

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Instituto de Ciencias Biomédicas

Departamento de Ciencias Veterinarias

Maestría en Ciencia Animal



**Evaluación del efecto antimicrobiano de la quercetina y α -
tocoferol en semen criopreservado de ovino**

Tesis para obtener el grado de

Maestro en Ciencia Animal

M.V.Z. Mónica Edith Bojórquez Salcedo

“Becada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”

Bajo la dirección del

Dr. José María Carrera Chávez

Y la co-dirección de la

Dra. Florinda Jiménez Vega

Ciudad Juárez, Chihuahua diciembre de 2021

APROBACIÓN DE LA TESIS

Evaluación del efecto antimicrobiano de la quercetina y α -tocoferol en semen criopreservado de ovino como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

ha sido aprobado y aceptado por:

Dr. José María Carrera Chávez
Director de Tesis

Dra. Florinda Jiménez Vega
Co-Director de Tesis

Dr. Andrés Quezada Casasola
Asesor

Dr. Mateo Fabian Itzá Ortiz
Asesor

Dra. Claudia Carolina Hernández Peña
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Evaluación del efecto antimicrobiano de la quercetina y α -tocoferol en semen criopreservado de ovino

Se permite el uso académico de información contenida en esta tesis, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor. Para la reproducción parcial o total de este documento con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de las autoridades que avalan esta tesis.

Dr. José María Carrera Chávez

Coordinador de la Maestría en Ciencia Animal

Dr. Ramón Rivera Barreno

Jefe del Departamento de Ciencias Veterinarias

C.D. Salvador David Nava Martínez

Director del Instituto de Ciencias Biomédicas

DEDICATORIA

Quiero dedicar este proyecto a mis padres Raúl Bojórquez y Martha Salcedo ya que, sin su esfuerzo, apoyo, paciencia y sobre todo amor incondicional esto no hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre por ser mi mayor ejemplo para seguir, soporte, y fuente infinita de amor e inspiración. A mi madre por tenerme paciencia y acompañarme durante mis momentos de estrés y frustración, y por ser la mejor consejera y amiga. A mi esposo por acompañarme y apoyarme en todo momento. A mis hermanas por apoyarme y guiarme en el camino con sus consejos y su ejemplo. A mis profesores y compañeros de tesis. En especial al Dr. Carrera y a la Dra. Jiménez, sin su ayuda y su guía no hubiera sido posible este proyecto. Por último, al “Team moringa”, mis compañeros y amigos, por tantas risas, estrés, enojos, etc. producto de trabajar tantas horas, pero a pesar de todo siempre estar ahí para apoyarnos como equipo.

RESUMEN

Evaluación del efecto antimicrobiano de la quercetina y α -tocoferol en semen criopreservado de ovino

Por:

Mónica Edith Bojórquez Salcedo

El uso y la aplicación indiscriminada de los antibióticos ha provocado que exista resistencia a estos, provocando un impacto significativo en la salud a nivel mundial; por esto, se recomienda el uso de flavonoides como una alternativa viable, ya que, al ser compuestos poco comunes con características diversas, entre ellas su función como antibiótico, presentan una ventaja sobre los utilizados comúnmente. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibiótica de la quercetina y el α -tocoferol en el semen criopreservado de ovino. Se trabajó con cuatro sementales ovinos. Se utilizó un diluyente a base de TRIS y yema de huevo, y se realizaron diferentes tratamientos: Control (antibiótico convencional), Testigo (Agua estéril), Quercetina (200 μ M), Vitamina E (α -Tocoferol) (100 μ M), y Vitamina E + Quercetina (Quercetina 200 μ M y Vit E 100 μ M). Se realizó la dilución, refrigeración y criopreservación de semen y posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la viabilidad del semen, con microscopia además se realizó la evaluación antimicrobiana mediante cultivos sólidos, pruebas bioquímicas, tinciones y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En la evaluación de semen post-criopreservación, así como en la inhibición bacteriana, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$); sin embargo, numéricamente se mostró mejoría en el tratamiento Vitamina E + Quercetina. En conclusión, la adición de quercetina (200 μ M) y α -tocoferol (100 μ M) redujo las unidades formadoras de colonias, lo que indica una inhibición de la proliferación de distintas bacterias, entre las que destacan *Actinobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., (identificadas mediante pruebas bioquímicas) y *P. aureginosa* (esta última identificada tanto en pruebas bioquímicas y PCR) durante el proceso de criopreservación del semen de ovino sin alterar negativamente características espermáticas como la motilidad y viabilidad de los espermatozoides.

Palabras clave: ovino; semen; criopreservación; antimicrobiano; quercetina; α -tocoferol

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2.REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Producción de ovinos.....	2
2.2 inseminación artificial.....	2
2.3 métodos de recolección de semen.....	2
2.3.1 Electroeyaculación.....	3
2.3.2 Vagina artificial.....	3
2.4 Criopreservación del semen.....	4
2.5 Procesamiento del semen y rangos de congelación.....	5
2.6 Contaminación del semen.....	5
2.6.1 Bacterias comúnmente presentes en infecciones y microbiota de ovinos	7
2.6.2 Efecto de las bacterias en los espermatozoides.....	8
2.6.3 Efecto de las bacterias sobre características espermáticas	8
2.6.4 Prevención de la contaminación en el semen congelado	9
2.6.5 Utilización de antibióticos en la conservación de semen (ventajas y desventajas).....	9
2.7 Muerte celular inducida por antibióticos.....	10
2.7.1 Resistencia a antibióticos y sus mecanismos.....	11
2.7.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	12
2.7.3 Efecto interno de las bacterias en los espermatozoides.....	13
2.8 Mecanismos que conllevan a la muerte celular por ROS.....	16
2.9 Plantas medicinales como antibiótico.....	16
2.10 Generalidades de quercetina.....	18
2.11 Quercetina como antibiótico.....	18
2.12 Efecto de α-tocoferol (vitamina E) sobre la actividad antimicrobiana.....	19
2.13 Identificación bacteriana.....	19
2.13.1 Identificación por cultivo.....	19
2.13.2 Pruebas bioquímicas.....	19
2.13.3 Pruebas de lectura rápida.....	22
2.13.4 Tinciones.....	23

2.13.5 Identificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
2.13.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	24
3.HIPÓTESIS.....	26
4.OBJETIVO GENERAL.....	26
4.1 Objetivos específicos.....	26
5. MATERIALES Y METODOS.....	27
5.1 Área de estudio.....	27
5.2 Inicio y duración del estudio.....	27
5.3 Recolección de semen y evaluación.....	27
5.3.1 Evaluación macroscópica del semen.....	27
5.3.2 Evaluación microscópica del semen.....	27
5.4 Dilución y refrigeración del semen.....	28
5.4.1 Dilución del semen.....	28
5.4.2 Refrigeración y equilibramiento del semen.....	28
5.5 Proceso de congelación de semen.....	28
5.6 Evaluación de características seminales post-descongelado.....	28
5.7 Elección de las concentraciones de quercetina y α- tocoferol	29
5.7.1 Tratamientos.....	29
5.8 Determinación de la actividad antimicrobiana	30
5.9 identificación bacteriana.....	30
5.9.1 Morfología de colonia.....	30
5.9.2 Tinción.....	31
5.9.3 Pruebas bioquímicas.....	31
5.10 Extracción de ADN por Fenol: Cloroformo: alcohol isoamílico.....	32
5.11 Cuantificación de ADN.....	33
5.12 identificación bacteriana mediante PCR.....	33
5.13 Electroforesis.....	36
5.14 Análisis estadístico.....	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7. CONCLUSIONES.....	51
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Listado de las bacterias comúnmente encontradas en semen de ovinos.....	7
Cuadro 2. Condiciones de amplificación estandarizadas en el laboratorio para <i>E. coli</i>	34
Cuadro 3. Condiciones de amplificación para <i>P. aureginosa</i> de acuerdo a lo descrito por Spilker et al. (2004).....	34
Cuadro 4. Condiciones de amplificación para <i>A. seminis</i> de acuerdo a lo descrito por Saunders et al. (2007).....	35
Cuadro 5. Condiciones de amplificación para <i>C. pseudotuberculosis</i> modificado de acuerdo con lo descrito por Cetinkaya <i>et al.</i> (2002)	35
Cuadro 6. Efecto de 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M de quercetina sobre la viabilidad de células espermáticas de ovino. Estudio preliminar 1.....	38
Cuadro 7. Efecto de 100 μ M, 200 μ M y 300 μ M de quercetina sobre la viabilidad de células espermáticas de ovino. Estudio preliminar 2.....	38
Cuadro 8. Efecto de α -Tocoferol a 100 μ M, 200 μ M y 400 μ M sobre la viabilidad de las células espermáticas de ovino. Estudio preliminar 3.....	37
Cuadro 9. Efecto de quercetina y α -tocoferol en la contaminación bacteriana de semen criopreservado de ovino (Media \pm desviación estándar).....	40
Cuadro 10. Géneros bacterianos encontrados mediante pruebas bioquímicas en semen criopreservado de ovino adicionado con 200 μ m de quercetina, 100 μ m de α -tocoferol y la combinación de ambos.....	42
Cuadro 11. Resultados de las pruebas de PCR para diagnóstico molecular de <i>E. coli</i> , <i>P. aureginosa</i> , <i>A. seminis</i> , y <i>C. pseudotuberculosis</i> en semen criopreservado de ovino adicionado con 200 μ m de quercetina, 100 μ m de α -tocoferol y la combinación de ambos.....	48
Cuadro 12. Efecto de la adición de quercetina y α -tocoferol sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media \pm desviación estándar).....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Efectos negativos de las bacterias sobre los espermatozoides.....	15
Figura 2. Mecanismos que llevan a la muerte celular del espermatozoide.....	17
Figura 3. Productos de amplificación a partir de DNA de los microorganismos a evaluar	44
Figura 4. Producto de amplificación a partir del DNA de <i>E. coli</i>	44
Figura 5. Producto de amplificación a partir del DNA de <i>P. aureginosa</i>	45
Figura 6. Producto de amplificación a partir del DNA de <i>A. seminis</i>	46
Figura 7. Producto de amplificación a partir del DNA de <i>C. pseudotuberculosis</i>	47

1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen es una técnica utilizada para el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad de los espermatozoides a temperaturas extremadamente bajas, esto es para su almacenamiento y posterior uso mediante inseminación artificial u otras tecnologías reproductivas; sin embargo, durante este proceso existe el riesgo de que el semen sea contaminado (Ávila- Portillo 2006). Así mismo, se ha descubierto como el uso indiscriminado de antibióticos durante el proceso de criopreservación de semen puede causar un efecto dañino en los espermatozoides, y puede favorecer el desarrollo de resistencia bacteriana ante los antibióticos. Además, aunque el semen se encuentre en condiciones asépticas, se corre el riesgo de sufrir contaminación durante la toma de muestras, el manejo previo a la congelación o incluso después de la misma (Morrel, 2016). Así mismo se debe considerar que existen microorganismos comúnmente encontrados en semen tales como *Actinobacillus spp.*, *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, *Pasteurella spp.* (Saunders *et al.*, 2007). Los cuales suelen ser identificados fácilmente con base a la taxonomía clásica de características fenotípicas, morfológicas, medio de cultivo, propiedades fisiológicas y bioquímicas entre otras, para un tratamiento certero de las mismas (Gobernado *et al.*, 2003). Para evitar la resistencia bacteriana, se considera como una opción viable el uso de alternativas naturales como la implementación de extractos de plantas en los diluyentes del semen, tales como *Moringa oleifera*, la cual es usada como medicina herbolaria y suplemento alimenticio por sus componentes antioxidantes naturales tales como fenoles, flavonoides y vitamina C, vitamina E, β carotenos, zinc, selenio, los cuales se ha documentado poseen un fuerte potencial antioxidante (Vieira 2010; Bukar *et al.*, 2010). Específicamente, los flavonoides son conocidos por su habilidad para inhibir bacterias tanto gram positivas como negativas (Shu *et al.*, 2011). Considerando lo anterior, y debido a la posible variabilidad de los extractos naturales, así como de los diferentes mecanismos de respuesta de las diferentes bacterias, se recomienda el uso de los componentes en específico. Por lo anterior el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de la adición quercetina y de α -tocoferol, como antibiótico no convencional en semen criopreservado y su efecto en la actividad antimicrobiana.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Producción de ovinos

La producción ovina representa un rubro importante dentro del sector agropecuario, y por lo general, se desarrolla bajo sistemas de pastoreo. Esta situación constituye una gran ventaja económica por el ahorro en los costos de producción, generando mejor relación costo/beneficio y proporcionando algunas ventajas comparativas a la calidad nutricional de la carne, pero a su vez son muy susceptibles a las variaciones climatológicas estacionales (FAO, 2010). México cuenta con una gran diversidad de climas que van desde el templado hasta el cálido y del húmedo al muy seco. También tiene una orografía muy accidentada y heterogénea, con diferentes tipos de suelo y presenta una tremenda pluralidad socioeconómica, con niveles de educación muy distintos e ingresos económicos muy desiguales, aun dentro del mismo medio rural (INEGI, 2012), por lo que el manejo de la reproducción de ovinos es de gran importancia tanto para la producción de pie de cría, como para subproductos de estos. Existen en la actualidad ciertas técnicas que contribuyen al incremento de la eficiencia reproductiva, pero se debe de tomar en cuenta que la aplicación de estas técnicas dependerá de las circunstancias específicas de cada explotación (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2006).

2.2 Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) es definida como la introducción de semen en el tracto genital de una hembra, esto mediante algún procedimiento distinto a la copula (Parraguez *et al.*, 2000). La IA es utilizada por su gran aporte en el mejoramiento genético del ganado y por la mejora en los índices de producción en diferentes especies y partes del mundo (Huanca 2001). Además de la utilidad productiva que tiene esta técnica, ofrece la ventaja de poder identificar posibles problemas relacionados con el desempeño reproductivo de los animales, ya que como parte del proceso se evalúa minuciosamente el semen antes de ser utilizado (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2006) además, la IA contribuye al control y prevención de enfermedades de los animales domésticos, sin embargo, se deben extremar precauciones, ya que el uso incorrecto puede provocar la diseminación de enfermedades (Silveira *et al.*, 2005) por lo que es de importancia fundamental la necesidad de contar con criterios estrictos para asegurar la bioseguridad (Gloria *et al.*, 2014).

2.3 Métodos de recolección de semen

Los métodos de recolección de semen más comunes son el electroeyaculador y la vagina artificial, la cual cuenta con distintas ventajas como lo es la concentración espermática y el bienestar animal (Aguirre *et al.*, 2005).

2.3.1 Electroeyaculación

La electroeyaculación es un procedimiento en el cual se generan pequeñas descargas eléctricas rectalmente en el semental, mediante las cuales se estimulan los nervios pélvicos, la próstata y las vesículas seminales con la finalidad de inducir una erección y posteriormente la eyaculación obteniendo así la muestra de semen. Este método, aunque es muy útil para obtener semen de carneros no entrenados en vagina artificial, suele presentar contaminación de la muestra con orina. Se pudiera pensar que tiene la ventaja de obtener un gran volumen de semen, este suele presentar una menor concentración espermática, por lo que solo se recomienda su empleo cuando los machos no puedan ser entrenados para la recolección con vagina artificial (McDonald, 2002).

2.3.2 Vagina artificial

La recolección mediante vagina artificial es el procedimiento más aceptable, ya que simula la copula natural. La unidad proporciona temperatura adecuada, así como presión y lubricación suficiente para producir la eyaculación y cuenta con un tubo calibrado unido para recolectar el semen. Para la recolección como tal, se debe usar una vagina artificial individual, estéril para cada muestra de recolección, lo que ayuda a la prevención de contaminación bacteriana del semen. Después de la eyaculación se debe inclinar suavemente la vagina artificial hacia abajo para que el semen llegue hasta el tubo de recolección estéril (Hafez, 2002); el producto recolectado mediante este método se encuentra libre de contaminación y es representativo de una eyaculación normal. Cabe mencionar que, para poder utilizar este método, los ejemplares deben ser entrenados primero. La forma más común es utilizar como estímulo hembras en estro y acostumbrar a los machos a la presencia y manipulación por parte del humano; este proceso puede tomar algunas semanas para completar su objetivo. Otro método para lograr este entrenamiento es acostumbrar a los machos a montar objetos inanimados; esto representa una ventaja en cuanto al manejo y evita el tener que contar con hembras manipuladas hormonalmente, no obstante, el elegir este método significaría pasar por un proceso más largo y utilizando técnicas de habituación y condicionamiento. La temperatura en el interior de la vagina debe ser de 42 a 44 °C; los primeros 7 a 12 cm correspondientes a la entrada de la vagina deben lubricarse ligeramente con una jalea estéril que no sea tóxica para los espermatozoides. Durante la recolección se debe sostener la vagina en forma paralela y cerca de la hembra, alineada en forma inclinada con la trayectoria esperada del pene, que debe guiarse hacia adentro de la vagina tomando la vaina con la mano inmediatamente atrás del orificio prepucial. El impulso hacia adelante, del carnero, es poco vigoroso, pero rápido, por lo cual el recolector de semen debe coordinar sus movimientos con los del carnero con rapidez (McDonald, 2002); durante este proceso se debe llevar a cabo la evaluación de semen y se debe recalcar que analizar solo volumen, densidad y color del semen no es suficiente para predecir la fertilidad, ya que aunque estos

parámetros se encuentren afectados, los espermatozoides pueden seguir siendo fértiles con la excepción de que el ejemplar tenga problemas tales como azoospermia, necrospermia, entre otros (Patel *et al.*, 2017).

2.4 Criopreservación del semen

El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad de los espermatozoides a temperaturas extremadamente bajas. La estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirán los índices de sobrevivencia de la célula una vez que ha sido descongelada (Ávila -Portillo, 2006); además, el método de criopreservación incluye una reducción de la temperatura, deshidratación celular, congelación y descongelación, y durante el proceso se detiene la actividad celular, reiniciando sus funciones normales después de la descongelación. El enfriamiento y el equilibrio de 30 a 4 °C se llevan a cabo en un refrigerador durante dos horas a 5 °C. Después, las pajillas son colocadas horizontalmente en un estante dentro de una caja metálica que contiene nitrógeno, 4-6 cm sobre la superficie de nitrógeno líquido, experimentando la congelación con vapor de nitrógeno líquido durante 20 minutos. El rango de congelación está regulado por la distancia entre las pajillas y el nivel de nitrógeno líquido (Barbas, 2009).

Las sustancias utilizadas comúnmente como diluyentes para este proceso incluyen:

- 1) Hidroximetil aminometano (TRIS), considerado como el principal componente para la dilución de semen criopreservado debido a su predominante capacidad buffer, diurética y actividad osmótica, así como una baja toxicidad y alta concentración (Próspero *et al.*, 2008).
- 2) Ácido docosahexaenoico, Nasiri *et al.* (2012) afirmaron que dicha sustancia es un ácido graso polinsaturado de cadena larga, el cual puede aumentar la resistencia de la membrana plasmática a los daños provocados por el enfriamiento, cumpliendo la función antioxidante.
- 3) Alfa-tocoferol, también conocida como vitamina E, es un antioxidante biológico primario del grupo de los antioxidantes de rotura de cadena, es decir, impide las reacciones de propagación de cadena, por lo tanto, participa en la disminución del estrés oxidativo influyendo en el control de la peroxidación lipídica (Satorre *et al.*, 2013; Benhenia *et al.*, 2016).
- 4) Ácido Ascórbico, este compuesto elimina los radicales libres de origen natural. Cuando la concentración de ácido ascórbico en el líquido seminal se encuentra muy elevada, las características de la membrana se ven afectadas y se provoca una reducción de la peroxidación lipídica (Hu *et al.*, 2010).

5) Fructosa, se encarga de dar energía al espermatozoide debido al incremento de velocidad de rutas metabólicas que dan como consecuencia el aumento en la formación de ATP, lo que mantiene la motilidad del espermatozoide (Flores *et al.*, 2010).

6) Yema de huevo, actualmente es uno de los componentes más utilizados debido a su efecto protector sobre las membranas de los espermatozoides debido al aporte de lipoproteínas de baja densidad (LBD) compuestas por triglicéridos, fosfolípidos y colesterol (Hu *et al.*, 2010).

7) Glicerol, es el crioprotector más frecuentemente usado para el congelamiento de semen, su principal función es reducir la concentración de sales y mejorar la cantidad de agua no congelada, tanto en el interior como en el exterior de la célula (Flores *et al.*, 2010).

8) Antibióticos, entre ellos los aminoglicósidos principalmente gentamicina, neomicina para la inhibición del desarrollo microbiano (Flores *et al.*, 2010).

2.5 Procesamiento del semen y rangos de congelación

La viabilidad reducida del semen ovino está directamente relacionada con su sensibilidad a la temperatura. Esto lleva al uso de compuestos protectores en los diluyentes, como TRIS (Hidroximetil aminometano) y yema de huevo, eficientes protegiendo a los espermatozoides del choque de temperaturas durante la criopreservación (Falchi, 2018). Sin embargo, se considera también que la sobrevivencia de los espermatozoides durante la congelación y descongelación está influenciada por el rango de dilución del semen, ya que esto los protege durante el enfriamiento, congelación y descongelación. Después de diluir el semen, es enfriado a una temperatura de 5 °C; durante este periodo de refrigeración, hay una adaptación de los espermatozoides a un metabolismo reducido. Cuando se habla de equilibrio se refiere a un intervalo de tiempo en el que la célula espermática permanece en contacto con el glicerol, para que así el crioprotector pueda penetrar las células y crear un equilibrio entre las concentraciones intracelulares, así como las extracelulares del glicerol y otros elementos activos (Barbas, 2009).

2.6 Contaminación del semen

La contaminación bacteriana del semen es una determinante importante para la calidad del semen, ya que esto puede afectar la fertilización directamente o por la inducción de la reacción del acrosoma (Gloria *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la detección de los leucocitos en semen, peroxidasa positivos son la fuente más grande de especies reactivas al oxígeno (ROS), los cuales suelen estar presentes durante la contaminación bacteriana (Rodríguez *et al.*, 2016). El estrés oxidativo también puede dañar la integridad del genoma espermático causando altas frecuencias de rupturas dobles o simples del ácido

desoxiribonucleico (ADN), por lo que es extremadamente importante identificar la fuente de cualquier exceso de ROS en los eyaculados (Saleh *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2017). Debe considerarse que, aunque el semen dentro del animal se encuentre en condiciones asépticas, se corre el riesgo de sufrir una contaminación durante la toma de muestras, el manejo previo a la congelación o inclusive después de la misma, ya que existen bacterias tales como *Staphylococcus spp* y *Streptococcus spp*, que se encuentran en la piel y mucosa de animales sanos. La proliferación de bacterias puede ser controlada mediante el uso de antibióticos, sin embargo, es importante recordar que el uso indiscriminado de estos puede provocar resistencia; además no solo se debe ser cuidadoso al adicionar los antibióticos debido a que pueden provocar nuevas resistencias, sino que también se debe de tomar muy en cuenta que antibiótico se utilizará y que nivel de resistencia existe ante cuales bacterias. Antes del uso de antibiótico, se debe de considerar que la microbiota normal de la piel, pelo y tracto respiratorio del macho permanece presente, por lo que se recomienda que el personal minimice su propia contribución bacteriana a través de la higiene personal, así como la esterilidad del equipo y la técnica con la que se va a recolectar el semen (Morrel, 2016).

La contaminación del semen se puede llevar a cabo durante cualquier etapa de la colección hasta la congelación de este. Estudios han demostrado la presencia de bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp*. antes de la dilución del semen, por lo que es necesaria la adición de antibiótico que, disminuya el número de colonias; sin embargo, como se mencionó anteriormente, el indiscriminado uso de los antibióticos contribuye provocar resistencia. Algunos antibióticos efectivos descritos son: estreptomomicina, gentamicina, tilosina, lincomicina, y espectinomomicina (Morrel, 2016).

Es de importancia mencionar que los tipos de bacterias encontrados en el semen dependen de la población microbiana en el tracto genital, así como del manejo de los sementales, o de la habilidad de las bacterias para sobrevivir en las condiciones de la cavidad prepucial y uretra (Hernández, 2017), por lo que la introducción del semen congelado en la hembra receptora agrava el problema de la diseminación de enfermedades, ya que facilita el intercambio de material seminal y sin afectar la sobrevivencia de los agentes infecciosos. Se ha encontrado que a pesar de que el semen se encuentre bajo condiciones cuidadosas, este puede contaminarse debido a la transportación provocando la diseminación de bacterias geográficamente por lo que se hace necesaria la adición de antibióticos durante la dilución de este (Silveira *et al.*, 2005).

2.6.1 Bacterias comúnmente presentes en infecciones y microbiota de ovinos

La presencia de microorganismos en el tracto urinario es causa de infertilidad, sin embargo, es importante resaltar que muchos de los microorganismos más comunes son parte de la microbiota normal

del organismo (Lacroix *et al.*, 1996). Dentro de los microorganismos más comunes en semen causantes de infecciones se encuentra *A. seminis*, *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, y *Pasteurella multocida*. Los seminales infectados con alguno de estos patógenos pueden exhibir lesiones testiculares, así como fertilidad reducida (Saunders *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Listado de las bacterias comúnmente encontradas en semen de ovinos.

Bacteria	Autor
<i>Staphylococcus spp</i>	• Islam <i>et al.</i> , 2005
<i>Staphylococcus aureus</i>	• Yaniz <i>et al.</i> , 2010
	• Oliviera <i>et al.</i> , 2013
	• Hajtos <i>et al.</i> , 1987
	• Mbai <i>et al.</i> , 1996
<i>Actinobacillus seminis</i>	• Dibarrat <i>et al.</i> , 2006
	• Saunders <i>et al.</i> , 2007
	• Moustacas <i>et al.</i> , 2010
<i>Escherichia coli</i>	• Islam <i>et al.</i> , 2005
	• Yaniz <i>et al.</i> , 2010
	• Oliviera <i>et al.</i> , 2013
	• Rehman <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	• Islam <i>et al.</i> 2005
	• Rehman <i>et al.</i> , 2013
<i>Corynebacterium spp</i>	• Oliviera <i>et al.</i> , 2013
	• Islam <i>et al.</i> , 2005
<i>Corynebacterium renale</i>	• Hernandez <i>et al.</i> , 2017

2.6.2 Efecto de las bacterias en los espermatozoides

La presencia de bacterias contaminantes ha demostrado estar asociada a una baja motilidad y viabilidad de los espermatozoides, así como aglutinación espermática, entre otros problemas. La contaminación del semen puede ocasionar problemas para la hembra como descargas vulvares asociadas a la IA así como endometritis y muerte fetal (Morrel, 2014), por lo que debe tomarse en cuenta que no debe restársele importancia a la flora normal del tracto reproductivo del macho, así como de las bacterias adquiridas durante la recolección, procesamiento y almacenaje del semen, debido a que siguen teniendo una influencia relevante en la fertilidad y potencialidad infecciosa (Silveira *et al.*, 2005). Se debe tener en cuenta que existe una gran variedad de microorganismos patógenos en semen causantes de epididimitis en ovinos, tal es el caso de *A. lingieresii*, *A. pyogenes*, *E. coli*, *C. pseudotuberculosis*, *P. multocida*, *A. seminis*, e *H. somni* entre otros; dicha patología es de importancia, ya que no solo ocasiona lesiones dolorosas en el aparato reproductor del animal, sino que puede afectar la fertilidad; tal es el caso de la infección causada por *A. seminis*, ya que además de lo anterior, suele ser poco responsiva a los tratamientos con antibióticos. Otro claro ejemplo es la infección causada por *E. coli*, siendo este uno de los microorganismos más frecuentemente encontrado en semen; este se adhiere rápidamente a los espermatozoides resultando en una disminución de motilidad y provocando la aglutinación de los mismos. Los espermatozoides infectados por *E. coli*, además de causar una infección en el macho al ser transferidos a la hembra, pueden ser responsables de provocar una infección en el tracto de reproductor de esta (Saunders *et al.*, 2007). Por lo anterior las medidas higiénicas deben ser tomadas durante el proceso mismo, desde la recolección hasta el almacenamiento de las muestras para garantizar la calidad sanitaria del semen (Silveira *et al.*, 2005).

2.6.3 Efecto de las bacterias sobre características espermáticas

La presencia de bacterias contaminantes ha demostrado tener un efecto negativo en los espermatozoides tales como la disminución de viabilidad y motilidad del semen, de igual manera no se debe omitir la presencia de la microbiota natural del tracto reproductor del macho ya que en cantidades adecuadas pueden tener el mismo efecto negativo en el semen que una bacteria externa (Silveira *et al.*, 2005). Una IA exitosa puede ser influenciada por muchas razones, incluyendo la contaminación del eyaculado por varios microorganismos y por la concentración de estos mismos en el semen; la presencia de algún microorganismo puede provocar numerosas afecciones, así como la inducción de procesos inflamatorios en el aparato reproductivo de la hembra inseminada (Mazurova *et al.*, 2015).

Debe tomarse en cuenta que en caso de que el semen destinado para utilizarse en IA contenga microorganismos, puede disminuir la tasa de concepción e incluso diseminar enfermedades a

poblaciones sanas como es el caso de *P. aeruginosa*, que puede causar enfermedades genitales serias que interfieren con la viabilidad espermática y probablemente disminuyen también la tasa de concepción (Andrabi *et al.*, 2016). Se debe tomar en cuenta que el aparato reproductivo de la hembra está expuesto a contaminación bacteriana durante la reproducción natural, por lo que ha desarrollado un mecanismo natural de defensa, sin embargo, durante la IA el semen puede ser depositado en un área en la que no se haya expuesto jamás en el aparato reproductivo, lo que puede predisponer a una infección. Si bien la eliminación de bacterias es importante, se debe considerar que los antibióticos no solo afectan a estos microorganismos, sino que también se ha demostrado que la calidad del semen puede verse afectada. Por ejemplo, la gentamicina es un antibiótico comúnmente utilizado para la conservación del semen; sin embargo, se ha demostrado que tiene un efecto adverso en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Morrel, 2014).

2.6.4 Prevención de la contaminación en el semen congelado

Es de gran importancia que el semen utilizado en IA debe estar libre de agentes infecciosos y sin riesgo de transmisión de enfermedades. Para alcanzar esta meta se deben identificar los factores que podrían influir en la contaminación, desde el semental hasta la transferencia del semen a la hembra. Para evitar cualquier tipo de contaminación es necesario mantener un nivel de higiene efectivo desde las instalaciones hasta el personal antes de iniciar cualquier procedimiento con los animales; una vez que se alcanza el nivel óptimo de asepsia en las instalaciones, se procede a la inspección y supervisión de los animales asegurándose de limitar al máximo cualquier contaminación; estos cuidados no deben disminuir en ningún momento, ya que durante el proceso de congelación se desea seguir manteniendo un área lo más libre de contaminación que sea posible, con esto refiriéndose a las áreas del laboratorio así como los diluyentes e instrumental utilizado (Rubio *et al.*, 2011).

2.6.5 Utilización de antibióticos en la conservación de semen (ventajas y desventajas)

Los antibióticos han sido ampliamente utilizados en la conservación del semen en la industria animal, siendo esta de interés no solo científico sino económico, por lo que se han buscado otros métodos para cumplir la función bactericida de los antibióticos (Berkovich *et al.*, 2013); es por esto que si lo que se busca es reducir las bacterias en las muestras recolectadas, no solo se debe tomar en cuenta la adición de sustancias (administración de antibióticos), sino que se debe de cuidar una higiene adecuada, que reduzca la contaminación del semen durante la colección; sin embargo, la microbiota normal de la piel, pelo y tracto respiratorio no se puede reducir, pero la persona y el instrumental utilizados para la extracción pueden ayudar a minimizar la contaminación. El uso de ropa adecuada, así como calzado limpio y específico para la recolección deberán ser usados; ya que algunos jabones pueden tener cierto

efecto espermatocida, se deberá evitar lavar o desinfectar el instrumental que estará en contacto directo con el semen, para estos se deberá buscar otra forma de limpieza. Otra manera para eliminar bacterias se puede hacer mediante la separación física de las mismas. Varios autores han reportado que la utilización de centrifugación coloidal puede separar los espermatozoides de las bacterias (Morrel, 2014).

Varios tipos de antibióticos, tradicionalmente estreptomina y penicilina, han sido añadidos a diferentes conservadores para controlar el crecimiento bacteriano, pero algunas bacterias han demostrado resistencia a estas moléculas. El directivo de EU 88/407, definió la cantidad de antibióticos a agregar en el semen diluido (estreptomina 500 µg/ml; penicilina 500 UI/ml; lincomicina 150 µg/mL; espectinomicina 300 µg/mL) (Restrepo *et al.*, 2016). Además, en un estudio previo Shin *et al.* (1998) demostró que la combinación de gentamicina (500 µg/mL), tilosina (100 µg/mL), y linco-espectina (300 y 600 µg/mL, respectivamente, fueron los antibióticos más efectivos para el control del crecimiento bacteriano en semen (Gloria *et al.*, 2014).

Sin embargo, estos antibióticos han sido estudiados sistemáticamente para su dosificación, método de adición e interacción con el extensor y sus efectos en el semen (Andrabi *et al.*, 2016). La mezcla de gentamicina, tilosina y linco-espectina (GTLS), es usualmente añadida a los conservadores comerciales, y ha fallado en el control del crecimiento bacteriano en bovinos, sugiriendo una reducción en la efectividad, como se ha reportado previamente en otras especies. Esta evidencia implica la necesidad de evaluar moléculas antimicrobianas más recientes para conservadores seminales, los cuales pueden ser utilizados cuando los convencionales fallan en controlar el crecimiento bacteriano (Gloria *et al.*, 2014).

2.7 Muerte celular inducida por antibióticos

El mecanismo de acción de un antibiótico está basado en el objetivo de este, e independientemente la inhibición resultante es letal para la bacteria. Sin importar en la interacción medicamento-blanco, los antibióticos estimulan la producción de radicales libres contribuyendo así a la muerte celular, además Clara *et al.* (1999) explican que el DNA bacteriano esta superenrollado en orientación negativa y condensado en una pequeña área de la célula. Para que se lleve a cabo la replicación debe primero separarse en dos cadenas, lo que posibilita la transcripción de sus genes individuales. Existe una enzima llamada DNA girasa (topoisomerasa II) la cual facilita el superenrollado negativo y posibilita la separación de las moléculas. Esta enzima está compuesta por dos subunidades, la subunidad A es la responsable del clivaje y la reunión del DNA y la subunidad B que es el sitio de hidrólisis del ATP. En el caso de las quinolonas, estas inhiben la actividad de la topoisomerasa tipo II, generando así la acción bactericida. Se forma un complejo DNA-DNA girasa (entre las cadenas cortadas y las que aún no se unen) y las quinolonas, lo que impide la reconstrucción de la cadena original y resulta letal para la célula.

El mecanismo de la formación de los radicales inducido por antibióticos es el producto final del daño oxidativo en el que se relaciona el ciclo del ácido tricarbóxico, desestabilización de grupos hierro-sulfuro y la estimulación de la reacción Fenton (Kohanski *et al.*, 2007) las cuales según Wang (2008) se produce al catalizar el peróxido de hidrógeno con metales de transición, generalmente hierro, dando como resultado la generación de radicales altamente reactivos del hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Considerando lo anterior, se piensa que la letalidad de un antibiótico es un proceso fisiológicamente complejo en el cual se ha demostrado que los procesos desencadenantes de la actividad antimicrobiana se relacionan directamente con el proceso de muerte celular. En particular, alterar el metabolismo, así como estrés transicional y daño en el DNA cada uno contribuye a la muerte celular inducida por antibióticos (Belenky *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017;).

Según Kuile *et al.* (2017) los antimicrobianos atacan a los microorganismos mediante interacciones celulares muy específicas, en contraste con métodos más generales como el tratamiento de calor o desinfectantes. Por lo que se asume que cada antibiótico tiene un mecanismo diferente, es por esto que la muerte celular inducida por diferentes antibióticos está acompañada de varios marcadores bioquímicos de apoptosis, incluidos: generación de ROS, los cuales son reguladores de apoptosis en células eucariotas, así como fragmentación de DNA (Carmona *et al.*, 2012.) por lo que según Pace *et al.* (2003) es en contraste con la apoptosis lo que distingue la muerte apoptótica de una muerte necrótica, el daño extensivo de la cromatina ocurre en etapas tardías de la apoptosis, y esta fragmentación puede ser detectada mediante distintas tinciones. Por otro lado, otro daño celular puede ser la condensación de la cromatina, ya que de acuerdo con Vagnarelli *et al.* (2013), es uno de los mayores eventos en la cromatina que ocurren durante la división celular, ya que los cambios en la compactación ayudan a la estructura y organización celular al momento de replicar el genoma y transmitirlo a células hijas por lo que al haber un daño durante este proceso se pierde estructura para la célula, lo que puede causar la muerte de la misma.

2.7.1 Resistencia a antibióticos y sus mecanismos

El descubrimiento de los antibióticos fue considerado como una solución a varias enfermedades producidas por bacterias, y estas como todos los seres vivos tienen mecanismos biológicos que les ayudan a su adaptación ante distintos cambios ambientales, y aunque la resistencia a los antibióticos es considerada como una respuesta natural de la evolución y genética bacteriana, existen distintos factores que contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente. Durante los últimos años el uso indiscriminado de antibióticos ha hecho que las bacterias (las cuales poseen múltiples mecanismos bioquímicos, genéticos-moleculares celulares) desarrollen estrategias que les permitan evadir con efectividad la acción de estos compuestos (Clara *et al.*, 1999).

2.7.2 Mecanismos de resistencia a antibióticos

Existen diferentes géneros de bacterias con resistencia innata a antibióticos específicos (Cabrera *et al.*, 2007). Los principales mecanismos de resistencia ocurren por mutación espontánea cromosómica, en donde se incluyen las mutaciones de la DNA girasa y alteraciones de la permeabilidad que impiden la incorporación del medicamento a través de las porinas de los bacilos gram negativos (Clara *et al.*, 1999). Esta resistencia funciona específicamente a través de varios mecanismos como: conjugación, la cual es una transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra a través de una hebra sexual; por lo regular, estos plásmidos contienen genes que les otorgan la resistencia a drogas, antisépticos y desinfectantes (Getino, 2006), de igual manera mediante transferencia se encuentra la transformación, que consiste en una transferencia de genes desde un DNA desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe e incorpora a su genoma (Cabrera *et al.*, 2007). Por otra parte, existe también la transposición, un mecanismo que consiste en el movimiento de una sección de DNA o transposón que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular (Añorga, 2011). Sin embargo, existe también la modificación enzimática o destrucción del antibiótico, en la cual este mecanismo utiliza algunas bacterias contra medicamentos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos); el ejemplo más común suele ser las betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. La resistencia por este mecanismo viene de estímulos naturales o mutaciones en los cromosomas de los genes o de la adquisición de elementos genéticos extracromosomales que portan los genes de transferencia (Cabrera *et al.*, 2007). Otro de estos mecanismos mediante los cuales funcionan los antibióticos se encuentra la impermeabilidad al antibiótico, en donde es importante mencionar que existen diferentes tipos de membrana plasmática en las bacterias y que estas diferencias suelen ser notables sobre todo en la cantidad de peptidoglicano que contienen, además de poseer una capa delgada de este, las bacterias gram negativas se sabe que tienen una estructura de membrana consistente en lipopolisacárido y lipoproteína ancladas a este peptidoglicano junto con grandes proteínas de membrana llamadas porinas. Estas son variadas en tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. La resistencia está relacionada con la poca cantidad de moléculas de porina, ya que las mutaciones que resultan por la alteración de la forma y número de las ya existentes, influyen en la permeabilidad a los antibióticos, por lo que se presentan diversos tipos de resistencia a través de la membrana (Arias *et al.*, 2003). Existe también la alteración o producción de nuevos sitios blanco, en donde los cambios en los sitios blanco del antibiótico suelen ser de los mecanismos más comunes y de gran importancia en la resistencia a los antibióticos ya que se usan en clínica, pues evitan el efecto bactericida que estimula la resistencia. Uno de los ejemplos más comunes

de resistencia a macrólidos como la eritromicina por bacterias gran negativas implica la modificación del sitio blanco en el ribosoma, específicamente con la metilación de un residuo de adenina en un dominio específico del ácido ribonucleico (RNA) (Cabrera *et al.*, 2007). Además, se presenta también la presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico, en donde el mecanismo de eflujo ayuda en la resistencia intrínseca y adquirida contra distintos agentes. Este tipo de resistencia puede disminuir o suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos. Este mecanismo de eflujo es diseñado y mediado por proteínas de transporte, que les otorgan resistencia a los componentes tóxicos. Por último, hay que tomar en cuenta también a la sobreexpresión del sitio blanco, la cual solo se ha descrito en aislados clínicos de micobacterias y que probablemente el mecanismo responsable consiste en la duplicación génica o las mutaciones de los promotores implicados en la transcripción de estos genes (Arias *et al.*, 2003).

2.7.3 Efecto interno de las bacterias en los espermatozoides

La contaminación bacteriana del semen es un determinante importante de su calidad, ya que conduce a la producción de ROS, que son perjudiciales a la motilidad espermática y viabilidad. En adición, la presencia de microorganismos, especialmente bacterias, pueden afectar la fertilización directamente, o pueden hacerlo por la inducción de la reacción del acrosoma (Gloria *et al.*, 2014).

Además, autores como Saleh *et al.*, (2002) aseguran que los leucocitos están presentes en el sistema reproductivo del macho, y se encuentran en casi todos los eyaculados; la importancia clínica del aumento de leucocitos es debido a que leucositospermia es la presencia de leucocitos peroxidasa positivos en concentraciones mayores a 1×10^6 por mL; estos incluyen leucocitos polimorfonucleares, los cuales representan 50-60% de los leucocitos seminales y macrófagos, los cuales representan 20-30%. Diversos estudios han demostrado que los leucocitos peroxidasa positivos son la fuente más grande de ROS en el semen. La relación entre los espermatozoides de poca calidad y las ROS depende de la presencia de citoplasma residual en exceso, debido a que cuando la espermatogénesis se lleva a cabo, los procesos de creación del citoplasma en ocasiones fallan, y como resultado los espermatozoides son liberados en el epitelio germinal con un exceso de citoplasma en los espermatozoides. También se señala que los espermatozoides son particularmente susceptibles al daño inducido por ROS debido a que las membranas citoplasmáticas contienen grandes cantidades de ácidos grasos polinsaturados y su citoplasma contiene bajas concentraciones de enzimas, dando como resultado que las células antioxidantes no puedan proteger la membrana plasmática que rodea el acrosoma y la cola, forzando al espermatozoide a depender de la protección que le da el plasma seminal (Figura 1) (Schulze *et al.*, 2016).

Por lo anterior, es de vital importancia identificar las fuentes de ROS en las muestras de semen obtenidas, ya que las implicaciones clínicas de la leucositospermia son diferentes a las condiciones patológicas en las que el espermatozoide en sí es la fuente de ROS. Los leucocitos seminales juegan un rol muy importante en la estimulación excesiva de células resistentes al oxígeno por los espermatozoides. Sin embargo, el mecanismo de estimulación es nuclear y puede ser debido a un contacto directo o inmediato con productos solubles liberados por los leucocitos. Otra posible explicación para el aumento de ROS puede ser, en parte, debido al incremento en el porcentaje de los espermatozoides con morfología anormal, comparado con el caso de las muestras sin leucositosperma (Saleh *et al.*, 2002).

Durante la criopreservación de semen existe una baja pero significativa correlación entre la concentración de bacterias y la integridad del acrosoma. Aunque la motilidad espermática es similar en el semen fresco y refrigerado conservado con diferentes tratamientos, una reducción significativa en la motilidad progresiva está presente en todo el semen refrigerado con antibióticos. Esta reducción puede ser resultado de la reducción de velocidad del espermatozoide en presencia de antibióticos. El proceso de criopreservación parece afectar la integridad de la membrana de los espermatozoides, pero este efecto parece ser limitado en la integridad del acrosoma de espermatozoides con daño a la membrana en las muestras con antibióticos. Por otra parte, los espermatozoides en las muestras criopreservadas sin antibióticos suelen tener una mejor reacción acrosómica. Por lo que el porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana e integridad de acrosoma intactas, suelen ser significativamente bajos en las muestras criopreservadas sin antibióticos (Gloria *et al.*, 2014).

Por otro lado, la presencia de bacterias en semen crea una competencia por nutrientes, lo que también resulta en la producción de subproductos metabólicos que pueden dañar los espermatozoides. En adición, algunas bacterias contienen lipopolisacáridos en sus paredes celulares, los cuales son liberados cuando mueren, y estos también causan daño a los espermatozoides (Morrel, 2016). La predominancia de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en semen es de gran importancia dado a que se ha reportado que alteran la función de los espermatozoides *in vitro* al interferir con los procesos metabólicos. *E. coli* se adhiere a la superficie espermática vía unión de manosa, resultando en un daño estructural a la membrana plasmática del espermatozoide, comprometiendo la motilidad espermática; también se le ha asociado infecciones uterinas y alteraciones de la fertilidad en vacas (Andrabi *et al.*, 2016). Algunos investigadores como Diemer (1996) consideran que *E. coli* es el patógeno más importante causando prostatitis y epididimitis. En particular, las infecciones seminales con *E. coli* inhiben la motilidad espermática, aunque esta también puede ser inhibida por los efectos directos de la bacteria en los espermatozoides, por ejemplo, la adhesión bacteriana y la presencia de citotoxinas, o más indirectamente, efectos nocivos inducidos por el proceso inflamatorio, por ejemplo, leucocitos

polimorfonucleares, macrófagos y sus secreciones tóxicas. En los experimentos realizados por Diemer (1996), no hubo un efecto evidente de las bacterias en la motilidad espermática inmediatamente después de su inoculación y dos horas después. En la medición en las cuatro horas posteriores de las muestras incubadas con *E. coli*, se presentaron cambios significativos en la motilidad a diferencia del control. El decremento en la motilidad de las muestras con *E. coli* fue relacionada con el crecimiento bacteriano de cada muestra, demostrando efectos decisivos y significativos en la motilidad solamente cuando la concentración bacteriana había aumentado. Cuando el crecimiento bacteriano se previno con la adición de cloranfenicol, no hubo diferencia en la motilidad progresiva, modalidad de moción y los tipos de velocidad entre las muestras inoculadas con *E. coli* y las muestras control. Las medidas de velocidad han sido consideradas como un indicador indirecto de la función mitocondrial de los espermatozoides y está asociado con la fertilidad. La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza puede indicar reflejos de la eficiencia del patrón de ritmo flagelar y parece ser un factor crítico cuando la generación de fuerzas de presión está relacionada con la penetración espermática en el moco cervical o su habilidad para penetrar el cumulus oophorus y la zona pelúcida (Andrabi *et al*, 2016).

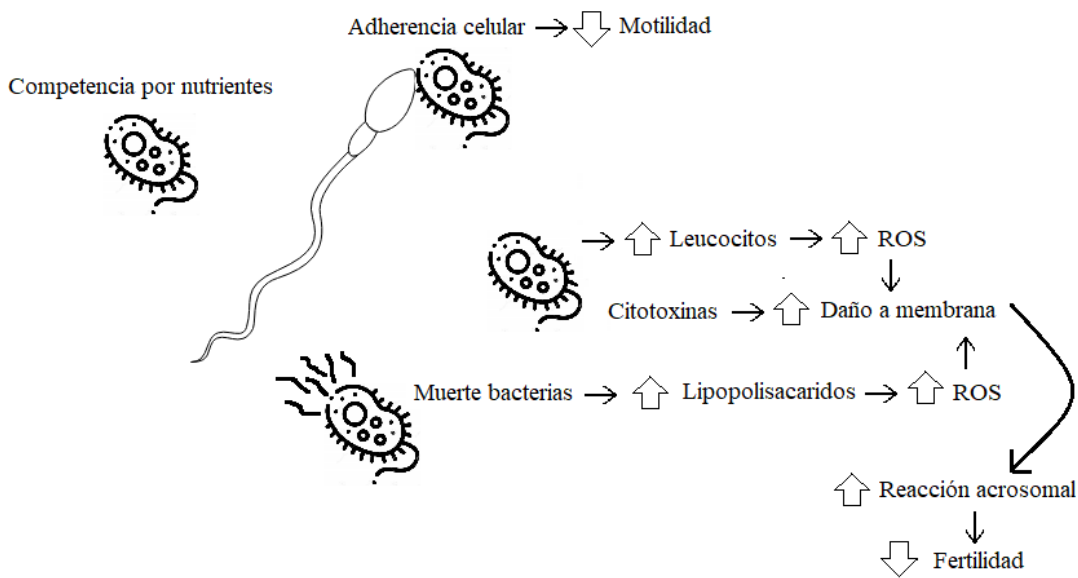


Figura 1. Efectos negativos de las bacterias sobre los espermatozoides.

Además, los componentes bacterianos tales como liposacáridos son conocidos por inducir apoptosis en varios tipos de células (Eley, 2005).

2.8 Mecanismos que conllevan a la muerte celular de los espermatozoides por ROS

Se ha demostrado que en individuos con infertilidad idiopática existen altos niveles de ROS intracelular, así como niveles altos de fragmentación de DNA en los espermatozoides, por lo que se asume que estos dos parámetros están relacionados (Hernandez *et al.*, 2010; Mayorga, 2012; Cho *et al.*, 2017). Y no solo eso, sino que, en organismos vivos, las cantidades de radicales libres y ROS son controladas por un complejo sistema de homeostasis, capaz de mantener niveles fisiológicos de ROS necesarios para el funcionamiento y regulación de algunas biomoléculas. Paralelamente, los organismos pueden poseer sistemas bioquímicos de protección contra el estrés oxidativo, que consiste en el desbalance entre la producción de especies químicas altamente reactivas y las defensas antioxidantes de la célula (Mayorga *et al.*, 2015), lo que lleva al hecho de que la formación de ROS en organismos vivos es causada por la respiración celular la cual se lleva en un ambiente rico en oxígeno. No obstante, en la capacitación espermática, las ROS también juegan un papel decisivo, ya que se ha comprobado que bajo condiciones fisiológicas y de forma controlada, la producción de ROS es de vital importancia para la adquisición de la capacidad fecundante del espermatozoide (Paparella *et al.*, 2015).

No hay que olvidar que el estrés oxidativo conlleva a una función defectuosa de los espermatozoides, debido al efecto toxico causado por el peróxido de hidrogeno, ya sea en el metabolismo del espermatozoide como en la motilidad (Wagner *et al.*, 2017).

Además, existe numerosa evidencia de que el papel del ROS endógeno es un agente causal de la mutagénesis y contribuye en la carga mutacional que experimentan los microorganismos durante periodos de estrés oxidativo, esto se propone con base a la existencia de distintos mecanismos enzimáticos empleados por las bacterias para combatir la toxicidad de las ROS (Dwyer *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2016).

Originalmente se propuso que la interacción del antibiótico con la bacteria simulaba la oxidación de NADH mediante la cadena de transporte de electrones. La hiperactivación de la cadena transportadora de electrones depende de reducir los equivalentes producidos por el ciclo de Krebs, que inducen la formación de superóxido y peróxido de hidrogeno, los cuales pueden dañar los receptores de hierro en las proteínas y al reaccionar con peróxido de hidrogeno en la reacción Fenton genera radicales hidroxil que pueden ser altamente deletéreos para las células y pueden dañar directamente el DNA, lípidos y proteínas (Van Acker *et al.*, 2016). Los mecanismos mencionados se resumen en la Figura 2.

2.9 Plantas medicinales como antibiótico

Las plantas proveen una rica fuente de compuestos naturales, los cuales son usados directa o indirectamente para una amplia variedad de aplicaciones para el bienestar de la población humana y animales domésticos. Estos compuestos son principalmente fitomoléculas sintetizadas a través de mecanismos metabólicos primarios y secundarios en plantas (Gupta *et al.*, 2018).

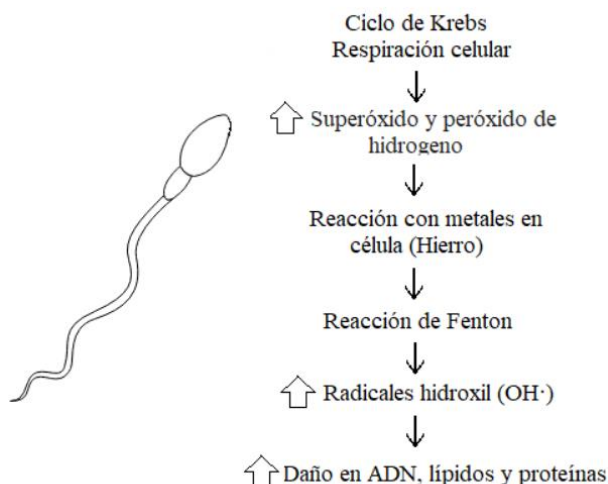


Figura 2. Mecanismos que llevan a la muerte celular del espermatozoide.

Se ha demostrado que varias especies de plantas son importantes para el mantenimiento de la nutrición y salud de humanos y animales (Barakat *et al.*, 2015). Se ha llevado a cabo mucha investigación en todo el mundo para identificar y estudiar los compuestos antibacteriales encontrados en plantas medicinales. Estudios en los que se usan aceites esenciales o compuestos aislados tales como alcaloides, flavonoides, sesquiterpenos, lactonas, diterpenos, triterpenos y naftoquinones para probar los efectos antibacteriales son necesarios para validar el uso de un rango de medicinas populares; por ejemplo, *Moringa oleífera*, de la cual investigaciones recientes de esta planta han revelado propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, pro-coagulantes, y antibacteriales (Oliveria *et al.*, 2011). Un grupo de antioxidantes que comúnmente se sugiere son buenos candidatos para la terapia antioxidante dado a su rol potencial dando soporte a la salud son los flavonoides (Boots *et al.*, 2008) En años recientes, numerosos estudios exploraron las propiedades terapéuticas de los extractos de diferentes partes de varias plantas medicinales. Los flavonoides son una clase de compuestos fenólicos naturales, presentes en células fotosintéticas (Boots *et al.*, 2008). La quercetina, un miembro de la familia de flavonoides, está

ampliamente distribuida en frutas, vegetales, hierbas, granos de soya, té, vino, etc. (Jia *et al.*, 2011, Naseer *et al.*, 2017).

2.10 Generalidades de la quercetina

La quercetina es un flavonoide ampliamente estudiado, capaz de inhibir completamente la peroxidación en semen, aumentando la viabilidad espermática cuando es adicionada a los diluyentes previos a la congelación. Se ha descrito que con distintos niveles de la suplementación con quercetina, se inhibirá el efecto de la peroxidación lipídica, aumentará la motilidad del semen, además de ser beneficioso para el aumento de ATP, asociado de igual manera a una mejora en la motilidad (Mc-Niven *et al.*, 2006).

La adición de quercetina al diluyente de semen aminoró el efecto negativo de la crio preservación en la motilidad espermática redujo la formación y actividad de ROS, de oxidasas, y también tuvo un efecto positivo en la conservación del DNA; se piensa que el efecto benéfico que tiene la quercetina en la motilidad está relacionado por el mecanismo propuesto por Nass-arden (1990), en el cual la motilidad se inhibía a las 2 horas de incubación, pero durante las siguientes 3-4 h, esta era estimulada por la quercetina, debido a la inhibición de calcio en la membrana plasmática, lo que conserva el ATP contenido en la célula y la disminución de la peroxidación lipídica durante la primer hora de incubación resulta en una motilidad alta las siguientes horas (Seifi-Jamadi *et al.*, 2017).

2.11 Quercetina como antibiótico

La urgente necesidad de hacer frente al problema de resistencia a los antibióticos ha llevado a la búsqueda de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana, pero al mismo tiempo se busca que las bacterias no tengan resistencia a estas sustancias; las plantas han constituido la principal fuente de agentes medicinales, por lo que se recomienda el uso de estas como alternativa, ya que los extractos de plantas medicinales son comúnmente empleados para el control bacteriano en ciertas enfermedades, esto debido a componentes como quercetina, la cual se ha demostrado tener una excelente actividad en contra de numerosas bacterias (Mingyu *et al.*, 2007). La quercetina pertenece a la familia de los flavonoides, los cuales han demostrado ser sustancias muy útiles en la inhibición bacteriana. Lo anterior se debe posiblemente a la habilidad de destruir la membrana celular de las bacterias y formar un complejo extracelular. La quercetina es considerada como un flavonoide único, conocido por su habilidad para inhibir bacterias tanto gram positivas como negativas, mediante la inactivación extracelular de proteínas; además se considera que la actividad antimicrobiana de los flavonoides puede estar influida por sinergismo de los principios contenidos en los extractos o al pH que presentan (Shu *et al.*, 2011; Días da Costa *et al.*, 2018). Asimismo, cuenta con la ventaja de ser uno de los flavonoides más ampliamente estudiados, presentan una gran variedad de actividades biológicas, y aunque a pesar de que estas han

sido estudiadas a detalle, la actividad antibacterial no ha sido tomada en cuenta lo suficiente. Sin embargo, se han obtenidos resultados benéficos en contra de la actividad bacteriana de grupos tales como *Staphylococcus. spp.*, *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus fecalis* y *E. coli* (Aziz *et al.*, 1998). Distintos autores tales como Jaisinghani (2017) y Hirai *et al.* (2010) confirmaron que el uso de la quercetina puede inhibir bacterias tales como *E. coli* y *K. pneumonia*.

2.12 Efecto de α -tocoferol (vitamina E) sobre la actividad antimicrobiana

La vitamina E es liposoluble y un potente antioxidante. Se encuentra naturalmente en alimentos y plantas, y debido a su carácter lipofílico, puede causar defectos en la membrana celular de bacterias resultando en un aumento de la permeabilidad, afectando bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. (Andrade *et al.*, 2014., Naguib *et al.*, 2018). Además, el uso de α -tocoferol puede inhibir exitosamente la actividad antimicrobiana, especialmente si se combina con componentes naturales tales como extractos de plantas (Georganterlis *et al.*, 2007), ya que las vitaminas actúan mediante mecanismos específicos los cuales pueden incrementar la actividad antimicrobiana especialmente si esta se encuentra acompañada de componentes antibióticos (Tintino *et al.*, 2016) y gracias a los altos niveles de tocoferol la vitamina E puede ser utilizada como un eficiente antibiótico (Ulusoy *et al.*, 2009; Abd *et al.*, 2013).

2.13 Identificación bacteriana

La identificación de bacterias está basada en la taxonomía clásica y tradicional de sus caracteres fenotípicos como morfología, aspecto en los medios de cultivo, propiedades fisiológicas, propiedades bioquímicas, etc. Se suelen utilizar técnicas sencillas como microscopia en fresco o tinciones. Se considera que para obtener resultados certeros se tomen en cuenta pruebas clásicas, pero incorporando nuevos conocimientos tecnológicos (Gobernado *et al.*, 2003).

2.13.1 Identificación por cultivo

La clave para identificar bacterias como agentes patógenos depende de su aislamiento en cultivo puro. Una colonia de cultivo puro está compuesta por un solo tipo de microorganismos; una vez aisladas las bacterias se puede identificar dependiendo de sus características de crecimiento (aerobias, anaerobias, microaerofilas, tiempo de cultivo, grado de humedad, temperatura de crecimiento) así como el estudio visual del aspecto de las colonias, morfología, elevación, bordes, tamaño color, tipo de superficie, densidad consistencia, incrustación al medio de cultivo, etc. (Gobernado *et al.*, 2003).

2.13.2 Pruebas bioquímicas

Estas pruebas permiten determinar las características metabólicas, pueden ser rápidas y sencillas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas, o pueden ser más lentas y complejas en las cuales para su lectura se requiere el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48 h; a este grupo pertenecen la mayoría de la pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar (Fernández *et al.*, 2010)

Hierro triple azúcar (TSI): el agar TSI es un medio de cultivo sólido que sirve como prueba bioquímica para la identificación inicial de los bacilos Gram negativos. Se fundamenta en hacer notar la fermentación de los azúcares presentes y la producción de hidrógeno y gas. Contiene tres carbohidratos fermentables: glucosa, lactosa y sacarosa. Posee cuatro derivados proteicos (extracto de levadura, extracto de carne, peptona y peptona proteosa) también contiene sulfato ferroso de amonio, tiosulfato de sodio, cloruro de sodio, rojo de fenol y agar. La incapacidad de un microorganismo de fermentar glucosa presente en el medio es lo que lo excluye de pertenecer a la familia de enterobacteriaceae, lo que hace a esta prueba esencial para la ruta de identificación que se debe tomar para determinar el género y especie de una bacteria. Con la fuente de carbono utilizada se produce un viraje de color rojo al amarillo; en lactosa ocurre en la parte superior, sacarosa en la parte intermedia y glucosa en la parte profunda del medio. El tiosulfato es reducido a sulfuro de Hidrógeno (H_2S) quien reacciona con el citrato férrico amoniacal para dar formación al sulfuro de hierro que es de color negro. La presencia de gas se debe al bióxido de carbono (CO_2) producto de la fermentación y se manifiesta con la fragmentación del medio de cultivo en el tubo (Calderón *et al.*, 2016).

Agar lisina hierro (LIA): utilizada para la identificación de bacterias de la familia enterobacteriaceae, consiste en demostrar la presencia de la enzima lisina descarboxilasa, la cual reacciona con el grupo carboxilo del aminoácido L-lisina. Los tubos deben leerse 24 horas después de la incubación; una vez concluido este tiempo si se observa un fondo amarillo con una superficie morada, la reacción es negativa, el color púrpura o morado de la superficie corresponde a la alcalinización del medio por el uso de las peptonas. Una reacción se considera positiva cuando el fondo y la superficie del tubo son completamente púrpuras. Para la desaminación de la lisina el tubo deberá tener una superficie rojiza y un fondo amarillo, o en su defecto todo el tubo de color rojizo, en este caso se interpreta como negativa para la descarboxilación de la lisina, pero positiva para la desaminación de la lisina. En cuanto a la producción de sulfuro de Hidrógeno (H_2S) se considera una reacción positiva cuando existe la aparición de un precipitado negro en todo el medio o en parte de él (MacFaddin, 2003).

Medio MIO: se utiliza para la identificación de especies de bacterias pertenecientes a la familia enterobacteriaceae. Sus siglas describen a cada uno de los parámetros que se pueden observar en este medio; motilidad, indol y ornitina. La motilidad es la capacidad del microorganismo de moverse por la presencia de flagelos. Para que esta propiedad pueda ser observada la consistencia del medio debe ser semisólida, por lo que la preparación lleva menos cantidad de agar. La producción de indol evidencia la presencia de la enzima triptafonasa que actúa sobre el aminoácido triptófano, siendo necesario el uso de un reactivo revelador para hacer visible la producción del indol, y finalmente la ornitina determina si la bacteria es capaz de descarboxilar el aminoácido, es decir si cuenta con la enzima ornitina descarboxilasa. Para su interpretación el indol se considera positivo cuando existe la formación de un anillo de color rojo al agregar gotas del reactivo de kovacs, y en caso de que no exista este anillo se considera negativo; para la motilidad se evidenciara si se observa un medio turbio o si hay una ligera línea gruesa de crecimiento que se expande alrededor de la inoculación inicial; para la ornitina se considera negativa la prueba si el medio es de color amarillo o con fondo amarillo y positiva si el medio es completamente morado (Mac Faddin, 2003).

Medio SIM: es un agar semisólido y diferencial, especialmente diseñado para ayudar a la identificación de algunas bacterias, principalmente de la familia Enterobacteriaceae. Este compuesto por tripteina, peptona, sulfato de hierro, sulfato de amonio, tiosulfato de sodio y agar. Este medio permite la ejecución de tres importantes pruebas: a producción de H₂S, la formación del indol y la motilidad. Para la formación de indol es necesario agregar una sustancia reveladora (reactivo de Kovac's), el cual reacciona con el indol, formando una sustancia de color rojo en forma de anillo en la superficie del agar. Si el anillo color fucsia aparece la prueba de indol se interpreta como positiva, las bacterias que no posean esta enzima no formarán el anillo y se interpreta como una prueba de indol negativa. Para la formación de sulfato de Hierro se toma en cuenta la presencia de un precipitado de color negro, en caso de no estar presente la prueba se considera negativa. En cuanto a la motilidad se pondrá en evidencia cuando se observe turbidez, tanto en el inóculo inicial, como alrededor de este, en tanto que, las bacterias no móviles solo se desarrollan en el trayecto del inóculo inicial (Calderon *et al.*, 2016).

Caldo de Urea: es un medio de cultivo líquido utilizado para evidenciar la presencia de la enzima ureasa en ciertos microorganismos. La ureasa es una enzima microbiana que se produce de manera constitutiva, es decir, es sintetizada independientemente de estar o no presente el sulfato sobre el que actúa. Para que esta prueba sea considerada como positiva se presentara un viraje de color a rosa fucsia; la intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de amonio producido (Mac Faddin, 2003).

Citrato de Simmons: medio utilizado para la identificación de microorganismos especialmente gran negativos. Algunas bacterias tienen la capacidad de sobrevivir en ausencia de fermentación o producción

de ácido láctico, necesitando conseguir energía a través de la utilización de otros sustratos. En esta prueba la única fuente de carbono ofrecida es el citrato. Si el medio queda del color original (verde) y no hay crecimiento visible, la prueba es negativa, pero si el medio cambia a color azul, indica la presencia de productos alcalinos, que es detectado por el indicador de pH. En este caso la prueba es positiva. Esto sucede cuando la bacteria utiliza el carbono del citrato también es capaz de tomar el nitrógeno del fosfato de amonio con el cual libera amoníaco, alcalinizando el medio. Si se observa crecimiento de la bacteria en el medio, pero no hay cambio de color, también la prueba debe considerarse positiva, ya que si hay crecimiento quiere decir que la bacteria fue capaz de utilizar el citrato como fuente de carbono, aunque no haya un cambio del pH en el momento (en ocasiones puede tardar). Se considera negativa en caso de que no se observe crecimiento en el medio, ni cambio de color en el mismo (Mac Faddin, 2003).

Voges-Proskauer: se utiliza para la identificación de bacterias de la familia enterobacteriaceae. Se realiza en un medio de cultivo líquido llamado rojo de metilo-voges-proskauer. Se fundamenta en la capacidad que tiene el microorganismo de utilizar la glucosa por la vía butilén-glicólica, y formar un producto final neutro denominado acetoina, en presencia de oxígeno y de un pH alcalino. En el medio Rojo de Metilo /Voges Proskauer, además de poderse revelar el test de Voges-Proskauer, también se puede revelar la prueba de rojo de metilo. Generalmente la prueba da positiva después de 2 a 5 minutos, cuando se puede observar un color rosado débil. Si se deja en reposo durante 30 min a 1 hora la intensidad del color será máxima (rojo intenso). Una prueba negativa se pondrá en evidencia cuando el caldo quede de color amarillo. Después de 1 hora, si la prueba es negativa, se puede formar un color cobrizo producto de la reacción del hidróxido de potasio sobre el α -naftol (Calderon *et al.*, 2016).

Rojo de metilo: El rojo de metilo es un compuesto que funciona como indicador de pH. El uso principal de este indicador de pH está circunscrito a revelar reacciones de fermentación bacteriana de carbohidratos. En este tipo de pruebas, el rojo de metilo detecta los cambios de pH del medio. El indicador de pH rojo de metilo es por sí solo ácido, y su color es rojo. Este indicador de pH se mantendrá rojo por debajo de pH 4.2, mientras que por encima de 6.3 virará a amarillo, en tanto que en el rango intermedio produce diversas tonalidades de anaranjado (Calderon *et al.*, 2016).

2.13.3 Pruebas de lectura rápida

Una prueba de lectura rápida es la cual que se utiliza en la identificación preliminar y con lectura inmediata como en el caso de las pruebas de:

Catalasa: enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos; las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en

forma de burbujas, esta prueba suele ser usada para identificación y separar *Streptococcus spp.* y *Enterococcus spp.* (negativa) y *microcaceae* (positiva) considerandose negativa en caso de ausencia de burbujas y positiva con la presencia de estas (Gobernado *et al.*, 2003).

Oxidasa: la reacción de la oxidasa se debe a la presencia en enzimas oxidasas por un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo, el cual se reduce por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrogeno según la especie. El oxígeno actúa como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones, por lo general este sistema solo se encuentra en bacterias aerobias (Fernández *et al.*, 2010).

2.13.4 Tinciones

En ocasiones estas suelen utilizarse como el primer paso y a veces el único para la identificación bacteriana. Una de las tinciones más comunes es la tinción de gram, la cual es especialmente utilizada para ver las propiedades de tinción de todo tipo de bacterias, diferenciándolas en dos grupos: gram positivas (color violeta) y gram negativas (color rojo), esta prueba permite también distinguir su morfología y forma de agruparse. Esta tinción es de utilidad para identificar la mayoría de las bacterias, pero permite hacer una presunción, apoyados en el tipo de muestra y diagnóstico presuntivo de bacterias como *S. pneumoniae*, *Neisseria*, *C. bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus*, entre otras.

2.13.5 Identificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En microbiología clínica se pueden presentar diferentes circunstancias en las que la identificación bacteriana mediante métodos moleculares es muy útil. La introducción de estos métodos representa un gran apoyo para obtener diagnósticos sensibles y específicos en el menor tiempo posible, aunque son muy eficaces no sustituyen, sino que complementan los ya usados métodos tradicionales, lo que lleva a un diagnóstico más exacto. En la actualidad una de las técnicas más comúnmente utilizadas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual permite la detección de agentes etiológicos, y de sus genotipos de virulencia y resistencia, con gran sensibilidad y rapidez. Se basa en la amplificación genómica y en secuenciación de genes o sus fragmentos que permite su posterior detección por hibridación o interacción de los fragmentos de AND, la identificación de genes codificadores de factores de virulencia, la detección de microorganismos, únicos o múltiples, de difícil cultivo o no cultivables y la aplicación a situaciones nuevas emergentes desconocidas (Méndez *et al.*, 2004). La identificación precisa del agente patógeno en una infección por bacterias es tarea fundamental que permite el manejo apropiado de la enfermedad, y la elección más apropiada del tratamiento. La mayor parte de microorganismos de interés clínico pueden aislarse e identificarse mediante cultivos convencionales y

pruebas básicas, sin embargo, en ocasiones los microorganismos pueden ser difíciles de identificar, de aislar, de crecimiento lento o no pueden ser cultivables por lo que se ha optado por utilizar técnicas más sofisticadas como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Poggi *et al.*, 2009). Otra de las situaciones en las que se opta por identificación génica, es en el transporte de animales, ya que se debe procurar solo mover animales sanos y la realización de pruebas tradicionales suelen ser tediosas, además de poco precisas debido al manejo de las muestras. Adicionalmente la PCR proporciona la oportunidad de una rápida identificación directamente en las muestras de semen y reduce la posibilidad de resultados positivos a otros patógenos, consecuencia de contaminación de las muestras, además de que la posibilidad de la realización simultánea de esta prueba con distintas bacterias, aporta resultados rápidos y certeros (Saunders *et al.*, 2007).

2.13.5.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Tamay de Dios *et al.* (2013) aseguran que la (PCR) es una de las herramientas más innovadoras para el estudio de ácidos nucleicos, ya que se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de interpretar. La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica una secuencia de DNA durante varios ciclos, en los que la secuencia blanca es copiada, para ello la reacción utiliza la actividad de la enzima de DNA polimerasa (Espinosa, 2007).

Mutary *et al.* (2018) explican que cada ciclo de PCR se lleva a cabo en tres etapas:

Desnaturalización. Es aquí donde las cadenas de DNA son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo con el modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso.

Hibridación. En esta etapa, los cebadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-cebador, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los cebadores es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

Extensión. En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-cebadores y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agregar dNTP's complementarios para crear las cadenas

completas de DNA. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del DNA, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador.

Si bien el diagnóstico de distintas enfermedades del tracto genitourinario de los ovinos se lleva a cabo mediante análisis clínicos, pruebas serológicas y bacteriológicas. Adicionalmente se utilizan métodos moleculares basados en la amplificación de los distintos géneros bacteriológicos, siendo actualmente pruebas más específicas gracias a la implementación de la PCR (Moustacas *et al.*, 2013).

La PCR provee la oportunidad de identificar rápidamente distintos patógenos directamente de muestras de semen; se ha demostrado que los diluyentes utilizados para la criopreservación del semen pudieran enmascarar la presencia de ciertas bacterias durante la PCR, sin embargo, esto podría reducirse mediante la utilización de proteinasa K; la cual es una serina no específica altamente reactiva capaz de inactivar RNasas y DNasas. Se utiliza en el aislamiento o preparación de ácidos nucleicos de alto peso molecular, principalmente para digerir proteínas y eliminar la contaminación de las preparaciones de las muestras (Saunders *et al.*, 2007).

La PCR se considera un método útil para el diagnóstico de enfermedades tales como epididimitis ovina ya que favorecen la identificación de bacterias, tal es el caso de la *Brucella ovis*, agente causal de dicha enfermedad (Moustacas *et al.*, 2013).

3. HIPOTESIS

La quercetina y el α -tocoferol tienen efectos antibióticos en el semen criopreservado de ovino, ya que influye positivamente en la disminución de bacterias sin afectar a las células espermáticas.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la quercetina y α -tocoferol como antibiótico no convencional en semen criopreservado de ovino.

4.1 Objetivos específicos

Determinar la concentración adecuada de quercetina y α -tocoferol en la actividad antimicrobiana para el semen.

Cuantificar e identificar la proliferación de bacterias en el semen criopreservado de ovino adicionado con quercetina y α -tocoferol.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Reproducción Animal del Departamento de Ciencias Veterinarias, en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana, así como en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB), perteneciente a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). El Municipio de Ciudad Juárez se encuentra ubicado en las coordenadas geográficas 31°44'22" N 106°29'13" O y a una altitud de 1,120 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2017).

5.2 Inicio y duración del estudio

El estudio se realizó desde el mes de agosto del 2018 hasta marzo de 2021 con una duración de 25 meses.

5.3 Recolección de semen y evaluación

Se seleccionaron cuatro ovinos en base a sus características físicas, de los cuales se utilizaron dos sementales por sesión para la toma de muestras, la cual se realizó dos veces por semana durante tres semanas utilizando la técnica de vagina artificial descrita por McDonald (1998) y Hafez (2002), la cual consiste en simular la cópula natural, proporcionando presión, lubricación y temperatura adecuada.

5.3.1 Evaluación macroscópica del semen

Los aspectos para la evaluación macroscópica del semen son: volumen, el cual se mide mediante observación directa sobre el tubo graduado, los valores normales oscilan entre 0.8 y 1.2 mL; color, dentro de los cuales se consideran normales los colores que van del blanco, blanco cremoso, blanco lechoso, nebuloso, y acuoso, siendo patológicos los colores rosado, amarronado y verdoso; y densidad, la cual varía desde un semen acuoso, lechoso, lechoso-cremoso, hasta un cremoso, estando directamente relacionada con la concentración, la cual se considera normal aproximadamente de 1.5×10^9 espermatozoides/mL (Contri *et al.*, 2010).

5.3.2 Evaluación microscópica del semen

Utilizando una micropipeta (Dlab Micropipette Plus 10-20 μ L) se tomaron 10 μ L de la muestra mezclada y homogénea, la cual se depositó en una cámara de recuento estándar 20 μ m (Cámara Leja, Leja Products, Holanda) de cuatro áreas de conteo, para ser evaluada mediante un análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision, Minitube, Alemania). Mediante el análisis CASA, se obtuvieron los siguientes datos: motilidad progresiva (%), células vivas (%) y concentración (cels/mL) para poder realizar la dilución del semen (David *et al.*, 2015).

5.4 Dilución y refrigeración de semen

5.4.1 Dilución del semen

Se realizó un protocolo con diluyente comercial (TwoStep, Continental, USA) basado en TRIS y yema de huevo dividido en dos fracciones. Para realizar la dilución, se utilizaron dos mezclas; la mezcla A que contiene: 39.0% de diluyente A, 49.0% de agua, 2.0% de antibiótico, quercetina o α -tocoferol y 10.0% de yema de huevo. La mezcla B contiene: 39.0% de diluyente B, 50.8% de agua, 0.2% de antibiótico, quercetina o α -tocoferol y 10.0 % de yema de huevo. El volumen de eyaculado obtenido se diluyó con la mezcla A y B, después de realizar el análisis de los datos volumen, concentración espermática, motilidad progresiva y porcentaje de células vivas en una hoja de cálculo (Microsoft Office, Excel, USA) hasta obtener una concentración de 120×10^6 espermatozoides móviles por mL, de forma que en cada pajilla exista una concentración de 30×10^6 espermatozoides móviles por mL (Dorado *et al.*, 2007).

5.4.2 Refrigeración y equilibramiento del semen

Una vez diluido el semen, se envasó en pajillas de 0.25 mL, y selladas con alcohol polivinílico, después fueron depositadas en un recipiente con agua a 37 °C para lograr que la temperatura disminuyera paulatinamente a una velocidad de 0.5 °C por minuto durante una hora de refrigeración. Una vez que se alcanzó una temperatura de 5°C, permanecieron una hora más en refrigeración para el equilibrio de la muestra.

5.5 Proceso de congelación de semen

Una vez refrigerado y equilibrado a 5 °C el semen, se colocaron las pajillas en un baño de nitrógeno (CryoLogic CL-8800, Australia), el cual permaneció a una temperatura de 5 °C y comenzó el descenso de la temperatura de 10 °C por minuto hasta llegar a una temperatura final de -120 °C. Una vez que las pajillas alcanzaron esta temperatura fueron almacenadas en un termo criogénico para realizar los análisis correspondientes posteriormente.

5.6 Evaluación de características seminales post-descongelado

El descongelamiento del semen se llevó a cabo colocando cada pajilla a baño maría (37 °C) por 30 segundos, después de este proceso se evaluó la motilidad progresiva (%), la motilidad rápida (%), la motilidad lenta (%), y células motiles (%) utilizando el análisis CASA.

5.7 Elección de las concentraciones de quercetina y α -tocoferol

Para la elección adecuada de concentraciones para los tratamientos se realizaron tres estudios previos, el primero para la elección de la concentración de quercetina, con base a concentraciones tomadas de la literatura. En este estudio se colectó, procesó y congeló el semen, utilizando los siguientes tratamientos:

- Tx0: adicionado con etanol 90%
- Tx1: adicionado con antibiótico convencional (tylosina 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicina 275 $\mu\text{g}/\text{mL}$, espectinomomicina 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lincomicina 165 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
- Tx2: adicionado con quercetina 10 μM
- Tx3: adicionado con quercetina 50 μM
- Tx4: adicionado con quercetina 100 μM

Una vez obtenidos los resultados de este estudio y observar una tendencia positiva a mayor concentración de quercetina, se llevó a cabo un segundo estudio en el cual se utilizaron los siguientes tratamientos:

- Tx0: adicionado con etanol al 90%
- Tx1: adicionado con antibiótico convencional (tylosina 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicina 275 $\mu\text{g}/\text{mL}$, espectinomomicina 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lincomicina 165 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Tx2: adicionado con quercetina 100 μM
- Tx3: adicionado con quercetina 200 μM
- Tx4: adicionado con quercetina 300 μM

El tercer estudio previo se llevó a cabo para la elección de la concentración de α -tocoferol, en el cual las concentraciones elegidas con base en la motilidad espermática fueron:

- Tx0: adicionado con etanol 90%
- Tx1: adicionado con antibiótico convencional (tylosina 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicina 275 $\mu\text{g}/\text{mL}$, espectinomomicina 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lincomicina 165 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Tx2: adicionado con α -tocoferol 100 μM
- Tx3: adicionado con α -tocoferol 200 μM
- Tx4: adicionado con α -tocoferol 400 μM

5.7.1 Tratamientos

Al momento de la preparación del diluyente, las muestras diluidas de semen fueron fraccionadas en cinco porciones las cuales contienen quercetina, α -tocoferol y una mezcla de antibióticos convencionales cada muestra fue adicionada con:

- Tx0 Testigo: no se adicionó ningún tipo de antibiótico y en su lugar se utilizó agua estéril.
- Tx1 Control: fue adicionado con antibiótico convencional (tilosina 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicina 275 $\mu\text{g}/\text{mL}$, espectinomomicina 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lincomicina 165 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- Tx2 Quercetina: fue adicionado con quercetina 200 μM
- Tx3 Antioxidante: fue adicionado con α -tocoferol 100 μM
- Tx4 Quercetina + α -tocoferol: fue adicionado con quercetina 200 μM y α -tocoferol 100 μM

5.8 Determinación de actividad antimicrobiana

Se descongeló 1 pajilla de las muestras de semen correspondientes a los tratamientos, y se prepararon diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000 tomando 100 μL de la muestra y mezclando con 9.9 mL de agua estéril en las primeras dos diluciones; se colocaron 100 μL de la solución en caja Petri y se vaciaron 25 mL de agar soya tripticaseína; se incubaron las placas a 37 °C y a las 48 h se realizó un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC). En caso de que se presenten UFC de masivo o incontable, se consideró un número de 301 UFC para el análisis estadístico (Gajdziok *et al.*, 2015).

5.9 Identificación bacteriana

Para poder llevar a cabo la identificación de las bacterias mediante pruebas microbiológicas, se llevó a cabo el aislamiento de las bacterias según su tratamiento. Para esto se sembró mediante el método de estriado simple, en una caja Petri con 25 mL de agar soya tripticaseína las diferentes colonias existentes en los cultivos previos y se incubaron las placas a 37 °C por 24 h. Una vez que se obtuvo el aislamiento de las colonias por cada tratamiento, se procedió a hacer una resiembra más en medio líquido adicionando 20 mL de caldo nutritivo y una pequeña muestra de la colonia tomada con el asa incubando a 37 °C por 24 h. Después del periodo de incubación, se procedió a tomar 700 μL del cultivo en un microtubo y agregar 1.5 mL de glicerol, mezclar bien y congelar para su posterior uso. A cada bacteria aislada se le fue otorgada una clave, para su posterior identificación, tomando el número del tratamiento como primer número de la clave y el segundo la numeración del aislado correspondiente (ej. Primer bacteria aislada del tratamiento 0, se le asignó la clave 0.1).

5.9.1 Morfología de colonia

Se realizó mediante la observación de los cultivos de las bacterias aisladas, se recopiló información de la apariencia de las colonias basado en los criterios: forma, borde, elevación y superficie (Flores *et al.*, 2014).

5.9.2 Tinción

Para poder iniciar el proceso de identificación bacteriana, una vez teniendo los cultivos de las bacterias aisladas se llevó a cabo la tinción de Gram, tomando una pequeña muestra de una colonia, así como de agua destilada, realizando un frotis. Se dejó secar por varios segundos y luego se fijó al portaobjetos con mechero, se agregaron un par de gotas de cristal violeta, se dejaron actuar por un minuto, se enjuagó la muestra con agua no directa y se agregó lugol durante un minuto, se enjuagó nuevamente con agua no directa para posteriormente adicionar alcohol, esperar 30 segundos, enjuagarlo y adicionar safranina durante un minuto para después enjuagar. Se dejaron secar las muestras y se procedió a su observación al microscopio para su evaluación (López *et al.*, 2014)

5.9.3 Pruebas bioquímicas

Para realización de las pruebas bioquímicas se realizaron cultivos de cada bacteria aislada por tratamiento, utilizando las bacterias congeladas en glicerol. Se prepararon los medios para cada prueba bioquímica dependiendo de sus especificaciones y se realizaron las pruebas por medio de cultivo diferencial. Las pruebas realizadas fueron:

Agar hierro triple azúcar (TSI): (BD Bioxon, México) se preparó el medio en un tubo de ensaye con agua destilada, se esterilizó en autoclave. Después de ser esterilizado, se inclinó y dejó solidificar para poder realizar el cultivo tomando una pequeña muestra con el asa y sembrando por picadura profunda en el agar sin tocar el fondo del tubo y al sacar el asa se continúa la siembra por estría en el pico del medio y se incubaron las muestras a 37 °C por 24 h.

Lisina hierro agar (LIA): (BD Bioxon, México) se preparó el medio con agua destilada; se esterilizó en autoclave, se dejó reposar de manera inclinada hasta solidificar para posteriormente tomar una muestra del cultivo y sembrar por picadura profunda el fondo del medio y por estriado en el pico y se incubaron las muestras a 37 °C por 24 h.

Motilidad indol ornitina (MIO): (MCD LAB, México) se preparó el medio en tubo de ensaye con agua destilada, se esterilizó en autoclave y se dejó solidificar. Una vez solidado se tomó una muestra de la colonia y se sembró mediante picadura profunda, se incubaron las muestras a 37 °C por 24 h.

Sulfuro indol motilidad (SIM): (BD Bioxon, México) se preparó el medio con agua destilada, se esterilizó en autoclave y se dejó solidificar. Una vez solidado se sembró con un asa mediante picadura profunda y se incubaron las muestras a 37 °C por 24 h.

Agar hierro Kligler (KIA): (Fisher Scientific, Estados Unidos) se preparó el medio con agua destilada, se esterilizó en autoclave y se dejó reposar de manera inclinada hasta solidificar para sembrar por picadura profunda en el fondo del tubo y por estría en el pico del medio, se incubaron las muestras a 37 °C por 24 h.

Citrato de Simmons: (MCD LAB, México) se preparó el medio con agua destilada, se esterilizó en autoclave y se dejó reposar inclinado hasta solidificar para sembrar por picadura profunda en el fondo del medio y por estría en el pico, se incubaron las muestras a 37 °C por 24 h.

Caldo Urea: (BD Bioxon, México) se preparó este medio líquido y se sembraron las muestras. Después se incubaron a 37 °C por 24 h.

Prueba de catalasa: (Protec, México) Se colocó una pequeña parte de la colonia en un portaobjetos y se agregó una gota de peróxido de hidrógeno y se observó la muestra por unos segundos, en caso de que existiera la presencia de burbujas, la muestra se consideró como positiva y en el caso de que no hubiera un cambio en la muestra después de la adición del peróxido de hidrogeno la muestra se consideró negativa.

Prueba de oxidasa: (Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos) se tomó una pequeña muestra de la colonia en un portaobjetos y se adicionó el contenido del gotero para prueba de catalasa, y se procedió a la observación inmediata de la muestra; si la muestra cambio de color a azul-violeta en 30 segundos se consideró positiva. Todas aquellas muestras que contaban con cambios de color una vez pasados los 30 segundos se consideraron negativas, así como aquellas muestras en las que no hubo cambio en la coloración. (Vallespi *et al.*, 2005)

5.10 Extracción de DNA por fenol: cloroformo: alcohol isoamílico para PCR

La extracción de DNA fue realizada mediante el método de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:24:1). Se realizó una mezcla con dos pajillas por tratamiento. La muestra (500 µL) de semen fue centrifugada a 10,000 rpm durante tres minutos, se adicionó 500 µl de buffer de lisis (0.2M TRIS-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8; 0.5M NaCl; 1% SDS) y 2.5 µL de proteinasa K (20 mg/mL), se mezcló en vortex. Se incubó la muestra a 56 °C por 30 min y se mezcló en vórtex. A los 15 min se adicionaron 2.5 µL de proteinasa K, se dejó enfriar a temperatura ambiente 30 segundos y se mezcló en vortex, y se colocó la muestra a 100 °C en termoblock por 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 3 min. Se procedió a realizar el primer lavado en el cual se agregaron 400 µL de fenol-cloroformo-alcohol

isoamílico (FCAI) (24:25:1), y se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. El segundo lavado se llevó a cabo con 400 μ L de Cloroformo-alcohol isoamílico (CAI) (24:1) y se centrifugó 12,000 rpm por 3 min. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionó 1/10 volumen de acetato de sodio y 2 volumen de etanol 100% frío y se mezcló por inmersión, se incubó por 30 min a 1 h a 80° C (o -20 °C por 1 día), se centrifugó la muestra a 14,000 rpm por 15 min. Se quitó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol 75% frío y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y se dejó secar por 15 min aproximadamente, y fue resuspendido el pellet en 30 - 50 μ L de agua estéril.

5.11 Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN extraído del semen de borrego se calculó mediante espectrofotometría utilizando el NanoDrop 2000. El cual para su posterior utilización fue calibrado con 2 μ L de agua estéril en el lector, para después colocar 2 μ L de cada muestra para así poder estimar la pureza del ADN según la relación de absorbancia A_{260} / A_{280} considerándose un ADN de puro, a una relación $< A_{1.80}$ y $> A_{1.60}$. La concentración de ADN se calculó utilizando un nivel de absorbancia de 260nm bajo la siguiente ecuación.

Incluir la ecuación para calcular la concentración de ADN

5.12 Identificación bacteriana mediante PCR

El análisis por PCR fue realizado utilizando como controles cultivos bacterianos líquidos de las bacterias reportadas en la literatura, para el caso de las muestras experimentales se realizó la extracción de DNA de la muestra de semen contenido en la pajilla antes de la experimentación. Los primers utilizados fueron los reportados como efectivos para estas bacterias, siendo estos descrito en la literatura como se muestra en los cuadros 2 al 5. Las reacciones se hicieron utilizando 12.5 μ L de máster mix, el cual está compuesto por DNA polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$ y un buffer, 20 μ M de primer forward, 20 μ M de primer reverse y agua a volumen final de 25 μ L. Las reacciones fueron cargadas en el gel de agarosa 1.8% en el termociclador (ProFlex, Thermofisher, Massachusetts, USA). Se utilizaron marcadores de pares de base de 100 pb (Promega, Madison WI) y se dejó un carril sin muestra (vacío) como control negativo. Las condiciones de amplificación para cada patógeno son descritas a continuación:

Cuadro 2. Condiciones de amplificación estandarizadas en el laboratorio para *E. coli*.

Primer	Etapa	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización	94 °C	3 min
Fw ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	35 ciclos Desnaturalización	95 °C	30 seg
Rv AGAACGCCCACTGAGATCATC	Alineamiento	50 °C	1 min
	Extensión	72 °C	1 min
	Extensión	72 °C	8 min
		4 °C	∞

Cuadro 3. Condiciones de amplificación para *P. aureginosa* de acuerdo con lo descrito por Spilker *et al.* (2004).

Primer	Etapa	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización	95 °C	2 min
Fw GGGGGATCTTCGGACCTCA	40 ciclos Desnaturalización	95 °C	20 seg
Rv TCCTTAGAGTGCCCACCCG	Alineamiento	58 °C	20seg
	Extensión	72 °C	1 min
	Extensión	72 °C	8 min
		4 °C	∞

Cuadro 4. Condiciones de amplificación para *A. seminis* de acuerdo con lo descrito por Saunders *et al.* (2007).

Primer	Etapa	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización	94 °C	2 min
	30 ciclos		
Fw CTTATCTTTCTTAAGCCCTGAC	Desnaturalización	94 °C	30 seg
Rv	Alineamiento	55 °C	30seg
AAGAAAAAGACGAAGAGACATT	Extensión	72 °C	1 min
	Extensión	72 °C	8 min
		4 °C	∞

Cuadro 5. Condiciones de amplificación para *C. pseudotuberculosis* modificado de acuerdo a lo descrito por Cetinkaya *et al.* (2002).

Primer	Etapa	Temperatura	Tiempo
	Desnaturalización	94 °C	3min
	30 ciclos		
Fw	Desnaturalización	94 °C	30 seg
ACCGCACTTTAGTGTGTGTG	Alineamiento	55 °C	1min
Rv	Extensión	72 °C	1 min
TCTCTACGCCGATCTTGTAT	Extensión	72 °C	8 min
		4 °C	∞

5.13 Electroforesis

Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1.8%, corridos a 100 V durante 45 min. Para su preparación fueron utilizados 20 ml de buffer TAE 1X (40 mM Trizma base y 1 mM EDTA, pH 8.3), 1.8gr de agarosa y 10 μ L de Bromuro de Etidio al 0.1 %, una vez solidificado el material en cada pozo del gel se cargaron 10 μ L de cada una de los productos de amplificación, adicionalmente se utilizaron marcadores de peso 100 pb DNA ladder Promega y 50 pb DNA ladder Promega, una vez transcurridos los 45 minutos de electroforesis los geles se irradiaron y documentaron utilizando un transiluminador y fotodocumentados utilizando el sistema EDAS 290 Kodak.

5.14 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2009 / STAT versión 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC). Los datos porcentuales se transformaron en arcoseno antes del análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para las variables numéricas y actividad antimicrobiana. Se llevo a cabo una comparación de medias mediante la prueba de Tukey. El nivel de significancia considerado fue $P < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó la estandarización de las concentraciones para los tratamientos de quercetina y α -tocoferol con base en la evaluación de características de motilidad de los espermatozoides tomando en cuenta los resultados obtenidos en los estudios preliminares realizados. Los resultados de estos estudios preliminares se presentan en el cuadro 6, 7 y 8.

Cuadro 6. Efecto de 10 μ M, 50 μ M y 100 μ M de quercetina sobre la viabilidad de células espermáticas de ovino. Estudio preliminar 1.

Tratamiento	Motilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad Rápida
Etanol	43.64 \pm 5.88 ^a	37.06 \pm 6.22 ^a	12.94 \pm 3.60 ^a
Ant. Conv	56.35 \pm 5.08 ^a	50.17 \pm 5.83 ^a	21.31 \pm 6.12 ^a
Quercetina 10 μ M	34.43 \pm 4.26 ^a	28.59 \pm 3.76 ^a	6.20 \pm 1.46 ^a
Quercetina 50 μ M	38.50 \pm 6.62 ^a	33.48 \pm 6.30 ^a	7.93 \pm 1.88 ^a
Quercetina 100 μ M	51.34 \pm 5.97 ^a	49.37 \pm 6.51 ^a	15.81 \pm 3.53 ^a

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

Teniendo en cuenta que los mecanismos bajo los cuales actúa un antibiótico pueden ser efectivos no solo ante las bacterias, sino también con las células espermáticas, es de vital importancia que la elección de la concentración de quercetina a utilizar en el semen sea la adecuada, es por esto que se optó por realizar pruebas con diferentes concentraciones de quercetina y α -tocoferol. Aunque no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en ninguno de los estudios preliminares, se decidió elegir las concentraciones de acuerdo con el mayor número de sobrevivencia de los espermatozoides basado en los resultados obtenidos, siendo elegidas las concentraciones de 200 μ m de quercetina y 100 μ m de α -tocoferol para utilizarse en el estudio principal.

Cuadro 7. Efecto de 100 μ M, 200 μ M y 300 μ M de quercetina sobre la viabilidad de células espermáticas de ovino. Estudio preliminar 2.

Tratamiento	Motilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad Rápida
Etanol	43.64 \pm 5.88 ^a	37.06 \pm 6.22 ^a	12.94 \pm 3.60 ^a
Ant. Conv	56.35 \pm 5.08 ^a	50.17 \pm 5.83 ^a	21.31 \pm 6.12 ^a
Quercetina 100 μ M	51.34 \pm 5.97 ^a	49.37 \pm 6.51 ^a	20.36 \pm 5.54 ^a
Quercetina 200 μ M	64.05 \pm 7.16 ^a	57.73 \pm 9.13 ^a	23.81 \pm 5.54 ^a
Quercetina 300 μ M	55.02 \pm 7.74 ^a	50.05 \pm 8.41 ^a	20.82 \pm 6.80 ^a

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.05).

Cuadro 8. Efecto de α -Tocoferol a 100 μ M, 200 μ M y 400 μ M sobre la viabilidad de las células espermáticas de ovino. Estudio preliminar 3.

Tratamiento	Motilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad Rápida
Etanol	43.64 \pm 5.88 ^a	37.06 \pm 6.22 ^a	12.94 \pm 3.60 ^a
Ant. Conv	52.17 \pm 5.59 ^a	50.17 \pm 5.83 ^a	21.31 \pm 6.12 ^a
α -tocoferol 100 μ M	56.35 \pm 5.08 ^a	47.89 \pm 5.79 ^a	15.24 \pm 3.40 ^a
α -tocoferol 200 μ M	34.95 \pm 5.68 ^a	29.06 \pm 5.94 ^a	7.55 \pm 2.18 ^a
α -tocoferol 400 μ M	36.23 \pm 6.64 ^a	31.18 \pm 6.67 ^a	8.39 \pm 2.52 ^a

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.05).

Debido a que la utilización de antibióticos es cada vez más común, es necesario conocer el uso correcto de estos, ya que con un mal manejo se pueden presentar reacciones adversas y potenciales toxicidades que se deben a que el medicamento se encuentra en cantidades superiores a las que pueden ser manejadas fisiológicamente por las células, ya sea por la excesiva dosificación o por el deterioro del metabolismo celular (Palavecino, 2014). Algunos efectos secundarios producidos por ciertos antibióticos están relacionados con la capacidad de incrementar el estrés oxidativo en las células, sin embargo, la quercetina ha demostrado tener un importante efecto inhibitorio de la producción de ROS, es por esto que la administración de quercetina podría representar una potencial opción terapéutica, ya que se ha reportado un marcado efecto protector frente al estrés oxidativo (Bustos, 2017).

Parte de la contaminación que se presenta en el semen es debido a la presencia de microorganismos propios del tracto urinario, sin embargo, el origen de esta contaminación no debe ser ignorada, debido a que, aunque es común que esté presente, aún mantiene su potencialidad infecciosa además de que puede estar relacionado a problemas de fertilidad (Silveira *et al.*, 2005). Por lo anterior, y considerando que autores tales como Morrel (2016) y Kohansky (2007) indican que la presencia de bacterias contaminantes ha demostrado estar asociada a una baja motilidad y viabilidad de los espermatozoides, así como aglutinación espermática, entre otros problemas, se recomienda el uso de antibióticos para reducir estos efectos; sin embargo, el mecanismo de acción de un antibiótico está basado en el objetivo de este, e independientemente la inhibición resultante es letal para la bacteria (Morrel, 2014). Sin importar en la interacción medicamento-blanco, los antibióticos estimulan la producción de radicales libres contribuyendo así a la muerte celular (Kohansky, 2007). Además, Cabrera *et al.* (2007) afirman que la resistencia a múltiples sustancias es un problema actual que se observa a nivel mundial, ya que el uso indiscriminado y la presión selectiva ambiental que provocan los antibióticos generó una respuesta de sobrevivencia en los microorganismos, que los capacitó para evadir con eficiencia la acción de los antibióticos. Entonces, aunque la adición de antibióticos durante el procesamiento de semen es deseable para el control del crecimiento bacteriano, los antibióticos pueden ocasionar un incremento de radicales que afectan a los espermatozoides, además de que todo uso de antibióticos puede contribuir a la generación de resistencia a los antibióticos (Morrel, 2016).

Debido a lo anterior, se recomienda el uso de alternativas a los antibióticos como es la quercetina, la cual ha demostrado ser una sustancia muy útil en la inhibición bacteriana, esto se debe posiblemente a la habilidad de destruir la membrana celular de las bacterias y formar un complejo extracelular. La quercetina es considerada como un flavonoide único, conocido por su habilidad para inhibir bacterias tanto gram positivas como negativas, mediante la inactivación extracelular de proteínas (Shu *et al.*, 2011).

En consideración a lo anterior, en el cuadro 9 se presentan los resultados obtenidos de los conteos de unidades formadoras de colonias (UFC) realizados mediante medios de cultivo a partir de las muestras de semen, en los cuales se puede observar que existe inhibición del crecimiento bacteriano cuando la quercetina y el α -tocoferol se utilizaron en combinación en relación a cuando solo se utilizó α -tocoferol ($P < 0.05$), mostrando una actividad antimicrobiana similar a la encontrada para el tratamiento testigo que incluye la utilización de un antibiótico convencional (55, 275, 330 y 165 $\mu\text{g/mL}$ de tilosina, gentamicina, espectinomomicina y lincomicina, respectivamente). Sin embargo, no existió diferencia significativa con los demás tratamientos. Es importante notar que los resultados obtenidos cuando se usaba quercetina y α -tocoferol de forma individual, son casi idénticos a los obtenidos en el tratamiento control (sin adición de ninguna sustancia antibiótica), lo que podría sugerir que su actividad antimicrobiana de forma individual es casi nula. Sin embargo, es necesario continuar realizando estudios para corroborar el efecto antimicrobiano de las sustancias y concentraciones utilizadas en el presente estudio.

Cuadro 9. Efecto de quercetina y α -tocoferol en la contaminación bacteriana de semen criopreservado de ovino (Media \pm desviación estándar).

Tratamiento	Unidades formadoras de colonia (UFC)
Control (Tx0)	214.44 \pm 52.56 ^{ab}
Testigo (Tx1)	177.55 \pm 23.04 ^{ab}
Quercetina 200 μm (Tx2)	213.55 \pm 63.20 ^{ab}
α -tocoferol 100 μm (Tx3)	242.11 \pm 52.38 ^a
Quercetina 200 μm + α -tocoferol 100 μm (Tx4)	168.0 \pm 21.67 ^b

^{a,b} Letras diferentes entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$).

La proliferación de bacterias en semen es un tema de gran importancia en la reproducción animal, no solo por la transmisión de enfermedades sino también por el decremento de viabilidad del semen resultante en una baja fertilidad. Se ha encontrado una gran variedad de microorganismos en semen tales como *Actinobacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Brucella spp.* e *Histophilus spp.* (Saunders *et al.*, 2007); si bien algunos microorganismos se encuentran comúnmente en la microbiota natural de los animales de producción, es importante mencionar que no solo la presencia de estos puede causar una infección, sino también la cantidad y velocidad en la que estas se reproduzcan en la muestra, debido a esto es de gran importancia la administración de antibióticos en las muestras de semen. Sin embargo, la necesidad de utilizar sustancias diferentes a los antibióticos convencionales para evitar contribuir la resistencia a los antibióticos ha abierto el panorama a la utilización de componentes

naturales con actividad antibiótica según lo descrito por McNiven *et al.* (2016). Es el caso de la quercetina, la cual es un flavonoide capaz de inhibir la peroxidación en semen, lo que produce un aumento en la viabilidad y motilidad de las células espermáticas, además de ser reconocida por su habilidad para inhibir bacterias tanto gram positivas como negativas. La actividad antimicrobiana de los flavonoides puede estar influida por sinergismo de los principios contenidos en los extractos o al pH que presentan (Shu *et al.*, 2011; días da Costa *et al.*, 2018). Dentro de esta búsqueda por alternativas a los antibióticos inclusive se ha considerado la idea de utilizar elementos antioxidantes como inhibidores de bacterias como es la vitamina E, que es un potente antioxidante liposoluble, lo que puede causar defectos en la membrana celular de bacterias resultando en un aumento de la permeabilidad. Se ha demostrado su poder antibiótico en bacterias como *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* (Andrade *et al.*, 2014; Naguib *et al.*, 2018). Además, un punto muy importante es que se ha mencionado que el uso de α -tocoferol como antibiótico puede ser potenciado si es combinado con componentes naturales tales como extractos de plantas (Georganterlis *et al.*, 2007). Debido a lo anterior, es que se considera que la combinación de la quercetina con el α -tocoferol resultó en una mayor inhibición de las UFC, que si bien no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en cuanto al crecimiento bacteriano, siendo una mejora solamente numérica, se considera como un resultado prometedor la combinación de ambos tratamientos, indicando la necesidad de continuar realizando estudios que puedan confirmar la utilidad como antibiótico de la combinación de α -tocoferol y quercetina.

Por otro lado, mediante la información recopilada de los cultivos y las pruebas bioquímicas realizadas a las muestras, se obtuvo como resultado la identificación de ocho géneros bacterianos en los distintos tratamientos. La presencia de estos depende de distintos factores además del antibiótico con el que fue tratado, y existe también la posibilidad de no haber contado con muestras homogeneizadas correctamente, lo que puede llevar a la ausencia de ciertas bacterias en tratamientos donde no se adicionó ningún antibiótico, y sin embargo esta misma bacteria ausente en el tratamiento control presentarse en una muestra adicionada con antibiótico, quercetina o α -tocoferol, y así mismo pudiera servir como un indicador de la eficacia del antibiótico ante los distintos géneros encontrados, los cuales fueron identificados con base a la comparación de estos y lo reportado en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Brenner *et al.*, 2004). Dichos géneros y clasificación de muestras se presentan a detalle en el Cuadro 10.

La variabilidad encontrada en los cultivos indica que, aun habiendo crecimiento de varios géneros bacterianos, estos no se encuentran en todos los tratamientos. Lo anterior indica que la quercetina como el α -tocoferol funcionan como inhibidor de ciertos géneros bacterianos. Sin embargo, cabe mencionar que la mayoría de las bacterias encontradas en los cultivos son gram negativas. Las bacterias gram

negativas resistentes a múltiples fármacos son un problema de salud grave en todo el mundo. Esto está relacionado con la gravedad de las infecciones que pueden causar, la dificultad de establecer un tratamiento correcto y la falta de nuevos antibióticos contra estos patógenos. Por tanto, el tratamiento con antibióticos debe basarse en antibiogramas y puede requerir una combinación de antibióticos (Fariñas *et al.*, 2013). El conocer los distintos géneros que fueron identificados en este estudio amplía el panorama para futuras elecciones de antibióticos y deja ver que a pesar de que se debe hacer una meticulosa elección de estos, existe la posibilidad de encontrar una gran variedad de bacterias resistentes a estos.

Cuadro 10. Géneros bacterianos encontrados mediante pruebas bioquímicas en semen criopreservado de ovino adicionado con 200 µm de quercetina, 100 µm de α-tocoferol y la combinación de ambos.

Bacterias	Tratamientos				
	Control	Testigo	Quercetina 200 µm	α-tocoferol 100 µm	Quercetina + α- tocoferol
<i>Pseudomonas spp.</i>	+	+		+	
<i>Corynebacterium spp.</i>	+		+	+	+
<i>E. coli.</i>	+	+	+	+	+
<i>Histophilus spp.</i>				+	+
<i>Actinobacillus spp.</i>	+		+		
<i>Staphylococcus spp.</i>	+	+			
<i>Salmonella spp.</i>	+	+	+	+	+
<i>Haemophilus spp.</i>				+	

+ indica la presencia del género en el tratamiento.

De acuerdo con lo expresado por Morrel (2016), bacterias como *Staphylococcus* y *Streptococcus spp.* se encuentran en piel y mucosa de animales sanos, al igual que en vísceras y tracto respiratorio; lo anterior pudiera explicar la presencia de *Staphylococcus spp* en distintos tratamientos y al ser bacterias “comunes” en el organismo de los ovinos, es probable que sea un factor que ha contribuido a que este género haya desarrollado resistencia a numerosos antibióticos (Carrada *et al.*, 2018). Es importante mencionar que este género no fue encontrado en los tratamientos adicionados con quercetina, esto quizá debido a que uno de los principales factores de virulencia de estos es una alfa toxina, una proteína formadora de poros con actividad citotóxica, por lo tanto, la inhibición de la secreción de esta es una alternativa en el control de las infecciones causadas por este microorganismo. La quercetina siendo un

flavonoide de origen natural, inhibe de manera dosis dependiente la actividad hemolítica y disminuye la secreción de esta alfa toxina (Carrada *et al.*, 2018). La quercetina es considerada como un flavonoide único, conocido por su habilidad para inhibir bacterias tanto gram positivas como negativas, mediante la inactivación extracelular de proteínas (Shu *et al.*, 2011; días da Costa *et al.*, 2018). En el caso de *E. coli* y *Salmonella* spp., fueron encontradas en todos los tratamientos, esto quizá debido a que son bacterias muy comúnmente encontradas no solo en el medio ambiente, si no en el organismo de los animales, y al ser enterobacterias y responsables de distintas infecciones gastrointestinales, han sido reportadas con altos porcentajes de resistencia a antibióticos debido al uso común en los tratamientos anti-infecciosos (Puig *et al.*, 2011).

El semen puede contaminarse durante la extracción mediante el uso de vagina artificial, debido a la presencia de bacterias en el prepucio y la uretra de los machos, lo que hace que la flora mixta desarrolle principalmente bacterias saprofitas como *E. coli* y *Pseudomonas* (Ortega *et al.*, 2009); tal es el caso de *P. aureginosa*, la cual crece fácilmente en distintos medios y sus requerimientos nutritivos son escasos, además de que esta bacteria es resistente a la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas, entre otros antibióticos (Fariñas *et al.*, 2013). Hoy en día la presencia de bacterias resistentes a antibióticos sigue siendo un problema grande que no parece estar siendo controlado, por lo que se cree que el descubrimiento de antibióticos nuevos más potentes no es la única solución a este problema, por lo que se presenta la alternativa el uso de compuestos naturales con propiedades antibacterianas, como lo es la quercetina (Storani *et al.*, 2019).

También se debe tomar en cuenta que la simple presencia de estas bacterias no es suficiente para desarrollar una infección, sino que además de la presencia se necesita la cantidad adecuada de estas para que exista una infección (McNiven *et al.*, 2016).

Se presenta la Figura 1 los resultados de la amplificación de los microorganismos a evaluar. Dicha evaluación se llevó a cabo con el objetivo de estandarizar la prueba y demostrar la presencia de dichos organismos. En el producto de amplificación a partir de DNA para identificar *E. coli* (Figura 2) se puede observar la presencia de bandas de amplificación en todos los tratamientos lo que indica la presencia de esta bacteria a pesar de las distintas sustancias utilizadas, esto se debe a que suele ser una bacteria poco responsiva a los tratamientos con antibióticos, además de ser uno de los microorganismos más frecuentemente encontrados en el semen (Silveira *et al.*, 2005), además de que según lo descrito por Abreham (2019) los ovinos son uno de los principales reservorios de *E. coli*, situación que podría afectar la producción ya que según lo descrito por Lacroix (1996) la presencia de uno o más agentes infecciosos en el tracto genito-urinario están asociados a la infertilidad.

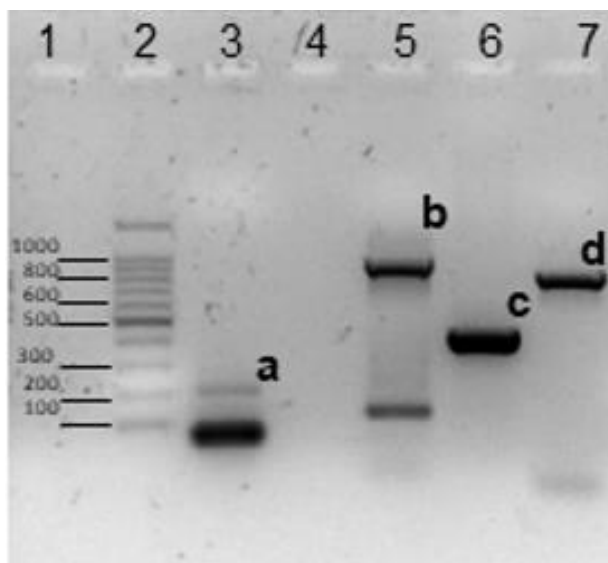


Figura 3. Productos de amplificación a partir de DNA de los microorganismos a evaluar. Gel de electroforesis en agarosa al 1.8%. Carril 1: Vacío, 2: Marcador de Peso molecular 100 pb, 3: Amplificación de *E.coli* banda a de 180 pb, 4: Vacío, 5: Amplificación de *P. aureginosa* banda b 956pb, 6: amplificación de *A. seminis* banda c 436 pb, 7: *C. pseudotuberculosis* banda d 800pb.

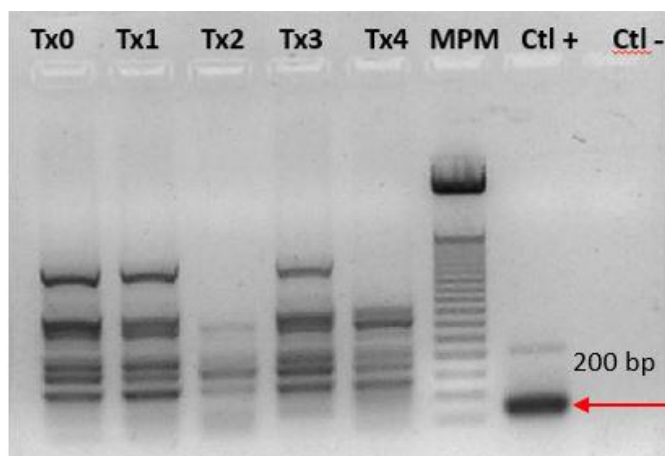


Figura 4. Producto de amplificación a partir del DNA de *E. coli*. Gel de electroforesis en agarosa al 1.8%: Tx0: Tratamiento control, Tx1: Tratamiento testigo, Tx2: Quercetina 200 μm , Tx3: α -tocoferol 100 μm , Tx4: quercetina 200 μm + α -tocoferol 100 μm ; MPM: Marcador de peso molecular, Ctl+: control

positivo (200 pb; Flecha roja), Ctrl-: control negativo. Al existir bandas de amplificación en todos los carriles indica la presencia de la bacteria en el respectivo tratamiento.

La obtención de estos resultados positivos a *E. coli* confirman que, según Bussaleu (2011), esta es una de las bacterias mayormente aisladas en el tracto genitourinario; lo anterior también concuerda con Otter (2018) que indica que *E. coli* es el agente más común (58.7%) encontrado en muestras de semen de borregos con historial de infertilidad, indicando que el origen en el semen puede deberse por ser comensales del tracto reproductivo o por contaminación. Además, de acuerdo con lo expresado por Lacroix (1996), la utilización de PCR ofrece un panorama más claro respecto a la confirmación de la presencia de esta bacteria en semen, ya que el resultado es exclusivo y certero de dicha especie de bacteria.

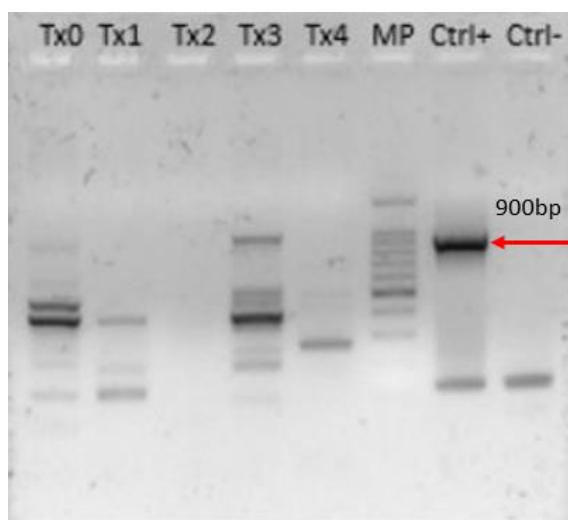


Figura 5. Producto de amplificación a partir del DNA de *P. aureginosa*. Gel de electroforesis en agarosa al 1.8% Tx0: Tratamiento control, Tx1: Tratamiento testigo, Tx2: Quercetina 200 μm , Tx3: α -tocoferol 100 μm , Tx4: quercetina 200 μm + α -tocoferol 100 μm , MP: Marcador de peso molecular 100 bp, Ctrl+: control positivo (900 pb; Flecha roja), Ctrl-: control negativo.

En los productos de amplificación a partir de DNA para identificar *P. aureginosa* (Figura 5) se pueden observar bandas de amplificación en los tratamientos Tx0 control y Tx3 (α -tocoferol 100 μM) considerados como positivos a diferencia de los Tx1 y Tx4 en donde las bandas además de ser muy tenues, no cuentan con el número de pares de bases suficientes indicado por el marcador de peso molecular por lo que estos son considerados negativos. Al igual que en el presente estudio, Islam *et al.* (2013) reportaron presencia de *P. aureginosa* en semen de borrego, encontrándola en el 12.5% de las muestras de semen evaluadas. Estos son datos importantes, ya que existen muchos factores que influyen directamente sobre

la calidad del semen y la presencia de microorganismos es uno de ellos. Un aspecto muy importante que debe ser tomado en cuenta es que la presencia de fructuosa en los diluyentes y la temperatura previa a la congelación durante el procedimiento de dilución son factores ideales para el crecimiento bacteriano (Rehman *et al.*, 2013) teniendo esto en cuenta y considerando que la presencia de *P. aureginosa* está asociada al daño en la integridad de la membrana y una reducción significativa en la motilidad espermática según lo expresado por Spilker (2004), se podría inferir que en este estudio la calidad del semen no fue afectada por esta bacteria.

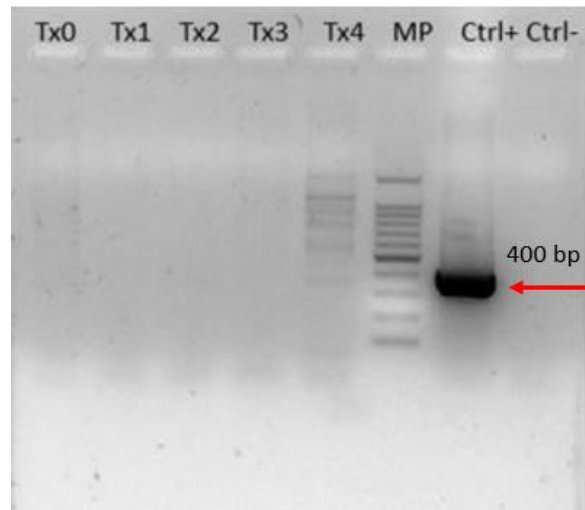


Figura 6. Producto de amplificación a partir del DNA de *A. seminis*. Gel de electroforesis en agarosa al 1.8% Tx0: Tratamiento control, Tx1: Tratamiento testigo, Tx2: Quercetina 200 μm , Tx3: α -tocoferol 100 μm , Tx4: quercetina 200 μm + α -tocoferol 100 μm MP: Marcador de peso molecular 100 pb Ctrl+: control positivo (400 pb; Flecha roja), Ctrl-: control negativo.

En los resultados de *A. seminis* en la Figura 6 se puede observar que no hubo amplificación en los Tx0 (Control), Tx1 (Testigo), Tx2 (Quercetina 200 μm) y Tx3 (α -tocoferol + quercetina 200 μm), considerándose únicamente el Tx4 (Quercetina 200 μm + α -tocoferol 100 μm) como positivo. Según Savvulidi *et al.* (2018), *A. seminis* es una de las bacterias que se reportan se identifican con regularidad en semen de borrego. Asimismo, Saunders *et al.* (2007) también identificaron esta bacteria en semen de borrego utilizando una prueba de PCR múltiple. En este sentido, existe una gran variedad de microorganismos asociados con la epididimitis ovina, entre los cuales se incluye *A. seminis*. Usualmente se utilizan métodos como cultivos bacterianos para su detección, sin embargo, para el diagnóstico de *A. seminis* estas técnicas suelen ser poco efectivas, ya que dicha bacteria tiende a crecer más lento en comparación a distintos coliformes, lo que retarda el proceso para una identificación rápida (Saunders *et al.*, 2007). Por lo anterior, la implementación de PCR no solo agiliza el proceso de identificación, si no

que agiliza de igual manera el poder implementar una inseminación artificial de manera segura. En relación a porque solo en el TX4 se identificó *A. seminis*, debe considerarse que según lo descrito por Morrel (2016), siempre se corre el riesgo de sufrir contaminación durante la toma de muestras, el manejo previo a la congelación o inclusive después de la misma, durante la manipulación de las muestras, por lo que puede dar una idea un poco más concreta sobre el porqué un tratamiento diferente al control resultó positivo. A continuación, en la Figura 7 se puede observar que no hubo amplificación del DNA de *C. pseudotuberculosis* en los tratamientos Tx0 (Control), Tx1 (Testigo), Tx3 (α - tocoferol 100 μm) y Tx4 (Quercetina 200 μm + α -tocoferol 100 μm), considerándose el Tx2 (Quercetina 200 μm) el único positivo

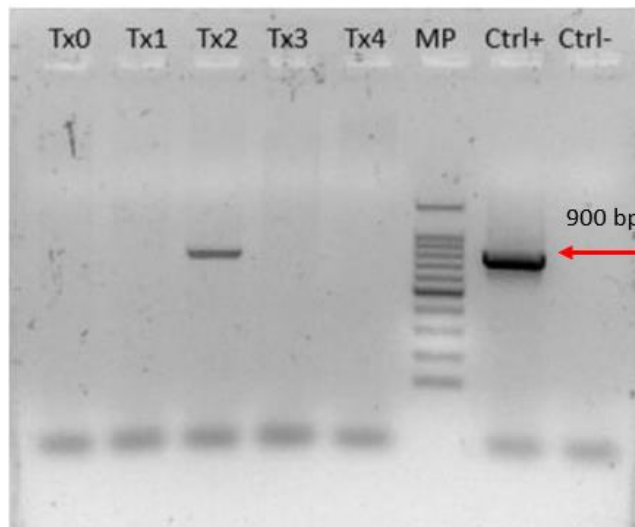


Figura 7. Producto de amplificación a partir del DNA de *C. pseudotuberculosis*. Gel de electroforesis en agarosa al 1.8% Tx0: Tratamiento control, Tx1: Tratamiento testigo, Tx2: Quercetina 200 μm (900 bp), Tx3: α -tocoferol 100 μm , Tx4: quercetina 200 μm + α -tocoferol 100 μm , MP: Marcador de peso molecular 500 bp , Ctrl+: control positivo (900 pb; Flecha roja), Ctrl-: control negativo.

En un estudio realizado por Valero *et al.* (2017) reportaron que utilizando técnicas de microbiología general identificaron *Corynebacterium renale* en el 81.8% de los sementales muestreados, pero sin reportar presencia de *C. pseudotuberculosis*, similar a lo reportado por Saunders *et al.* (2017) quienes tampoco lograron identificar *C. pseudotuberculosis* en semen de borrego. *C. pseudotuberculosis* es una bacteria de gran importancia no solo por las enfermedades que puede causar en los ovinos, si no por el riesgo que existe en los humanos de contagiarse; sin embargo, dicho agente es en ocasiones subestimado debido al desconocimiento de sus consecuencias. Usualmente el diagnóstico está basado en signos clínicos, sin embargo, se considera que lo ideal es identificar la presencia de esta bacteria antes de que provoque una infección, por lo que la implementación de la técnica de PCR ayuda no solo a detectar específicamente la bacteria, si no a evitar la propagación de la misma (Centikaya *et al.*, 2014).

Cuadro 11. Resultados de las pruebas de PCR para diagnóstico molecular de *E. coli*, *P. aureoginosa*, *A. seminis*, y *C. pseudotuberculosis* en semen criopreservado de ovino adicionado con 200 µm de quercetina, 100 µm de α-tocoferol y la combinación de ambos.

Bacterias	Tratamientos				
	Control	Testigo	Quercetina 200 µm	α-tocoferol 100 µm	Quercetina + α-tocoferol
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+
<i>P. aureoginosa</i>	+			+	
<i>A. seminis</i>					+
<i>C. pseudotuberculosis</i>			+		

+ indica la presencia de la bacteria en el tratamiento.

En los resultados presentados en el Cuadro 11 se observa la presencia de diferentes bacterias en los diferentes tratamientos realizados, con sus excepciones dependiendo de la bacteria a tratar y el tratamiento en específico; sin embargo, es de gran importancia tomar en cuenta que en los casos donde la bacteria estuvo presente en tratamientos adicionados con quercetina, pero no en el tratamiento en el cual no se adicionó ningún tipo de antibiótico (tratamiento control) se debe tomar en cuenta que este resultado puede deberse a un manejo inapropiado de la muestra como una homogenización deficiente de esta, o también se debe considerar que mediante los ensayos de PCR no se puede distinguir entre DNA de células vivas o muertas, ya que se utilizó el material genético de la muestra completa de semen, por lo que la presencia de estas bacterias no significa que se pueda detonar una infección, y al contrario, que el tratamiento si fue efectivo para combatir la infección. Distintos patógenos tales como *C. pseudotuberculosis*, *E. coli*, y *A. seminis* pueden ser responsables de epididimitis ovina, sin embargo, también algunos de estos patógenos son componentes de la microbiota normal de la mucosa prepucial (Moustacas *et al.*, 2007).

No obstante, es importante considerar que algunos métodos de laboratorio utilizados para la identificación bacteriana pueden durar periodos muy largos de tiempo (Pérez, 2013) y ser muy laboriosos, al contrario de la utilización de la herramienta de PCR, ya que se lleva a cabo en un menor tiempo, lo que da la oportunidad de identificar bacterias y actuar más rápido ante una infección, o en el

caso del semen utilizado para inseminación artificial, evitar la diseminación de enfermedades que puede darse a través del transporte de las muestras de semen. Pese a lo anterior, en la búsqueda bibliográfica se encontraron muy pocos estudios que hayan identificado la población bacteriana en semen de ovinos utilizando técnicas moleculares como PCR, cuando por ejemplo en semen humano (Lacroix, 1996) y semen bovino (Eaglesome *et al.*, 1995) existen estudios que han explorado con la técnica de PCR la contaminación bacteriana desde hace varios años.

Finalmente, es de importancia mencionar que la capacidad fertilizante de cualquier muestra de semen se puede ver afectada por el número de bacterias presentes (Guedea *et al.*, 2019), esto haciendo alusión a que en cantidades adecuadas las bacterias comúnmente encontradas en el tracto genitourinario del borrego puede dar origen a distintas infecciones, tal es el caso de la bacteria *E. coli*, la cual reduce la fertilidad mediante la aglutinación del espermatozoide, además de causar alteraciones morfológicas y así disminuir la viabilidad y motilidad de los espermatozoides (Yaniz *et al.*, 2010).

En el Cuadro 12 se encuentran los resultados obtenidos de la evaluación del semen post-descongelado, después de haber sido adicionado con los distintos tratamientos, en donde no se encontró una diferencia significativa estadísticamente entre los tratamientos ($P > 0.05$). Sin embargo, numéricamente se puede apreciar una motilidad progresiva ligeramente más alta de los espermatozoides en los tratamientos Tx0 (testigo) y Tx1 (antibiótico convencional). Esto se considera puede ser debido a la variedad de géneros bacterianos que se encontraron en todos los tratamientos, lo que indica que aunque la quercetina y el α -tocoferol funcionan para la inhibición de algunas bacterias (como se observa en el Cuadro 11), pueden no tener el mismo efecto en otras; esto debido a que no todas las bacterias están compuestas de la misma manera, y de igual manera no todos los antibióticos funcionan bajo los mismos mecanismos (Arias *et al.*, 2003) por lo que no pueden ser tratadas de la misma manera.

Respecto a la disminución de motilidad progresiva en el resto de los tratamientos, puede estar asociada a la presencia de las bacterias, ya que pueden provocar reacciones prematuras del acrosoma, así como aglutinación espermática, lo que deriva en la disminución de la motilidad y viabilidad del semen (Morrel, 2016), además que los distintos mecanismos de acción de las bacterias sobre el espermatozoide inducen una reacción inflamatoria y discapacidad funcional de las membranas (Eley, 2005). Asimismo, la presencia de bacterias incita la producción de macrófagos y granulocitos como línea de defensa del organismo, lo que promueve la producción estrés oxidativo, afectando la vitalidad de los espermatozoides (Gloria *et al.*, 2014).

Cuadro 12. Efecto de la adición de quercetina y α -tocoferol sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media \pm desviación estándar).

Tratamiento	Motilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad Rápida
Control (Tx 0)	71.55 \pm 5.88 ^a	67.67 \pm 6.33 ^a	24.45 \pm 9.10 ^a
Testigo (Tx 1)	71.23 \pm 5.44 ^a	67.52 \pm 5.95 ^a	36.49 \pm 6.19 ^a
Quercetina 200 μ M (Tx 2)	66.26 \pm 4.80 ^a	62.70 \pm 5.06 ^a	25.16 \pm 3.51 ^a
α -Tocoferol 100 μ M (Tx 3)	67.44 \pm 5.81 ^a	63.63 \pm 29.06 ^a	31.30 \pm 4.71 ^a
Quercetina + α -Tocoferol (Tx 4)	49.88 \pm 5.63 ^a	44.54 \pm 5.92 ^a	15.50 \pm 3.17 ^a

Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

Por otra parte, aunque el objetivo primordial de los antibióticos es la eliminación de bacterias, se debe tomar en cuenta que también las células espermáticas se ven afectadas por estos, tal es el caso de la gentamicina, antibiótico comúnmente utilizado para la conservación del semen el cual se ha demostrado que tiene efectos adversos en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Morrel, 2014). Esto último podría explicar una parte del decremento de motilidad que se observó en el tratamiento donde se adicionaron de manera conjunta la quercetina y el α -tocoferol, que, aunque no fue estadísticamente significativo, pudiera haber sido debido no solo a las bacterias, sino también al uso de sustancias externas en el semen. Por lo anterior, es necesario seguir realizando estudios que permitan dilucidar si diferentes concentraciones de quercetina y α -tocoferol de forma individual o conjunta pueden contribuir al control bacteriano, sin afectar o incluso incrementar las características espermáticas de semen criopreservado de distintas especies.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que la adición de quercetina (200 μM) y α -tocoferol (100 μM) en concentraciones adecuadas redujo las unidades formadoras de colonias en comparación a los otros tratamientos, lo que indica una inhibición de la proliferación de distintas bacterias, entre las que destacan *Actinobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., (identificadas mediante pruebas bioquímicas) y *P. aureginosa* (esta última identificada tanto por pruebas bioquímicas y PCR) durante el proceso de criopreservación del semen de ovino sin alterar negativamente características espermáticas como la motilidad y viabilidad de los espermatozoides. Sin embargo, es necesario seguir realizando estudios que permitan dilucidar si diferentes concentraciones y combinaciones de flavonoides pueden contribuir al control bacteriano, sin afectar o incluso incrementar las características espermáticas de semen criopreservado en distintas especies.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abd, D., A. Kader, F. Alsaedi, M. Bahir, M. Muhanad, T. Jehad. 2013. Antibacterial effects of vitamin E: *in vitro* study. J. Biotechnol. 7:10-19.
2. Abreham S., Teklu A., Cox E., Tessema T. 2019. Escherichia coli O157:H7: distribution, molecular characterization, antimicrobial resistance patterns and source of contamination of sheep and goat carcasses at an export abattoir, Mojo, Ethiopia. BMC Microbiology. 19: 215.
3. Agarwal A., D. Duraurajanayagam, J. Halabi, J. Peng, L. M. Vazquez. 2014. Proteomics, oxidative stress and male infertility. Reprod. Biomed. Online. 29:32-58.
4. Aguirre F. V., V. R. Reyes, O. T. Agustin. 2005. Entrenamiento de carneros para recolección de semen mediante vagina artificial, utilizando como estímulo objetos inanimados. Vet. Mex. 36:105-111.
5. Al-Mutary M., Al-Ghadi M., Al-Hiadi., Iwamoto D., Al-nazai T., Ammari A., Ahmad. J., Al-Khedhairi A. 2018. Using RT-PCR and glutathione level to study the effect of follicular fluid on *in vitro* maturation and gene expression of sheep oocytes. J. Biol. Sci.1-7.
6. Andrabi S. M. H., L. A. Khan, M. Shahab. 2016. Isolation of bacteria in semen and evaluation of antibiotics in extender for cryopreservation of buffalo (*Bobalus bubalis*) bull spermatozoa. Andrologia. 48:1166-1174.
7. Andrade J. C., M. F. B. Morais-Braga, G. M. M. Guedes, S. R. Tintino, M. A. Freitas, I. R. A. Menezes, H. D. M. Coutinho. 2014. Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivatives. Biomed. Pharmacother. 68:1065-1069.
8. Añorga G. M. 2011. Evaluación del efecto de las condiciones ambientales en la transposición de elementos móviles en la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae*. Tesis de Carrera. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra. Navarra, España.
9. Arias C. A., D. Panesso, M. Zuñiga. 2003. Guías para el uso racional de antibióticos B-lactámicos: mecanismo de resistencia y su interpretación clínica. Biomédica. 23:134-140
10. Ávila-Portillo L. M., J. I. Madero, C. López, M. F. León, L. Acosta, C. Gómez, L. G. Delgado, C. Gómez, J. M. Lozano, M. T. Reguero. 2006. Fundamentos de Criopreservación. Rev. Colomb. Obstet. Ginecol. 29:291-300.
11. Aziz N., S. Farang, L. Mousa, M. Abo-Zaid. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. Microbios. 374:43-54
12. Barbas, J. P., R. D. Mascarenhas. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. Cell Tissue Bank. 10:49-62.

13. Belenky P., J. D. Ye, B. M. Porter, E. G. Schwarz, C. Walker, J. J. Collins. 2015. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell. Rep.* 13: 968-980.
14. Benhenia K., A. S. Lamara Fatmi, M. Iguer- Ouada. 2016. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Rumin. Res.* 141: 29-35.
15. Berkovich L., Earon G., Ron I., Rimmon A., Vexler A., Lev-Ari. S., 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.
16. Brenner, D. J., N. R. Krieg, J. T. Staley. 2004. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* second edition. Vol. two, part b. USA: Springer; Verlag, USA.
17. Bukar, A., A. Uba, T. I. Oyeyi. 2010. Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* lam. extracts against some food – borne microorganisms. *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 3: 43-48.
18. Busselau. E., Yeste. M., Sepulveda.L., Torner. E., Pinart. E., Bonet. S. 2011. Effects of different concentrations of enterotoxigenic and verotoxigenic *E.coli* on boar sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.* 127: 176-182.
19. Cabrera C. E., R. F. Gomez, A. E. Zuniga. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes, una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb. Med.* 38: 149-158.
20. Calderon Q. M., C. N. Chacon. 2016. Tinción Gram y pruebas de identificación bioquímica de microorganismos. *Biotec. Industr.* 2:3-6.
21. Carmona G. D., G. Kroemer, F. Madeo. 2012. When death was Young: an ancestral apoptotic network in bacteria. *Mol. Cell.* 46:552-554.
22. Carrada L., S. Castañón. 2017. Quercetina atenúa la virulencia de *Staphylococcus aureus* al disminuir la secreción de alfa toxina. *Rev. Argen. Microbiol.* 50:131-135.
23. Centinkaya B., Karahan M., Atil E., Kalin R., De Baere T., Vanechoutte M. 2002. Identification of *Corynebacterium psudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR. *Vet. Microbiol.* 88: 75-83.
24. Cho C., A. Agarwal. 2017. Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: a systematic review. *Arab. J. Urol.* 16:21-34.
25. Clara L. O., M. A. Biglia. 1999. Farmacocinética de la travoflaxina: su significado clínico. *Medicina (B. Aires).* 59:17-99.
26. Contri, A., C. Valorz, M. Faustini, B. Wegher, A. Carluccio. 2010. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology.* 74:424–435.

27. Córdova-Izquierdo, A., O. J. Saltijeral, R. M. Muñoz, J. S. Córdova, J. A. Córdova, J. E. Guerra. 2006. Efecto del método de obtención de semen de ovino sobre la calidad espermática. *Rev. Electr. Vet.* 8: 8-11.
28. David, I., G. L. Kohnked, O. Praudf, F. Plouarbouef, P. Degondg, X. Druartda. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 161:75–81.
29. Dias da Costa J. S., S. J. Oliviera, C. L. Almeida, P. M. Araujo, S.N. Santos, C. M. Ferro. 2018. Antibacterial and antibiofilm activities of qercetin against clinical isolates of *Stapylococcus aureus* and *Staphylococcs saprophyticus* with resistance profile. *Agricult. Biotechnol.* 3:1948-1958.
30. Diemer T., W. Weidner, H. W. Michelmann, H. G., Schiefer, E. Rován, F. Mayer. 1996. Influence of *Escherichia coli* on motility parameters of human spermatozoa *in vitro*. *Int. J. Androl.* 19:271-277.
31. Dorado, J., I. Rodríguez, M. Hidalgo. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology.* 68:168–177.
32. Dwyer D. J., M. A. Kohanski, J. J. Collins. 2009. Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:482-489.
33. Eaglesome M. D., M. I. Sampath, M. M. Garcia. 1995. A detection assay for *Campylobacter fetus* in bovine semen by restriction analysis of PCR amplified DNA. *Vet. Res. Commun.* 19: 253-263.
34. Espinosa A. L. 2007. Las Herramientas moleculares. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (ed) *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, México.
35. Falchi L., Galleri G., Zedda M.T., Pau S, Bogliolo L., Ariu F., Ledda S. 2018. Liquid storage of ram semen for 96h: Effects in kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livest. Sci.* 207: 1-6.
36. FAO (Food and Agriculture Organization). 2010 FAOSTAT. Agriculture database.
37. Fariñas M.C., L. Martínez- Martínez. 2013. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multiresistentes enterobacterias, *Pseudomonas aureginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos grammnegativos no fermentadores. *Formación médica continuada: Infección nosocomial.* *Enferm. Infecc. Microbiol.* 31:402-409.
38. Fernández O.A., C. García de la Fuente, N. J. Saenz, R. S. Valdezate. 2010. Procedimeintos en *Microbiología Clínica. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.* *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2-28.

39. Flores J. A., A. Fernandez, H. Huaman, L. Ruiz, A. Santiani. 2010. Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. *Rev. Inv. Vet. Peru.* 21:26-34.
40. Flores V. T., K.A. Vargas. 2014. Morfología bacteriana. *Rev. Actual. Clínica.* 49:2594-25898.
41. García L. C., R. A. Martínez, J. Ortega, F. Castro. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Quím. Viva.* 9: 86-96.
42. Georgantelis D., I. Abrosiadis, P. Katikou, G. Blekas, S. Georgakis. 2007. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *J. Meat Sci.* 76:172-181.
43. Getino M. 2016. Control de la conjugación bacteriana. Tesis de grado. Universidad de Cantabria. Cantabria, España.
44. Gloria, A., A. Contri, L. Wegher, G. Vignola, D. Dellamaria, A. Carluccio. 2014. The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen-thawed bull semen. *Anim. Reprod. Sci.* 150:15-23.
45. Gobernado M., J. L. López-Hontangas. 2003. Identificación bacteriana. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21:54-60.
46. Guedea B. J. J. 2019. Efecto del extracto de *Moringa oleifera* sobre la calidad y capacidad de fecundación in vitro del semen criopreservado de ovino. Tesis de Maestría. Departamento de Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Heroica Ciudad Juárez, Chih. México.
47. Hafez E. S. E. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª Ed. Nueva Editorial Interamericana. México.
48. Hernández M. H., R. L. Delgado, P. R. López, S. G. Martínez, A. Mallok. 2010. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Endocrinol. Nutr.* 18:153-158.
49. Hernández V.M., F.J. Bueso, C. A. Fernández. 2017. Evaluación de la contaminación bacteriana del semen de moruecos recogido mediante vagina artificial. *Rev. Elect. Vet.* 18:1-9.
50. Hirai I., M. Okuno, R. Katsuma, N. Arita, M. Tachibana, Y. Yamamoto. 2010. Characterization of anti-*staphylococcus aureus* activity of quercetin. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45:1250-1254.
51. Hu J. H., W. Q. Tian, X. L. Zhao, L. S. Zan, H. Wang, Q. W. Li. 2010. The cryoprotective effects of ascorbic acid suplementacion on bovine semen quality. *Anim. Rep. Sci.* 121: 72-77.
52. INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2017. Calendario GPS y Coordenadas RGNA ITRF08. Marzo 2017, de INEGI Sitio web: http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geodesia/doc/cale2017_itrf2008.pdf

53. Islam R., S. A. Hussain, M. Z. Khan. 2005. Occurrence of some zoonotic pathogens in semen of ram. *J. Vet. Public Health*. 3: 141-144.
54. Jaisinghani, R. 2017. Antibacterial properties of quercetin. *Microbiol. Res*. 8:6877.
55. Kohanski M. A., J. D. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, J. J. Collins. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 130:797-810.
56. Kuile B. H., M. Hoeksema. 2017. Antibiotic killing through incomplete DNA repair. *Trends Microbiol*. 26: 2-4.
57. Lacroix M., Jarvi K., Batra S., Heritz D., Mittleman M. 1996. PCR- based technique for the detection of bacteria on semen and urine. *J. Microbiol. Methods*. 26: 61-71.
58. López J. L., D. M. Hernández, C. C. Colin, P. Ortega, C. G. Gonzalez, C. R. Franco. 2014. Las técnicas básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*. 3:10-18.
59. MacFaddin J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3era ed. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
60. Mayorga T., M. W. Cardona, A. Cadavid, M. Camargo. 2012. Evaluación de los parámetros funcionales espermáticos en individuos infértiles normozoospermicos. *Actas Urol. Esp*. 37:221-227.
61. Mazurova J., Kukla R., Rozkot M., Lustykova A., Slehova E., Sleha R., Lpensky J., Opleta L. 2015. Use of natural substances for boar semen decontamination. *Vet. Med*. 60: 235-247.
62. Mbai K., S. J. Munya, P. K. Gathumbi, S. Mbiuki. 1995. *Actinobacillus seminis* as a cause of ram infertility in Kenya. *Small Rum. Res*. 21:227-231.
63. McDonald L.E. 1978. Reproducción y Endocrinología Veterinarias. 2da Ed. Nueva Editorial Interamericana. México.
64. McNiven M., G. F. Richardson. 2006. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preserv. Tech*. 4: 169-177.
65. Méndez-Alvarez S., E. Perez-Roth. 2004. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enferm Infec. Microbiol. Clin*. 22:183-192.
66. Morrel J.M. 2016. Antimicrobials in Boar Semen Extenders – A Risk/Benefit Analysis. *J. Antimicro*. 2:107.
67. Morrell. J. M., M. Wallgren. 2014. Alternatives to antibiotics in semen extender: a review. *J. Pathog*. 3:934-946.
68. Moustacas V., Xavier M., Carhalho-junior C., Costa E., Henry R., Santos. 2010. Effect of extender supplementation with various antimicrobial agents on viability of *Brucella ovis* and *Actinobacillus seminis* in cryopreserved ovine semen. *Theriogenology*. 74: 1476-1481.

69. Moustafa A. E., A. A. Mohammed, A.N. Essam. 2014. Oxidative stress and acrosomal morphology: a cause of infertility in patients with normal semen parameters. Middle East Fertil. Soc. J. 20:79-85.
70. Naguib M.M., M.A. Valvano. 2018. Vitamin E increases antimicrobial sensitivity by inhibiting bacterial lipocalin antibiotic binding. mSphere 3:e00564-18.
71. Nasiri A. H., A. Towhid, S. Zeinoaldini. 2012. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. Andrologia. 44:550-55
72. Nass- Arden L., Breitbart H. 1990. Modulation of mammalian sperm motility by Quercetin. Mol. Reprod. Dev.25: 369- 373.
73. Oliviera L., Hulland C., Ruegg. 2013. Comparison of selected methods for identification of staphylococci and streptococci isolated from bovine milk samples. AGRIS. 45: 240-241.
74. Ortega C., L. González, A. Muriel, B. Macías, H. Rodríguez, J. A. Tapia, J. M. Alonso, F. J. Peña. 2009. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? Reprod. Dom. Anim. 44:518-522.
75. Otter A. 2018. Bacterial isolates from the semen of rams with suspected infertility. Vet. Record. 162: 623-624.
76. Pace K. E., L. G. Baum. 2003. Recognition of carbohydrates in biological systems, part B: specific applications. Methods enzymol. 363:499-518.
77. Palavecino M. 2014. Toxicidad antibacterianos:farmacocinética-farmacodinamia:prevención y manejo. Rev. Méd. Clín. Las Condes. 25:445-456.
78. Paparella C. V., A. B. Pavesi, R. N. Feldam, B. R. Bouvet. 2015. Importancia de la evaluación del estrés oxidativo en el semen humano. Ach. Med. Int. 1:1-12.
79. Parraguez, V.H., O. Blank, C. Muñoz, E. Latorre. 2000. Inseminación artificial en ovinos. Monografías Med. Vet. 20: diciembre 2000.
80. Patel A., J. Y. Leong, R. Ramasamy. 2017. Prediction of male infertility by the world health organization laboratory manual for assessment of semen analysis: a systematic review. Arab. J. Urol. 16:96-102.
81. Prospero C., A. C. Pantoja. 2008. Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 mL. Rev. Investig. Vet. 2:152-159.
82. Puig P. Y., H. M. Espino, C. V. Leyva. 2011. Resistencia antimicrobiana de salmonella y *E.coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. Panorama Cuba y Salud 6:30-38.

83. Rehman.F., Zhao.C., Shah. M., Quereshi.M., Wang. X.2013. Semen extender and artificial insemination in ruminants. Veterinaria. 1:1:8.
84. Restrepo B. G., M. L. Rodriguez, C. J. Duque. 2016. Proliferación microbiana y calidad post-descongelación de semen equino criopreservado en presencia de antibióticos. Rev. Int. Vet. 27:316-325.
85. Rodríguez P. B., P. F. Santana, A. E. Dominguez, G. B. Nuerquez, R. H. Reyes. 2016. Leucocitos seminales y calidad espermática de hombres en estudio de infertilidad. Rev. Cubana Endocrinol. 27:18-28.
86. Saleh R A., A. Agarwal, E. Kandirali, R. K. Sharma, A. J. Thomas, E. A. Nada, D. P. Evenson, J. G. Alvarez. 2002. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertil. Steril. 78:1215-1224.
87. Satorre M. M., E. Bereinger, M.T. Beconi. 2013. Cryopreservation with α -tocopherol and sephadex filtration improved the quality of boar sperm. Theriogenology. 78 1548-1556.
88. Saunders V. F., L. A. Reddacliff, T. Berg, M. Hronitzky. 2007. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. Prod. Anim. 85:72-77.
89. Savvulidi F., M. Ptáček, L. Stádník. 2018. Pathogens in processed ram semen and approaches for their elimination. Acta Univ. Agric. et Silv. Mendelianae Brun. 66:1065-102.
90. Schulze M., M. Dathe, D. Waberski, K. Müller. 2016. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. Theriogenology. 85:39-46.
91. Seifi-Jamadi, A, E. Ahmad, M. Ansari, H. Kohram, Effect of addition of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezability of Mahabadi goat semen. 2017. Cryobiology. 75:15-20.
92. Shin S. J., D. H. Lein, V. H. Pattern, H. L. Ruhnke. 1988. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus* ssp. venerealis and *Haemophilus somnus* in frozen bovine semen. Theriogenology. 29:577-591.
93. Shu Y., Y. Liu, J. Feng, B. Lou, X. Zhou, H. Wu. 2011. Antibacterial activity of quercetin on oral infectious pathogens. African J. Microbiol. Res. 5:5358-536.
94. Silveira P. E., P. R. Machado. 2005. Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación. Rev. Elect. Vet. 10:1-8.
95. Tamay de Dios. L., C. Ibarra, C. Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Invest. Discapacidad. 2:70-78.

96. Tintino S., C. Morais-Tintino, F. Campina, R. Pereira, M. Costa, M. Braga, P. Limaverde, J. Andrade, J. Siquiera-Junior, H. Coutinho, V. Balbino, L. Quintans-Junior. 2016. Action of colecalciferol and Alpha-tocopherol on *Staphylococcus aureus* efflux pumps. *J. Exp.Clin.Sci.* 15:315-322.
97. Vagnarelli P. 2013. Chromatin reorganization through mitosis. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 90:179-224.
98. Valero H. M., J. P. F. Bueso, A. C. Fernández. 2017. Bacterial contamination assessment from ram semen obtained by artificial vagina. *Rev. Elect. Vet.* 18: 1-9.
99. Vallespi. G. V., D. A. Pipet, S. A. Matton, H. A. Lopardo. 2005. Endocarditis fatal con localización mitral producida por *Erypelothrix rhusipathiae*. *Rev. Arg. Microbiol.* 37:78-80.
100. Van Acker H., T. Coenye. 2016. The role of reactive oxygen species in antibiotic-mediated killing of bacteria. *Trends Microbiol.* 25:465-466.
101. Vieira F. G. H., J. A. Mourão, A. M. Angelo, A. R. Costa, R. H. Silva. 2010. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata muricata* against gram positive and gram-negative bacteria. *Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 52:129-132.
102. Wagner H., J. W. Cheng, E. Y. Ko. 2017. Role of reactive oxygen species in male infertility: an update review of literature. *Arab. J. Urol.* 16:35-43.
103. Wang S. 2007. A comparative study of Fenton and Fenton-like reaction kinetics in decolourisation of wastewater. *Dyes Pigm.* 76:714-720.
104. Yang J., S. C. Bening, J. J. Collins. 2017. Antibiotic efficacy- context matters. *Curr. Opin. Microbiol.* 39:73-80.
105. Yaniz J., Marco-Aguado M., Mateos J, Santolaria P. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 122: 142-149.