

## Efecto de la adición de un antioxidante sobre la actividad mitocondrial y la motilidad del espermatozoide bovino criopreservado

Effect of the addition of an antioxidant on the mitochondrial activity and motility of cryopreserved bovine spermatozoa

Mejía-Flores Itzayana<sup>1</sup>, Hernández-Ignacio Javier<sup>2</sup>, Chiquete-Félix Natalia<sup>3</sup>, Cornejo-Cortes Miguel Angel<sup>4</sup>, Lammoglia-Villagómez Miguel Ángel<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento Ciencias Pecuarias. Universidad Nacional Autónoma de México - FES Cuautitlán. Campo Cuatro, Km. 2.5 Carr. Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastian Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. <sup>2</sup>Departamento de Reproducción FMVZ-UNAM. Universidad Nacional Autónoma De México, C.U., Distrito Federal, 04510, México. <sup>3</sup>Instituto de Fisiología Celular-UNAM. Universidad Nacional Autónoma De México, C.U., Distrito Federal, 04510, México. <sup>4</sup>Departamento Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México - FES Cuautitlán. Campo Cuatro, Km. 2.5 Carr. Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastian Xhala, 54714 Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

<sup>5</sup>Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Región Poza Rica-Tuxpan.

### NOTA SOBRE LOS AUTORES

Mejía-Flores Itzayana: [nayazaitmf@cuautitlan.unam.mx](mailto:nayazaitmf@cuautitlan.unam.mx)  <https://orcid.org/0000-0001-7282-9158>

Hernández-Ignacio Javier: [tysonjhi@hotmail.com](mailto:tysonjhi@hotmail.com)  <https://orcid.org/0000-0003-0016-2934>

Chiquete-Félix Natalia: [nchiquete@ifc.unam.mx](mailto:nchiquete@ifc.unam.mx)  <https://orcid.org/0000-0002-5850-6536>

Cornejo-Cortez Miguel Ángel: [mcornejocortes@yahoo.com.mx](mailto:mcornejocortes@yahoo.com.mx)  <https://orcid.org/0000-0002-6546-5189>

Lammoglia-Villagómez Miguel Ángel: [mlammoglia@uv.mx](mailto:mlammoglia@uv.mx)  <https://orcid.org/0000-0002-2958-0518>

Esta investigación fue financiada con recursos de los autores.

Los autores no tienen ningún conflicto de interés al haber hecho esta investigación.

Remita cualquier duda sobre este artículo a Mejía-Flores Itzayana.

**Recibido:** 20/06/2022

**Aceptado:** 01/09/2022

**Publicado:** 01/12/2022



Copyright (c) 2022 Mejía-Flores Itzayana, Hernández-Ignacio Javier, Chiquete-Félix Natalia, Cornejo-Cortes Miguel Angel y Lammoglia-Villagómez Miguel Ángel.

Esta obra está protegida por una licencia

[Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

## RESUMEN

El proceso de congelación-descongelación causa estrés oxidativo, estrés osmótico, shock térmico, formación de hielo intracelular, alteraciones en la composición de los lípidos y de las proteínas de la membrana plasmática, disminución de la viabilidad y motilidad espermática, daño a la mitocondria, al acrosoma, a la cola y promueve la fragmentación del ADN. La mitocondria es fuente de energía de la respiración y también el sitio principal de la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Los antioxidantes deben estar presentes dentro de la mitocondria en grandes cantidades para que sean efectivos en la reducción de EROs. Sin embargo, la membrana interna mitocondrial no es permeable a la mayoría de las moléculas. Diversos estudios indican que la suplementación de antioxidantes durante el proceso de congelación del semen mejora la calidad del espermatozoide congelado-descongelado en diversos grados, pero aún existe una falta de un antioxidante eficaz reconocido. Existen pocos estudios sobre los efectos de la suplementación de un antioxidante dirigido a las mitocondrias en la criopreservación del semen, por lo que el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la adición de MitoTEMPO sobre la actividad mitocondrial y motilidad de los espermatozoides de bovino criopreservados en un diluyente comercial. La suplementación del antioxidante en el diluyente comercial, a diferentes concentraciones mejoró la motilidad espermática en un 13% y 17% con respecto al grupo control; disminuyó en un 29% y 18% las EROs y aumento el porcentaje de producción de ATP 257% y 161% en los espermatozoides de bovino congelados-descongelados. Estos resultados apoyan la importancia del uso de antioxidantes durante la criopreservación de los espermatozoides, concluyendo que el empleo de MitoTEMPO en concentraciones relativamente bajas en el diluyente mejora la calidad del semen después de la descongelación del semen.

**Palabras Claves:** Antioxidante, espermatozoide, criopreservación.

## ABSTRACT

The freeze-thaw process causes oxidative stress, osmotic stress, heat shock, intracellular ice formation, alterations in the composition of plasma membrane lipids and proteins, decreased sperm viability and motility, damage to the mitochondria, acrosome and tail, and promotes DNA fragmentation. Mitochondria are a source of energy for respiration and the main site of reactive oxygen species (ROS) generation. Antioxidants must be present within the mitochondrion in large quantities to be effective in reducing ROS. However, the mitochondrial inner membrane is not permeable to most molecules. Several studies indicate that antioxidant supplementation during the

semen freezing process improves frozen-thawed sperm quality to several degrees, but there is still a lack of a recognized effective antioxidant. There are few studies on the effects of supplementation of a mitochondria-targeted antioxidant in semen cryopreservation, so the aim of the present work is to evaluate the effect of the addition of MitoTEMPO on the mitochondrial activity and motility of bovine sperm cryopreserved in a commercial extender. The supplementation of the antioxidant in the commercial extender at different concentrations improved sperm motility by 13% and 17% with respect to the control group; decreased ROS by 29% and 18% and increased the percentage of ATP production by 257% and 161% in the frozen-thawed bovine spermatozoa. These results support the importance of the use of antioxidants during sperm cryopreservation, concluding that the use of MitoTEMPO in relatively low concentrations in the extender improves semen quality after sperm thawing.

**keywords:** Antioxidant, spermatozoa, cryopreservation.

## INTRODUCCIÓN

Con la inseminación artificial (IA), los espermatozoides no son directamente introducidos en el tracto reproductor femenino al momento de la eyaculación como sucede en vida libre, sino que al momento de la eyaculación el semen es colectado en un tubo por medio de vagina artificial o por electroeyaculación, y son diluidos para su conservación por cortos o largos periodos de tiempo y después puedan ser introducidos en el tracto reproductor de la hembra. Estos procedimientos inducen un cambio o daño a nivel celular donde se incluye al ADN, membranas y organelos (Silva y Gadella 2006).

En la especie bovina la criopreservación de los espermatozoides es una técnica invaluable para la inseminación artificial, ya que permite una diseminación mundial y financiable de gametos de alto nivel genético, en general los daños funcionales y estructurales asociados a este proceso causan disminución de la capacidad fertilizante de los gametos, sin embargo, aunque la criopreservación se ha utilizado como una técnica de rutina, se sabe que daña en diferentes maneras al espermatozoide, dando como resultado daños subletales que reducen la vida del espermatozoide. Aproximadamente el 50% de los espermatozoides se vuelven inmóviles y los espermatozoides que se mantiene móviles están comprometidos lo que conlleva a una disminución en la capacidad de fertilización: es decir, entre el 40 y 50% de los espermatozoides no sobrevive el proceso de congelado-descongelado por lo que la eficiencia del semen criopreservado es relativamente baja (Mostek et al., 2017, Martínez et al., 2006). Adicionalmente, la capacidad de fertilización es siete veces menor, ya que en los

espermatozoides disminuye la capacidad de interactuar con el tracto reproductor de la hembra (Sullivan, 2004).

El proceso de congelación-descongelación causa estrés oxidativo y estrés osmótico, shock térmico, formación de hielo intracelular, alteraciones en la composición de los lípidos y de las proteínas de la membrana plasmática, disminución de la viabilidad y motilidad espermática, daño a la mitocondria, al acrosoma, a la cola y promueve la fragmentación del ADN. Además, induce la reorganización de las membranas lipídicas, dando como resultado un aumento en la fluidez en la membrana y un aumento en el calcio intracelular, que eventualmente inicia cambios parecidos a los de la capacitación, proceso referido como criocapitación (Mostek et al., 2017, Naresh Sai 2016, Guthrie y Welch, 2005). La inducción prematura de la capacitación y reacción acrosomal alteran la función mitocondrial y de este modo se reduce la motilidad espermática (Layek et al., 2016). La mitocondria es la fuente de energía de la respiración y también es el sitio principal de la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Se sabe que los antioxidantes deben estar presentes dentro de la mitocondria en grandes cantidades para que sean efectivos en la reducción de EROs. Sin embargo, la membrana interna mitocondrial no es permeable a la mayoría de las moléculas. Ésta puede ser una de las razones de la falta de efectividad universal de la mayoría de los antioxidantes estudiados hasta ahora, ya que muchos antioxidantes no pueden llegar a la membrana mitocondrial interna (Stowe y Camara, 2009). Muchos estudios han informado que la suplementación de antioxidantes durante el proceso de congelación del semen puede mejorar la calidad del espermatozoides congelado-descongelado en diversos grados, pero aún existe una falta de un antioxidante eficaz reconocido (Lu et al., 2017). Los avances recientes en el estrés oxidativo sugirieron que para intervenir en la producción de EROs deberían dirigirse directamente a las mitocondrias para lograr actividades antioxidantes eficaces (Gruber et al., 2013). Para dirigir selectivamente los antioxidantes a las mitocondrias, se ha demostrado por primera vez que el alfa-tocoferol conjugado con trifenilfosfonio (TPP), un catión lipofílico que se acumula dentro de las mitocondrias puede acumularse de manera más eficiente dentro de las mitocondrias que el alfa-tocoferol no conjugado (Lu et al., 2017). Hasta ahora, hay pocos estudios sobre los efectos de un antioxidante suplementario dirigido a las mitocondrias (MitoTempo) en la criopreservación del semen. Por lo que la evaluación del efecto de la adición de este tipo de antioxidantes a los medios de criopreservación, será de gran beneficio para la industria de la IA, con el objeto de tener las bases para poder implementar el uso de antioxidantes naturales que sean de uso práctico para los productores y de esta forma contribuir mejorando la capacidad fertilizante del espermatozoide en el ganado bovino.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Evaluación del semen: macroscópica y microscópicamente, se evaluaron antes y después de la criopreservación. Se obtuvieron 3 eyaculados de 3 bovino de toros sanos, pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA) de la FMVZ-UNAM, mediante el método de vagina artificial. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de CEIPSA a una temperatura de 35° C mantenidas en el diluyente Andromed 80% para su evaluación y se mantuvieron ahí hasta su empajillado. Al llegar al laboratorio se evaluó la concentración espermática, la motilidad progresiva. Solo se utilizaron los eyaculado que tuvieran 80% de espermatozoides vivos motiles.

Evaluación del semen:

1. La motilidad progresiva fue evaluada de la siguiente manera: se colocó una gota sobre un portaobjetos previamente calentado a 37°C y se cubrió con un cubreobjetos, se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40X, otorgándose un valor de movimiento rectilíneo progresivo de 0-100%. Los eyaculados con menos del 80% de motilidad progresiva y más de 20% de morfoanomalías fueron descartados.

2. Se calculó la concentración espermática por conteo en el hematocitómetro (cámara de Neubauer) y aplicando la siguiente fórmula: No. de espermatozoides x 21 x 10,000 x 5 = concentración de espermatozoides por ml.

Donde 21 es el factor de dilución (25 µl de semen diluido en 500ul de Tritón X-100 al 0.1% diluido en PBS), 10,000 está dado por la dimensión de la cámara y 5, es el número de cuadros contabilizados. La determinación del número de espermatozoides anormales se realizó de manera simultánea durante el conteo en el hematocitómetro.

Una vez que se evaluaron estos parámetros se procedió a realizar la congelación del semen, las muestras se dividieron en 3 grupos: Grupo 1 sin antioxidante, Grupo 2 con 25µM y Grupo 3 con 50µM, el antioxidante se agrego antes de realizar el empajillado.

Se realizó el protocolo de congelación de acuerdo al diluyente Andromed sin yema de huevo (empleando agua MiliQ), el cual contiene un crioprotector (glicerol), antibióticos y ácido cítrico. El empajillado de las muestras se realizó en pajillas de 0.25ml, a una concentración de  $20 \times 10^6$  células/ml de espermatozoides, se dejaron en un periodo de equilibrio de 4h a 4°C, posteriormente se realizó la congelación exponiendo las pajillas a vapores de nitrógeno durante 10 minutos, y por ultimo se sumergieron en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlos en goblets y después en canastillas, previamente identificadas, para finalmente ser almacenadas en tanques con nitrógeno

líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . La descongelación se realizó sacando las pajillas y exponiéndolas a temperatura ambiente por 10 segundos y después se colocaron en baño maría a  $37^{\circ}\text{C}$  por 40 segundos.

Al descongelado se realizó la evaluación de la motilidad y la medición de ATP y producción de EROs en los espermatozoides de bovino. Las especies reactivas de oxígeno se midieron en mitocondrias frescas utilizando el Amplex Red (Invitrogen, Molecular Probes). La mezcla de reacción con 0,5 mg de proteína/mL en 0,6 M de manitol, 5 mM de MES (pH 6,8), 0,1 M de KCl, 0,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 2 mL/mL de etanol se incubó con oligomicina durante 5 min. A continuación, se utilizó fosfato 0,4 mM con 1 mM de ADP o 2 mM de ADP, o 600  $\mu\text{M}$  de EGTA o 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  o 4 mM con 1 mM de ATP o 2 mM de ATP o 600  $\mu\text{M}$  de EGTA o 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , en ambos casos se utilizaron muestras sólo incubadas con fosfato. Después de 1 minuto, la mezcla de reacción de 80  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{g}$ ) se colocó en una microplaca de 96 pocillos con una solución de trabajo de 20  $\mu\text{l}$  ( $\mu\text{M}$  10 M de rojo Amplex, 0,2 unidades/mL de peroxidasa de rábano picante y 0,2 unidades/mL de superóxido dismutasa en 250 mM de fosfato sódico con pH 7,4), el volumen fue de 100  $\mu\text{l}$ .

El ATP intracelular se midió utilizando el Kit de Ensayo de Bioluminiscencia de ATP CLS II (Roche); este Kit está especialmente optimizado para el uso en luminómetros, exhibe una señal de luz constante que se mantiene durante varios minutos. Para calcular la concentración de ATP intracelular, se preparó una curva de calibración de ATP en fresco, tal y como indica el fabricante del Kit de Bioluminiscencia de ATP y utilizando el reactivo de luciferasa liofilizado. El procedimiento fue el siguiente, se tomaron  $8 \times 10^6$  células/mL y se resuspendieron en 100 mM Tris-HCl pH 7.8 y 4 mM EDTA. Las células se sumergieron en agua hirviendo durante 2 minutos y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 15,160 g. Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar la concentración de ATP endógeno; se añadieron a la reacción en la microplaca. Después se añadió el reactivo de luciferasa a las muestras y a los estándares.

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

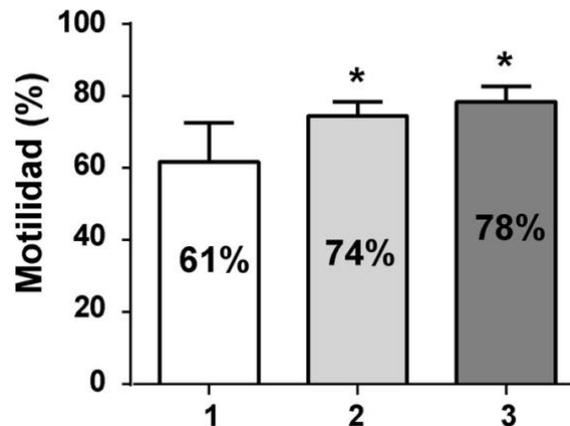
#### Análisis estadístico

Se empleó ANOVA de una vía (prueba de comparación múltiple de Dunnett) para comprar las medias de motilidad, producción de EROs y ATP en el grupo control y en los grupos adicionados con dos concentraciones de MitoTEMPO, el grupo 2 (25  $\mu\text{M}$ ) y el grupo 3 (50  $\mu\text{M}$ ), usando GraphPad Prism Versión 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Con un valor de  $P \leq 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

En cuanto a la motilidad la adición de ambas concentraciones de MitoTEMPO 50 $\mu$ M y 25 $\mu$ M mejoraron en un 17% y 13% respectivamente ( $P \leq 0.05$ ) la motilidad del espermatozoide congelado-descongelado en comparación con el grupo control (61%) (Gráfica 1). Nuestros resultados coinciden con los publicados por Kumar y Gosh, 2021 quienes reportan que en espermatozoides criopreservados a diferentes concentraciones del antioxidante 10, 50 y 100 $\mu$ M, la concentración de 50 $\mu$ M se mejoró la motilidad progresiva, viabilidad, integridad acrosomal y respuesta a la prueba hiposmótica. Adicionalmente, estudios en espermatozoides de carnero (Zaire y Daghigh, 2020) y gallo (Reza y Nader, 2021); coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, dichos estudios reportan que la motilidad de los espermatozoides inmediatamente después de la descongelación fue significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) con concentraciones de 5 y 50  $\mu$ M de MitoTEMPO y que no hallaron diferencias significativas en otras características cinéticas excepto en la motilidad.

Gráfica 1. Porcentaje de Motilidad al descongelado de los espermatozoides bovinos adicionados con diferentes concentraciones de antioxidante

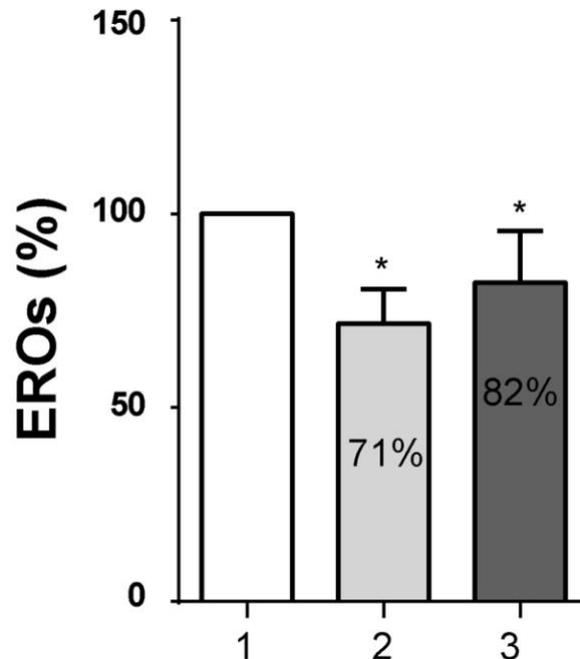


Gráfica 1. Donde se observa el porcentaje de motilidad de los espermatozoides bovinos, obtenido después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones del antioxidante (Grupo 1 sin antioxidante 61%<sup>a</sup>, Grupo 2 con 25 $\mu$ M 74%<sup>b</sup> y Grupo 3 con 50 $\mu$ M 78%<sup>b</sup>,  $P \leq 0.05$ ).

En cuanto a la medición de ATP y EROs, se observa una disminución en la producción de especies reactivas de oxígeno (Gráfica 2) en los grupos donde se adiciona el antioxidante Grupo 2 con 25 $\mu$ M (71%,  $P \leq 0.05$ ) y Grupo 3 con 50 $\mu$ M (82%,  $P \leq 0.05$ ) con respecto al medio sin antioxidantes. Al hacer una evaluación de los efectos de la adición del antioxidante en cuanto a la producción de ATP

(Gráfica 3) y EROs (Gráfica 2) se puede observar en en ambas gráficas que el Grupo 2 presenta mejores características en cuanto a la actividad mitocondrial; en donde la concentración del MitoTempo mantiene la funcionalidad de la mitocondria quien sigue produciendo ATP (257%,  $P \leq 0.05$ ) y de igual forma el antioxidante redujo la producción de EROs (71%,  $P \leq 0.05$ ).

Gráfica 2. Producción de EROs de los espermatozoides bovinos al descongelado adicionados con diferentes concentraciones de antioxidante.



Gráfica 2. Donde se observa el porcentaje de EROs de los espermatozoides bovinos, obtenido después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones del antioxidante MitoTEMPO (Grupo 1 sin antioxidante 100%<sup>a</sup>, Grupo 2 con 25 μM 71%<sup>b</sup> y Grupo 3 con 50 μM 82%<sup>b</sup>,  $P \leq 0.05$ ).

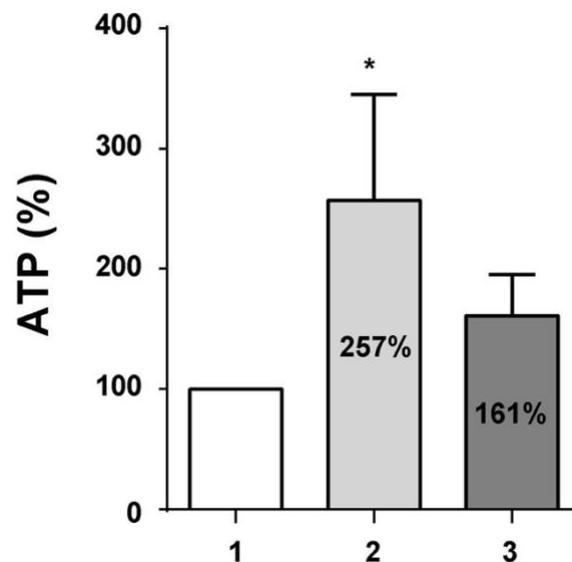
Como nuevo antioxidante permeable a las células, el MitoTEMPO es un potente crioprotector eficaz para la criopreservación de espermatozoides. En el presente estudio se han determinado los efectos del MitoTEMPO sobre las características del espermatozoide bovino y la producción de EROs y ATP durante la crioconservación.

Se ha comprobado que el MitoTEMPO tiene la capacidad de reducir el estrés oxidativo e inhibir el daño del ADN en varios tipos de células (Hu H., and Li M., 2016; Trnka et al., 2009). En el estudio, 25

$\mu\text{M}$  de MitoTEMPO mejoraron eficazmente la motilidad lo que es consistente con estudios previos sobre MitoTEMPO (Azadi, et al., 2017; Banihani et al., 2015).

El uso de MitoTEMPO en el presente estudio, el cuál es un antioxidante dirigido a las mitocondrias, tiene un mecanismo de acción bien documentado a nivel celular. Por lo que los resultados obtenidos podrían deberse a la neutralización del exceso de EROs producidas en el sitio mitocondrial debido al estrés oxidativo y a la minimización del daño mediado por las EROs que reduce la viabilidad y la fertilidad de los espermatozoides.

Gráfica 3. Producción de ATP de los espermatozoides bovinos al descongelado adicionados con diferentes concentraciones de antioxidante



Gráfica 3. Donde se observa el porcentaje de ATP de los espermatozoides bovinos, obtenido después del proceso de criopreservación adicionando al diluyente diferentes concentraciones del antioxidante (Grupo 1 diluyente sin antioxidante 100%<sup>a</sup>, Grupo 2 diluyente con 25  $\mu\text{M}$  257%<sup>b</sup> y Grupo 3 diluyente con 50  $\mu\text{M}$  161%<sup>a</sup> de MitoTempo,  $P \leq 0.05$ ).

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran los efectos beneficiosos de la suplementación de MitoTEMPO sobre la congelabilidad del espermatozoides y la suplementación individual fue tan eficaz como en los espermatozoides frescos. Por lo que el presente estudio demuestra que MitoTEMPO en concentraciones relativamente bajas en el diluyente mejora la calidad del semen después de la descongelación calidad del semen, se requieren más mediciones para observar diferencias estadísticas entre individuos.

Existen estudios de la combinación del Mito-Tempo con acetovanilona en espermatozoides de búfalo donde se observa una mejor viabilidad y actividad mitocondrial al descongelado de los espermatozoides. Nuestros resultados permiten tener las bases para combinar con otros antioxidantes de origen natural uno de ellos es la planta medicinal *Curcuma longa* Linn, estudios recientes confirman su propiedad antioxidante, citoprotectora, mediada por la fuerte capacidad antioxidante, de conjugación y de protección del ADN, tanto del curcumin (compuesto orgánico natural) como de los péptidos y residuos de metionina presentes en esta planta.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el financiamiento de UNAM-DGAPA-PAPIIT (IA5221) y de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (CI2264).

### LITERATURA CITADA

- Azadi L., Tavalae M., Deemeh M.R., et al., 2017. Effects of tempol and quercetin on human sperm function after cryopreservation, *Cryo Lett.* 38; 29–36.
- Banihani S., Agarwal A., Sharma, R., et al., 2015. Cryoprotective effect of l-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa, *Andrologia* 46; 637–641. <https://doi.org/10.1111/and.12130>
- Gruber, J., Fong, S., Chen, C.-B., Yoong, S., Pastorin, G., Schaffer, S., Cheah, I., Halliwell, B. 2013. Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing, *Biotechnol. Adv.* 31, 563–592. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.005>
- Guthrie, H.D., Welch, G.R. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, 63, 396-410. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.020>
- Hu H., and Li M., 2016. Mitochondria-targeted antioxidant mitotempo protects mitochondrial function against amyloid beta toxicity in primary cultured mouse neurons[J], *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478; 174–180. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.071>
- Kumar, A. Gosh, S. 2021. Efecto del diluyente de semen incorporado Mito-Tempo sobre los atributos fisicomorfológicos y la integridad funcional de la membrana de los espermatozoides de búfalo descongelados y congelados. *Criocartas*, vol. 42 (núm. 2), pág. 111-119.
- Layek, S.S., Mohanty, T.K., Kumaresan, A., Parks, J.E. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>

- Lu, X., Zhang, Y., Bai, H., Liu, J., Li, J., Bin Wu, B. 2017. Mitochondria-targeted antioxidant mitotempo improves the post-thaw sperm quality. *Cryobiology* <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.12.009>
- Martinez, C. O., Juárez-Mosqueda, M. L., Hernández, J., Valencia, J. 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology*, 66, 1969-1975. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.028>
- Mostek, A., Dietrich, M.A., Slowinska, M., Ciereszko, A. 2017. Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology*, 92, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.011>
- Naresh, S. 2016. Effect of cooling (4°C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. *Cryobiology*, 72, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.12.004>
- Reza, M. Nader, A. 2021. Efectos de la suplementación con extensor de congelación con el antioxidante Mito-Tempo dirigido a las mitocondrias sobre la calidad del semen de gallo congelado y descongelado y el rendimiento reproductivo. *Ciencia de la Producción Animal*, Vol. 225. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Silva, P. F.N., Gadella B.M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65, 958-878.
- Stowe, D.F., Camara, A.K. 2009. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Jun; 11(6): 1373-1414. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2331>
- Sullivan, R. 2004. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*, 82/83, 341-347. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.007>
- Trnka J., Blaikie F.H., Logan A. et al., 2009. Antioxidant properties of MitoTEMPO and its hydroxylamine, *Free Radic. Res.* 43; 4-12. <https://doi.org/10.1080/10715760802582183>
- Zarei, F. Daghigh, H. 2020. Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO I: Improvement in quality parameters and reproductive performance of cooled-stored semen. *Cryobiology* <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.018>

Copyright © 2022 Mejía-Flores Itzayana, Hernández-Ignacio Javier, Chiquete-Félix Natalia, Cornejo-Cortes Miguel Angel y Lammoglia-Villagómez Miguel Ángel.



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

**Atribución:** Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia](#) - [Texto completo de la licencia](#)