



VERACRUZ 2018

*Avances en Investigación
Agrícola, Pecuaria, Forestal,
Acuícola, Pesquería,
Desarrollo rural,
Transferencia de tecnología,
Biotecnología, Ambiente,
Recursos naturales y
Cambio climático*



inifap

Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático

No está permitida la reproducción total o parcial de esta publicación, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de la institución.

Este libro digital se elaboró en el Centro de Investigación Regional Golfo Centro del INIFAP, en Medellín, Veracruz, en octubre de 2018. C. P. 94277. Teléfonos: (229) 262 22 03, 04, 05.

Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático. Año 2, No. 1, octubre 2018, es una publicación anual, editada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, calle Progreso No. 5, Barrio de Santa Catarina, Delegación Coyoacán, C. P. 04010, Ciudad de México, México, Tel. (55) 3871-8700, www.inifap.gob.mx. Editor responsable: M.C. Sergio Alberto Curti Díaz. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2018-020610452000-203, ISSN: 2594-14X on line, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de este número Dr. Julio César Vinay Vadillo, Centro de Investigación Regional Golfo Centro del INIFAP. Km. 22.5 Carretera Veracruz-Córdoba, Paso del Toro, mpio. Medellín de Bravo, Ver. CP. 94277, Teléfonos: 229 262 22 03 al 05 y 01800 088 22 22, ext. 87809

<http://rcveracruz.org/doc/AvancesInvestigacionRC2018.pdf>

La cita correcta es:

Vinay, V. J. C., V. A. Esqueda E., O. H. Tosquy V., R. Zetina L., A. Ríos U., M. V. Vázquez H., A. L. Del Angel P. y C. Perdomo M. (comps.). 2018. Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático. INIFAP, CP, UACH, INAPESCA, UV, TecNM. Medellín, Ver., México. Año 2, Núm. 1, 1849 p.



Índice

PECUARIA

ADICIÓN DE EXTRACTO DE SEMILLA DE *Moringa oleifera* SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN SEMEN OVINO CRIOPRESERVADO 561

José María Carrera Chávez, Mónica Edith Bojórquez Salcedo, Andrés Quezada Casasola, José Alberto Núñez Gastélum, Eduardo Pérez Eguía, María Angélica Escárcega Ávila y Ernesto Orozco Lucero

ADICIÓN DE EXTRACTO DE SEMILLA DE *Moringa oleifera* SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SEMEN OVINO CRIOPRESERVADO 569

José María Carrer Chávez, Edson Eduardo Jiménez Aguilar, Andrés Quezada Casasola, José Alberto Núñez Gastélum, Eduardo Pérez Eguía, María Angélica Escarcéga Ávila y Ernesto Orozco Lucero

ÉPOCA Y FRECUENCIA DE CORTE EN EL RENDIMIENTO DE BIOMASA DEL PASTO TAIWÁN 578

Gloria Esperanza De Dios León, Catalino Jorge López Collado, Armando Guerrero Peña, Eusebio Ortega Jiménez, Alejandro Alonso López y Eduardo Daniel Bolaños Aguilar

INCLUSIÓN DE HARINA DE FOLLAJE DE *Trichanthera gigantea* EN UNA DIETA PARA PAVO AUTÓCTONO (*Meleagris gallopavo*) EN CRECIMIENTO A FINALIZACIÓN 590

Reina Pech Palomino, Jorge Ortiz Ortiz, Edgar Aguilar Urquizo, Mateo Itza Ortiz, Ángel Sierra Vásquez y Roberto Sanginés García

CARACTERÍSTICAS DE LA AVICULTURA DE TRASPATIO EN LA RANCHERÍA BOQUERÓN 2DA, CENTRO, TABASCO 600

Miguel Alberto Magaña Alejandro y Karina de los Ángeles Ramírez Méndez

PARTICIPACIÓN DE LA MUJER PARA LA CONSERVACIÓN DE *Gallus gallus domesticus* EN COMUNIDADES RURALES DE TETELA DE OCAMPO, PUEBLA 610

Maribel Martínez Carrera, Gerardo Landeta Cortés, Carlos Esli Tirado Erazo, José Víctor Rodríguez Hernández y Omar Romero Arenas

DINÁMICA DE CRECIMIENTO DE *Trifolium repens* EN ASOCIACIÓN CON *Lolium perenne* PARA ALIMENTACIÓN DE RUMIANTES 620

Ricardo Martínez Martínez, Perpetuo Álvarez Vázquez, Claudia Yanet Wilson García, Ricardo Vicente Pérez, Enrique-Octavio García Flores y Florencia García Alonso

FRACCIONES FERMENTABLES *In vitro* DE ESTRELLA AFRICANA EN BECERROS BAJO CRIANZA ARTIFICIAL ALIMENTADOS CON LACTOSUERO 629

María Guadalupe Cruz Bárcenas, René Pinto Ruiz, Adalberto Hernández López, Deb Raj Aryal, José A. Venegas Venegas, Eugenia Barrientos Niño y David Hernández Sánchez

INHIBIDORES DE HIDROXIMETIL GLUTARIL COENZIMA A EN EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y MICROBIOLÓGICO DE OVINOS 637

Marcos Pérez Sato, Estephany Andrade Oyarzabal, Guillermo Eutiquio Soni, Numa Pompilio Castro González y Esmeralda Ramírez Llaguno

INCLUSIÓN DE RAICILLA DE CEBADA EN DIETAS PARA BORREGOS 645

Marcos Pérez Sato, Estephany Andrade Oyarzabal, Eutiquio Soni Guillermo, Numa Pompilio Castro González y Luis Antonio Ávila Hernández

EVAUACIÓN DE DIFERENTES NIVELES DE SEMILLA DE LINAZA MOLIDA EN DIETAS PARA CERDOS EN FINALIZACIÓN 651

Eutiquio Soni Guillermo, Marcos Pérez Sato, Numa Pompilio Castro González e Inci Denisse Córdova Cruz





ADICIÓN DE EXTRACTO DE SEMILLA DE *Moringa oleifera* SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE SEMEN OVINO CRIOPRESERVADO

José María Carrer Chávez^{125*}, Edson Eduardo Jiménez Aguilar¹²⁵, Andrés Quezada Casasola¹²⁵, José Alberto Núñez Gastélum¹²⁶, Eduardo Pérez Eguía¹²⁵, María Angélica Escarcéga Ávila¹²⁵ y Ernesto Orozco Lucero¹²⁵

Resumen

El proceso de criopreservación del semen provoca daño a los espermatozoides por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño oxidativo resultante. Lo anterior debido a que la membrana de los espermatozoides es rica en fosfolípidos, que se deterioran debido a la peroxidación lipídica y debido al poco contenido citoplasmático del espermatozoide, la reserva antioxidante generalmente no es adecuada para sobrellevar el estrés oxidativo durante la criopreservación. Este estudio evaluó la capacidad antioxidante del extracto de semilla de *Moringa oleifera* en semen criopreservado de ovino. Se utilizaron ocho sementales de pelo, usando un diluyente a base de TRIS y yema de huevo, para luego dividir las muestras en cuatro tratamientos: Control, 0.5, 5.0 y 10.0 mg/mL de extracto de *M. oleifera*, y se realizó la criopreservación en una congeladora automática. Se evaluaron las características espermáticas incluyendo integridad del acrosoma y de la membrana, actividad mitocondrial, y la actividad antioxidante mediante el ensayo FRAP. Las variables se analizaron con un ANOVA y se compararon con una prueba de Tukey. La actividad antioxidante fue mayor para los tratamientos Moringa 0.5 (0.205 ± 0.028) y Moringa 5.0 (0.205 ± 0.017) en comparación con Moringa 10.0 (0.129 ± 0.005) y Control (0.119 ± 0.004) ($P < 0.05$). La viabilidad y motilidad progresiva obtenidas fueron mayores en Moringa 0.5 (51.33 ± 3.31 y 45.61 ± 3.47) en relación a Moringa 5.0 (48.76 ± 3.77 y 43.31 ± 3.82), Moringa 10.0 (44.71 ± 2.96 y 38.71 ± 2.88), y control (41.44 ± 2.17 y 35.84 ± 2.15) ($P < 0.05$). El daño a la membrana espermática fue menor en Moringa 0.5 (73.88 ± 2.64) comparado con el control (80.75 ± 1.06) ($P < 0.05$). En conclusión, la adición de 0.5 y 5.0 mg de extracto *M. oleifera*

¹²⁵Departamento de Ciencias Veterinarias. *jose.carrera@uacj.mx

¹²⁶Departamento de Químico Biológicas. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.





mejora la actividad antioxidante; sin embargo, solo la dosis de 0.5 mg de extracto *M. oleifera* disminuye el daño a la membrana, mejora la vitalidad y la motilidad progresiva en comparación con el control y las demás dosis evaluadas.

Palabras clave: Criopreservación, ovinos, antioxidante, características espermáticas, *Moringa oleifera*

Introducción

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son productos normales del metabolismo celular de los espermatozoides (Tremellen, 2008), ya que los espermatozoides por sí mismos producen pequeñas cantidades de ROS que son esenciales en muchos de los procesos fisiológicos, tales como capacitación espermática, hiperactivación y unión espermatozoide-ovulo (Aitken *et al.*, 2003) y se ha demostrado que bajos niveles de ROS son esenciales para la fertilización, reacción acrosomal y motilidad (Agarwal *et al.*, 2004). Sin embargo, el desbalance entre la producción de ROS y la habilidad biológica de detoxificar los intermediarios reactivos o reparar fácilmente el daño resultante es conocido como estrés oxidativo (Agarwal y Said, 2003), que es una condición que causa efectos tóxicos durante la producción de peróxidos y radicales libres que dañan los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN (Schafer y Buettner, 2001). Algunos autores han atribuido la reducida crio tolerancia del semen a factores asociados con el estrés oxidativo, como la pérdida de la actividad de defensa antioxidante (Macías *et al.*, 2011), la alta variabilidad en las propiedades antioxidantes entre los reproductores (Aitken *et al.*, 2014) y la generación diferencial de ROS entre los espermatozoides no viables o de pobre calidad y aquellos con metabolismo rápido y altos niveles de fosforilación oxidativa (Gibb y Aitken, 2016). Además, el proceso de criopreservación de semen altera la composición de los lípidos y proteínas de la membrana del espermatozoide, debido principalmente a la generación de ROS, reduciendo la motilidad y viabilidad, causando daños a las mitocondrias y acrosoma, e incrementando la fragmentación del ADN (Mostek *et al.*, 2017). De la misma manera, existen reportes que demuestran que los antimicrobianos convencionales producen moléculas





destructivas como los radicales de hidroxilo, que dañan el ADN de las bacterias, pero que también atacan a los espermatozoides, ocasionando peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, formando productos secundarios que pueden oxidar las proteínas de la membrana espermática (Pokharkar y Patel, 2015).

Diversos componentes de la planta *M. oleifera* han sido identificados por tener una alta actividad antioxidante, debido a la presencia de ácido ascórbico, flavonoides, fenoles y carotenos (Jayawardana *et al.*, 2015). Wang *et al.* (2017) afirman que antioxidantes como los flavonoides tienen la habilidad de tomar los radicales libres y reducir el riesgo de muerte celular. Sin embargo, se han realizado pocos estudios que planteen el uso de extractos de plantas como reemplazo de los antimicrobianos convencionales, lo que podría contribuir a resolver el problema de la resistencia a los antimicrobianos (Berkovich *et al.*, 2013), y al mismo tiempo generar una respuesta antioxidante para conservar la viabilidad espermática. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si mediante la adición de extracto de *Moringa oleifera* se mejora la capacidad antioxidante y las características espermáticas del semen ovino criopreservado.

Materiales y métodos

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición y Reproducción Animal del Departamento de Ciencias Veterinarias del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (31°44'22" N 106°29'13" O y a una altitud de 1,120 metros sobre el nivel del mar; INEGI, 2017). Se utilizaron ocho sementales de razas de pelo (Katahdin, Black Belly, Pelibuey). Se seleccionaron cuatro sementales por sesión para la toma de muestras, la cual se realizó dos veces por semana utilizando la técnica de vagina artificial. Las cuatro muestras obtenidas se mezclaron y homogenizaron para eliminar las diferencias individuales de cada una. Se depositaron 10 µl de la muestra en una cámara de recuento estándar de 20 µm (Cámara Leja, Leja Products, Holanda), para ser evaluada mediante un análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision, Minitube, Alemania) evaluando motilidad progresiva (%), vitalidad (%) y concentración espermática (cels/mL). Se realizó un protocolo de diluyentes basado en TRIS y yema de huevo. Las





muestras diluidas se fraccionaron en cuatro tratamientos: el control contenía antibiótico convencional (60 mg de tilosina, 300 mg de gentamicina, 360 mg de espectinomicina y 180 mg de lincomicina), y los tres tratamientos restantes contenían un extracto de *M. oleifera* en concentraciones de 0.5 mg (Moringa 0.5), 5.0 mg (Moringa 5.0) y 10.0 mg (Moringa 10.0) por mL, ajustando a una concentración de 40×10^6 espermatozoides móviles por mL^{-1} de forma que en cada pajilla existiera una concentración de 10×10^6 espermatozoides móviles. Una vez que el semen fue refrigerado y equilibrado a 5°C , se colocaron las pajillas en una congeladora automática (CryoLogic CL-8800, Australia), para posteriormente conservarlas en un termo criogénico a -196°C . El extracto de *M. oleifera* se obtuvo de semillas desengrasadas liofilizadas, procesadas siguiendo el método descrito por Núñez-Gastélum et al., (2015). Las muestras de semen fueron descongeladas un mes después, evaluadas con el análisis CASA para las variables vitalidad, motilidad progresiva, motilidad lenta, motilidad rápida, concentración espermática y se realizaron tinciones para evaluar la viabilidad de membrana (SYBP/PI), estado acrosomal (Hoeschst 33342/FITC-PNA), y actividad mitocondrial (Hoeschst 33342/Rhodamin 123). Asimismo, las muestras fueron analizadas para actividad antioxidante por el método FRAP; para esto, se incubó el reactivo durante 30 minutos a 37°C , una vez terminado el periodo de incubación se añadieron $24 \mu\text{L}$ de plasma seminal y $180 \mu\text{L}$ del reactivo FRAP a la microplaca para su posterior lectura a 595 nm a 37°C , los resultados se compararon contra una curva patrón de Trolox (Benzie y Strain, 1996). El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2009 / STAT versión 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Las variables se analizaron con un ANOVA y se compararon con una prueba de Tukey cuando se observaron diferencias entre los tratamientos ($P \leq 0.05$).

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 1. Se observó que Moringa 0.5 y Moringa 5.0 obtuvieron resultados similares y tuvieron mayor actividad antioxidante en comparación con Moringa 10.0 y el tratamiento control ($P < 0.05$); sin embargo, la viabilidad y motilidad progresiva obtenida fue mayor en Moringa 0.5 en relación con Moringa 5.0, Moringa 10.0, y

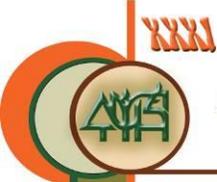




control ($P < 0.05$). En las variables motilidad lenta, motilidad rápida y concentración espermática no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$). El daño a la membrana espermática fue menor en *Moringa* 0.5 comparado con el control ($P < 0.05$), pero las variables daño al acrosoma y actividad mitocondrial fueron similares entre los cuatro tratamientos ($P > 0.05$). En este estudio se observa que la adición de dosis bajas de extracto semilla de *M. oleifera* (0.5 mg y 5.0 mg/mL) protegió a la membrana espermática, debido a sus propiedades antioxidantes, lo que a su vez mejoró la vitalidad y la motilidad progresiva de los espermatozoides, disminuyendo la formación de ROS en la membrana, reduciendo el daño en la membrana. Como se mencionó anteriormente, los espermatozoides de mamíferos son extremadamente susceptibles al estrés oxidativo durante largos periodos de almacenamiento aeróbico dado a que sus membranas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Falchi, 2018). En particular, los espermatozoides de ovinos son más sensibles a la peroxidación de los fosfolípidos de membrana con una consecuente producción de ROS si se compara con otras especies (Muiño-Blanco *et al.*, 2008). Por lo anterior, estudios han demostrado que los antioxidantes protegen a los espermatozoides eliminando los ROS producidos por leucocitos, previniendo la fragmentación del ADN, mejorando la calidad del semen, reduciendo el criodañó hacia el espermatozoide y bloqueando la maduración prematura de los espermatozoides (Agarwal *et al.*, 2007).

El semen contiene antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa; y antioxidantes no enzimáticos, como vitamina E, vitamina A, y transferina; juntos, remueven el O_2 y juegan un papel importante disminuyendo la peroxidación lipídica protegiendo a los espermatozoides (Sikka *et al.*, 1995). La vitamina E protege las membranas del daño oxidativo, atrapando y eliminando los tres tipos de radicales libres (Agarwal *et al.*, 2007); además, se ha demostrado que disminuye el daño provocado por la criopreservación durante el proceso de congelación y mejora la motilidad post-congelado (Park *et al.*, 2003). *M. oleifera* tiene componentes antioxidantes naturales como fenoles, flavonoides, vitamina C (Vongsak *et al.*, 2013; Jayawardana *et al.*, 2015), vitamina E, β carotenos, zinc, selenio, vitamina A y B, riboflavina, ácido nicotínico, ácido fólico y piridoxina (Moyo *et al.*, 2012) los cuales se ha documentado poseen un fuerte potencial antioxidante; además se ha reportado que el ácido cripto-clorogénico, la isoquercitrina y la astragalina son fitoquímicos importantes por la actividad antioxidante de la *M. oleifera* (Vongsak *et al.*, 2013).





La disfunción mitocondrial con reducción en la producción de ATP puede ser responsable de la disminución de la motilidad del espermatozoide, lo que generalmente se observa después de la descongelación (Medeiros *et al.*, 2002). De igual forma, el daño de la cromatina por lo general comienza en la región periacrosomal y las regiones basales del espermatozoide y posteriormente se expande a otras regiones del núcleo durante la criopreservación (Sousa *et al.*, 2016), afectando considerablemente el estado del acrosoma o incluso la vitalidad del espermatozoide. Sin embargo, en este estudio, no se encontró un efecto del extracto de *M. oleifera* sobre el estado acrosomal o la actividad mitocondrial de los espermatozoides de ovino criopreservados.

Cuadro 1. Efecto antioxidante y calidad de semen criopreservado de ovino después de la adición de extracto de *Moringa oleifera* a 0.5 mg, 5.0 mg y 10.0 mg por mL.

	FRAP ¹ (mmol ET)	Daño en la membrana (%)	Daño acrosoma (%)	Actividad mitocondria (%)	Vitalidad (%)	Motilidad progresiva (%)	Motilidad rápida (%)	Motilidad lenta (%)	Concentración espermática ²
Control	0.119±0.004 ^b	80.75±1.06 ^b	47.63±3.8 ^a	52.75±1.73 ^a	41.44±2.17 ^b	35.84±2.15 ^b	7.75±0.92 ^a	28.06±1.40 ^a	9.78±0.34 ^a
Moringa 0.5 ³	0.205±0.028 ^a	73.88±2.64 ^a	51.38±3.2 ^a	55.38±2.05 ^a	51.33±3.31 ^a	45.61±3.47 ^a	11.69±1.40 ^a	33.89±2.16 ^a	10.18±0.30 ^a
Moringa 5.0 ⁴	0.205±0.017 ^a	78.38±1.91 ^{ab}	47.88±4.5 ^a	55.38±2.16 ^a	48.76±3.77 ^{ab}	43.31±3.82 ^{ab}	11.16±1.79 ^a	32.08±2.16 ^a	9.24±0.54 ^a
Moringa 10.0 ⁵	0.129±0.005 ^b	79.50±1.79 ^{ab}	54.87±3.5 ^a	58.00±1.84 ^a	44.71±2.96 ^{ab}	38.71±2.88 ^{ab}	8.81±0.83 ^a	29.90±2.10 ^a	10.80±0.34 ^a

¹Poder reductor férrico (FRAP), medido en milimoles equivalentes de Trolox (mmol ET); ² Millones de espermatozoides; ³ 0.5 mg/mL de extracto de *M. oleifera*; ⁴ 5.0 mg/mL de extracto de *M. oleifera*; ⁵ 10.0 mg/mL de extracto de *M. oleifera*.

^{a,b} Literales entre columnas indican diferencias (P<0.05).

Conclusiones

1.- Los resultados obtenidos indican que la adición de 0.5 y 5.0 mg/mL de extracto de semilla de *M. oleifera* al diluyente utilizado para congelación de semen ovino mejora la actividad antioxidante; sin embargo, solo la dosis de 0.5 mg de extracto de semilla de *M. oleifera* disminuye el daño a la membrana, mejorando la vitalidad y la motilidad progresiva en comparación con el control y las demás dosis evaluadas.





Literatura citada

- Agarwal, A. and T. M. Said. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 9:331–345.
- Agarwal, A., K. P. Nallella, S. S. Allamaneni and T.M. Said. 2004. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online*. 8:616–627.
- Agarwal, A., S. A. Prabakaran and S. C. Sikka. 2007. Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *AUA Update Series*. 26:1–12.
- Aitken, R., S. Lambourne and Z. Gibb. 2014. The John Hughes Memorial Lecture: aspects of sperm physiology-oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci*. 34:17-27.
- Aitken, R. J., M. A. Baker and D. Sawyer. 2003. Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. *Reprod Biomed Online*. 7:65–70.
- Benzie, I. and J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239:70–76.
- Berkovich, L., G. Earon, I. Ron, A. Rimmon, A. Vexler and S. Lev-Ari. 2013. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappa B and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern Med*. 13:212.
- Falchi, L., G. Galleri, M. T. Zedda, S. Pau, L. Bogliolo, F. Ariu, S. Ledda. 2018. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livest Sci*. 207:1-6.
- Gibb, Z. and R. Aitken. 2016. The impact of sperm metabolism during *in vitro* storage: the stallion as a model. *Biomed Res Int* 2016:9380609.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2017. Calendario GPS y Coordenadas RGNA ITRF08. http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geodesia/doc/cale2017_itrf2008.pdf [consultado el 29 de mayo de 2018].





- Jayawardana, B. C., R. Liyanage, N. Lalantha, S. Iddamalgotoda and P. Weththasinghe. 2015. Antioxidant and antimicrobial activity of drumstick (*Moringa oleifera*) leaves in herbal chicken sausages. *LWT – Food Sci Technol.* 64:1204-1208.
- Macías, B., L. González, C. Ortega, A. Morillo, J. Gallardo, M. H. Rodríguez, *et al.* 2011. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 75: 811-818.
- Medeiros, C. M., F. Forrel, A. T. Oliveira and J. L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology.* 57:327-344.
- Mostek, A., M. A. Dietrich, M. Slowinska and A. Ciereszko. 2017. Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology* 92: 95-102.
- Moyo B., PJ Masika, V Muchenje. 2012. Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 11(11), pp. 2797-2802, 7 February, 2012
- Muiño-Blanco, T., R. Pérez-Pé and J. A. Cebrián-Pérez. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Dom Anim.* 43: 18-31.
- Núñez-Gastélum, J. A., E. Alvarez-Parrilla, L. A. de la Rosa, N. R. Martínez-Ruiz, G. A. González-Aguilar and J. Rodrigo-García. 2015. Effect of harvest date and storage duration on chemical composition, sugar and phenolic profile of 'Golden Delicious' apples from northwest Mexico. *New Zeal J Agr Res.* 43: 214-221.
- Park, N. C., H. J. Park, K. M. Lee and D. G. Shin. 2003: Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation. *Asian J Androl.* 5:195–201.
- Pokharkar, O. and H. A. Patel. 2015. Human spermatozoa damaged due to heat, antibiotics and bisphenol-a *in vitro*: sperm DNA. *J Pharm Health Care Sci.* 4:1402-1412.
- Schafer, F. Q. and G. R. Buettner. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30:1191–1212.
- Sikka, S. C., M. Rajasekaran and W. J. Hellstrom. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl.* 16:464–468.





- Sousa, P. C., E. E. Santos, A. M. Silva, J. A. Bezerra, A. L. Souza, G. L. Lima, *et al.* 2016. Identification of ultrastructural and functional damages in sperm from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) due to cryopreservation. *Pesq Vet Bras.* 36:767-774.
- Tremellen, K. 2008. Oxidative stress and male infertility: A clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14, 243–258.
- Vongsak B., P. Sithisarn and W. Gritsanapan. 2013. Bioactive contents and free radical scavenging activity of *Moringa oleifera* leaf extract under different storage conditions. *Ind Crops Prod.* 49:419-421.
- Wang, Y., Y. Gao, H. Ding, S. Liu, J. Gui and D. Liu. 2017. Subcritical extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 218:152-58.

