado de Gupta [58] y Llópiz [56]).

La C-Ficocianina posee una estructura similar a la bilirrubina [59], que es un antioxidante natural en el plasma, esta molécula es sintetizada a partir de la biliverdina por la biliverdina reductasa, una vez que es convertida a bilirrubina, se une a la albúmina y protege a los lípidos de la oxidación, una vez que ha sido reducido por los radicales libres, se reduce de nuevo a biliverdina [53]. Ahora bien, la ficocianobilina también se sintetiza a partir de biliverdina y se oxida a ficocianorrubina por la biliverdina reductasa; la ficocianorrubina también es un eliminador de radicales libres, siendo reducido a ficocianobilina y al igual que la bilirrubina, su capacidad antioxidante se regenera [53].

d. Diluyentes.

La dilución del semen y conservación del espermatozoide porcino, es una práctica que brinda a la industria la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del cerdo [60].

Cerca del 95% de las inseminaciones artificiales en la industria porcina, se realizan utilizando un método de conservación, en donde el espermatozoide permanece de 1 a 5 días a temperaturas entre los 15°C y 20°C y se conserva de forma adecuada [60], siendo el método de preservación líquida el principal y más utilizado, para mantener a la célula viable hasta la inseminación [4, 61], utilizando menor cantidad de espermatozoides por dosis en la IA, sin afectar la fecundidad [61].

Asimismo, los diluyentes se pueden definir como: solución acuosa utilizada para incrementar el volumen del eyaculado [12, 42, 61], los diluyentes contienen una mezcla de compuestos fisiológicos, bioquímicos y biofísicos equilibrados, lo anterior, para reducir el metabolismo del espermatozoide, prolongar su vida útil y evitar el desarrollo de microorganismos [12, 60, 62]. La función de un diluyente es suplir los nutrientes que necesita el espermatozoide fuera del organismo, para preservar su integridad [12, 60, 62, 63], su capacidad fecundante [12, 60, 61], controlar el pH del medio [60], mantener el equilibrio osmótico de la célula [60] y evitar el crecimiento bacteriano [62, 64].

Los ingredientes más comunes que conforman los diluyentes son: glucosa, para la actividad metabólica del espermatozoide [12, 42, 61] o fructuosa [63]; agentes crioprotectores, como por ejemplo: BSA (albúmina sérica de bovino) [12], yema de huevo [30] o glicerol [42], para proteger la membrana plasmática contra el choque térmico generado por enfriamiento o congelación y compensar la pérdida de proteínas [12]; bicarbonato de sodio, TRIS (trisaminometano) o citrato de sodio [12, 42, 61, 63] como controlador del pH del medio (buffer); antibióticos como gentamicina [42, 61], amikacina [61, 63], cloranfenicol [61], neomicina o kanamicina [42] para prevenir el crecimiento microbiano; así como cloruro de sodio o cloruro de potasio [12, 42, 61, 63], como controlador de la presión osmótica.

De acuerdo a su capacidad para preservar al espermatozoide, los diluyentes se pueden clasificar en: corta duración (1-2 días), media duración (3-4 días) y larga duración (7-10 días) [61]. Los diluyentes de corta duración se utilizan principalmente para llevar a cabo la IA dentro de la unidad de producción [42] y por lo general se utilizan el mismo día de la recolección [42]; mientras que los diluyentes de media y

larga duración, se utilizan cuando la unidad de producción está alejada del sitio donde se procesó el semen [12].

Dentro de las ventajas que tiene el uso de un diluyente de corta duración es que se puede utilizar una concentración espermática baja en el medio, lo que permitirá realizar más inseminaciones con una sola recolección, tiene un bajo costo en su preparación [60] y es fácil de llevar a cabo [31].

Como se mencionó previamente, durante el procesamiento del semen para ser incorporado en estos medios, normalmente el plasma seminal es removido, por lo que la capacidad natural antioxidante del espermatozoide se ve reducida y esto lo vuelve vulnerable al estrés oxidante [12, 14, 63]; con la finalidad de reducir este último y mantener la viabilidad del espermatozoide, los medios se conservan a temperaturas entre los 15 a 17°C; sin embargo, cuando estos medios ya preparados se acondicionan para IA, es decir, se calientan a 37°C, el metabolismo del espermatozoide se activa nuevamente [65], comienza a consumir los carbohidratos disponibles en el medio y comienza a liberar radicales libres, por lo que la adición de antioxidantes al diluyente, se vuelve necesario [12].

Otro tipo de manejos, tales como la centrifugación, resuspensión, filtración, refrigeración y criopreservación, inducen la alteración en la membrana plasmática y daño al ADN, incrementando la susceptibilidad de daño oxidante [12].

En cuanto a la temperatura, durante el procesamiento del espermatozoide, es sabido que se realiza por debajo de la temperatura fisiológica normal (37°C), siendo muy susceptible a temperaturas por debajo de los 15°C, en este caso la membrana plasmática es el primer sitio en sufrir daño y esto se debe a que los lípidos de la membrana plasmática se alteran [66], los cambios estructurales ocurren con mayor frecuencia entre temperaturas de 15°C a 5°C [12] y conforme la temperatura va descendiendo, ya sea en el manejo o almacenamiento, el espermatozoide sufre daño en su membrana plasmática, disminuye la viabilidad y movilidad [67] y se incrementan alteraciones acrosomales [68]. Otros factores por considerar durante el procesamiento, es que el espermatozoide se expone a luz y oxígeno, lo que puede ocasionar un ambiente oxidante que desencadenará un proceso peroxidativo perjudicial para la

célula [12].

V. ANTECEDENTES.

La C-Ficocianina cuenta con un cromóforo (ficocianobilina) que tiene estructura similar a un antioxidante natural, la bilirrubina [24, 50]; se compone de una parte proteica y una no proteica (cromóforos), la parte no proteica (ficocianobilina) contiene 3 grupos cromógenos (tetrapirroles lineales) y es la parte que es capaz de capturar y prevenir la formación de las ERO (figura 2), tales como los radicales hidroxilo, alcoxilo y al peróxido de hidrógeno [24, 53, 57, 69-71].

Además, esta molécula tiene la capacidad de remover el ion libre de hierro del medio, mismo que puede participar en la formación de radicales hidroxilos, a través de la reacción Fenton [69]; se ha reportado que, al interactuar con el hierro, se quela [69].

La actividad antioxidante y capacidad captadora de radicales libres de la C- Ficocianina ha sido documentada, se ha señalado que posee una estructura química cercana a la bilirrubina [59], donde está última actúa como antioxidante de radicales peroxilo donando un electrón, que está localizado en el carbono 10 [59]. En el caso de la C- Ficocianina, su mecanismo de acción se ha descrito mediante la estabilización de los radicales peroxilo por la oxidación de los dobles enlaces de los anillos tetrapirrólicos [25]. Renugadevi y colaboradores [72] realizaron estudios *in vitro* en donde reportan que la C-Ficocianina actúa como donador de electrones, es decir, dona un electrón para reducir al complejo oxidado y en el caso de la lipoperoxidación, actúa como donador de electrones y reduce los intermediarios del proceso de lipoperoxidación.

Eriksen en 2008 [53] y McCarty en 2007 [73] reportaron que la ficocianorrubina, que es la forma reducida de la ficocianobilina, es la molécula con propiedades antioxidantes, esto en función de su similitud con la bilirrubina. En la figura 3 se muestra el rol propuesto de la ficocianorrubina como antioxidante *in vivo* en comparación con la bilirrubina, un antioxidante natural en el plasma: La bilirrubina es

sintetizada a partir de biliverdina por la biliverdina reductasa que oxida el doble enlace entre los átomos de carbono 10 y 11 usando NADPH como donante de electrones, la eliminación de radicales oxidativos revierte la bilirrubina a biliverdina [53].

En las cianobacterias, la ficocianobilina también se sintetiza a partir de biliverdina por ficocianobilina: ferredoxina oxidoreductasa (PcyA) que cataliza esta reducción de cuatro electrones usando ferredoxina (Fd) como electrón donante [53]. Esta reacción afecta sólo a los extremos de la molécula y deja la estructura central alrededor del átomo de carbono 10 inalterada [53].

La biliverdina reductasa, en el humano, también reduce la ficocianobilina a ficocianorubina, esta última, ha demostrado en estudios *in vivo* y posterior a la ingesta de C-Ficocianina, tener el efecto antioxidante más eficiente [53]. La eliminación de radicales revierte la ficocianorrubina a ficocianobilina, que luego puede reoxidarse a ficocianorrubina y tener su capacidad reductora regenerada [53].

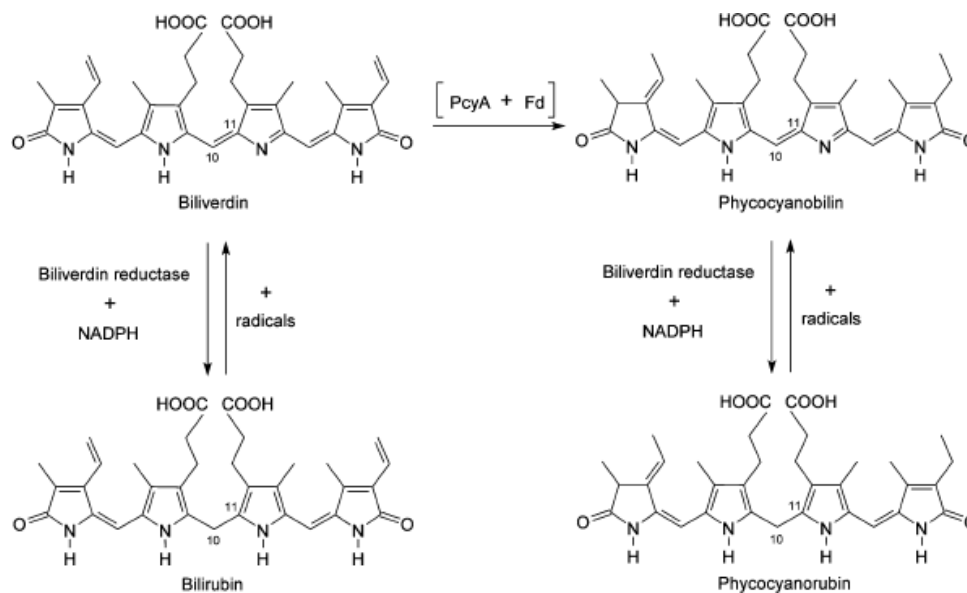


Figura 3. Papel propuesto de la ficocianorrubina como antioxidante *in vivo* en comparación con la bilirrubina, un antioxidante natural en plasma. La bilirrubina es sintetizada a partir de biliverdina por la biliverdina reductasa que reduce el doble enlace entre los átomos del carbono 10 y 11 usando NADPH como donante de electrones, la eliminación

de radicales libres revierte la bilirrubina a biliverdina. En las cianobacterias, la ficocianobilina también se sintetiza a partir de biliverdina, esto a través de la ferredoxina oxidoreductasa (PcyA) que cataliza la reducción de la biliverdina usando ferredoxina (Fd) como donador de electrones; esta reacción afecta solo a los extremos de la molécula y deja la estructura central alrededor del átomo de carbono 10 inalterada. En el humano, la biliverdina reductasa también reduce la ficocianobilina a ficocianorubina, que puede ser el antioxidante real *in vivo* después de la ingesta de C-Ficocianina; los radicales libres revierten la ficocianorubina a ficocianobilina, que luego puede reoxidarse a ficocianorubina y tener su capacidad reductora regenerada. *Abreviaturas:* ferredoxina oxidoreductasa, PcyA; ferredoxina, Fd. (tomado y modificado de Eriksen [53]).

Cabe señalar que la C-Ficocianina no es tóxica ni carcinogénica y ha demostrado poseer propiedades antiinflamatorias, neuroprotectoras [23, 58], hepatoprotectoras [23, 58, 69], anti-artríticas [55], antioxidantes [23-25, 50], nutricionales y además favorece el sistema inmunológico [74, 75].

Ivanona y colaboradores [76] señalaron que la C-Ficocianina estimula el sistema de defensa de enzimas antioxidantes y también tiene la capacidad de disminuir la producción de ERO en las células espermáticas durante su preservación a 5°C [24].

El uso de C-Ficocianina en diluyentes de corta y larga duración, en almacenamiento a 5°C, es capaz de controlar la producción de las ERO y puede retrasar, reducir o evitar el daño a moléculas esenciales, esto causado por el desequilibrio de la producción de ERO, así como una alteración del sistema de defensa antioxidante, en donde a concentraciones de 69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se observa que si hay un control intracelular positivo para disminuir la producción de las ERO [24].

Se reporta que el uso de C-Ficocianina en un medio de corta duración (Kortowo-3), almacenado a 5°C, en una concentración de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mejoran los parámetros de viabilidad espermática y movilidad progresiva, en comparación con el grupo control y los otros grupos experimentales [24].

La C-Ficocianina a concentraciones de 11.35 mM mL^{-1} comienza a inhibir la peroxidación lipídica y a concentraciones de 200 mM mL^{-1} presenta un 95% de

inhibición de la misma, lo anterior debido al secuestro de radicales peroxilo y ERO, lo cual se logra a través de su parte cromófora [69].

El uso de una concentración de C-Ficocianina por arriba de los 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no es citotóxica en macrófagos; sin embargo, en concentraciones de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se presenta citotoxicidad en las mismas [55].

El efecto máximo antioxidante de la C-Ficocianina se obtiene en concentración es de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y la mínima a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En este mismo estudio, se reportó que a concentraciones de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se obtiene un porcentaje de máximo antioxidante para el H_2O_2 de 95.27% a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y de 51.23% a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; mientras que para inhibir la oxidación de lípidos la concentración mínima es de 185 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [72].

Por otro lado, la cianobacteria espirulina (*Arthrospira* spp), ha sido utilizada como suplemento en la alimentación de cerdos [77] y en la conservación de células espermáticas de bovino [78], búfalo [79] y carnero [30]; esta alga es rica en vitaminas (A, D, C, E, B12, B1, B2) [77, 79], minerales (hierro, calcio, sodio, potasio, magnesio, fósforo y selenio) [77], ácidos grasos poliinsaturados (ácido gamma-linoleico, ácido alfa linoleico) [77], clorofila [79], espirulanos [30], C-Ficocianina [30] y aloficocianina [30].

Kistanova y colaboradores [77] señalaron que, suplementar la alimentación de cerdos con 1.4 mg/día de espirulina (*Arthrospira platensis*), por un periodo de 40 días, aumenta el volumen del eyaculado, la movilidad y la viabilidad durante el almacenamiento de células espermáticas en el diluyente DZNB a 15°C, por 72 horas; del mismo modo, aumenta la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa y disminuye la producción de ERO.

Mizera y colaboradores [78] reportaron que el uso de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto de espirulina (*Arthrospira maxima*), en el medio BioxCell®, almacenado a -80°C por 24 horas, incrementa la movilidad progresiva, la viabilidad, reduce la producción de ERO y protege el ADN del espermatozoide bovino.

Otros autores en 2021 [79] demostraron que una concentración de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto de espirulina (*Arthrospira platensis*) en el medio base Tris, almacenado a -196°C por 24 horas, aumenta la tasa de concepción de becerros, mejora la movilidad después de la descongelación e incrementa concentración de SOD y GSH; así mismo, disminuye la lipoperoxidación y el daño al acrosoma del espermatozoide de búfalo. También se reportó [30] que el uso de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto etanólico de espirulina (*Arthrospira platensis*) en el medio TEY, almacenado a 15°C por 72 horas, incrementa la movilidad total y progresiva, mejora la viabilidad, la integridad funcional de la membrana, aumenta la actividad de SOD y CAT en espermatozoides de carnero mientras que la concentración de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, disminuye su lipoperoxidación.

VI. JUSTIFICACIÓN.

La calidad espermática es de suma importancia ya que aumenta los porcentajes de fecundidad, lo que genera mayor eficiencia reproductiva y ganancias económicas al productor; para que esto se logre, es necesario llevar a cabo una buena conservación del semen [80].

Se ha reportado que, durante la preservación de espermatozoides en el cerdo, su calidad y su capacidad para fecundar son afectadas por el estrés oxidante, a través de la generación de ERO; por lo que, para tener un buen rendimiento reproductivo bajo técnicas de producción asistida, es esencial una buena preparación *in vitro* del semen [13].

Debido a que durante la preparación *in vitro* el plasma seminal es removido y este era el medio donde se encontraban en gran medida los antioxidantes, es necesario reemplazarlos, a fin de controlar los radicales libres y la consecuente formación de ERO [12], por lo que una estrategia es adicionando C-Ficocianina.

La C-Ficocianina, al ser un antioxidante, permite estudiar su participación en la protección de los espermatozoides de cerdo del daño que les provocan las ERO.

El conocimiento de la participación de la C-Ficocianina como antioxidante, podría servir en la comprensión de los procesos y mecanismos que favorecen la viabilidad de las células espermáticas por periodos de almacenamiento de 1 a 3 días, a temperatura

de 16°C; esto a su vez generará protocolos para la conservación de gametos de diferentes especies.

VII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cómo la C-Ficocianina, en un diluyente de corta duración, favorece los parámetros de calidad y fisiología espermática del cerdo?

VIII. HIPÓTESIS.

Dado que la alta concentración de ERO puede provocar la muerte de las células, la adición de C-Ficocianina en un diluyente de corta duración disminuirá la concentración de ERO y favorecerá los parámetros de calidad y fisiología espermática de cerdo.

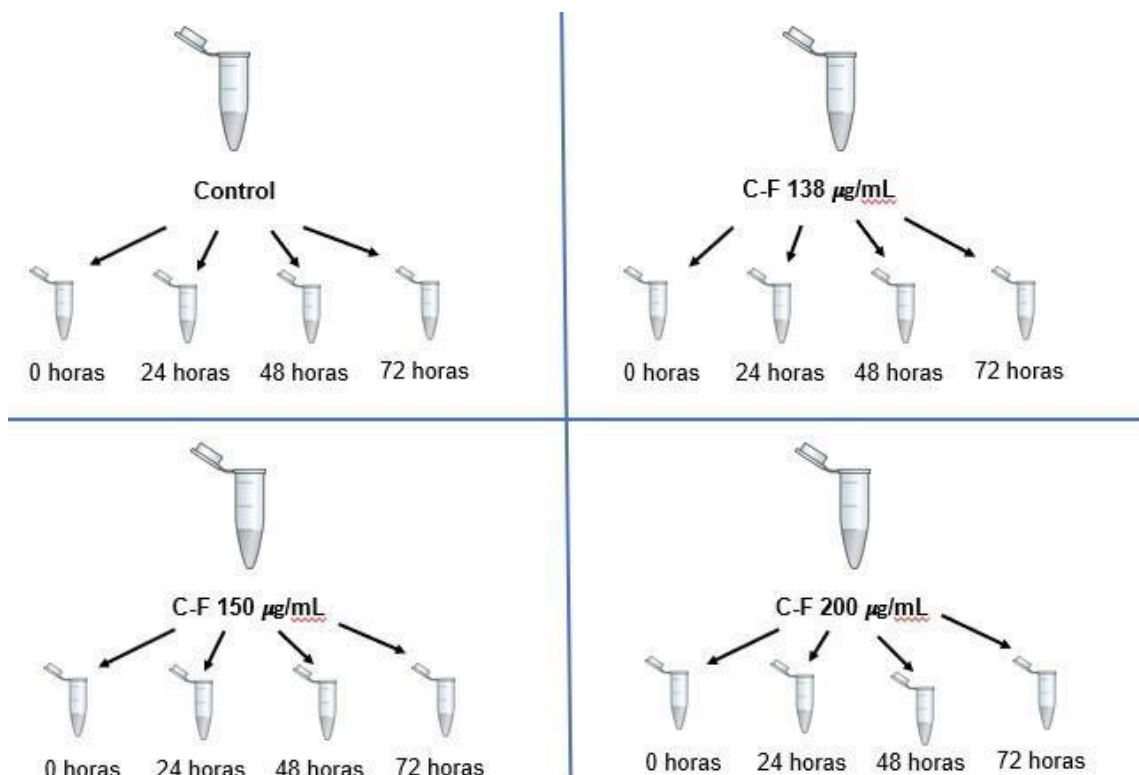
IX. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si la C-Ficocianina, adicionada en un diluyente de corta duración en almacenamiento a 16° C, favorece los parámetros de calidad y fisiología espermática de cerdo.

X. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar el efecto antioxidante de la C-Ficocianina sobre la calidad espermática de cerdo.
- Determinar el efecto antioxidante de la C-Ficocianina sobre la fisiología espermática de cerdo.

XI. DISEÑO EXPERIMENTAL.



Para cada grupo y tiempo de almacenamiento, se evaluará:

- Calidad espermática.
- Fisiología espermática.

XII. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se utilizaron eyaculados de cerdo de una granja particular, estas muestras se obtuvieron por técnica de mano enguantada, se eliminaron muestras que contenían sangre y orina; para poder considerar las muestras como óptimas, debieron cumplir con los parámetros espermáticos señalados por Sancho [81] y Trujillo [11]: movilidad total >80%, movilidad progresiva >60%, viabilidad >75% y anomalías espermáticas <20%.

Se elaboró el diluyente de corta duración de acuerdo a Pursel y Johnson (1975) e informado por Gadea [42], el cual contiene: Glucosa 37 g L-1, bicarbonato de sodio

(NaHCO₃) 1.25 g L⁻¹, citrato de sodio (Na₃C₆H₅O₇) 6.0 g L⁻¹, EDTA 1.25 g L⁻¹, cloruro de potasio (KCl) 0.75 g L⁻¹ y gentamicina 200 mg L⁻¹; ajustado a un pH de 7.2 y se mantuvo a una temperatura de 16°C.

a. Calidad espermática.

- Movilidad.

La movilidad se evaluó en microscopio de campo claro [82]. Se preparó una laminilla, atemperada a 36°C, donde se colocaron 5 µL de semen, posteriormente se colocó un portaobjetos y se observó la muestra con el objetivo 40X en el microscopio de campo claro con termoplatina a 36°C, se realizó un conteo de 100 espermatozoides distinguiendo movilidad progresiva, no progresiva e inmóviles, los resultados se expresaron en porcentajes.

- Vitalidad.

Para determinar la vitalidad se utilizó la técnica de eosina-nigrosina [82, 83]. Se preparó una laminilla donde se colocaron 5 µL de semen y 5 µL de la solución de eosina-nigrosina, se mezcló y posteriormente se expandió en la superficie del portaobjetos (frotis), se secó a 36°C. Se observó la muestra con el objetivo 40X en el microscopio de campo claro, y se realizó un conteo de 100 espermatozoides distinguiendo entre vivos y muertos. La eosina tiñe el citoplasma de los espermatozoides con membrana plasmática dañada, los cuales se les considera muertos; mientras que la nigrosina proporciona un fondo oscuro para la evaluación al microscopio. El número de espermatozoides vivos se consideró como el porcentaje devitalidad.

- Concentración espermática.

La concentración espermática se determinó mediante la cámara de Neubauer [82]. Se realizó una dilución 1:100 con paraformaldehído al 10%. Posteriormente se colocaron 10 µL de la dilución en la cámara de Neubauer y se observó a 40X, realizando el conteo en 5 y 5 cuadrículas diferentes de cada lado de la cámara. El resultado se expresó en millones (1X10⁶) de espermatozoides por mL.

- Anormalidades morfológicas.

Para determinar las anomalías morfológicas se utilizó la técnica de eosina-nigrosina [24, 30]. Se realizaron las preparaciones como se explicó anteriormente. Se observó la muestra con el objetivo 40X en el microscopio de campo claro, y se realizó un conteo de 100 espermatozoides distinguiendo diferentes anomalías morfológicas. El número de espermatozoides con anomalías morfológicas se expresó en porcentajes.

- Integridad al ADN.

Para evaluar el daño al ADN, se utilizó la tinción de naranja de acridina [84, 85]. Se tomó una alícuota de 10 μL de muestra de semen y se expandió en la superficie de un portaobjetos (frotis), dejando secar a temperatura ambiente por 20 minutos; una vez seco, se fijó durante 8 horas en solución Carnoy (1:3 de ácido acético glacial y metanol), una vez transcurrido este tiempo, el frotis se retiró de la solución Carnoy y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se tiñó con solución de naranja de acridina (10 mL de naranja de acridina diluidos en agua destilada (10 mg mL^{-1}), 40 mL de 0.1 M de ácido cítrico y 2.5 mL de 0.3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) por 5 minutos en oscuridad. Una vez que transcurrieron los 5 minutos, el frotis se sacó de la solución de naranja de acridina y se enjuagó suavemente con agua destilada, se cubrió con un cubreobjetos, se sellaron las orillas con barniz transparente y se observaron directamente en microscopio de epifluorescencia, contando 200 células. Los espermatozoides sin daño en el DNA (doble cadena) presentaron fluorescencia verde, mientras que aquellas células que presentaron daño en el ADN, muestran fluorescencia en color naranja, amarillo o rojo.

b. Fisiología espermática.

- Potencial de membrana mitocondrial.

El potencial de membrana mitocondrial se determinó mediante ensayos con MitoTracker® Green (MTG) a 200nM conteniendo 1×10^6 de células espermáticas [86, 87]. Para incorporar el MTG los espermatozoides fueron incubados 20 minutos en total oscuridad a 37°C . Posteriormente se centrifugaron a 600 g por 5 minutos. El botón

espermático se resuspendió en 1 mL de PBS antes de cuantificar por citometría de flujo en un FACSCalibur (Becton Dickinson). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 520 nm; se contaron al menos 10,000 eventos por muestra y se determinó la media de fluorescencia utilizando el sistema de cómputo *Flowing Software*, versión 2.5.1.

- ERO.

Las ERO en espermatozoides se determinó usando ensayos con diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) a 10 μ M conteniendo 2×10^6 de células espermáticas [88, 89]. Para incorporar el DCFH-DA los espermatozoides se incubaron 10 minutos en total oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron (600 g por 5 minutos) con la finalidad de desechar el DCFH-DA que no se incorporó a las células. El botón espermático se resuspendió en 1 mL de PBS antes de cuantificar por citometría de flujo en un FACSCalibur (Becton Dickinson). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 520 nm; se contaron, al menos 10,000 eventos por muestra y se determinó la media de fluorescencia [90, 91] utilizando el sistema de cómputo *Flowing Software*, versión 2.5.1.

- Capacitación.

Para la inducción de la capacitación [13, 92], los espermatozoides fueron lavados en fresco y resuspendidos en 1 mL de medio capacitante TALP sin suplementar (114.06 mM NaCl, 3.20 mM KCl, 0.50 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mM lactato de sodio, 0.35 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 5 mM glucosa, 25.07 mM $NaHCO_3$, 2 mM cafeína, 8 mM lactato de calcio $\cdot 5H_2O$, 1 mg/mL PVA y 0.17 mM gentamicina, 0.0003 mM de rojo fenol; ajustado a pH 7.4), este procedimiento se repitió 2 veces a 600 g durante 10 minutos, ya lavados se resuspendieron en 1 mL de medio capacitante TALP, suplementado con 6 mg mL⁻¹ de BSA y 0.2 mM de piruvato de sodio. Las alícuotas de semen (aproximadamente 10×10^6 espermatozoides) se incubaron por 4 horas a 38.5°C y con una atmósfera de 5% CO₂.

Para determinar el porcentaje de espermatozoides capacitados, se utilizó la técnica de clortetraciclina (CTC), la cual consiste en resuspender los espermatozoides capacitados en solución CTC (750 $\mu\text{M L}^{-1}$ CTC en 130 mM L^{-1} NaCl, 5 mM mL^{-1} cisteína y 20 mM mL^{-1} Tris-HCl, ajustando a pH 7.8), se realizaron frotis y se observaron directamente en microscopio de fluorescencia, contando 100 células [13, 92].

- Reacción acrosomal.

Para evaluar la reacción acrosomal [93, 94], primero se debe inducir la misma para lo cual, se agregaron 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de progesterona al medio donde se llevó a cabo la capacitación y se incubó por 1 hora a 39°C y con una atmósfera de 5% CO_2 [95]. Posterior al procedimiento de incubación con progesterona, se realizaron frotis y se dejaron secar a temperatura ambiente, después se fijaron con etanol al 100% por 20 segundos y se tiñeron con azul de Coomassie al 0.22%, durante 2 minutos y se observó al microscopio de campo claro (40X). Se evaluaron 100 células espermáticas, en donde se contaron la cantidad de espermatozoides con presencia y ausencia de acrosoma, el resultado se expresó en porcentaje.

XIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Las variables que se evaluaron fueron los efectos en la calidad y fisiología espermática, de las diferentes concentraciones de C-Ficocianina en los mismos tiempos de almacenamiento, así como los efectos entre mismas concentraciones de C-Ficocianina en diferentes tiempos de almacenamiento.

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para determinar homocedasticidad de varianzas.

Para los datos que mostraron normalidad y homocedasticidad se realizaron pruebas paramétricas para comparar entre grupos (más de 2), siendo esta ANOVA de una vía y post-hoc Duncan. En el caso de los datos no normales y con heterocedasticidad, se realizaron pruebas no paramétricas para comparar entre grupos (Kruskall-Wallis) y post-hoc U de Mann-Whitney. El programa estadístico utilizado fue IBM SPSS Statistics, versión 24.0.0.

XIV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El uso de diluyentes para conservar espermatozoides de cerdo es un método ampliamente utilizado a nivel mundial en la inseminación artificial porcina [4], la temperatura ideal para mantener estas células se encuentra entre los 15 y 17°C [42, 44, 96]. Durante el procesamiento del semen porcino para ser incorporado al diluyente, normalmente el plasma seminal es removido, por lo que la capacidad natural antioxidante del espermatozoide se ve reducida y esto lo vuelve vulnerable al estrés oxidante [14]; además, cuando el espermatozoide de cerdo se almacena a 17°C la actividad de la célula disminuye, pero el consumo de energía y metabolismo continúa [27], lo que conduce a una continua producción de ERO por parte de la mitocondria [16, 97] y NADPH oxidasa (NOX5) [16, 36]; es por ello que la suplementación en el diluyente con antioxidantes ha sido una estrategia para la conservación de espermatozoides de cerdo [29, 31, 98], carnero [99], caballo [100] y gallo [101], demostrando tener efectos positivos en el mantenimiento de la calidad y fisiología de la célula espermática durante su almacenamiento [102, 103].

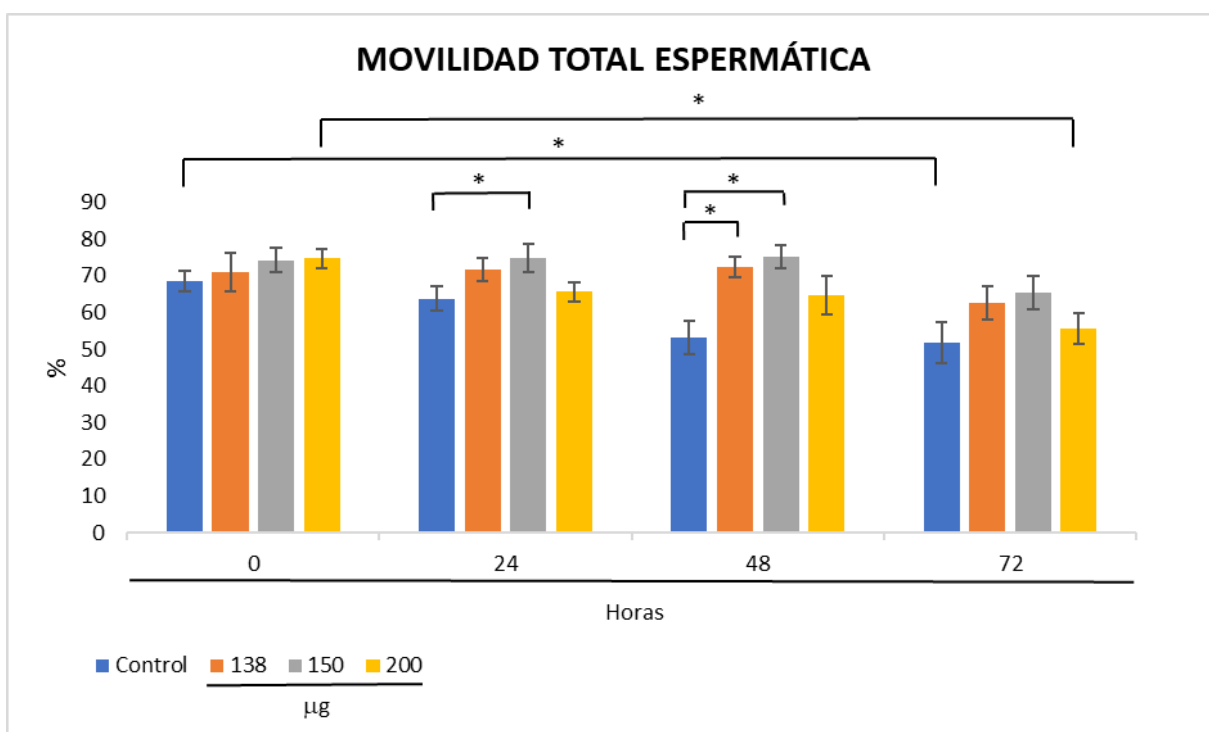
Ahora bien, los resultados en la tabla 1 muestran el promedio y la desviación estándar de los parámetros espermáticos para las muestras utilizadas. Únicamente se emplearon muestras que cumplieron con los parámetros descritos en la literatura como normales, y que no contenían sangre ni orina.

Tabla 1. Parámetros de inclusión y resultados de espermatobioscopías.

Análisis	Resultado (%)	Parámetro (%)	Referencia Bibliográfica
Movilidad total.	82 ± 2	> 80	Sancho y Villagran [81]; Trujillo, Silva y Gutiérrez [11].
Movilidad progresiva.	66 ± 5	> 60	
Vitalidad.	84 ± 6	> 75	
Morfología.	2 ± 2	< 20	

Cabe señalar que el análisis anterior se realizó con la finalidad de establecer los parámetros aceptables, teniendo en cuenta que una mejor calidad espermática, favorece la reproducción, así mismo se tuvo mucho cuidado al momento de trabajar las muestras para que su calidad no se viera comprometida y de esta manera nuestros resultados no se vieran afectados.

La movilidad espermática se ha descrito como una característica fundamental, ya que demuestra un metabolismo activo e integridad de la membrana celular [96, 104], esto favorece la capacidad fecundante de la célula, lo que se traduce en menores pérdidas económicas en la industria porcina [12, 63].



Gráfica 1. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de C-Ficocianina sobre la movilidad total espermática en función del tiempo de almacenamiento. El asterisco indica diferencia significativa entre diferentes grupos y tiempos. ANOVA ($p < 0.05$) $n=3$.

Ahora bien, en la gráfica 1 podemos observar el efecto que tiene la adición de diferentes concentraciones de C-Ficocianina a un diluyente de corta duración a 16°C, donde a las 24 horas con una concentración de 150 µg mL⁻¹, mejora el porcentaje de la movilidad total espermática (75 ± 9%), esto en comparación con el grupo control (64 ± 8%) en un mismo tiempo ($p < 0.05$); así mismo, a las 48 horas con una

concentración de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mejora el porcentaje de este parámetro ($73 \pm 7\%$ y $75 \pm 8\%$, respectivamente), esto en comparación con el grupo control ($53 \pm 11\%$) en un mismo tiempo ($p < 0.05$). Para los demás tiempos y concentraciones, las pruebas estadísticas no muestran diferencias. Esto nos indica que la C-Ficocianina, está mejorando la movilidad total a partir de las 24 horas, bajo nuestras condiciones.

Como se mencionó, la C-Ficocianina es la parte proteica más abundante en la cianobacteria *Arthrospira maxima* [24, 25, 54, 55], esta cianobacteria también es conocida como espirulina [25] y extractos de este organismo han sido utilizados en estudios recientes, donde se adicionan a diluyentes para la conservación de espermatozoides de bovino [78], búfalo [79] y carnero [30] a 4°C , demostrando que tiene propiedades para mejorar la movilidad espermática, por lo que podríamos señalar que la C-Ficocianina está participando en el mejoramiento de este parámetro como parte de la estructura de esta cianobacteria.

Mizera y colaboradores [78] reportaron que el uso de 4 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de *Spirulina maxima* en un diluyente para la conservación de espermatozoides bovinos almacenados a 4°C , mejora la movilidad de las células después de un día de congelamiento, comparado con el control; sin embargo, en este mismo estudio, cuando se utilizó una concentración de 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, la movilidad disminuyó, en comparación con el grupo control.

En otro estudio [79] se demostró que 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del extracto de espirulina adicionada en el diluyente Base-Tris, almacenada a 4°C , mejora la movilidad en espermatozoides de búfalo, 24 horas después de su almacenamiento, esto en comparación con el grupo control y con una concentración de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no presenta diferencia en este parámetro, respecto al control. Por otro lado, en el estudio de Leugoue y colaboradores en 2022 [30], reportaron que el uso de 20, 40 y 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto etanólico de espirulina en el diluyente TEY, almacenado a 4°C , mejora la movilidad total espermática en carneros, a partir de las 48 y 72 horas de almacenamiento, respectivamente, en comparación con los grupos control.

Por otro lado, la movilidad total en el grupo control y en el grupo con una concentración de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, va decreciendo durante el tiempo de almacenamiento de los espermatozoides, al pasar de $69 \pm 7\%$ a las 0 horas a $52 \pm 13\%$ a las 72 horas de almacenamiento ($p < 0.05$) y de $75 \pm 7\%$ a las 0 horas a $56 \pm 10\%$ a las 72 horas de almacenamiento ($p < 0.05$), respectivamente; esto nos podría indicar que a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ la C-Ficocianina no está funcionando como molécula que ayude a mejorar este parámetro espermático.

Con base a lo anterior, Sheperd y colaboradores [98] reportaron que en la movilidad total disminuye del día 1 post-colecta (53%) al día 4 post-colecta (42 %), en un diluyente de larga duración almacenado a 17°C. Dubé y colaboradores [97] reportaron resultados similares al utilizar un diluyente similar al de este estudio (*Beltsville Thawing Solution* [BTS]) y a temperatura de almacenamiento de 17°C. Del mismo modo, Vyt y colaboradores [105] reportaron una disminución en la movilidad utilizando el diluyente (BTS) y almacenado a 17°C, observando que a un pH alto, este parámetro se ve afectado, dato que concuerda con lo reportado en este estudio. Esto podría deberse a una alcalinización del medio donde se mantienen los espermatozoides, ya que la glucosa en el diluyente, como fuente de energía y la temperatura de almacenamiento, estimulan el metabolismo glucolítico del espermatozoide [96, 106], generando CO_2 ; el bicarbonato al actuar como molécula amortiguadora va eliminando protones de la solución lo que en consecuencia, resulta en un aumento del pH del medio [105, 107].

Por otro lado, se reportó [28] que el adicionar cisteína como antioxidante a un diluyente (Modena) no mejora la movilidad total, durante 9 días de almacenamiento a 17°C y se observa que hasta el día 13 se presenta un incremento en este parámetro espermático; sin embargo, bajo nuestras condiciones de estudio (16°C a 24 y 48 horas de almacenamiento), se observa una mejora en la movilidad total utilizando una concentración de 138 y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para posteriormente (a las 72 horas) no mostrar diferencias, lo que nos indica que la C-Ficocianina comienza a tener efectos en la célula espermática a partir del día 1 de almacenamiento.

El espermatozoide de mamíferos posee dos principales sistemas enzimáticos de defensa contra las ERO; uno es la SOD, que cataliza la eliminación de O_2^- y el otro es la GPX [77]. Al respecto, Leugoue en 2022 [30] observó que la adición de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ de extracto de espirulina a un diluyente presenta una correlación positiva entre la movilidad total y la actividad de SOD, por lo que a concentraciones de $138 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina, podría estar aumentando la actividad de SOD en el espermatozoide y de esta manera, mejorando la movilidad; manteniendo un equilibrio entre la producción de ERO y su participación en la movilidad, ya que, la presencia de altos niveles de ERO's, se relaciona, entre otras, con pérdida en la movilidad espermática. [108]

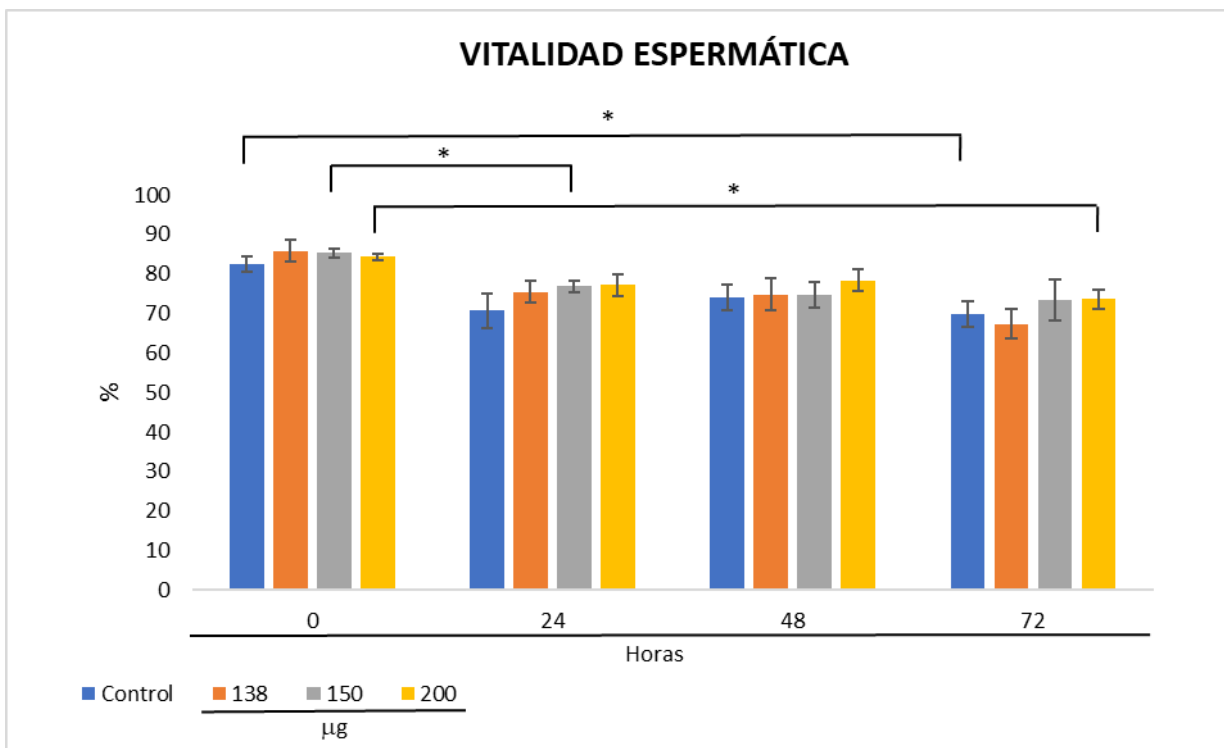
Por otro lado, Kistanova y colaboradores [77] reportaron que la adición de espirulina en la dieta de cerdos, mejora los niveles de SOD en el plasma seminal, esto debido a los constituyentes del alga, por ejemplo: ficocianina, β -carotenos, ácidos poliinsaturados y superóxido dismutasa, esto también nos podría indicar que la C-Ficocianina está ayudando a mejorar la actividad de SOD en el espermatozoide.

Otro factor a considerar es la contaminación bacteriana, que puede generar pérdida en la movilidad [109], daño en la membrana plasmática [109, 110] y en el acrosoma [111]. En semen de cerdo se ha confirmado la presencia de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* [64] y el sulfato de gentamicina, antibiótico utilizado en el diluyente elaborado en este trabajo, podría estar limitando el crecimiento de las bacterias Gram negativas [64], favoreciendo la calidad espermática.

La vitalidad es un indicador de la integridad de la membrana y es necesaria para llevar a cabo sus funciones [42]. En relación con este parámetro, podemos observar en la gráfica 2, que la vitalidad va disminuyendo durante el tiempo de almacenamiento, al pasar de $83 \pm 5\%$ a las 0 horas a $70 \pm 8\%$ a las 72 horas de almacenamiento ($p < 0.05$) para el grupo control y de $84 \pm 2\%$ a las 0 horas a $74 \pm 6\%$ a las 72 horas de almacenamiento ($p < 0.05$) para el grupo de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina, lo que demuestra que, a concentraciones de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, la molécula antioxidante no mejora este parámetro espermático.

Ahora bien, bajo concentraciones de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina, no se muestran diferencias en los diferentes tiempo y tratamientos, adicionados a un diluyente de corta duración y almacenado a 16°C, sin embargo, esto no podría indicarnos que la molécula no esté funcionando, sino que se debe extender el tiempo de almacenamiento bajo nuestras condiciones de estudio, para posiblemente observar una mejora en este parámetro, ya que durante el tiempo de almacenamiento y condiciones de estudio, la vitalidad espermática se mantiene.

En el caso de la concentración de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina, se observó una disminución durante el tiempo de almacenamiento, al pasar de 85 \pm 3% a las 0 horas a 77 \pm 4% a las 24 horas ($p < 0.05$), para después mantenerse sin diferencias hasta las 72 horas, esto podría estar sugiriendo que a esta concentración también es posible mantener este parámetro espermático sin cambios y posiblemente ver una mejoría hasta después de las 72 horas de almacenamiento.



Gráfica 2. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de C-Ficocianina sobre la vitalidad espermática en función del tiempo de almacenamiento. El asterisco indica diferencia significativa entre diferentes tiempos. ANOVA ($p < 0.05$) $n=3$.

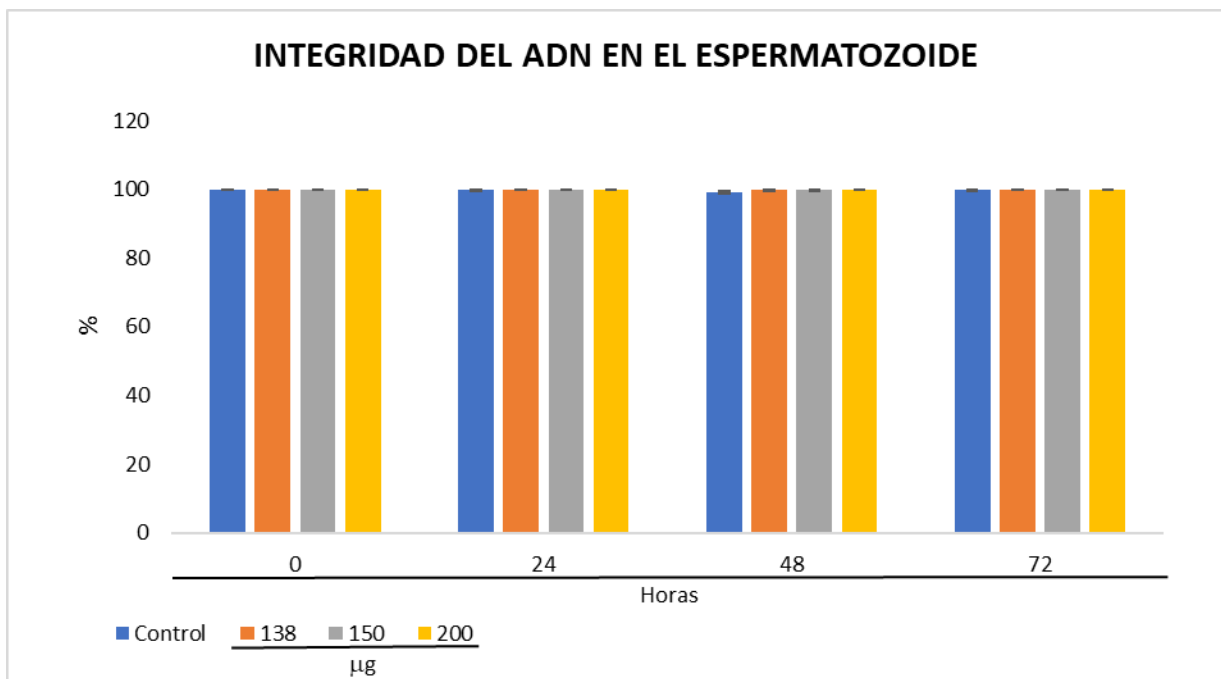
En los resultados de este estudio se observó que la vitalidad espermática va decreciendo después de 24 horas de almacenamiento, al pasar del 86% al 67% a las 72 horas, información que concuerda con la reportada por Antonio y colaboradores en 2019 [24], donde la vitalidad de las células en almacenamiento a 4°C, se deteriora rápidamente después de 24 horas, pasando del 90% al 16% a las 72 horas. Sin embargo, la diferencia en los porcentajes de vitalidad entre lo reportado por Antonio [24] y nuestro trabajo, se debe a la temperatura de almacenamiento que utilizó, en comparación con el nuestro (16°C). Por otro lado, en otro estudio [64] se reporta que cuando se almacenan espermatozoides en un diluyente a 16°C, el porcentaje de células vivas aumenta en comparación con 5°C y 25°C de almacenamiento. Se ha descrito que una temperatura inferior a las 15°C puede inducir en los espermatozoides de cerdo un choque térmico por frío [96], lo cual puede provocar daños irreversibles en la permeabilidad de las células a través de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática [42].

Por lo anterior, Leugoue y colaboradores en 2022 [30] señalaron en su estudio, que la ficocianina y otros componentes presentes en el alga espirulina, podrían estar neutralizando el exceso de ERO y, de esta manera, reducir los daños en la membrana plasmática del espermatozoide, inhibiendo la lipoperoxidación y preservando la vitalidad de la célula; cabe señalar que esto fue observado en un diluyente mantenido a 4°C, por 72 horas de almacenamiento, por lo que el efecto de la C-Ficocianina podría estar funcionando bajo las condiciones de estudio antes señaladas. Por otro lado, Zhu y colaboradores en 2022 [28] reportaron que, el adicionar cisteína mejora la vitalidad espermática, a los 5, 9 y 13 días de almacenamiento a 17°C; sin embargo, bajo nuestras condiciones de estudio (almacenamiento hasta por 3 días), no se mostraron diferencias a concentraciones de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina, por lo que en esta concentración se podría extender el tiempo esperando apreciar un cambio respecto a su control.

Adicional a lo anterior, en otro estudio [112] se reportó que, si el pH del diluyente disminuye por debajo de 6.8, podría dañar la membrana plasmática, produciendo daños irreversibles, por lo que el sistema amortiguador en la solución podría estar

manteniendo la integridad de la membrana, debido a que el pH del diluyente que es utilizado en este trabajo es de 7.2 [113], donde el bicarbonato y citrato de sodio podrían estar participando como molécula amortiguadora [113].

El núcleo del espermatozoide es uno de los componentes vitales involucrados en una eficiente fecundación, un daño al ADN puede comprometer la eficiencia reproductiva en la piara [114]. El ADN espermático presenta una alta compactación debido a la presencia de protaminas, proteínas ricas en arginina y cisteína [36, 115]; estas estructuras confieren protección al material genético contra alteraciones físicas y químicas que causen mutaciones, así como protección cuando se presente un incremento de ERO [36]. Es importante señalar que el ADN del espermatozoide de cerdo, presenta una alta resistencia a procesos de congelamiento y descongelamiento, esta resistencia parece estar relacionada con la cantidad de puentes disulfuro con los que cuentan las protaminas para estabilizar la cromatina [24].



Gráfica 3. Porcentaje de espermatozoides sin daño al ADN, utilizando diferentes concentraciones de C-Ficocianina y en función del tiempo de almacenamiento. n=3.

Respecto a la integridad del ADN (gráfica 3), no se muestran diferencias en los distintos tiempos y tratamientos, estos datos concuerdan con lo reportado en otro estudio [116], en donde la integridad de la cromatina se mantuvo hasta las 96 horas de almacenamiento en el diluyente BTS a 17°C, sugiriendo que se necesita mayor tiempo de almacenamiento para que se pueda presentar daño en el ADN y poder observar un potencial efecto protector de la C-Ficocianina. Otro factor importante a considerar es la temperatura, Antonio en 2019 [24] reportó que a una temperatura de almacenamiento de 4°C, el daño al ADN, se presentó en cerca del 40% de las células a partir de las 24 horas, por lo que la temperatura de almacenamiento de este estudio (16°C), podría estar manteniendo la integridad de esta estructura.

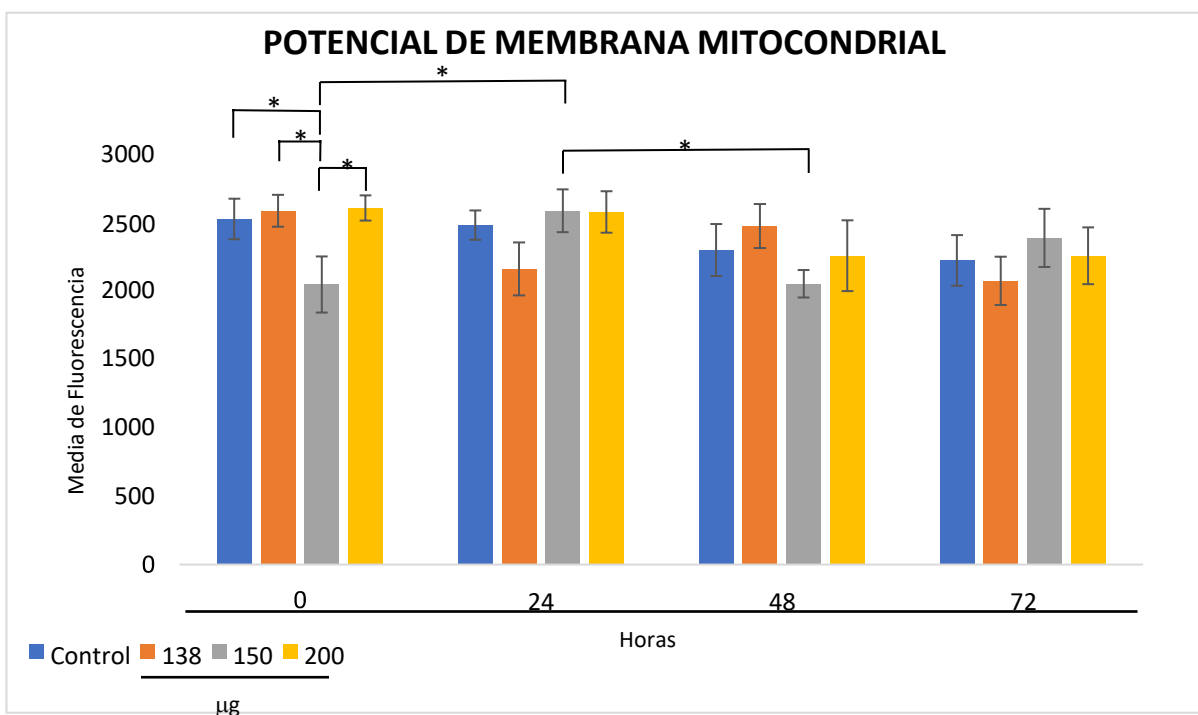
Mizera y colaboradores en 2019 [78] reportaron que la adición de 2, 4 y 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del extracto de *Spirulina maxima* en un diluyente para la conservación de espermatozoides bovinos almacenados a 4°C, mejora a las 24 horas de descongelación el porcentaje de integridad al ADN; estos datos podrían confirmar lo señalado en el párrafo anterior, donde la temperatura de almacenamiento de nuestro estudio (16°C) favorece la integridad del ADN, volviendo a hipotetizar que es necesario extender el tiempo de almacenamiento para que la C-Ficocianina pudiera demostrar su capacidad para ver resultados en este parámetro espermático.

Otro punto a considerar son los componentes del diluyente, en donde el bicarbonato y citrato de sodio, podrían estar preservando la integridad del ADN, esto debido a que la fragmentación se asocia a un descenso en el pH del medio [96], rompiendo los puentes disulfuro en la cromatina [117], por lo que las moléculas amortiguadoras de nuestro diluyente, podrían estar manteniendo el pH y, de esta manera, ayudando a mantener la integridad del material genético.

El potencial de membrana mitocondrial (PMM) es un indicador directo de movilidad [30, 118] y su interés radica en su importancia para la producción de adenosín trifosfato (ATP), sintetizado en la fosforilación oxidativa [119].

En la gráfica 4 podemos observar que, a las 0 horas de almacenamiento, el PMM disminuye a una concentración de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina (2035 ± 499), respecto al grupo control (2510 ± 362) y a los grupos con concentraciones de 138 μg

mL⁻¹ (2570 ± 283) y 200 µg mL⁻¹ de C-Ficocianina (2590 ± 224) (p<0.05), sin embargo a las 24 horas de almacenamiento, el PMM se incrementa en la concentración de 150 µg mL⁻¹ (2571 ± 379) respecto a la misma concentración en el tiempo 0 de almacenamiento (2035 ± 499) (p<0.05), para posteriormente (48 horas) volver a decrecer (2038 ± 246) (p<0.05).



Gráfica 4. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de C-Ficocianina sobre el potencial de membrana mitocondrial en función del tiempo. El asterisco indica diferencia significativa entre diferentes grupos y tiempos de almacenamiento. ANOVA (p<0.05) n=3.

Ahora bien, si se comparan los diferentes tratamientos de C-Ficocianina, respecto a su grupo control, no se muestran diferencias que mejoren este parámetro, estos datos concuerdan con lo reportado por Shepherd y colaboradores en 2022 [98], donde el PMM no muestra diferencia en el día 1 y 4 post-colecta, en un diluyente de larga duración almacenado a 17°C, esto podría indicarnos que la C-Ficocianina podría estar controlando la producción de ERO dentro de la mitocondria y por lo tanto esté preservando la integridad del organelo, lo anterior debido a que una disminución en el PMM se atribuye a un incremento en la producción de ERO [16, 120].

Por otro lado, Zhu y colaboradores en 2022 [28], reportaron que el adicionar cisteína como antioxidante a un diluyente (Modena) a temperatura de 17°C, no genera diferencia al día 1 de almacenamiento; sin embargo, a partir del día 5, 9 y 13, se presenta un incremento en este parámetro. En otro estudio [27] se observó que la adición de proantocianidinas oligoméricas, como antioxidante, en un diluyente BTS, almacenado a 17°C, mejora el potencial de membrana al día 3 y 5 de almacenamiento; lo que nos podría indicar que el tiempo de almacenamiento en este estudio, es muy corto para poder ver diferencias en el uso de C-Ficocianina entre las diferentes concentraciones y el grupo control.

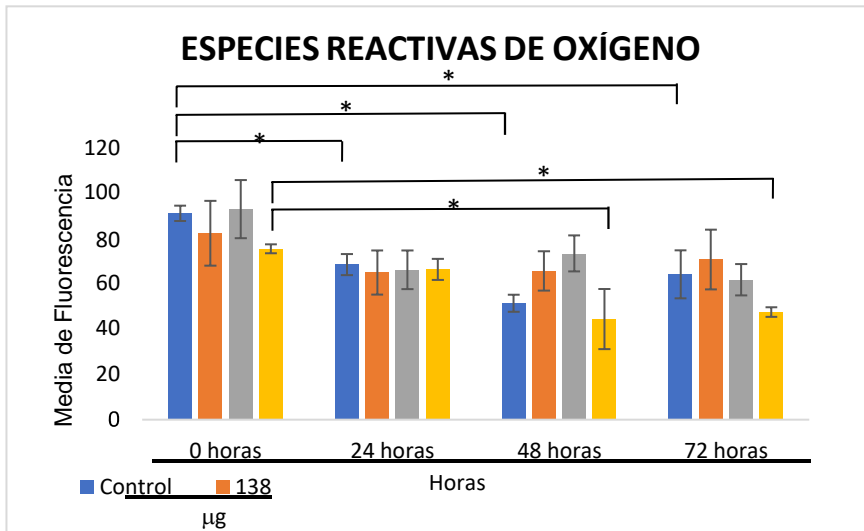
Como se mencionó anteriormente, la movilidad es una función que depende de la energía y se asocia a la actividad mitocondrial [30], una disminución de la movilidad es indicativo de un suministro insuficiente de energía por parte de las mitocondrias [121]; en los resultados de este trabajo puede observarse un mejoramiento en la movilidad en concentraciones de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina a las 48 horas de almacenamiento y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina a las 24 y 48 horas; por lo que podríamos hipotetizar que en las concentraciones antes señaladas, la C-Ficocianina está protegiendo a las mitocondrias para una correcta producción de ATP, lo anterior debido a que este organelo es sensible al proceso de enfriamiento, esta sensibilidad resulta en una disrupción en la síntesis de ATP y, consecuentemente, la reducción de la movilidad [121].

La exposición de la célula espermática a condiciones artificiales de mantenimiento incrementa la producción de ERO que normalmente surge como consecuencia de las condiciones aeróbicas en las que participan los espermatozoides vivos [122] y cuando las concentraciones de ERO alcanzan niveles críticos, se presenta un estrés oxidante en la célula [30, 78], provocando, por ejemplo, daño al ADN [36], oxidación de proteínas y lípidos [123], pérdida de la movilidad [30] y daño a la membrana [18].

En cuanto a la evaluación de este parámetro, en la gráfica 5 se observa una disminución, de la media de fluorescencia, en el grupo control de las 0 horas de almacenamiento (90 ± 6) respecto a las 24 (68 ± 8), 48 (51 ± 6) y 72 (63 ± 18) horas de almacenamiento ($p < 0.05$), respectivamente; así mismo en el grupo con una

concentración de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, la media de fluorescencia disminuye de las 0 horas de almacenamiento (75 ± 3) respecto a las 48 (44 ± 23) y 72 (47 ± 4) horas de almacenamiento, respectivamente ($p < 0.05$). Estos datos podrían relacionarse con la vitalidad espermática, donde este parámetro decrece en el grupo control de las 0 horas de almacenamiento ($83 \pm 5\%$) respecto a las 72 horas ($70 \pm 8\%$) y en el grupo con 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, disminuye de las 0 horas de almacenamiento (84 ± 2) respecto a las 72 horas (74 ± 6), por lo que la disminución en la producción de ERO podría deberse a muerte celular, toda vez que la DCFH-DA debe ser incorporado a la célula y ser diacetilado para emitir fluorescencia.

En cuanto a las concentraciones de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina, la producción de ERO no muestra diferencias entre los tiempos y tratamientos, esto podría deberse a que a estas concentraciones, la C-Ficocianina podría estar neutralizando ERO; lo anterior de acuerdo a un estudio de Leugoue y colaboradores en 2022 [30], en donde reportan que cuando se presenta un estrés oxidante, se provoca una pérdida de la movilidad, tal y como se aprecia en este estudio; sin embargo, en concentraciones de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina, a las 24 y 48 horas de almacenamiento y 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina a las 48 horas de almacenamiento, se observó un mejoramiento en este parámetro espermático, respecto al grupo control de cada tratamiento y tiempo de almacenamiento, lo que podría indicarnos que la C-Ficocianina está controlando la producción de ERO y de esta manera mejora la movilidad de la célula.



Gráfica 5. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de C-Ficocianina sobre las ERO en función del tiempo de almacenamiento. El asterisco indica diferencia significativa entre diferentes tiempos de almacenamiento. ANOVA ($p < 0.05$) $n = 3$.

Ahora bien, la mitocondria es el mayor productor intracelular de ERO [98] y existe una relación positiva entre el potencial de membrana mitocondrial y la producción de ERO [124, 125]. De acuerdo a Kurshunov y colaboradores [124], existe un aumento en la producción de ERO cuando hay un alto PMM; datos que concuerdan con este trabajo, en donde el PMM está generando ERO, sugiriendo que la C-Ficocianina y el sistema antioxidante del espermatozoide está podrían estar actuando en conjunto para neutralizar las ERO de manera eficiente; esto debido a que un exceso de ERO podría dañar la membrana interna de la mitocondria [126, 127], afectando el PMM y, por lo tanto, la producción de ATP, que se vería reflejado en una disminución de la movilidad espermática [28, 30].

Por otro lado, Antonio y colaboradores en 2019 [24], observaron que la adición de C-Ficocianina a un diluyente almacenado a 4°C, reduce la producción de ERO a las 0 y 24 horas de almacenamiento, respectivamente; datos que contrastan con los reportado en este trabajo en donde la producción de ERO no muestra una diferencia entre los controles de estos tiempos; lo anterior se debe a que la temperatura de almacenamiento en nuestro estudio (16°C), mantiene la integridad celular y la

producción de ERO es controlada; esto podría deberse a que la temperatura utilizada en el estudio de Antonio [24] (4°C), induce daños irreversibles en el espermatozoide [128] y uno de los factores responsables de este daño es el incremento en la producción de ERO [129], por lo que la C-Ficocianina, podría estar actuando en la neutralización de las ERO que se encuentran en elevada concentración. Adicional a lo anterior, podríamos hipotetizar que la C-Ficocianina funciona mejor a temperatura de 4°C, que a temperatura de 16°C.

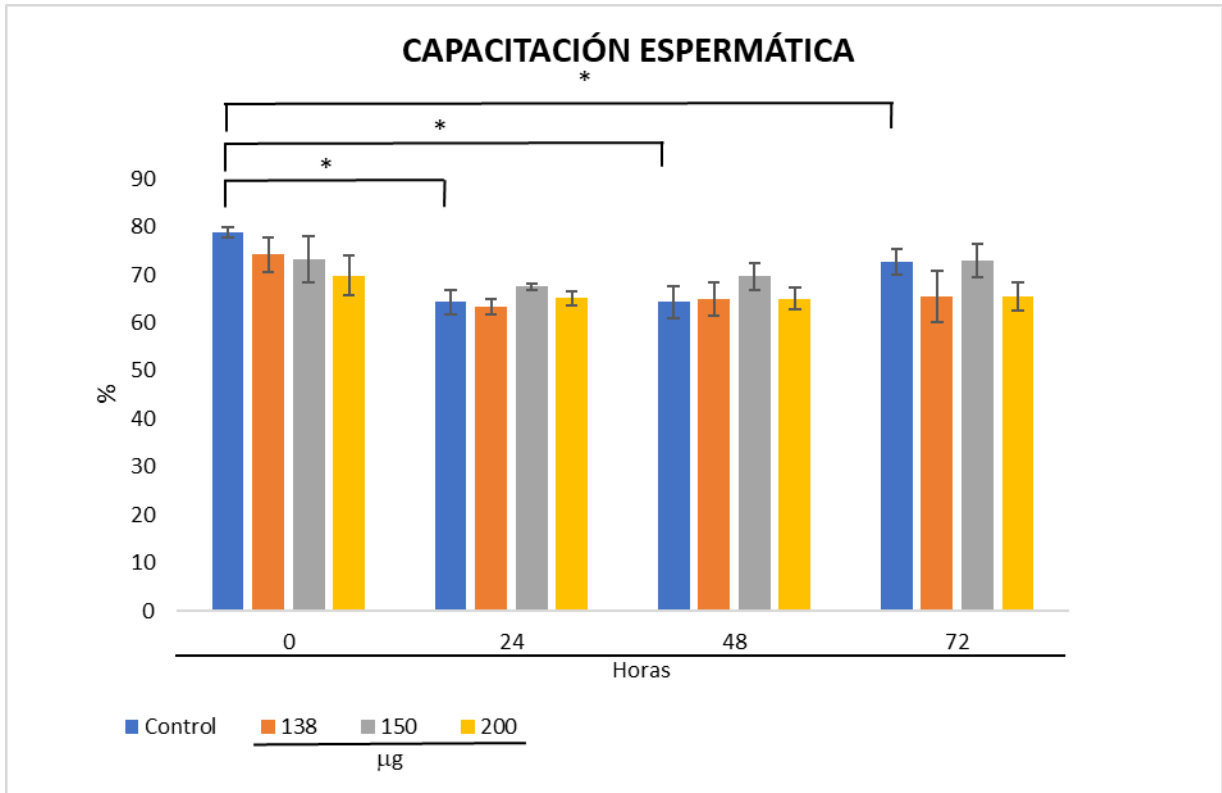
La capacitación espermática se define como el proceso fisiológico que involucra cambios morfológicos y bioquímicos en el espermatozoide para facilitar la unión y la penetración de la zona pelúcida para finalmente fusionarse con el ovocito [47, 130, 131]. La capacitación está regulada, entre otros factores, por reacciones de oxidoreducción [132], en donde las ERO, a niveles fisiológicos, actúan como mediadores en esta función espermática [78]. De Lamirande y colaboradores [132] reportaron que el H₂O₂ y el O₂⁻ participan en la regulación de los niveles de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) a través de la oxidación de la adenilil ciclasa a nivel de los grupos tiol de los residuos de cisteína que contiene. Esto a su vez se ha reportado en otros trabajos [93, 133].

Se ha observado que el H₂O₂ participa en la inhibición de la tirosina fosfatasa y en la estimulación de la tirosina cinasa [38, 93]; la inhibición de la tirosina fosfatasa provoca que aumenten los niveles de fosforilación de tirosinas, que acompañan las señales de transducción en la capacitación [133]. Lo anterior sucede a través de los residuos de tirosina que posee, debido a que para que la enzima se encuentre activa, necesita estar en estado reducido [134, 135].

Por otro lado, se ha reportado que el H₂O₂ y el O₂⁻, participan como mecanismo activador, ya que la adenilil ciclasa es oxidada por estas ERO en los grupos tiol de los residuos de cisteína [38, 93], esto provoca el incremento de AMPC en el espermatozoide y promueve que se lleve a cabo la actividad de la tirosina cinasa [133, 136]. La generación de ERO, la adenilil ciclasa y la activación de la fosforilación de tirosinas, provocarán que el espermatozoide se capacite [130].

En los resultados de nuestro trabajo (gráfica 6) se aprecia una disminución en el porcentaje de espermatozoides capacitados, en el grupo control de las 0 horas de almacenamiento ($79 \pm 3\%$) respecto a las 24 ($64 \pm 6\%$), 48 ($64 \pm 8\%$) y 72 ($73 \pm 6\%$) horas de almacenamiento ($p < 0.05$), respectivamente; para los demás tiempos y tratamientos no se muestran diferencias. Lo anterior podría relacionarse con los resultados en la producción de ERO, en donde se presenta una disminución, de la media de fluorescencia, en el grupo control de las 0 horas de almacenamiento (90 ± 6) respecto a las 24 (68 ± 8), 48 (51 ± 6) y 72 (63 ± 18) horas de almacenamiento ($p < 0.05$), respectivamente, lo que nos permite ver que cuando la producción de ERO disminuye, existe una disminución en la capacitación espermática, lo que también podría relacionarse con la vitalidad en el grupo control, donde decrece de las 0 a las 72 horas de almacenamiento, respectivamente.

En cuanto a los grupos, con tratamiento de $130 \mu\text{g mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de C-Ficocianina, las pruebas estadísticas no muestran diferencia entre los distintos tiempos de almacenamiento, lo que nos podría estar indicando que la producción de ERO's está siendo controlada por la C-Ficocianina, así como por el espermatozoide, a través de su sistema antioxidante, de tal manera que las mantiene dentro de los niveles fisiológicos para que pueda llevar a cabo la capacitación; además, de que el tiempo de almacenamiento de las células en el diluyente podría ser muy corto y esto nos podría estar impidiendo observar los efectos de la C-Ficocianina en el mejoramiento de la capacitación.



Gráfica 6. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de C-Ficocianina sobre la capacitación espermática en función del tiempo de almacenamiento. El asterisco indica diferencia significativa entre diferentes tiempos de almacenamiento. ANOVA ($p < 0.05$) $n=3$.

Ahora bien, otro factor a considerar es el diluyente utilizado en este trabajo, en donde las moléculas amortiguadoras (bicarbonato de sodio y citrato de sodio) mantienen los niveles de pH óptimos para que no se lleve a cabo una capacitación no regulada debido a variaciones en el pH del medio [97] y el agente quelante (EDTA) que se agrega al diluyente ayuda a evitar una capacitación y reacción acrosomal prematura [42].

La reacción acrosomal es un evento fisiológico que se presenta en el espermatozoide previamente capacitado, involucra la fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática de la célula y la liberación de enzimas proteolíticas [39, 137, 138].

Al igual que la capacitación, la reacción acrosomal está regulada, entre otros factores, por reacciones de oxido-reducción [132, 139, 140], en donde las ERO, a niveles fisiológicos, también actúan como mediadores en esta función espermática [39].

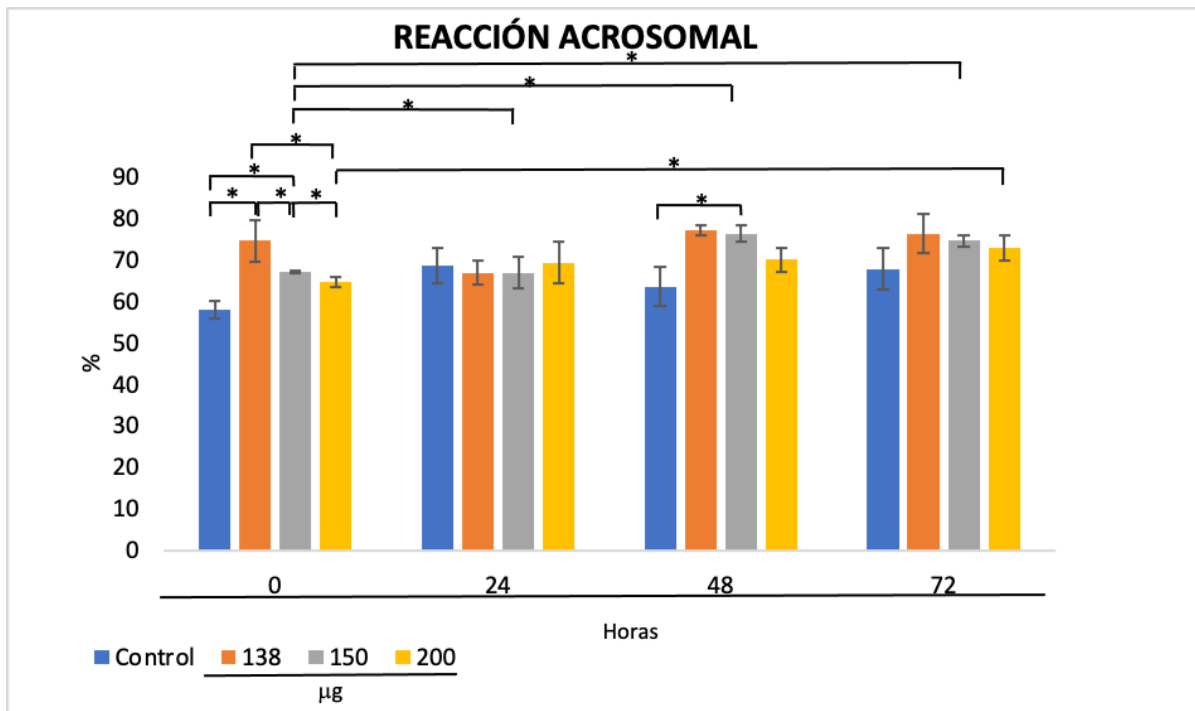
De Lamirande [132, 139, 140] y Juárez [36] reportaron que el O_2^- produce un incremento en la producción de AMPc, que provoca la activación de la proteína cinasa A (PKA), que a su vez fosforila los residuos de tirosinas de las proteínas, lo que provoca la liberación de enzimas proteolíticas contenidas en el acrosoma; estas enzimas abren paso al espermatozoide para penetrar y cruzar la zona pelúcida para, finalmente, fusionarse con el ovocito [133].

Juárez y colaboradores [36] señalaron que el H_2O_2 tiene un papel importante en la estabilidad de la membrana plasmática durante la capacitación, ya que participa en la inhibición de la tirosina fosfatasa [38, 93], esta enzima desfosforila moléculas y mantiene a la fosfolipasa A (FLPA) inactiva, es decir en estado oxidado [36]; lo anterior sucede a través de los residuos de serina que posee la FLPA [141]. Cuando el espermatozoide entra en contacto con la zona pelúcida, el O_2^- activa a la proteína tirosina cinasa (PKT), que a su vez activa a la proteína cinasa C (PKC) y esta fosforila y activa a la FLPA [142]; una vez activada la FLPA, se incrementa la fluidez de la membrana por remoción de ácidos grasos de las cadenas de fosfolípidos de fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, causando degradación de la membrana y generando ácido araquidónico y lisofosfolípidos [143].

En los resultados de este trabajo (gráfica 7) podemos observar el efecto que tiene la adición de diferentes concentraciones de C-Ficocianina a un diluyente de corta duración a $16^\circ C$, donde a la temperatura de almacenamiento inicial (0 horas) con una concentración de $138 \mu g mL^{-1}$ y $150 \mu g mL^{-1}$, mejora el porcentaje de reacción acrosomal ($75 \pm 4\%$ y $67 \pm 7\%$, respectivamente), esto en comparación con el grupo control ($57 \pm 5\%$) en un mismo tiempo ($p < 0.05$); cabe resaltar que existe una mejoría en el porcentaje de espermatozoides reaccionados con la concentración de $138 \mu g mL^{-1}$ ($75 \pm 4\%$) respecto a la concentración de $150 \mu g mL^{-1}$ ($67 \pm 7\%$) y $200 \mu g mL^{-1}$ ($65 \pm 3\%$), en este mismo tiempo ($p < 0.05$). Así mismo, a las 48 horas con una concentración de $150 \mu g mL^{-1}$, se mejora el porcentaje de este parámetro ($76 \pm 3\%$), esto en comparación con el grupo control ($63 \pm 11\%$) en un mismo tiempo ($p < 0.05$);

para los demás tiempos y concentraciones, las pruebas estadísticas no muestran diferencias. Esto nos podría indicar que la C-Ficocianina está preservando la membrana plasmática y protegiendo la estructura acrosomal, esto debido a su actividad antioxidante; al proteger estas estructuras, el espermatozoide es capaz de llevar a cabo la reacción acrosomal.

Por otro lado, se aprecia un aumento en el porcentaje de espermatozoides reaccionados en el grupo con concentración de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a las 0 horas de almacenamiento ($79 \pm 3\%$) respecto a las 24 ($64 \pm 6\%$), 48 ($64 \pm 8\%$) y 72 ($73 \pm 6\%$) horas de almacenamiento ($p < 0.05$), respectivamente. Esta misma tendencia la apreciamos en la concentración de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ al tiempo de almacenamiento inicial (0 horas) ($65 \pm 3\%$) respecto a las 72 horas de almacenamiento ($73 \pm 6\%$) ($p < 0.05$). Lo que nos indica que la C-Ficocianina, a una concentración de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, está mejorando la reacción acrosomal, pero el tiempo de almacenamiento es muy corto como para poder observar diferencia significativa respecto al grupo control en cada tiempo de almacenamiento.



Gráfica 7. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de C-Ficocianina en la reacción acrosomal en función del tiempo de almacenamiento. El asterisco indica diferencia significativa entre diferentes grupos y tiempos de almacenamiento. ANOVA ($p < 0.05$) $n=3$.

El estudio de Guerrero y colaboradores en 2021 [144], señalaron que la adición de extractos de *Cymbopogon citratus* e *Hypericum perforatum*, como agentes antioxidantes, a semen fresco de cerdo almacenado a 17°C; no muestran una disminución en el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma dañado, a las 24 horas de almacenamiento respecto al grupo control; sin embargo a las 72 horas de almacenamiento disminuye el porcentaje de acrosomas dañados, utilizado 0.125 μl y 0.0625 μl de extractos de *Cymbopogon citratus*, así como 0.250 μl , 0.125 μl y 0.0625 μl de *Hypericum perforatum*, respecto al grupo control. Estos datos contrastan con los nuestros, donde la adición de C-Ficocianina comienza a mejorar la reacción acrosomal a partir de la hora 0, para después mantenerse sin cambios a las 24 horas y posteriormente observar una mejoría a las 48 horas; esto nos podría indicar que existe una protección de la C-Ficocianina hacia el acrosoma a partir del tiempo inicial de almacenamiento.

Por otro lado, Martins y colaboradores en 2020 [145], observaron que la adición de vitamina C, trolox y glutatión reducido a un diluyente de larga duración y almacenado a 15°C, mejora la preservación del acrosoma, durante el tiempo de almacenamiento inicial (0 horas) y hasta 72 horas, respecto al grupo control; siendo el glutatión reducido la molécula con mayores porcentajes de acrosoma intacto, esto respecto al control. Datos que concuerdan con los reportados en este trabajo, donde a partir de las 0 horas comienza a observarse una mejora en la reacción acrosomal del espermatozoide.

Otro factor a considerar es el pH del medio. Cross [146], demostró que el porcentaje de espermatozoides reaccionados y que fueron expuestos a progesterona, fue menor cuando el pH extracelular se encontraba entre 6.7 y 7.0, pero presentando un mayor porcentaje en pH extracelular entre 7.0 y 7.6; el pH del diluyente utilizado en este estudio es de 7.2 y de acuerdo a lo anterior, se podría hipotetizar que, debido al pH

de nuestro medio, existe una buena respuesta a la reacción acrosomal, después de cada tiempo de incubación.

Ahora bien, el medio de capacitación utilizado en este trabajo, contiene lactato y piruvato, los cuales acidifican al espermatozoide [147], esto sugiere que, la presencia de estas moléculas retarda el desarrollo de la reacción acrosomal [146]. Cross [146] demostró que, en ausencia de lactato y piruvato de sodio, se reduce la respuesta para la reacción acrosomal, por lo que la presencia de estas moléculas podría estar favoreciendo la respuesta para la reacción acrosomal. Por otro lado, la molécula de EDTA (agente quelante) que se utilizó en el diluyente de este trabajo, ayudó a evitar una reacción acrosomal prematura [42].

XV. CONCLUSIONES.

- La C-Ficocianina a 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y a 48 horas de almacenamiento; así como a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 24 y 48 horas de almacenamiento, respectivamente, mejora la movilidad total espermática.
- A concentraciones de 138 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, al tiempo de almacenamiento inicial (0 horas); así como a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y a 48 horas de almacenamiento, aumenta el número de células con reacción acrosomal.
- El diluyente utilizado en este trabajo, ayuda a mantener a la célula viva.
- La temperatura de almacenamiento utilizada en este trabajo es la indicada para mantener la calidad (vitalidad, integridad del ADN) y fisiología espermática (PMM, producción de ERO y capacitación) de cerdo, por un periodo de tiempo de 1 a 3 días a 16°C.

XVI. PERSPECTIVAS.

Es de notar que actualmente existen investigaciones donde se reporta el uso de la C-Ficocianina como molécula antioxidante, antiinflamatoria, neuroprotectora o hepatoprotectora pero, pocos estudios corresponden a su uso como antioxidante en diluyentes para la conservación de espermatozoides de cerdo, siendo éste, uno de

ellos; por lo tanto, el presente estudio es un punto de partida para entender mejor el mecanismo de acción de la C-Ficocianina como molécula antioxidante en el almacenamiento de gametos en diluyentes de corta, mediana o larga duración, así como su participación en la actividad enzimática antioxidante de la célula espermática.

Por otro lado, el uso de antibióticos en los diluyentes es muy utilizado a nivel mundial ya que prolonga la vida del espermatozoide y reduce el riesgo de transmisión de enfermedades, pero el uso de estos conlleva el riesgo de generar resistencia bacteriana, esta última es un grave riesgo para la salud humana y economía mundial, ya que los antibióticos incorporados a los diluyentes pueden seguir una ruta para la diseminación de resistencias a los antibióticos, esto es a través de la inseminación artificial, donde los antibióticos ingresan al cuerpo de la cerda y esto podría ser una causa de riesgo, ya que esta resistencia puede ingresar a la cadena alimenticia del humano.

Actualmente se estudian alternativas para el control bacteriano en el almacenamiento de espermatozoides de cerdo, esto como parte de la estrategia mundial de defensa contra la resistencia a los antimicrobianos y una de estas estrategias es el uso de diluyentes que se almacenan a bajas temperaturas (5°C), que contienen antioxidantes, inhibidores de la capacitación y protectores de membrana; esta alternativa podría ser una opción para preservar la calidad de las células espermáticas e inhibir el crecimiento de bacterias en ausencia de antibióticos. Otros estudios señalan el uso de péptidos antimicrobianos, nanopartículas o compuestos naturales para el control microbiano; por lo que la C-Ficocianina, al ser un compuesto natural, podría ser una estrategia viable para conservar la calidad del espermatozoide a temperaturas bajas y sin el uso de antibióticos.

XVII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Rego, S., *Artificial Insemination of Farm Animals*. 2019: Delve Publishing.
2. Yar Qamar, A., et al., *Biotechnology and Animal Reproduction*, in *The Role of Biotechnology in Improvement of Livestock Animal Health and Biotechnology.*, M. Abu-Bakr, A. Saeed, and O. Kul, Editors. 2015, Springer.: Berlin. p. 1-26.

3. Dias, et al., *Inseminación Artificial*, in *Reproducción de Animales Domésticos*. 2006, Limusa: Ciudad de México. p. 215-216.
4. Waberski, D., et al., *Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges*. *Theriogenology*, 2019. **137**: p. 2-7.
5. Rotaru, I. *Evolution of pigs' livestock and pork production in the world*. in *Scientific Papers Series D. Animal Science*. 2018.
6. Servicio Nacional de Sanidad, I.y.C.A. México, *entre los principales productores y consumidores de carne de cerdo en América Latina y el mundo*. Prensa Septiembre, 2022; Available from: <https://www.gob.mx/senasica/prensa/mexico-entre-los-principales-productores-y-consumidores-de-carne-de-cerdo-en-america-latina-y-el-mundo-313553>.
7. Will, K.J., et al., *Perspectives of intrauterine artificial insemination applicability in gilts*. *Ciência Rural*, 2021. **51**.
8. Hernández-Caravaca, I., et al., *Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows*. *Animal reproduction science*, 2012. **136**(1-2): p. 14-22.
9. Watson, P. and J. Behan, *Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial*. *Theriogenology*, 2002. **57**(6): p. 1683-1693.
10. Phillips, C.J., *Principles of cattle production*. 2018: CABI.
11. Trujillo, M.E., H. Silva Santos, and O. Gutiérrez Pérez, *Manejo del semen*, in *Reproducción del cerdo: una visión práctica*. 2019. p. 116-131.
12. Bussalleu, E. and E. Torner, *Quality improvement of boar seminal doses*, in *Boar Reproduction*. 2013, Springer. p. 517-550.
13. Rodríguez-Tobón, E., et al., *Boar sperm incubation with reduced glutathione (GSH) differentially modulates protein tyrosine phosphorylation patterns and reorganization of calcium in sperm, in vitro fertilization, and embryo development depending on concentrations*. *Research in Veterinary Science*, 2021. **135**: p. 386-396.

14. Gibb, Z., et al., *Functions and effects of reactive oxygen species in male fertility*. Animal reproduction science, 2020. **220**: p. 106456.
15. Castellini, C., et al., *Pathophysiology of mitochondrial dysfunction in human spermatozoa: Focus on energetic metabolism, oxidative stress and apoptosis*. Antioxidants, 2021. **10**(5): p. 695.
16. Aitken, R.J., *Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage*. Molecular reproduction and development, 2017. **84**(10): p. 1039-1052.
17. Arenas Ríos, E., et al., *Participación de las Especies Reactivas de Oxígeno, desde la Formación de espermatozoides, hasta la Capacitación Espermática.*, in *Ciencias Biológicas y Químicas. La labor investigadora e innovadora en México.* , M.d.R. Ramírez Jiménez, et al., Editors. 2015, Science Associated Editors L.L.C: Estados Unidos de América. p. 123-137.
18. Arenas-Ríos, E., et al., *Participación de las especies reactivas de oxígeno en la fisiología espermática*. Revista Iberoamericana deficiencias, 2014. **1**: p. 73.
19. Wright, C., S. Milne, and H. Leeson, *Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility*. Reproductive biomedicine online, 2014. **28**(6): p. 684-703.
20. Ahmed, H., et al., *Supplementation of green tea extract (GTE) in extender improves structural and functional characteristics, total antioxidant capacity and in vivo fertility of buffalo (Bubalus bubalis) bull sperm atozoa*. Theriogenology, 2020. **145**: p. 190-197.
21. Pezo, F., et al., *Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm*. Cryobiology, 2021. **98**: p. 5-11.
22. Pezo, F., et al., *Oxidative and nitrosative stress in frozen-thawed pig spermatozoa. I: Protective effect of melatonin and butylhydroxytoluene on sperm function*. Research in Veterinary Science, 2021. **136**: p. 143-150.
23. Gupta, N.K. and K.P. Gupta, *Effects of C-Phycocyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*. Environmental toxicology and pharmacology, 2012. **34**(3): p. 941-948.

24. Antonio Marcos, E., et al., *Can C-phycoocyanin be used as a sperm protector?* 2019, *Veterinaria México OA*.
25. Mysliwa-Kurdziel, B. and K. Solymosi, *Phycobilins and phycobiliproteins used in food industry and medicine*. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2017. **17**(13):p. 1173-1193.
26. Ali, M., M. Martinez, and N. Parekh, *Are antioxidants a viable treatment option for male infertility?* *Andrologia*, 2021. **53**(1): p. e13644.
27. Li, Q., et al., *Effects of oligomeric proanthocyanidins on quality of boar semen during liquid preservation at 17 C*. *Animal reproduction science*, 2018. **198**: p. 47-56.
28. Zhu, Z., Y. Zeng, and W. Zeng, *Cysteine improves boar sperm quality via glutathione biosynthesis during the liquid storage*. *Animal Bioscience*, 2022. **35**(2): p. 166.
29. He, Y., et al., *Boar sperm quality and oxidative status as affected by rosmarinic acid at 17 C*. *Tropical Animal Health and Production*, 2020. **52**(4): p. 2169- 2177.
30. LEUGOUÉ, S.K., et al., *Spirulina (Arthrospira platensis) extract promotes motility, microscopic, and antioxidative parameters of ram semen during refrigerated storage*. *Black Sea Journal of Agriculture*. **5**(4): p. 481-490.
31. Tian, X., et al., *Supplementation of salvianic acid A to boar semen extender to improve seminal quality and antioxidant capacity*. *Animal Science Journal*, 2019. **90**(9): p. 1142-1148.
32. Carvajal Carvajal, C., *Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo*. *Medicina Legal de Costa Rica*, 2019. **36**(1): p. 91-100.
33. Elejalde Guerra, J. *Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes*. in *Anales de medicina interna*. 2001. SciELO Espana.
34. Phaniendra, A., D.B. Jestadi, and L. Periyasamy, *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases*. *Indian journal of clinical biochemistry*, 2015. **30**(1): p. 11-26.

35. Vaquero-Raya, E. and X. Molero-Richard, *Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas:¿ una posible diana terapéutica?* Gastroenterología y hepatología, 2005. **28**(8): p. 473-484.
36. Juárez-Rojas, L., et al., *Physiological role of reactive oxygen species in testis and epididymal spermatozoa.* Andrologia, 2022. **54**(4): p. e14367.
37. Olivera, M., et al., *El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización.* Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 2006. **19**(4): p. 426- 436.
38. Ford, W., *Regulation of sperm function by reactive oxygen species.* Human reproduction update, 2004. **10**(5): p. 387-399.
39. Kothari, S., et al., *Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function.* 2010.
40. Agarwal, A., et al., *Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility?* Therapeutic Advances in Urology, 2016. **8**(5): p. 302-318.
41. Koziorowska-Gilun, M., et al., *Seasonal changes in antioxidant defence systems in seminal plasma and fluids of the boar reproductive tract.* Reproductive biology, 2011. **11**(1): p. 37-47.
42. Gadea, J., *Semen extenders used in the artificial insemination of swine.* Spanish Journal of Agricultural Research, 2003. **1**(2): p. 17-27.
43. Aitken, J. and H. Fisher, *Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk.* Bioessays, 1994. **16**(4): p. 259-267.
44. Silvestre, M.A., et al., *Role of antioxidants in cooled liquid storage of mammal spermatozoa.* Antioxidants, 2021. **10**(7): p. 1096.
45. Polishchuk, S., et al., *Status of prooxidant and antioxidant systems in the sperm and seminal plasma of breeding boars of large white breed and SS23 synthetic line.* Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society, 2022. **73**(1).

46. Kim, S., Y.-J. Lee, and Y.-J. Kim, *Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 C*. Animal Reproduction Science, 2011. **124**(1-2): p. 118-124.
47. Chen, Y., et al., *GPx6 is involved in the in vitro induced capacitation and acrosome reaction in porcine sperm*. Theriogenology, 2020. **156**: p. 107-115.
48. Parrilla, I., et al., *Boar seminal plasma: current insights on its potential role for assisted reproductive technologies in swine*. Animal Reproduction, 2020. **17**.
49. Nolfi-Donagan, D., A. Braganza, and S. Shiva, *Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement*. Redox biology, 2020. **37**: p. 101674.
50. Antonio Marcos, E.G., *Producción y usos de Cficocianina de Arthrospira maxima*, ed. Ó. Monroy Hermosillo, et al. 2019: Universidad Autónoma Metropolitana.
51. Kannaujiya, V.K., S. Sundaram, and R.P. Sinha, *Structural and functional significance of phycobiliproteins*, in *Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications*. 2017, Springer. p. 21-44.
52. Díaz Domínguez, G., V. Marsán Suárez, and L.O. del Valle Pérez, *Principales propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la ficobiliproteína C-ficocianina*. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 2016. **32**(4): p. 447-454.
53. Eriksen, N.T., *Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine*. Applied microbiology and biotechnology, 2008. **80**(1): p. 1-14.
54. Rojas-Franco, P., et al., *Arthrospira maxima (Spirulina) prevents endoplasmic reticulum stress in the kidney through its C-phycocyanin*. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B, 2021. **22**(7): p. 603-608.
55. AlQranei, M.S., et al., *C-phycocyanin attenuates RANKL-induced osteoclastogenesis and bone resorption in vitro through inhibiting ROS levels, NFATc1 and NF-κB activation*. Scientific reports, 2020. **10**(1): p. 1-13.
56. Llopiz, A., A. Milián, and G.D. Domínguez, *Purificación y caracterización de la ficocianobilina*.

57. Marín-Prida, J., et al., *Aplicaciones de la C-Ficocianina: Métodos de obtención y propiedades farmacológicas/Applications of C-Phycocyanin: Methods of purification and pharmacological properties*. Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, 2015. **1**(1).
58. Gupta, M., U.N. Dwivedi, and S. Khandelwal, *C-Phycocyanin: an effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin*. Toxicology Letters, 2011. **204**(1): p. 2-11.
59. Romay, C., et al., *Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae*. Inflammation research, 1998. **47**(1): p. 36-41.
60. Condoy, M.C. and J.A. Cevallos, *Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina*. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 2017. **18**(9): p. 1-11.
61. Pezo, F., et al., *Preservation of boar semen: An update*. Reproduction in domestic animals, 2019. **54**(3): p. 423-434.
62. Govindasamy, K., et al., *Efficacy of different extenders on sperm characteristics and fertility in crossbred pigs of north-eastern India*. Veterinarski arhiv, 2016. **86**(4): p. 515-528.
63. Bresciani, C., et al., *Reproductive efficiency of a new modified boar semen extender for liquid storage*. Livestock Science, 2013. **157**(1): p. 384-388.
64. Gaczarzewicz, D., et al., *Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability*. Turkish Journal of Biology, 2015. **39**(4): p. 582-594.
65. Fraser, L., et al., *Effect of extender composition and storage temperatures on motility of preserved boar semen*. Journal of Animal and Feed Sciences, 2002. **11**(4): p. 661-670.
66. Bailey, J.L., et al., *Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry*. Theriogenology, 2008. **70**(8): p. 1251-1259.
67. Casas, I., et al., *The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability*. Theriogenology, 2010. **74**(6): p. 940-950.

68. Flores, E., et al., *Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm*. Theriogenology, 2008. **69**(9): p. 1083-1094.
69. Bhat, V.B. and K. Madyastha, *C-phycoerythrin: a potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro*. Biochemical and biophysical research communications, 2000. **275**(1): p. 20-25.
70. Estrada, J.P., P.B. Bescós, and A.V. Del Fresno, *Antioxidant activity of different fractions of Spirulina platensis protean extract*. Il farmaco, 2001. **56**(5- 7): p. 497-500.
71. Romay, C., D. Remírez, and R. González, *Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2001. **20**(1): p. 38-41.
72. Renugadevi, K., et al., *Antioxidant activity of phycoerythrin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria Geitlerinema sp TRV57*. Biocatalysis and agricultural biotechnology, 2018. **16**: p. 237-242.
73. McCarty, M.F., *"Iatrogenic Gilbert syndrome"—A strategy for reducing vascular and cancer risk by increasing plasma unconjugated bilirubin*. Medical hypotheses, 2007. **69**(5): p. 974-994.
74. Belay, A., *The potential application of Spirulina (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management*. J Am Nutraceutical Assoc, 2002. **5**: p. 27-48.
75. Lu, Y.-M., W.-Z. Xiang, and Y.-H. Wen, *Spirulina (Arthrospira) industry in Inner Mongolia of China: current status and prospects*. Journal of applied phycology, 2011. **23**(2): p. 265-269.
76. Ivanova, K.G., et al., *The biliprotein C-phycoerythrin modulates the early radiation response: a pilot study*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2010. **695**(1-2): p. 40-45.
77. Kistanova, E., et al., *Effect of the Spirulina platensis included in the main diet on the boar sperm quality*. Biotechnology in Animal Husbandry, 2009. **25**(5-6- 1): p. 547-557.

78. Mizera, A., M. Kuczaj, and A. Szul, *Impact of the Spirulina maxima extract addition to semen extender on bovine sperm quality*. Italian Journal of Animal Science, 2019. **18**(1): p. 601-607.
79. Badr, M., et al., *Spirulina platensis extract addition to semen extender enhances cryotolerance and fertilizing potentials of buffalo bull spermatozoa*. Animal Reproduction, 2021. **18**.
80. Córdova, A., et al., *Oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation*. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 2009. **3**(1): p. 01-38.
81. Sancho, S. and I. Vilagran, *The boar ejaculate: sperm function and seminal plasma analyses*, in *Boar Reproduction*. 2013, Springer. p. 471-516.
82. Organization, W.H., *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. 2021: World Health Organization.
83. Björndahl, L., I. Söderlund, and U. Kvist, *Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment*. Human reproduction, 2003. **18**(4): p. 813-816.
84. Tejada, R.I., et al., *A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence*. Fertility and sterility, 1984. **42**(1): p. 87-91.
85. Villaverde, A.I.S.B., et al., *Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa*. Theriogenology, 2013. **80**(7): p. 730-737.
86. Bussalleu, E., et al., *Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa*. Microscopy research and technique, 2005. **68**(5): p. 277-283.
87. Pipan, M.Z., et al., *The influence of macro-and microelements in seminal plasma on diluted boar sperm quality*. Acta Veterinaria Scandinavica, 2017. **59**(1): p. 1-9.
88. Kim, H. and X. Xue, *Detection of total reactive oxygen species in adherent cells by 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate staining*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2020(160): p. e60682.

89. Mayorga-Torres, B., et al., *Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility?* *Andrologia*, 2017. **49**(5): p. e12659.
90. Zhang, B., et al., *Freeze-thawing impairs the motility, plasma membrane integrity and mitochondria function of boar spermatozoa through generating excessive ROS.* *BMC veterinary research*, 2021. **17**(1): p. 1-9.
91. Juanpanich, T., et al., *The relationship between reactive oxygen species, DNA fragmentation, and sperm parameters in human sperm using simplified sucrose vitrification with or without triple antioxidant supplementation.* *Korean Journal of Fertility and Sterility*, 2022.
92. Ded, L., et al., *Fluorescent analysis of boar sperm capacitation process in vitro.* *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2019. **17**(1): p. 1-11.
93. Awda, B.J., M. Mackenzie-Bell, and M.M. Buhr, *Reactive oxygen species and boar sperm function.* *Biology of reproduction*, 2009. **81**(3): p. 553-561.
94. Rungruangsak, J., et al., *A comparative study of two methods to determine acrosome integrity of frozen-thawed boar sperm: FITC-PNA/EthD-1 versus Coomassie blue staining.* *Veterinarska stanica*, 2021. **52**(6): p. 629-638.
95. Ramió-Lluch, L., et al., *"In vitro" capacitation and further progesterone-induced acrosome exocytosis are linked to specific changes in the expression and location of threonine phosphorylation of boar spermatozoa.* *Reproduction in Domestic Animals*, 2019. **54**(8): p. 1085-1094.
96. Johnson, L., et al., *Storage of boar semen.* *Animal reproduction science*, 2000. **62**(1-3): p. 143-172.
97. Dubé, C., et al., *Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation.* *Theriogenology*, 2004. **62**(5): p. 874-886.
98. Shepherd, M.J., et al., *Effects of boar sperm antioxidant supplementation on fertility.* *Animal Reproduction Science*, 2022. **237**: p. 106923.
99. Fang, Y., et al., *Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage.* *Small ruminant research*, 2015. **130**: p. 178-182.

100. Zhandi, M. and V. Ghadimi, *Effect of glutathione-supplemented INRA82 extender on miniature Caspian stallion sperm quality during storage at 5 C*. Journal of Equine Veterinary Science, 2014. **34**(5): p. 606-610.
101. Partyka, A. and W. Nizański, *Supplementation of Avian Semen Extenders with Antioxidants to Improve Semen Quality—Is It an Effective Strategy?* Antioxidants, 2021. **10**(12): p. 1927.
102. Sotler, R., et al., *Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health*. Acta Clinica Croatica, 2019. **58**(4.): p. 726-736.
103. Gao, Q., et al., *Antioxidant and prooxidant activities of phenolic acids commonly existed in vegetables and their relationship with structures*. Food Science and Technology, 2022. **42**.
104. Karageorgiou, M.A., et al., *A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility*. Acta Veterinaria Brno, 2016. **85**(1): p. 23-31.
105. Vyt, P., et al., *Air contact influences the pH of extended porcine semen*. Reproduction in domestic animals, 2007. **42**(2): p. 218-220.
106. Henning, H., et al., *Changes in responsiveness to bicarbonate under capacitating conditions in liquid preserved boar spermatozoa in vitro*. Control of Pig Reproduction VIII, 2010. **66**: p. 79.
107. Purdy, P., et al., *Implications of the pH and temperature of diluted, cooled boar semen on fresh and frozen-thawed sperm motility characteristics*. Theriogenology, 2010. **74**(7): p. 1304-1310.
108. Ball, B., *Role of oxidative stress in normal and abnormal function of equine spermatozoa*. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 2009. **33**(Suppl. 6): p. 20-24.
109. Schulze, M., et al., *Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders*. Theriogenology, 2016. **85**(1): p. 39-46.
110. Martín, L.O.M., et al., *Bacterial contamination of boar semen affects the litter size*. Animal Reproduction Science, 2010. **120**(1-4): p. 95-104.

111. Tvrdá, E., et al., *The Efficiency of Selected Extenders against Bacterial Contamination of Boar Semen in a Swine Breeding Facility in Western Slovakia*. *Animals*, 2021. **11**(11): p. 3320.
112. Vergara, V. and C. Ronald, *Factores que influyen en la calidad y principales características seminales del verraco*. 2014.
113. Medrano, A., et al., *Variations in the proportion of glycolytic/non-glycolytic energy substrates modulate sperm membrane integrity and function in diluted boar samples stored at 15–17 C*. *Reproduction in domestic animals*, 2005. **40**(5): p. 448-453.
114. Baiee, F., et al., *Sperm DNA Impairment in the Bull: Causes, Influences on Reproduction and Evaluations*. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 2018. **41**(1).
115. Golan, R., et al., *Andrology: Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry*. *Human reproduction*, 1996. **11**(7): p. 1457-1462.
116. De Ambrogi, M., et al., *Effect of storage in short-and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa*. *international journal of andrology*, 2006. **29**(5): p. 543-552.
117. Ausejo, R., et al., *Nuclear DNA Fragmentation in Boar Spermatozoa: Measurement Methods and Reproductive Performance Implications*. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022. **9**.
118. Manosalva, P., et al., *Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos*. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2005. **16**(2): p. 114-128.
119. Andrade, A., *Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino*. 2005, Universidad Complutense de Madrid: Madrid, España. p. 287.
120. Guthrie, H. and G. Welch, *Effects of reactive oxygen species on sperm function*. *Theriogenology*, 2012. **78**(8): p. 1700-1708.

121. Zarei, M., et al., *Egg yolk enriched with polyunsaturated fatty acids (PUFAs) improves the shelf life of ram semen in liquid storage*. Small Ruminant Research, 2018. **166**: p. 87-92.
122. Agarwal, A., S. Gupta, and R.K. Sharma, *Role of oxidative stress in female reproduction*. Reproductive biology and endocrinology, 2005. **3**(1): p. 1-21.
123. Villaverde, A.I.S.B., J. Netherton, and M.A. Baker, *From past to present: The link between reactive oxygen species in sperm and male infertility*. Antioxidants, 2019. **8**(12): p. 616.
124. Korshunov, S.S., V.P. Skulachev, and A.A. Starkov, *High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria*. FEBS letters, 1997. **416**(1): p. 15-18.
125. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. The Journal of physiology, 2003. **552**(2): p. 335-344.
126. Wojtczak, L., et al., *Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in Ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for mitochondrial energetics: further arguments for the role of Ca²⁺ in the mechanism of the Crabtree effect*. European journal of biochemistry, 1999. **263**(2): p. 495-501.
127. Zhu, Z., et al., *Negative effects of ROS generated during linear sperm motility on gene expression and ATP generation in boar sperm mitochondria*. Free Radical Biology and Medicine, 2019. **141**: p. 159-171.
128. Medeiros, C., et al., *Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?* Theriogenology, 2002. **57**(1): p. 327-344.
129. Vemo, B.N., et al., *Effects of ethanol extract of Bersama engleriana leaves on oxidative stress and reproductive parameters in male Guinea pig (Cavia porcellus) exposed to cypermethrin*. International Journal of Biological and Chemical Sciences, 2017. **11**(5): p. 2243-2253.
130. O'Flaherty, C., *Redox regulation of mammalian sperm capacitation*. Asian journal of andrology, 2015. **17**(4): p. 583.

131. Gervasi, M.G. and P.E. Visconti, *Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective*. Molecular Reproduction and Development, 2016. **83**(10): p. 860-874.
132. De Lamirande, E., et al., *Reactive oxygen species and sperm physiology*. Reviews of reproduction, 1997. **2**: p. 48-54.
133. Dutta, S., et al., *Physiological role of ROS in sperm function*, in *Male infertility*. 2020, Springer. p. 337-345.
134. Heffetz, D., et al., *The insulinomimetic agents H₂O₂ and vanadate stimulate protein tyrosine phosphorylation in intact cells*. Journal of Biological Chemistry, 1990. **265**(5): p. 2896-2902.
135. Gu, W. and N.B. Hecht, *Developmental expression of glutathione peroxidase, catalase, and manganese superoxide dismutase mRNAs during spermatogenesis in the mouse*. Journal of andrology, 1996. **17**(3): p. 256-262.
136. Zhang, H. and R.-L. Zheng, *Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions*. Free radical research, 1996. **25**(4): p. 347-354.
137. Prajapati, P., et al., *Elevated and sustained intracellular calcium signalling is necessary for efficacious induction of the human sperm acrosome reaction*. International journal of molecular sciences, 2022. **23**(19): p. 11253.
138. Tulsiani, D.R., et al., *The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization*. Experimental cell research, 1998. **240**(2): p. 151-164.
139. de Lamirande, E., et al., *Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates*. Journal of Andrology, 1998. **19**(5): p. 585-594.
140. de Lamirande, E., G. Lamothe, and M. Villemure, *Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation*. Free Radical Biology and Medicine, 2009. **46**(10): p. 1420-1427.
141. García, G.A. and A.G. Cardona, *Fosfolipasas A2: Grandes familias y mecanismos de acción*. Revista Repertorio de Medicina y Cirugía, 2009. **18**(4): p. 199-209.

142. Breitbart, H. and B. Spungin, *The biochemistry of the acrosome reaction*. Molecular human reproduction, 1997. **3**(3): p. 195-202.
143. Brucker, C. and G. Lipford, *The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update*. Human reproduction update, 1995. **1**(1): p. 51-62.
144. Guerrero-Guzmán, A., et al., *Antioxidant effect of Cymbopogon citratus and Hypericum perforatum extracts in boar semen like a new alternative for conservation*. All Life, 2021. **14**(1): p. 954-962.
145. Martins, V., et al., *Antioxidant effect on viability of boar semen cooled to 15° C*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2020. **72**: p. 145-152.
146. Cross, N., *Effect of pH on the development of acrosomal responsiveness of human sperm*. Andrologia, 2007. **39**(2): p. 55-59.
147. Babcock, D.F., G. Rufo Jr, and H.A. Lardy, *Potassium-dependent increases in cytosolic pH stimulate metabolism and motility of mammalian sperm*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1983. **80**(5): p. 1327-1331.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00116
Matricula: 2203801649

Efecto del uso de la C-Ficocianina, como agente antioxidante, durante el almacenamiento de espermatzoide de cerdo (*Sus scrofa*), en un diluyente de corta duración, a una temperatura de 16°C.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 12 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ERNESTO RODRIGUEZ TOBON
DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA
DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: MARIA ISABELLA BERBER ARANDA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Isabella

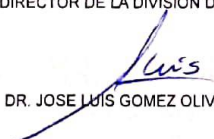
MARIA ISABELLA BERBER ARANDA
ALUMNA

REVISÓ




MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE




DR. ERNESTO RODRIGUEZ TOBON

VOCAL



DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL



M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA

SECRETARIO



DR. ALEJANDRO AVALOS RODRIGUEZ