



# **Universidad Autónoma de Ciudad Juárez**

Instituto de Ciencias Biomédicas  
Departamento de Ciencias Veterinarias  
Programa de Maestría en Ciencia Animal

## **“Efecto del extracto de *Moringa oleifera* sobre la calidad y capacidad de fecundación *in vitro* del semen criopreservado de ovino”**

Tesis para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia Animal

M.V.Z. José Julián Guedea Betancourt

“Becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”

**Bajo la Dirección de**  
**Dr. en C. José María Carrera Chávez**  
**Y la Codirección de**  
**Dr. Andrés Quezada Casasola**

Cd. Juárez, Chihuahua, México. Mayo de 2019

## **APROBACIÓN DE LA TESIS**

Efecto del extracto de *Moringa oleifera* sobre la calidad y capacidad de fecundación *in vitro* del semen criopreservado de ovino reporte de investigación preparado por José Julián Guedea Betancourt 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**

---

**Dr. Andrés Quezada Casasola**  
**CO-DIRECTOR DE TESIS**

---

**Dr. José Alberto Núñez Gastélum**  
**ASESOR**

---

**Dra. Angélica María Escárcega**  
**ASESOR**

---

**PhD. Ernesto Orozco Lucero**  
**ASESOR**

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**

### **Efecto del extracto de *Moringa oleifera* sobre la calidad y capacidad de fecundación in vitro del 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 MAESTRIA EN CIENCIA ANIMAL**

---

**Dr. Ramón Rivera Barreno**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VETERINARIAS**

---

**C.D. Salvador Nava Martínez**

**DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme fuerza para continuar en este proceso, así como la oportunidad de haberme permitido llegar hasta este punto y brindarme salud para lograr mis objetivos.

A mis padres Raquel y Julián porque gracias a ustedes Dios me dio la oportunidad de vivir y poder ser alguien en la vida, por su trabajo, sacrificio, educación y valores que me dieron en todos estos años, por sus consejos, apoyo, comprensión y sobre todo paciencia hacia mí y la ayuda que me han brindado para que yo culminara mi maestría. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser su hijo, son los mejores padres.

A mi hermana Erika así como a su esposo Emanuel por todo el apoyo y a mi querida sobrina Elisa.

A todas las personas que de una u otra manera me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos durante toda la maestría.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez y al programa de la maestría en Ciencia animal gracias por permitirme pertenecer a esta gran institución. Así mismo al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) por el apoyo económico.

Al Dr. José María Carrera Chávez por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de tesis, por toda su ayuda y apoyo durante todo el trabajo de investigación, así como por sus consejos, paciencia muchas gracias.

A mis asesores, los Doctores, Andrés Quezada Casasola, Ernesto Lucero Orozco, Angélica Escárcega Ávila y a los doctores que desafortunadamente ya no están con nosotros, Eduardo Pérez Eguía y Héctor Janacua Vidales por todo su apoyo y disposición durante este proyecto y brindarme parte de su tiempo y paciencia para la revisión de la misma.

También a mi asesor al Dr. José Núñez Gastélum por todo su apoyo y disposición durante este proyecto y brindarme parte de su tiempo y paciencia para la revisión de la misma, así como a los compañeros la Lic. Yesica Czajkowska a la Dra. Claudia Vargas y al M. C, Gaspar Torres por toda su ayuda y apoyo que me brindaron muchas gracias.

A todos mis compañeros y amigos Theisy Acosta, Mónica Bojórquez, Edson Jiménez, Cinthia Irigoyen, Oscar González, Laura Muñoz y Bianca Orozco que estuvieron en todo momento y me ayudaron en el trabajo de investigación muchas gracias. También a mis compañeros y amigos de la maestría que me apoyaron en todo momento gracias.

Asimismo al Rastro Municipal de Ciudad Juárez que nos proporcionó ovarios para poder realizar este trabajo de investigación en especial a los MVZ. Corella y Andujo, por su apoyo en todo momento.

## RESUMEN

### Efecto del extracto de *Moringa oleifera* sobre la calidad y capacidad de fecundación *in vitro* del semen criopreservado de ovino

Por:

José Julián Guedea Betancourt

Maestro en Ciencia Animal

Departamento de Ciencias Veterinarias

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

Director de tesis: Dr. José María Carrera Chávez

Evaluar el efecto de la adición de extracto de semilla de *Moringa oleifera* sobre la actividad antimicrobiana, la capacidad antioxidante, y de fecundación *in vitro* en el semen criopreservado de ovino. Se utilizaron cinco tratamientos: control (antibiótico convencional); testigo (sin antibiótico); y tres tratamientos con concentraciones de *M. oleifera* de: 1.0, 10.0 y 50.0 mg/mL. Se evaluaron las características espermáticas post-criopreservación mediante análisis de semen asistido por computadora. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando un método de dilución y la capacidad antioxidante mediante el método FRAP. La técnica de FIV heteróloga se realizó para medir la tasa de fecundación. En la evaluación post-criopreservación, la motilidad progresiva y rápida fue diferente en el tratamiento de 10.0 mg/mL ( $P < 0.05$ ). En viabilidad de membrana, existió una diferencia significativa en los tratamientos de 1.0 y 10.0 mg/mL. En integridad del acrosoma y mitocondrias activas no existieron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.05$ ). Todos los tratamientos de *M. oleifera* mostraron una inhibición microbiana comparada con el tratamiento control. La capacidad antioxidante del extracto de semilla de *M. oleifera* en las concentraciones de 50.0 y 10.0 mg/mL mostró una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). La capacidad de fecundación fue mayor en los tratamientos de 10.0 mg/mL y testigo ( $P < 0.05$ ). La adición de 10.0 mg/mL del extracto de *M. oleifera* puede considerarse como un buen sustituto del antibiótico convencional en el diluyente del semen de ovino, ya que inhibe el desarrollo de microorganismos, y por su capacidad antioxidante coadyuva a preservar las diferentes características espermáticas del semen.

**Palabras clave:** antimicrobiana, antioxidante, crioconservado, heteróloga, *Moringa oleifera*, semen

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN DE LA TESIS .....</b>	<b>i</b>
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL .....</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>iv</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Tecnologías de la reproducción.....	3
2.1.1 Inseminación artificial.....	3
2.1.2 Transferencia de embriones.....	4
2.1.3 Fertilización <i>in vitro</i> .....	5
2.1.4 FIV heteróloga.....	6
2.2. Criopreservación del semen .....	7
2.2.1 Diluyentes en el semen.....	8
2.3. Recolección de semen. ....	10
2.3.1 Métodos de recolección de semen de ovino .....	10
2.4. Evaluación de semen.....	11
2.5 Daño oxidativo y antioxidantes.....	13
2.6 Métodos para determinación de actividad antioxidante .....	16
2.7 Resistencia antimicrobiana en semen.....	17
2.8 Plantas con propiedades antimicrobianas y antioxidantes.....	19
2.9 Generalidades de la <i>Moringa oleifera</i> .....	20
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Objetivo general .....	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
5.1. Localización del lugar de estudio.....	25
5.2. Procesamiento del semen .....	25
5.2.1 Recolección de semen .....	25
5.2.2. Evaluación de las muestras seminales.....	25
5.2.3. Dilución del eyaculado.....	25
5.2.4. Extracto de <i>Moringa oleifera</i> .....	26
5.2.5. Tratamientos.....	26
5.2.6. Criopreservación del semen .....	26

5.2.7. Evaluación del semen post-criopreservación .....	27
5.3. Determinación de la actividad antimicrobiana .....	28
5.4. Análisis de la actividad antioxidante .....	28
5.5. Fertilización <i>in vitro</i> heteróloga .....	29
5.5.1. Colección de los ovocitos.....	29
5.5.2. Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos .....	29
5.5.3. Fertilización <i>in vitro</i> (FIV).....	30
5.5.4 Preparación del semen de ovino.....	30
5.5.5 Cultivo de embriones <i>in vitro</i> (IVC) .....	30
5.6. Análisis estadístico.....	31
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>7. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>48</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página
Tabla 1. Fenoles totales y flavonoides en extracto de semilla de <i>Moringa oleifera</i> .....	26
Tabla 2. Efecto del extracto de la semilla de <i>Moringa oleifera</i> sobre la contaminación bacteriana en el semen criopreservado de ovino.....	32
Tabla 3. Efecto de la capacidad antioxidante del extracto de semilla de <i>M. oleifera</i> en el semen criopreservado de ovino.....	35
Tabla 4. Efecto del extracto de semilla de <i>Moringa oleifera</i> sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino.....	39
Tabla 5. Efecto de la adición del extracto de semilla de <i>Moringa oleifera</i> en el semen criopreservado de ovino sobre la viabilidad de la membrana, viabilidad del acrosoma y la actividad mitocondrial.....	40
Tabla 6. Efecto de la adición del extracto de semilla de <i>Moringa oleifera</i> sobre la capacidad de fecundación del semen criopreservado de ovino mediante la fertilización <i>in vitro</i> heteróloga.....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial y la fertilización *in vitro* son de gran interés, ya que el congelamiento del semen es esencial en los programas de cría y de selección con el fin de aumentar la producción de especies domésticas. La importancia del diluyente en la conservación del semen es suministrar a los espermatozoides una fuente de energía, proteger a las células de daños relacionados con la temperatura y mantener un ambiente adecuado para que los espermatozoides sobrevivan temporalmente (Dorado *et al.*, 2007). Aun con la adición del diluyente, el proceso de congelación y descongelación de los espermatozoides afecta negativamente a la calidad de estos. Específicamente, el congelamiento induce estrés osmótico, alta producción de especies reactivas de oxígeno por sus siglas en inglés (ROS), daño al ADN del espermatozoide, desestabilización de la membrana espermática y disfunción de mitocondrias espermáticas (Vichas *et al.*, 2017). Aunque la generación de ROS cumple una importante función en la fisiología espermática normal, debido a los ROS activan al espermatozoide en la fecundación, un desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide (Membrillo *et al.*, 2011). Otros efectos adversos sobre la calidad de los espermatozoides durante el proceso de congelación resultan en un aumento en el número de células apoptóticas en comparación con el semen fresco. Dentro de los principales factores perjudiciales durante la criopreservación es el del daño oxidativo (Membrillo *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2016).

Otra problemática que afecta la calidad y viabilidad del semen es la contaminación y resistencia bacteriana que tiene efectos nocivos en el espermatozoide. Varios géneros de bacterias han sido identificados en muestras de semen de diversas especies animales. Y ciertas bacterias tienen efectos perjudiciales sobre la calidad del semen almacenado a baja temperatura (Yániz *et al.*, 2010). Lo anterior se debe a que la recolección de semen en animales de granja no es un procedimiento estéril, por lo que cierto grado de contaminación por bacterias no puede evitarse. En los carneros, el semen generalmente es recolectado con una vagina artificial de bordes abiertos que podría estar contaminada con bacterias de la superficie y prepucio del pene, en consecuencia, las bacterias podrían contaminar el semen, comprometiendo su calidad durante el almacenamiento. Para minimizar los efectos adversos de la contaminación bacteriana, se han incluido antibióticos en la composición de los diluyentes de semen de carneros para evitar la proliferación de bacterias (Yániz *et al.*, 2010). Por otra parte los agentes antimicrobianos son de gran importancia para el control del crecimiento bacteriano. Para contrarrestar la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales, se deben desarrollar agentes antimicrobianos que actúen a través de diferentes mecanismos de acción (Schulze *et al.*, 2016). Una opción ante la problemática causada por estrés oxidativo, resistencia y contaminación bacteriana son los compuestos bioactivos de las plantas, algunos de ellos cuentan con actividad antioxidante y

antibacteriana. Los extractos de la planta *Moringa oleifera*, tanto de hojas, semillas y raíces, tienen gran actividad antibacteriana y antioxidante (Viera *et al.*, 2010; Sokunbi *et al.*, 2015). En éste trabajo se propone al extracto de semilla de *M. oleifera* como un sustituto de los antibióticos convencionales en el diluyente del semen; además se postula que puede proteger al espermatozoide del daño oxidativo ocasionado por las ROS.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Tecnologías de la reproducción

A través de los años, los científicos han avanzado en las técnicas de manipulación de la actividad y funciones reproductivas en las diversas especies domésticas, desarrollando tecnologías como la inseminación artificial (IA), la sincronización del celo, la superovulación, la transferencia de embriones (TE) y la fertilización *in vitro* (FIV). Sin embargo, en las décadas más recientes han aparecido nuevas tecnologías como la producción de embriones *in vitro* (PIV), la criopreservación de gametos y cigotos, y la selección del sexo de embriones y espermatozoides. Estas tecnologías han aportado diversas herramientas que permiten manipular la actividad reproductiva con el propósito de propagar con rapidez animales de interés y sus genes. Asimismo, han permitido seleccionar genéticamente dichos animales con el fin de mejorar la calidad sus crías (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2011; Bury, 2014). Algunas de estas tecnologías se mencionan a continuación.

#### 2.1.1 Inseminación artificial

La IA es un método de reproducción asistida en el que se obtiene el semen del macho para introducirlo posteriormente en el aparato reproductor de la hembra de forma manual o por medio de instrumentos especializados. En este sistema no existe contacto directo entre el macho y la hembra (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2006). Existen varios tipos de IA en animales de granja, los cuales tienen gran importancia en la explotación, por su alto porcentaje de efectividad como medio de reproducción. Los métodos difieren en cuanto a su complejidad y expectativas de éxito en ovejas, la IA puede ser vaginal, cervical, transcervical o intrauterina (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2006).

La IA en los rumiantes se ha practicado por más de 50 años, volviéndose rutinaria. Se ha empleado con gran eficacia semen fresco diluido, pero también semen congelado-descongelado. El desarrollo de un método de inseminación intrauterina, con la ayuda de un laparoscopio, ha hecho que el uso de semen congelado en ovejas sea una propuesta viable. La inseminación intrauterina por laparoscopia es probablemente uno de los desarrollos más importantes en la IA de ovejas (Salamón *et al.*, 2000; Hafez *et al.*, 2001). En relación a lo anterior, Menchaca *et al.* (2004) mencionan que la IA permite un uso más eficiente de los machos superiores en programas genéticos lo que puede generar un impacto económico importante que justifica su aplicación en los sistemas de producción comercial.

El principal objetivo de la IA es obtener un método simple, preciso, rápido, masivo y económico para inducir la fecundación en diferentes especies. Muchos factores influyen en la fertilidad después de la IA, por ejemplo: número de espermatozoides; técnica de conservación de semen (congelado, refrigerado, en fresco), técnica de inseminación, tiempo de inseminación, tipo de celo

(natural o inducido/sincronizado), tratamiento hormonal, edad, raza; estación del año, factores de estrés y salud del animal (Papadopoulos *et al.*, 2015).

### **2.1.2 Transferencia de embriones**

Bó *et al.* (2013) señalan que la industria comercial de TE en bovinos evolucionó a principios de los años 70, con la introducción de razas continentales de ganado en Norteamérica. Desde entonces, el uso de la tecnología de TE en la cría de ganado ha seguido aumentando en el mundo. Hoy en día, se producen más de 750,000 embriones se producen anualmente a partir de donadoras superovuladas y más de 450,000 embriones utilizando técnicas *in vitro*.

La TE en bovinos es una tecnología reproductiva que ha tenido gran avance ya que para el año 2015, 127,980 embriones de bovinos (obtenidos *in vivo* e *in vitro*) fueron transferidos esto incluyó 112,387 embriones transferidos en América del Sur, que representan 35% de la actividad mundial. Las hembras receptoras juegan un papel crítico en el éxito de la TE. Sin embargo, el alto costo del mantenimiento de las receptoras y la baja eficiencia de los programas basados para la sincronización del estro en receptoras. Los protocolos hormonales que utilizan la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y prostaglandina F2 $\alpha$  o progesterona y estradiol han sido utilizados con éxito para controlar la dinámica ovárica (crecimiento folicular y formación de cuerpos lúteos) y para sincronizar la ovulación sin la necesidad de detección del celo esto se denomina TE en tiempo fijo (Pietro *et al.*, 2010). La TE en pequeños rumiantes se ha venido desarrollando durante los últimos 35 años. Durante este tiempo los métodos han mejorado considerablemente y una serie de técnicas se han desarrollado para la manipulación y almacenamiento de los embriones (Soberano-Martínez *et al.*, 2011).

Por otra parte la tecnología de TE está siendo utilizada en todo el mundo porque tiene un riesgo relativamente bajo de transmitir enfermedades. Además, uno de los factores más importantes asociados con el éxito y la aplicación generalizada de esta tecnología es la evaluación de los embriones antes de la congelación y/o transferencia a una receptora (Bó *et al.*, 2013).

Herradón *et al.*, (2007) mencionan que la utilización de la FIV para la producción de embriones en rumiantes ha permitido demostrar sus numerosas aplicaciones, entre las que se pueden destacar: 1) un aumento en el rendimiento de los programas de producción de embriones a partir de hembras de elevado valor genético, ya que este procedimiento permite obtener ovocitos en novillas de más de 6 meses de edad y en vacas durante el primer trimestre de gestación y a partir de las 2-3 semanas del periodo posparto; 2) producir embriones a muy bajo costo, lo que permite transferir embriones de razas cárnicas en rumiantes de aptitud láctea no destinadas a la recría o utilizarlos para tratar la infertilidad derivada de problemas de ovulación, fecundación o mortalidad embrionaria precoz; 3) obtener descendientes de hembras de elevada calidad genética que deban ser sacrificadas por padecer enfermedades, infertilidad, por su avanzada edad o durante los

programas de erradicación de enfermedades infecciosas (tuberculosis, brucelosis, leucosis); 4) aprovechamiento de animales con determinadas formas de infertilidad: machos con oligospermias severas o hembras con alteraciones estructurales o funcionales del tracto genital; 5) incrementa la eficacia de los procedimientos de selección mediante la aplicación de técnicas de diagnóstico preimplantacional para identificar variantes alélicas de algunos genes de interés productivo; 6) facilita la utilización de semen sexado (Herradón *et al.*, 2007).

### **2.1.3 Fertilización *in vitro***

Durante la FIV ovocitos maduros son expuestos a espermatozoides capacitados, de tal forma que se produzca la fecundación fuera del oviducto materno. El éxito del procedimiento de la FIV se demuestra al producir individuos vivos, utilizando tanto ovocitos madurados *in vivo* o madurados *in vitro*, aunque la eficiencia de estos procesos es inferior a la fecundación natural (Cabrera *et al.*, 2009).

La FIV, es una herramienta valiosa en el campo de la investigación y ofrece una nueva área de biotecnología práctica en la reproducción animal asistida, como prueba de fertilidad en los animales reproductores y mejor aprovechamiento del potencial biológico que poseen, tanto las hembras como los machos de los animales de granja. La historia de la FIV en mamíferos se remonta al año 1878, cuando se fecundaron *in vitro* ovocitos de coneja, con espermatozoides homólogos. La tecnología moderna de la FIV se inició en el año 1959 cuando se observó a través del microscopio por primera vez este fenómeno en gametos de conejo. Desde entonces, esta biotecnología ha contribuido de manera definitiva al estudio de la reproducción en animales incluyendo seres humanos (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2011). En pequeños rumiantes, la producción de embriones *in vitro* muestra gran variabilidad debido a que los componentes de los medios utilizados son limitados si se comparan con los del fluido uterino o bien por la falta de sustratos adecuados para la síntesis de nuevos compuestos. Los protocolos para la PIV, precisan de la exposición de los ovocitos y embriones a tres diferentes medios durante cada una de las fases, que incluyen la maduración (MIV), fertilización (FIV) y desarrollo *in vitro* de los embriones (DIV) (Soberano-Martínez *et al.*, 2011).

La FIV se puede aplicar en el ámbito de la producción animal, como la preservación de especies en vías de extinción y supone un sistema modelo para el estudio de interacciones celulares y moleculares de la fecundación de los mamíferos. En un principio, se orientó principalmente al estudio de factores involucrados en la fecundación, capacitación espermática, maduración del ovocito, mecanismo íntimo de la interacción entre gametos, así como al estudio de señales que intervienen en procesos de desarrollo y diferenciación del embrión, los cuales, en la actualidad, han tomado gran importancia, tanto en animales como en humanos. Esta técnica se aplica de forma rutinaria en casi todas las especies de mamíferos, para valorar la capacidad fecundante de

los espermatozoides, lo que permite clasificar y seleccionar a los mejores reproductores en función de la calidad de su material germinal (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2011).

Cabrera *et al.* (2009) y Ancco *et al.* (2015) mencionan que la FIV, proporciona una herramienta valiosa que amplía las tecnologías aplicadas disponibles en reproducción animal.

Por otro lado Córdova-Izquierdo *et al.* (2011) encontraron que los elementos que intervienen para el éxito de la FIV son: el espermatozoide, la capacitación espermática, el ovocito, el cultivo *in vitro* de los ovocitos, volumen del medio, tiempo de cultivo y la valoración de los resultados de la FIV. García-Álvarez *et al.* (2009) y Ancco *et al.* (2015) mencionan que, en bovinos, se ha demostrado que el donante del semen influye en gran medida el resultado de fecundación y cultivo de embriones, ya que los espermatozoides demuestran su habilidad para penetrar la zona pelúcida (ZP) y realizar una fecundación y completar su desarrollo.

#### **2.1.4 FIV heteróloga**

En animales, la FIV heteróloga suele ser un método atractivo para evaluar la capacidad fertilizante de espermatozoides frescos o congelados-descongelados (Valente *et al.*, 2009; Taberner *et al.*, 2010).

La FIV heteróloga es un método atractivo para evaluar la capacidad fertilizante del espermatozoide congelado-descongelado en diferentes especies, ya que no requiere el uso de gametos homólogos de gran valor o de complicada obtención. Además, en comparación con la IA, la FIV heteróloga requiere una cantidad mucho menor de espermatozoides. Por lo tanto, la función del espermatozoide puede ser probada completamente mientras se preservan valiosos gametos masculinos (Kouba *et al.*, 2001).

Bastidas *et al.* (1997) indicaron que la FIV homóloga, ha sido utilizada para evaluar el potencial fertilizante de espermatozoides en diferentes especies de mamíferos. Sin embargo, una adecuada provisión de ovocitos constituye un requerimiento básico para el estudio de fertilidad en algunas especies, ya que el examen macro y microscópico del semen (volumen, motilidad, concentración y porcentaje de espermatozoides anormales) como análisis aislado ha tenido un valor limitado en la predicción de la fertilidad (Bastidas *et al.*, 1997). Por consiguiente, el establecimiento de la técnica de FIV heteróloga, utilizando ovocitos de vaca (fuente abundante de ovocitos bovinos provenientes de matadero) y, por ejemplo; semen de búfalo, constituiría una metodología útil para evaluar el potencial fertilizante de semen congelado y fresco de búfalos (Bastidas *et al.*, 1997).

Taberner *et al.* (2010) señalan que se ha utilizado FIV homóloga para predecir la fertilidad en machos utilizando ovocitos con la ZP intacta. Sin embargo, a menudo es difícil obtener ovocitos de la misma especie que el semen donante, especialmente si esta especie es salvaje o está en peligro de extinción.

Kouba *et al.* (2001) y Soler *et al.* (2008) afirman que la FIV heteróloga es un método para evaluar la capacidad fertilizante de los espermatozoides, ya que las muestras en especies silvestres no requiere el uso de gametos homólogos. Estos mismos autores mencionan que las especies

cruzadas en la fertilización de los ovocitos ha sido un éxito, usando espermatozoides criopreservados en ciervos y bovinos no domésticos (Kouba *et al.*, 2001; Soler *et al.*, 2008). Todas las tecnologías mencionadas con anterioridad dependen de semen de calidad óptima.

## **2.2. Criopreservación del semen**

La criopreservación de los espermatozoides de mamíferos es un proceso complejo que implica equilibrar múltiples factores para obtener resultados satisfactorios. Para asegurar el mínimo éxito, no sólo se requiere el diluyente, la dilución de espermatozoides, la velocidad de enfriamiento y la velocidad de descongelación adecuados, sino también un conocimiento intrincado de la fisiología del espermatozoide es esencial para maximizar la recuperación post-descongelación de espermatozoides y por consiguiente la fertilidad (Purdy, 2006).

Hoy en día, la criopreservación y almacenamiento del semen son de gran importancia para conservar el valor genético de los carneros. El desarrollo de tecnologías reproductivas como la IA y la FIV son de gran interés, ya que el congelamiento del semen es esencial en los programas de cría y de selección con el fin de aumentar la producción de especies domésticas. El semen criopreservado tiene muchas aplicaciones biotecnológicas: puede ser utilizado para resolver problemas de infertilidad o enfermedades que amenazan la vida, preservar el semen y el ADN de especies en peligro de extinción y conservar la biodiversidad. La interacción de varios factores como la velocidad de enfriamiento, la temperatura de almacenamiento, la concentración y efectos de los ingredientes y del crioprotector sobre la acumulación de radicales libres, la composición del plasma seminal y el control de la higiene, son aspectos claves que afectan la viabilidad de los espermatozoides (El-Sheshtawy *et al.*, 2017).

Membrillo *et al.* (2011) señalan que el éxito de la congelación del semen depende de numerosos factores de cada especie y deben ser optimizados de acuerdo al tipo de semen que se va a preservar. Para la fecundación del ovocito de la vaca, se necesitan menos millones de espermatozoides que en la cerda, la cual requiere cantidades sensiblemente mayores de espermatozoides.

Membrillo *et al.* (2011) y El-Sheshtawy *et al.* (2017) afirman que el proceso de congelación de semen tiene como resultado un aumento en el número de células apoptóticas en comparación con el semen fresco. Durante la criopreservación del semen, el estrés provoca daños en la integridad de la membrana con la consecuente pérdida de la motilidad y viabilidad, por lo cual la fertilidad del semen congelado es más baja comparada con el semen fresco, debido a la pérdida de capacidad de fecundación. Dentro de los principales factores perjudiciales durante la criopreservación figuran los ocasionados por los radicales libres que se forman en este proceso, siendo los responsables del daño oxidativo. El daño a bajas temperaturas ocurre en la membrana plasmática, en la membrana acrosomal, en la mitocondria y en la vaina del axonema y aunque fisiológicamente se forman radicales libres durante la respiración mitocondrial, es importante

tener en cuenta que las anomalías en la mitocondria pueden contribuir a la producción excesiva de los radicales libres (Cabrera *et al.*, 2010; Membrillo *et al.*, 2011; El-Sheshtawy *et al.*, 2017). Cabrera *et al.* (2008) afirman que durante el proceso de criopreservación se produce una disminución aproximada del 50% en la viabilidad espermática, debido principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica, ocurriendo cambios en la organización morfológica de las células, tales como la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular. La hipertonidad causa desnaturalización proteica, disociación de lipoproteínas e influye en la activación, estabilización o inhibición de enzimas. Los cristales de hielo intracelular causan ruptura y vacuolización del citoplasma y membranas; la ruptura de membranas y, en especial, la de liposomas, está asociada a la liberación de enzimas hidrofílicas liposomales con la consiguiente destrucción química de la célula (Cabrera *et al.*, 2008; Jafaroghli *et al.*, 2011; Salmani *et al.*, 2014; Yodmingkwana *et al.*, 2016).

En este sentido, Purdy (2006) y Jafaroghli *et al.* (2011) mencionan que se forma hielo en la célula espermática y es uno de los factores perjudiciales que reducen la viabilidad y la integridad del espermatozoide congelado-descongelado. Aparte del protocolo de crioconservación utilizado, la composición del diluyente y la naturaleza de los crioprotectores son de gran importancia para la supervivencia de los espermatozoides. Por lo tanto, se debe ejercer considerable cuidado durante la congelación del semen, para evitar dañar innecesariamente al espermatozoide.

### **2.2.1 Diluyentes en el semen**

Los propósitos de un diluyente de semen para congelación es suministrar a las células del espermatozoide una fuente de energía, proteger las células de los daños relacionados con la temperatura y proporcionar un adecuado ambiente para que los espermatozoides sobrevivan temporalmente (Dorado *et al.*, 2007). Es esencial que la muestra de semen sea diluida apropiadamente de modo que haya suficiente número de espermatozoides y suficiente volumen de diluyente para acomodar las células en una pajilla de inseminación, de modo que se pueda utilizar un menor número de inseminaciones y el número más bajo posible de espermatozoides por inseminación. La mejor manera de diluir el semen, para efectos comparativos, es basarse en la concentración de espermatozoides (Purdy, 2006). Se han utilizado diferentes diluyentes para proteger los espermatozoides de carnero durante su procesamiento y almacenamiento en estado congelado. Por ejemplo: diluyentes a base de yema de huevo, TRIS (hidroximetil aminometano) y la leche (Kasimanickama *et al.*, 2011). Yodmingkwana *et al.* (2016) mencionan que la yema de huevo es el componente más común en los diluyentes, ya que protege a los espermatozoides de un daño durante el proceso de congelación-descongelación. Sin embargo, la yema de huevo representa algunos problemas, ya que aumenta el riesgo de contaminación microbiana que puede conducir a la producción de endotoxinas que pueden reducir la capacidad de fertilización de los

espermatozoides y aumentar el riesgo de transmisión de enfermedades en el intercambio de semen almacenado.

Una alternativa para reemplazar los componentes de origen animal (por ejemplo la yema de huevo) en los diluyentes del semen es la lecitina de soya, una mezcla natural de fosfatidilcolina y varios ácidos grasos tales como esteárico, oleico y palmítico. Dichos ácidos grasos son fosfolípidos predominantes en la mayoría de las membranas biológicas de mamíferos y son conocidos por mantener la estabilidad estructural de las células (Yodmingkwana *et al.*, 2016). Salmani *et al.* (2014) y Yodmingkwana *et al.* (2016) mencionan que la adición de lecitina de soya al diluyente del semen mejora la motilidad de los espermatozoides después de la descongelación, viabilidad, integridad del acrosoma y la integridad de la membrana en humanos, gato doméstico, carnero y perro doméstico.

Kasimanickama *et al.* (2011) afirman que los extractos basados en lecitina de soya han demostrado tener un buen efecto crioprotector en los diluyentes del semen de bovino. Sin embargo, estos diluyentes no eran superiores aquellos a base de huevo.

Cabrera *et al.* (2010) reportan que usando TRIS con 20 % de yema de huevo como diluyente, se obtuvo una mejor motilidad progresiva y un menor daño a la membrana plasmática durante la conservación del semen de ovino a 20 °C, en comparación al uso de un diluyente basado en leche con 5 % de yema de huevo. Estas diferencias implican el estudio de los diluyentes en la conservación de los espermatozoides y la evaluación de protocolos de congelamiento que permitan una adecuada conservación del semen por periodos prolongados de tiempo para su posterior uso en la IA. Los diluyentes de semen contienen TRIS o citrato de sodio como buffers, glucosa o fructosa como fuente de energía, y penicilina o estreptomycin como agentes antimicrobianos (Gibbons *et al.*, 2009). Además, el diluyente debe contener agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5 °C (generalmente yema de huevo), y el congelamiento (generalmente glicerol) para evitar lesiones de la membrana durante la congelación. Asimismo, existen diluyentes comerciales como el Laiciphos (IMV, Technologies, Francia) para diluir semen fresco, Ovine Fresh (IMV, Technologies, Francia) para semen refrigerado y Ovine Freezing (IMV Technologies, Francia) para la congelación de semen (Cabrera *et al.*, 2008; Gibbons *et al.*, 2009).

La leche desnatada es uno de los diluyentes más utilizados para la conservación del semen; sin embargo, algunos componentes del plasma seminal, tales como la secreción de la glándula bulbouretral y su fracción proteica, son perjudiciales para la supervivencia del espermatozoide (Leboeuf *et al.*, 2000; Mara *et al.*, 2007).

Purdy (2006) menciona que es importante estudiar la influencia de diferentes azúcares en los espermatozoides, ya que mantienen la presión osmótica de los diluyentes por inducción de deshidratación celular y ayudan a que exista una menor formación de cristales de hielo en los espermatozoides. Este mismo autor indica que además, el azúcar es utilizado por los

espermatozoides como una fuente de energía a través de glicólisis y fosforilación oxidativa mitocondrial para apoyar la motilidad del espermatozoide. Nainga *et al.* (2010) y Jafaroghli *et al.* (2011) mencionaron que la adición de azúcares como la glucosa, la fructosa, la lactosa o la rafinosa, en medio basado en TRIS en carnero, no mejoró significativamente la supervivencia sin congelar los espermatozoides. Estos mismos autores mencionan que no hay un efecto del tipo de azúcar (fructosa, glucosa, lactosa, sacarosa o trehalosa) sobre la motilidad post-descongelación de espermatozoides de carnero.

### **2.3. Recolección de semen.**

La recolección de semen en animales de granja no es procedimiento estéril y existe un grado de contaminación que no se puede evitar. En los carneros, el semen suele ser recogido utilizando la técnica de vagina artificial de composición abierta que puede estar contaminada con bacterias de la superficie del pene y prepucio, así como del área de recolección, de los equipos y del personal. Como consecuencia, las bacterias pueden comprometer la calidad del semen durante el almacenamiento y contaminar el aparato reproductor femenino. Se requiere minimizar estos efectos adversos, utilizando antibióticos que se incluyen en la composición de los diluyentes del semen de carnero para prevenir el crecimiento de bacterias (Salamon *et al.*, 2000; Yániz *et al.*, 2010).

Algunas bacterias son deletéreas para los espermatozoides de forma dependiente de la concentración. El más estudiado es el efecto de *Escherichia coli* en espermatozoides. Esta bacteria Gram-negativa reduce la motilidad a través de la adhesión y aglutinación al espermatozoide; causa alteraciones morfológicas como cambios en el nivel de la pieza intermedia, la membrana y del acrosoma; altera la función espermática, y aumenta la translación de fosfatidilserina. En animales, existe una variedad de bacterias de diferentes géneros que han sido identificados tras un cultivo aeróbico con muestras de semen, y ciertas bacterias han ocasionado efectos sobre la calidad del semen durante la baja temperatura y el almacenamiento congelado (Althouse *et al.*, 2000; Yániz *et al.*, 2010).

Las células espermáticas tienen gran sensibilidad a factores ambientales como luz solar, agua, jabón, soluciones antisépticas, germicidas, cambios bruscos de temperatura, etc. El semen debe manejarse de manera cuidadosa desde su recolección hasta su procesamiento, con el fin de mantener las características espermáticas en condiciones óptimas o aceptables (Salamon *et al.*, 2000; Córdova-Izquierdo *et al.*, 2006).

#### **2.3.1 Métodos de recolección de semen de ovino**

Los métodos de recolección de semen han sufrido cambios ligeros. El primer método utilizado para la recolección de semen en el ganado ovino fue la recuperación del semen después de la cópula. Más tarde, se empezó a utilizar la vagina artificial de Gummi–Bertram, convirtiéndose en

el método ideal para la recolección de semen en el ganado ovino y caprino (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2006). Los métodos más utilizados actualmente para la recolección de semen en los rumiantes son: la vagina artificial, la electroeyaculación y los masajes de las glándulas genitales accesorias. Cuando el semen es colectado por electroeyaculación, los machos se ven sometidos a condiciones de estrés por lo tanto, sólo se recomienda su empleo cuando no puedan ser entrenados los animales para la recolección con vagina artificial, ni para la utilización en IA con semen fresco. Usualmente con la electroeyaculación se obtienen eyaculados de mayor volumen debido a una sobrestimulación de las glándulas seminales, productoras del plasma seminal, pero con una menor concentración espermática. Asimismo, con esta técnica es frecuente la contaminación con orina (Jiménez *et al.*, 2012; Ledesma *et al.*, 2014).

El uso de la electroeyaculación emplea un dispositivo eléctrico que consiste en una fuente generadora de energía eléctrica que transmite impulsos eléctricos en una determinada frecuencia, voltaje y corriente que son conducidos a través de un transductor que consiste en un dispositivo de forma anular de proporciones requeridas según la especie y que contiene los electrodos que permiten el paso de la energía eléctrica que provocará las descargas que ocasionen la eyaculación del animal (Barszcz *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2012; Ledesma *et al.*, 2014).

El más utilizado es la vagina artificial, por cuanto ofrece al macho condiciones similares a la vagina de la hembra y permite obtener eyaculados con alta motilidad y concentración espermática. No produce estrés en los animales, siendo el método de elección para programas de congelamiento seminal de alta frecuencia de colectas (Marjuki, 2011).

#### **2.4. Evaluación de semen**

Con el fin de predecir la fertilidad potencial del semen, el análisis de rutina es basado en la evaluación macroscópica-física del eyaculado, y en la evaluación por microscopía de los espermatozoides. Este análisis, convencionalmente ha incluido la determinación de aspectos como el volumen de semen, la presencia de sangre, orina o bacterias potencialmente patógenas, la concentración de espermatozoides, la proporción de vivos y muertos, el análisis de las características morfológicas de las células espermáticas, la movilidad total, la movilidad progresiva, e incluso la velocidad del movimiento, y la duración de la movilidad de los espermatozoides (Dorado *et al.*, 2007). Se han incorporado diferentes métodos directos e indirectos, además de novedosos recursos tecnológicos para evaluar la integridad, la vitalidad y la funcionalidad de los espermatozoides y sus organelos. Diversos procedimientos de fijación de células y de tinción de compartimentos celulares se han implementado para mejorar las evaluaciones convencionales desarrolladas por microscopía. Con el desarrollo de sistema de análisis de semen asistido por computadora (CASA; *Computer Assisted Sperm Analysis*), la evaluación espermática se ha tornado más objetiva, ha incluido y facilitado la determinación de nuevas variables con valor diagnóstico. Asimismo, se han incorporado métodos de análisis tan

específicos, como lo permiten los actuales desarrollos en microscopía de fluorescencia. El hallazgo de una amplia variedad de fluorocromos y de compuestos conjugados a sondas fluorescentes, y el desarrollo de diferentes tecnologías para la visualización y cuantificación de la fluorescencia emitida por la célula y los compartimentos celulares, han permitido un análisis más amplio de los atributos de los espermatozoides (Contri *et al.*, 2010; Chenoweth y McPherson, 2016; Karayat *et al.*, 2016).

La evaluación de la motilidad y morfología de los espermatozoides es un parámetro esencial en el examen de la calidad espermática y el establecimiento de correlaciones entre la calidad del espermatozoide y la fertilidad. Anteriormente la evaluación de la motilidad era subjetiva porque tenía un limitado valor predictivo de la fertilidad, ya que la estimación se veía afectada por la formación y experiencia del técnico evaluador. Debido a esto, se ha hecho hincapié sobre el desarrollo de métodos objetivos para evaluar la calidad del semen. El CASA mejora la objetividad, la precisión y eficiencia de la evaluación de diferentes características: movimiento, velocidad y morfología. El registro de datos cuantitativos por CASA ha permitido detectar cambios sutiles en el movimiento de los espermatozoides (Dorado *et al.*, 2007; David *et al.*, 2015). Para determinar la concentración de un eyaculado, uno de los pasos más importantes es la evaluación seminal, dado que además de proveer información sobre la capacidad fecundante, también es necesario para definir las tasas de dilución, o la cantidad de dosis para la IA. La concentración seminal se evalúa por el método del hematocitómetro, o por espectrofotometría mediante sistemas automatizados. Los contadores electrónicos de partículas (Coulter) y la citometría de flujo, pueden emplearse también para determinar la concentración espermática, sin embargo, el costo de obtención, operación y mantenimiento de estos equipos limita su uso para evaluaciones de rutina para semen (Contri *et al.*, 2010; Restrepo *et al.*, 2013).

Existen diferentes métodos que consisten en evaluaciones funcionales y no funcionales del espermatozoide, ya que se deben evaluar diversas características de la célula espermática. Las pruebas funcionales son: prueba de penetración del moco cervical la cual se utiliza para evaluar el número de espermatozoides retenidos en el oviducto; prueba de penetración de la zona pelúcida y prueba de fertilización *in vitro*, realizada *a priori* y que es la prueba más relevante para evaluar la capacidad de fertilización de los espermatozoides (David *et al.*, 2015).

Las pruebas no funcionales son las siguientes: medición de las proteínas seminales, prueba de integridad de cromatina, prueba del estado de la membrana plasmática y del acrosoma, prueba de porcentaje de espermatozoides anormales/muertos, que se relaciona con la fertilidad en múltiples especies. Las evaluaciones relacionadas con la determinación del movimiento del espermatozoide pueden ser estimaciones utilizando las mediciones de adenosina trifosfato (ATP) o directamente por la observación de grupos de espermatozoides, motilidad masal o de la motilidad individual (David *et al.*, 2015).

La integridad de la membrana plasmática puede ser considerada como un indicador indirecto de la vitalidad de los espermatozoides. La evaluación de la integridad de la membrana plasmática ha sido reportada mediante el uso de sondas fluorescentes como SYBR-14 y yoduro de propidio (PI). Ambos fluorocromos actúan mediante la penetración de la membrana espermática, y evalúan la integridad de la membrana del espermatozoide, marcando las células viables y las bombas iónicas funcionales. SYBR-14 identifica a todos los espermatozoides en la muestra (vivos y muertos), mientras que el PI sólo tiñe los núcleos de los espermatozoides muertos. Con esta combinación, el núcleo de los espermatozoides vivos fluoresce verde (SYBR-14), mientras las células degeneradas, las cuales han perdido la integridad de su membrana, se tiñen de rojo. Otras pruebas de fluorescencia han sido usadas para evaluar la integridad de la membrana espermática usando otros fluorocromos como el Hoechst 33258, isotiocianato de fluoresceína (FITC), tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC), Calcein-AM y homodimer-1 de etidio (Restrepo *et al.*, 2013).

Existen diversos métodos diseñados para la evaluación de la vitalidad y el estado del acrosoma en muestras teñidas. Estas técnicas requieren generalmente de la tinción de la región acrosomal, siendo la estrategia más común, el uso de un colorante para la tinción del acrosoma, y un colorante diferente para la tinción nuclear, con el fin de lograr contraste en la región posterior de la cabeza, y así reducir la cantidad de colorante acrosomal incorporado por el núcleo. El marcador de contenido acrosomal FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína) se une al contenido acrosomal de los espermatozoides, luego de la permeabilización de la membrana plasmática, determinando así la presencia o ausencia de la matriz acrosomal. Con esta técnica se pueden identificar claramente dos patrones: el primero corresponde a los acrosomas que fluorescen completamente de color verde, indicando un acrosoma intacto; y el segundo como solo una banda fluorescente en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, indicando la ocurrencia de la reacción acrosómica. Dicha reacción también puede observarse mediante otra técnica de tinción con lectinas combinadas que utiliza la sonda de fluorescencia FITC-PNA; aglutinina de maní conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Restrepo *et al.*, 2013).

## **2.5 Daño oxidativo y antioxidantes**

Los espermatozoides son extremadamente susceptibles a bajas temperaturas durante el proceso de enfriamiento o congelación. Esto se ha atribuido a la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática de espermatozoides de carnero que hace que las células sean sensibles al choque frío así como a la peroxidación lipídica en presencia de ROS (Bucak *et al.*, 2009; Allai *et al.*, 2018; Falchi *et al.*, 2018). La criopreservación del semen a

menudo induce una fuente adicional de ROS que atacan al espermatozoide debido a la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes y la membrana del espermatozoide; esta última se vuelve más susceptible a la peroxidación lipídica, afectando la permeabilidad de la membrana (El-Sheshtawy *et al.*, 2017). El espermatozoide genera ROS como una consecuencia normal de metabolismo oxidativo y una baja concentración de ROS tiene un papel importante en las funciones de los espermatozoides de mamíferos, como la capacitación, la reacción acrosómica y estabilización de la cápsula mitocondrial para la pieza intermedia. Para mantener las actividades fisiológicas adecuadas a un equilibrio óptimo entre la producción de ROS y el reciclaje alrededor de las células espermáticas es esencial ya que un desequilibrio puede afectar la función espermática a través del estrés oxidativo, que conduce a un aumento de las tasas de peroxidación lipídica y, en consecuencia, a la pérdida de motilidad durante el almacenamiento prolongado. Durante el procesamiento, los espermatozoides producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno que disminuye la motilidad de los espermatozoides después del descongelamiento (Bucak *et al.*, 2009; Allai *et al.*, 2018; Falchi *et al.*, 2018).

El almacenamiento exitoso de espermatozoides (líquidos y congelados) requiere ralentizar el metabolismo celular, por lo tanto prolonga la viabilidad. Para lograr este objetivo y mejorar la calidad del espermatozoide, el uso de un extensor y crioprotectores y un proceso apropiado de enfriamiento-calentamiento son necesarios. Para este propósito, se han agregado componentes a los extensores para mantener la movilidad y la capacidad de fertilización y para preservar la integridad de la membrana espermática. En la mayoría de los casos, estos protectores tienen actividad antioxidante lo cual reducen el proceso de oxidación o lo regulan, además, previenen la formación de la suplementación con antioxidantes y otros compuestos, por lo tanto, pueden reducir el efecto negativo del estrés oxidativo causado por ROS en el espermatozoide del carnero durante la preservación (Bucak *et al.*, 2009; Allai *et al.*, 2018; Falchi *et al.*, 2018).

Membrillo *et al.*, (2011) y Vichas *et al.*, (2017) afirman que las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, ya que pueden activar al espermatozoide en la fecundación; un desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide, provocando un estrés oxidativo que se ha definido como un desequilibrio entre los agentes oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Estos últimos involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas diversas entre las que se incluyen las vitaminas E y C, que cumplen su función antioxidante al disminuir el porcentaje de peroxidación lipídica. Un factor limitante en la preservación del semen es su exposición a la luz durante la manipulación antes del almacenamiento, dando lugar a la formación de ROS con daño al espermatozoide, a la motilidad celular y la integridad genómica. Este problema puede superarse mediante la adición de antioxidantes en el medio de conservación (Mara *et al.*, 2007). Los espermatozoides cuentan con un sistema de defensa antioxidante. Que incluye; superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión

peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), así como antioxidantes no enzimáticos como metionina, ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol. La capacidad de biosíntesis de los espermatozoides, es limitada y la concentración de los antioxidantes presentes en el semen se puede reducir por dilución, y como resultado, disminuye el efecto de esta defensa antioxidante endógena. Por lo tanto, la adición de antioxidantes, incluso en pequeñas concentraciones, puede mejorar la función de los espermatozoides durante la preservación (Bucak *et al.*, 2007; Allai *et al.*, 2018; Falchi *et al.*, 2018).

La producción de ROS por espermatozoides dañados tiene un impacto negativo sobre las células viables restantes, ya que representa un daño acumulativo para los espermatozoides que son almacenados. Entre las ROS destacan fundamentalmente el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este último, a pesar de ser un radical libre, es la molécula que más se ha involucrado en el daño de los espermatozoides. El peróxido de hidrógeno es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales hidroxilos en presencia de metales de transición. La reacción inicial de la oxidación de los ácidos grasos consiste en una lipoperoxidación y es generada por las ROS que inducen una reacción en cadena, provocando un rompimiento de dobles enlaces en los lípidos de las membranas (Membrillo *et al.*, 2011; El-Sheshtawy *et al.*, 2017).

La enzima SOD en el citoplasma y en la mitocondria es responsable de combinar dos moléculas del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en uno de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y catalasa (CAT) y peroxidasa de glutatión (GSH-Px) convierte de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$ . Esta enzima ha sido detectada en semen de carnero por su capacidad antioxidante, sin embargo, cambia con la calidad del semen, así como durante el proceso de congelación-descongelación. Tales cambios en las actividades enzimáticas en el semen, así como la relación (positiva o negativa) con la calidad del espermatozoide pueden ser debidas al estrés oxidativo, porque las enzimas se utilizan en exceso para proteger o mantener la calidad del espermatozoide, o porque las enzimas no tienen la capacidad de mantener la calidad espermática (Allai *et al.*, 2018).

La CAT se ha utilizado en los diluyentes para mejorar la capacidad antioxidante del semen y preservar la función de los espermatozoides, un mayor porcentaje de acrosomas y membranas intactas en el plasma en el semen de carnero cuando se criopreserva con yema de huevo Tris-hidroximetil aminometano (Tris) extensor que contiene 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de catalasa. Además, la inclusión de 100 y 200 UI / mL de CAT en diluyentes puede evitar efectos nocivos del enfriamiento sobre la motilidad y sobre la supervivencia del espermatozoide, durante el almacenamiento a 5 °C. Sin embargo, las concentraciones de CAT superiores a 200 UI / mL son tóxicas para los espermatozoides (Allai *et al.*, 2018).

## 2.6 Métodos para determinación de actividad antioxidante

Existen diferentes tipos de ensayos los cuales permiten evaluar la capacidad antioxidante. El ensayo de capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC) proporciona una fuente controlable de radicales peroxílicos que modulan reacciones de los antioxidantes con lípidos tanto en alimentos, como en modelos fisiológicos y sistemas que se pueden adaptar para detectar tanto hidrofílicos e hidrófobos mediante la alteración de la fuente radical y solvente. El ensayo de parámetro total de antioxidante que atrapa radicales (TRAP): este método monitorea la habilidad de compuestos antioxidantes para interferir con la reacción entre los radicales peroxilo generados por 2,2  $\phi$ -azobis (2 amidinopropano) diclorhidrato (AAPH o ABAP) y una sonda diana. Este ensayo implica el inicio de la peroxidación lipídica generando radicales peroxil solubles en agua y es sensible a todos los antioxidantes de rotura de cadena. Otro ensayo es el de capacidad total de evacuación del oxidante (TOSC): este método permite una cuantificación de la capacidad de absorción de antioxidantes específicamente hacia tres oxidantes potentes, es decir, radicales hidroxilo, radicales peroxilo y peroxinitrito. Este método aborda un tema importante en términos de poder evaluar diferentes antioxidantes con distintas fuentes de radicales biológicamente relevantes. Quimioluminiscencia (CL): la química fundamental de los ensayos de CL se basa en la reacción de los radicales oxidantes con compuestos marcadores para producir especies de estados excitados que emiten quimioluminiscencia (químicamente luz inducida). Los radicales inhiben la producción de luz con fuentes oxidantes de peroxil, los radicales incluyen la enzima peroxidasa. En tanto el ensayo de fotoquimioluminiscencia (PCL): el ensayo implica la generación fotoquímica de superóxido ( $O_2^-$ ) y los radicales libres combinados con la detección de CL. El ensayo se inicia por la excitación óptica de un fotosensibilizador (S), resultando en la generación del anión radical superóxido (Prior *et al.*, 2005).

El ensayo potencial reductor férrico (FRAP) fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain, (1996) para medir el poder reductor en plasma, pero este ensayo posteriormente también se ha adaptado y utilizado para el ensayo de capacidad antioxidantes en productos botánicos. Las medidas de reacción reducción de 2,4,6-tripiridil-s-triazina férrica (TPTZ) detecta compuestos con potenciales redox de  $<0.7$  V (el potencial redox de  $Fe^{3+}$  -TPTZ), por lo que el FRAP es razonable para detectar la capacidad de mantener el estado redox en células o tejidos. La reducción del poder parece estar relacionada con el grado de hidroxilación y grado de conjugación en polifenoles. Sin embargo, el FRAP no puede detectar compuestos que actúan por radicales (transferencia de H), particularmente tioles y proteínas (Prior *et al.*, 2005). El ensayo FRAP no mide tiol antioxidantes, como el glutatión. El FRAP en realidad sólo mide la capacidad de reducción basada en el ion férrico, lo cual no es relevante para la actividad antioxidante mecánica y fisiológicamente. Sin embargo, a diferencia de otras pruebas de antioxidante, el ensayo FRAP es simple, veloz, económico y no requiere equipamiento especializado. El FRAP se puede realizar automatizado, semiautomático o por métodos manuales (Prior *et al.*, 2005).

## **2.7 Resistencia antimicrobiana en semen**

Los genitales externos del semental están normalmente habitados por microorganismos comensales, no patógenos, y ocasionalmente por patógenos potenciales tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. Estos patógenos potenciales pueden causar afecciones negativas, como la vesiculitis seminal, o pueden contaminar el semen y ser transferido al tracto reproductivo de las hembras, y puede dar lugar a endometritis post-reproducción. Los extensores disponibles en el mercado a menudo se formulan con antibióticos de amplio espectro para ayudar en el control del crecimiento bacteriano en el semen. La resistencia a los antibióticos es una preocupación creciente ya que se relaciona con el medio ambiente y, debido a una contaminación con bacterias resistentes a los antibióticos. La aplicación y el uso de antibióticos de nueva generación deben ser limitados a las circunstancias donde las bacterias resistentes a los antibióticos han sido identificadas (Hernández-Avilés *et al.*, 2018).

El fluido seminal contiene agua, carbohidratos, enzimas, ácidos grasos, vitaminas, proteínas, aminoácidos y otros componentes para mantener el metabolismo fisiológico normal y actividad del espermatozoide. Además, estos componentes de semen proporcionan un medio nutritivo para el crecimiento de bacterias durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Un estudio informó que el 75% de los eyaculados estaban contaminados con al menos un tipo de bacterias, con bacterias Gram negativas que representan las principales contaminantes. El semen es fácilmente contaminado por bacterias durante el proceso de recogida y transporte. En diversos informes, se han identificado especies de bacterias contaminantes, con un gran porcentaje perteneciente a la familia de las enterobacterias (Shaoyong *et al.*, 2019).

La bacteriospermia es uno de los principales problemas en la conservación del semen. Para inhibir el crecimiento de bacterias y para mejorar la calidad del semen durante conservación del semen, actualmente la práctica principal es añadir antibióticos al diluyente del semen. En los últimos años, debido a los abusos de la aplicación de antibióticos en la cría de animales, como resultado se han producido muchas bacterias resistentes a los fármacos. Por lo tanto, la identificación de nuevas sustancias antimicrobianas que pueden ser utilizadas para reemplazar los antibióticos convencionales es crítica para resolver este problema. Los antibióticos se agregan rutinariamente a los diluyentes en el semen, sin embargo, un aumento de la resistencia bacteriana a ellos ha observado en los últimos años; más del 90% de las bacterias aisladas de las dosis seminales son resistentes a los antibióticos comunes que se agregan a los extensores. Para superar este problema, es importante destacar que es necesario el control de las medidas higiénicas al obtener el semen, pero también es urgente encontrar alternativas a los antibióticos convencionales. En las últimas décadas, ha habido una gran esfuerzo en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, como los péptidos antimicrobiano (AMP) que se encuentran en diferentes organismos vivos, sin

embargo, la actividad de los péptidos antimicrobianos pueden ser tóxicos para los espermatozoides (Sancho *et al.*, 2017; Shaoyong *et al.*, 2019).

En ausencia del desarrollo de nuevas generaciones de antibióticos, el uso apropiado de los antibióticos existentes es necesaria para garantizar la disponibilidad a largo plazo de tratamientos para infecciones bacterianas. Si los antibióticos se vuelven Inefectivos, representa una creciente amenaza, lo cual puede conducir a una mayor morbilidad. Desafortunadamente, un mayor uso de antibióticos durante los últimos 55 años ha ejercido presión selectiva sobre bacterias susceptibles y pueden haber favorecido la supervivencia de cepas resistentes, algunas de los cuales son resistentes a más de un antibiótico. Si se puede reducir el uso excesivo de antibióticos, la expectativa es que las bacterias resistentes puedan ser sustituidas por bacterias susceptibles debido a bacterias resistentes, puede ser menos "apto" que las bacterias susceptibles (Bell *et al.*, 2014).

Una pequeña cantidad del uso de antibióticos puede llevar a unos considerables niveles de resistencia a antibióticos que se desarrollan dentro de una especie animal, y los genes para la resistencia antimicrobiana se intercambian fácilmente entre embalses en seres humanos y animales. Por lo tanto, ahora hay un esfuerzo concertado para restringir el uso de antibióticos solo con fines terapéuticos, eligiendo los antibióticos adecuados por sus propiedades farmacocinéticas y la sensibilidad de los medicamentos específicos bacterias involucradas. Sin embargo, a pesar de este esfuerzo, la resistencia a los antibióticos sigue siendo una gran amenaza (Morrell *et al.*, 2019).

Dado que el semen es generalmente almacenado durante varios días antes de la IA en un medio rico en nutrientes para mantener la supervivencia del espermatozoide, las bacterias pueden multiplicarse, incluso a la temperatura de almacenamiento normal para el semen. Se agregan antibióticos para prevenir las bacterias inducidas e impedir un deterioro en la calidad del espermatozoide y la posibilidad de causar enfermedades en hembras inseminadas. Sin embargo, la eficacia de los antibióticos contra los microorganismos que comúnmente contaminan el semen (Morrell *et al.*, 2019).

La presencia de bacterias en el semen extendido crea competencia para nutrientes y también resulta en la producción de subproductos metabólicos eso puede dañar los espermatozoides. Además, algunas bacterias contienen lipopolisacáridos (LPS) en sus paredes celulares que se liberan cuando ellos mueren; estos LPS también causan daño a los espermatozoides. La presencia de bacterias contaminantes en el semen se asocia con una disminución en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, reacción acrosoma prematura o aglutinación de espermatozoides. Además, las bacterias pueden provocar la producción de anticuerpos dirigidos contra el espermatozoide glyocalix complex (Morrell. 2016).

Los antibióticos utilizados y las concentraciones recomendadas para dosis de semen comercial están estipulados por las directrices nacionales e internacionales. Sin embargo, hay desventajas

en esta práctica, tanto para calidad del espermatozoide y para el medio ambiente. Los antimicrobianos pueden tener un efecto perjudicial sobre la supervivencia del espermatozoide, limitando así la elección de agentes que se pueden agregar a los extensores de semen. En un esfuerzo por reducir la toxicidad, agentes antibacterianos altamente potentes son usados. Sin embargo, cualquier uso de antibióticos puede contribuir al desarrollo de resistencia a los antibióticos, y esta resistencia puede, a su vez, ser transferida a otras bacterias en otras especies huésped. Así, desafortunadamente, aunque las combinaciones de antibióticos pueden reducir la toxicidad del espermatozoide, en realidad pueden contribuir más a la resistencia a los antibióticos que los agentes individuales. Es esencial que cualquier extensor que contenga antibióticos y cualquier dosis de semen no utilizada debe ser eliminados de una manera aprobada que resulte en la inactivación de los antibióticos antes de que alcancen el medio ambiente (Morrell. 2016).

## **2.8 Plantas con propiedades antimicrobianas y antioxidantes**

Muchas de las hierbas han sido desarrolladas como un suplemento, que ayudan para un estilo de vida saludable. Entre estas hierbas se encuentra la silimarina que es un fuerte antioxidante y es utilizada como remedio para la protección hepática contra el estrés oxidativo, como protector del tejido testicular y para mejorar la calidad del semen mediante la elevación del nivel de testosterona en sangre (El-Sheshtawy *et al.*, 2017).

Los antioxidantes naturales ejercen un efecto protector preservando la actividad metabólica y la viabilidad celular de los espermatozoides criopreservados. En la actualidad, el uso de productos naturales ha ganado interés en todo el mundo (El-Sheshtawy *et al.*, 2017).

Las especias y hierbas tienen una gran actividad antioxidante y / o contienen fitoquímicos carotenoides, flavonoides y otros compuestos fenólicos que se han utilizado para el procesamiento de semen. Los extractos de diferentes tipos de vegetales (*Syzygium aromaticum*, *Rosmarinus officinalis*, *Camellia sinensis*) han sido utilizados para mejorar la calidad del semen de carnero (Allai *et al.*, 2018).

El clavo de olor (*S. aromaticum*) es rico en ácidos fenólicos, flavonol glucósidos, aceites fenólicos volátiles (eugenol, acetil eugenol, isoeugenol) y taninos. Estos compuestos proporcionan la capacidad de funcionar como eliminador de radicales libres y como quelante de metales. El uso de clavo para complementar el extendedor de yema de huevo Tris a 35 y 75 µg / mL mejoró la motilidad de espermatozoides en carnero después de enfriamiento y congelación-descongelación en comparación con 0 y 115 µg / mL. De la misma manera, donde se basa la lecitina de soja extensor suplementado con 4 % y 6 % de extracto acuoso de romero mejoró los porcentajes de motilidad total, motilidad progresiva, y la funcionalidad de la membrana plasmática del semen congelado en carnero (Baghshah *et al.*, 2014; Allai *et al.*, 2018).

Además del clavo de olor (*S. aromaticum*) y el romero, el té verde (*Camellia sinensis*) contiene una variedad de activos compuestos tales como polifenoles, catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina y apigallocatequina- 3- galato, los cuales tienen grandes cantidades de actividad de eliminación de radicales libres (Nakagawa *et al.*, 2002; Allai *et al.*, 2018).

La adición de extracto de té verde al extensor de lecitina de soya (*Glycine maxprotege*) al espermatozoide del carnero contra daño causado por el estrés oxidativo durante la criopreservación (De Paz *et al.*, 2010; Allai *et al.*, 2018).

La lecitina de soya (*G. maxprotege*) es otro componente que puede usarse para la preservación de espermatozoide. Protege la membrana del espermatozoide al estabilizar y reemplaza los fosfolípidos, aumentando así la tolerancia al proceso de congelación. Durante la criopreservación del semen de carnero, el extensor de TRIS suplementado con 1,5 % de lecitina de soya mejora la mayoría de los parámetros de calidad del semen. Sin embargo, durante almacenamiento a 5 °C, la adición de 3 % de lecitina de soya al extensor resulta en una disminución de la motilidad y la actividad mitocondrial. El efecto negativo de la lecitina de soya sobre la actividad mitocondrial también se observó en el semen de carnero descongelado (Allai *et al.*, 2018).

Estudios recientes indican que la adición de aceite de argán (*Argania spinosa*) y aceite de semilla de cactus (*Cactaceae*) en pequeñas cantidades de extensores de yema de huevo TRIS / leche descremada aumenta la motilidad del espermatozoide, la motilidad progresiva, la viabilidad y la integridad de la membrana, pero disminuye la peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN en semen de carnero a temperatura de refrigeración (Allai *et al.*, 2018).

## **2.9 Generalidades de la *Moringa oleifera***

La *Moringa oleifera* es un árbol de gran crecimiento en la India, y se encuentra ampliamente distribuida en los trópicos de toda la región del Pacífico, África Occidental, así como América Central y el Caribe. En los últimos años, *Moringa oleifera* ha llamado la atención de los investigadores debido al uso potencial en muchos campos, como industriales y medicinales, y varios productos alimenticios y piensos que pueden derivarse de sus hojas y frutos. Casi todas las partes del árbol se pueden comer, y más importante, es que todas las partes del árbol tienen un gran potencial con propiedades medicinales (Soliva *et al.*, 2005; Viera *et al.*, 2010; Peixoto *et al.*, 2011; Sokunbi *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2017).

Los extractos de hojas, semillas y raíces de *M. oleifera* han sido ampliamente estudiados, para muchos usos potenciales incluyendo la actividad curativa, anti-tumoral, analgésica, antipirética, anti-epiléptica, antiinflamatoria, anti-ulcerosa, antiespasmódica, diurética, hipocolesterolémica, antifúngica, antibacteriana y antioxidante (Viera *et al.*, 2010; Sokunbi *et al.*, 2015).

Las hojas son fuente rica de aminoácidos tales como metionina, cistina, triptófano y lisina con un alto contenido de proteínas. Además, contiene pigmentos vegetales específicos que han demostrado tener un potente efecto antioxidante por sus componentes tales como los carotenoides, luteína, alfa-caroteno, beta-caroteno, xantinas y clorofila; otros fitoquímicos con poder antioxidante conocido como kaempferol, quercetina, rutina y ácidos cafeoilquínicos; con potentes vitaminas antioxidantes: C, E y A, y micronutrientes esenciales con actividad antioxidante: selenio y zinc (Barakat *et al.*, 2015; Sokunbi *et al.*, 2015; Surendra *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2017).

La acumulación de radicales libres está asociada a la patogénesis de muchas enfermedades. Los antioxidantes son sustancias capaces de retardar o prevenir la formación de radicales. Las plantas contienen compuestos antioxidantes como los carotenoides, tocoferoles, ascorbatos y fenoles—que pueden atenuar el daño oxidativo; ya sea de manera indirecta, al activar las defensas celulares, o directa, al eliminar los radicales libres. Las diferentes partes de *M. oleifera* contienen más de 40 compuestos con actividad antioxidante (Martin *et al.*, 2013).

Entre los compuestos con este potencial, ya sea por actividad de captación de radicales libres o por capacidad de formación de quelatos de iones metálicos identificados en las semillas de moringa, se encuentran compuestos fenólicos como el kaempferol y los ácidos gálico y eláxico. Estudios *in vitro* han demostrado que los extractos de hojas, frutos y semillas de moringa, debido a sus propiedades antioxidantes, protegen las células vivas del daño oxidativo del ADN asociado con el envejecimiento, el cáncer y las enfermedades degenerativas; también se indicó que dichos extractos inhiben la peroxidación lipídica y crecimiento bacteriano, y se propuso a *M. oleifera* como un candidato ideal para las industrias farmacéutica, nutracéutica y de alimentos funcionales. Por otro lado la fracción extraída con acetato de etilo, la cual es rica en ácidos fenólicos y flavonoides, presenta el mayor poder antioxidante entre las fracciones extraídas con distintos disolventes (Martin *et al.*, 2013).

Los extractos de semillas de *M. oleifera* pueden ser usados en terapias antioxidantes para disminuir la genotoxicidad del arsénico y otros metales pesados, cuyos mecanismos de acción carcinogénica están relacionados con especies reactivas de oxígeno. El polvo de tales semillas reduce la concentración de arsénico y protege contra las alteraciones hematológicas y el estrés oxidativo inducidos por ese metal, en lo que desempeñan un papel significativo varios fitoquímicos con poder antioxidante y quelatante. Los coagulantes naturales de la semilla de moringa, su alto contenido de aminoácidos como metionina y cisteína, y de antioxidantes como las vitaminas C y E, y  $\beta$ -caroteno son los responsables de la remediación del estrés oxidativo inducido por el arsénico (Martin *et al.*, 2013).

Estudios bacteriológicos demostraron la actividad antimicrobiana de los extractos de semillas de moringa, los cuales flocculan bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su acción bacteriostática consiste en la disrupción de la membrana celular por inhibición de enzimas esenciales. El principal ingrediente responsable de dicha actividad es el 4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-ranopiranosiloxi)-isotiocionato de bencilo, el cual tiene acción bactericida sobre varias especies patógenas, incluyendo aislados de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Legionella* resistentes a antibióticos (Martin *et al.*, 2013).

### **3. HIPÓTESIS**

La adición de extracto de semilla de *Moringa oleifera* posee efecto antimicrobiano y aumenta la capacidad antioxidante y de fecundación del semen criopreservado de ovino.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición del extracto de semilla de *Moringa oleifera* sobre la actividad antimicrobiana, la capacidad antioxidante y de fecundación del semen criopreservado de ovino.

### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1 1. Determinar la capacidad antioxidante y antimicrobiana del extracto de *Moringa oleifera* en el semen criopreservado de ovino.

4.2.2 2. Valorar el efecto de la adición del extracto de semilla de *Moringa oleifera* en el semen post criopreservado de ovino sobre la motilidad, viabilidad de la membrana, viabilidad del acrosoma y la actividad mitocondrial.

4.2.3 3. Evaluar la capacidad de fecundación del semen criopreservado de ovino mediante la fertilización *in vitro* heteróloga.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Localización del lugar de estudio

Este estudio se desarrolló en el Laboratorio de Investigación y Nutrición Animal del Departamento de Ciencias Veterinarias del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB), perteneciente a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). Se utilizaron seis sementales de razas de pelo (Katahdin, Black Belly, Pelibuey), de entre dos y cinco años de edad, que se encuentran alojados en el Área de Investigación de Rumiantes, localizada dentro del ICB; en esta misma área se llevó a cabo la recolección de semen. Los ovocitos se obtuvieron de ovarios de vacas proporcionados por el Rastro Municipal de Ciudad Juárez para la fertilización *in vitro* heteróloga.

### 5.2. Procesamiento del semen

#### 5.2.1 Recolección de semen

Se seleccionaron tres sementales por sesión para la toma de muestras, las cuales se colectaron dos veces por semana durante cuatro semanas utilizando la técnica de vagina artificial descrita por Salamon *et al.* (2000). Una vez recolectadas, las muestras de semen se conservaron a 37 °C en baño María (Presicion Water, Thermo Scientific, USA).

#### 5.2.2. Evaluación de las muestras seminales

La primera evaluación que se realizó es la macroscópica, consistió en evaluar: volumen, color, densidad que varía desde un semen acuoso, lechoso, lechoso cremoso, hasta un cremoso, estando directamente relacionada con la concentración, motilidad en masa y la presencia de cuerpos extraños. Después de la evaluación macroscópica, el semen se evaluó microscópicamente con el sistema de análisis de semen asistido por computadora (CASA) las siglas son por su nombre en inglés (AndroVision®, Minitube, Alemania). Se evaluó la concentración la motilidad progresiva y motilidad rápida. Después de la evaluación del semen, se mezclaron las tres muestras obtenidas, esto para eliminar las diferencias individuales de cada una y se evaluó nuevamente microscópicamente con el CASA (AndroVision®, Minitube, Alemania).

#### 5.2.3. Dilución del eyaculado

La dilución del semen se llevó a cabo utilizando un diluyente comercial (Two step®, Continental Plastic Corp, U.S.A.) dividido en dos fracciones. Para realizar la dilución se utilizaron dos mezclas; mezcla A contiene 39.0% de diluyente A, 49.0% de agua, la mezcla B contiene 39.0% de diluyente B, 50.8% de agua, 6% glicerol y se añadió a las mezclas 10 % de yema de huevo. Se evaluó nuevamente con el CASA. Posteriormente se fraccionó el total del semen diluido en cinco tratamientos.

#### 5.2.4. Extracto de *Moringa oleifera*

El extracto de *M. oleifera* se obtuvo a partir de semillas desgrasadas liofilizadas siguiendo el método descrito por Núñez-Gastélum *et al.* (2019), con algunas modificaciones. Específicamente, se agregaron 100 mL de metanol al 80% (v/v) a 10 g de muestra. La mezcla se sometió a sonicación a 40 kHz durante 30 min en oscuridad. El extracto se centrifugó a  $1600 \times g$  durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante se recuperó por filtración. El residuo se volvió a extraer en las mismas condiciones. Finalmente, los sobrenadantes se combinaron, se evaporaron por destilación a vacío (Buchi R-3, Flawil, Suiza), se liofilizaron (FreeZone 4.5, Labconco, EE. UU) y se almacenaron a  $-80$  °C hasta su uso. Para caracterizar los extractos, se determinó el contenido de fenoles totales y flavonoides siguiendo el procedimiento descrito por Núñez-Gastélum *et al.* (2018), utilizando el método de Folin-Ciocalteu y la complejación con cloruro de aluminio, respectivamente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Fenoles totales y flavonoides en extracto de semilla de *Moringa oleifera*.

Fenoles totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EC/g)
$3.11 \pm 0.11$	$2.43 \pm 0.11$

Datos presentados en medias  $\pm$  DE.

mg EAG/g: miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo

mg EC/g: miligramos de equivalentes de catequina por gramo

#### 5.2.5. Tratamientos

Tratamiento testigo: no se utilizó ningún tipo de antibiótico.

Tratamiento Control: Se utilizó antibiótico comercial (tylosina 55  $\mu\text{g/mL}$ , gentamicina 275  $\mu\text{g/mL}$ , espectinomicina 330  $\mu\text{g/mL}$ , lincomicina 165  $\mu\text{g/mL}$ ).

Tratamiento 1: se utilizó extracto de semilla de *Moringa oleifera* 1.0 mg/mL

Tratamiento 2: se utilizó extracto de semilla de *Moringa oleifera* 10.0 mg/mL

Tratamiento 3: se utilizó extracto de semilla de *Moringa oleifera* 50.0 mg/mL.

#### 5.2.6. Criopreservación del semen

El eyaculado se diluyó y se colocó manualmente en pajillas de plástico de (30 millones de espermatozoides/0.25 mL) (IMV Technologies, L'Aigle, Francia) y estas fueron selladas con polivinilpirrolidona (Xiamen Aeco, Chemical Industrial, China) obteniendo de este modo las dosis seminales. Los procesos de dilución y empajillado de las dosis se efectuaron a temperatura ambiente (22-25 °C). Las pajillas estuvieron en refrigeración durante 2 horas a una temperatura de 5 °C. Después de ese tiempo, se evaluó motilidad con el sistema CASA post-refrigerado, esto con el fin de que no haya disminuido la motilidad comparada con la motilidad en semen fresco y observar que la refrigeración no haya provocado cambios negativos en la motilidad y así seguir

con el proceso de criopreservación. Para la congelación del semen, se colocaron las pajillas en un recipiente con nitrógeno (Cryobath®CL-8800, CryoLogic, 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. Después del proceso de congelación, las pajillas se colocaron en un termo con nitrógeno para un uso posterior.

### **5.2.7. Evaluación del semen post-criopreservación**

Las pajillas se descongelaron durante 30 segundos a 37 °C en baño María (Precision, Thermo Scientific, USA) y se usó una alícuota de 10 µL para evaluar concentración, motilidad progresiva y motilidad utilizando el sistema CASA. Asimismo, se evaluaron las siguientes características espermáticas por fluorescencia:

**5.2.7.1. Viabilidad de la membrana.** Se realizó un conteo automático del porcentaje de espermatozoides con membranas intactas utilizando la sonda Hoechst 33342/ Yoduro de propidio (PI) (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania). Las muestras de semen se prepararon y tiñeron del siguiente modo: la muestra de semen fue temperada a 38 °C. Para 50 µL del semen temperado a 38 °C se adicionaron 1.5 µL de mezcla colorante. Se incubó la muestra por 15 min a 38 °C, para asegurar una tinción suficiente de la muestra. Durante este lapso, la muestra permaneció protegida de la luz. Se colocó una gota de 8 µL sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Bajo microscopio de epifluorescencia (Axioscope, Carl Zeiss Microscopy, U.S.A) se reconocieron visualmente los espermatozoides teñidos con un aumento de 200X. Para el análisis se utilizó el módulo de viabilidad de membrana de AndroVision® y se utilizó un objetivo negativo (20X) y la cámara ese preparo a la función color.

**5.2.7.2. Integridad de acrosomas.** Se realizó un conteo automático del porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado utilizando la sonda Hoechst 33342/FITC-PNA (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania). La evaluación se efectuó con el módulo integridad de acrosomas de AndroVision®. Las muestras de semen se prepararon y tiñeron del siguiente modo: la muestra de semen fue temperada a 38°C. Para 50 µL del semen temperado a 38 °C se adicionaron 27 µL de mezcla colorante. Se mantuvo la muestra por 20 min a temperatura 38 °C, para asegurar una tinción suficiente de la muestra. Durante este lapso, la muestra permaneció protegida de la luz. Se colocó una gota de 8 µL sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Bajo microscopio de epifluorescencia (Axioscope, Carl Zeiss Microscopy, U.S.A), se reconocieron visualmente los espermatozoides teñidos con un aumento de 200X y se utilizó un objetivo Neofluar (20X).

**5.2.7.1. Actividad mitocondrial.** Se realizó un conteo automático del porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial, basado en una doble tinción de fluorescencia utilizando la sonda Hoechst 33342/Rhodamin 123 (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania). La

evaluación se efectuó con el módulo mitocondrias de AndroVision®. Las muestras de semen se prepararon y tiñeron del siguiente modo: la muestra de semen fue temperada a 38 °C. Para 50 µL el semen temperado a 38 °C se adicionó 4 µL de mezcla colorante. Se mantuvo la muestra en incubación por 20 min a temperatura 38 °C, para asegurar una tinción suficiente de la muestra. Durante este lapso, la muestra permaneció protegida bajo la luz. La muestra fue centrifugada por 4 minutos a 800 x g, retirando el sobrenadante después de la centrifugación. El centrifugado se resuspendió añadiendo 50 µL de un diluyente comercial (BTS, Minitüb, Tiefenbach, Alemania) y la muestra se incubó por otros 5 min a 38 °C. Se colocó una gota de 8 µL sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Bajo microscopio de epifluorescencia (Axioscope, Carl Zeiss Microscopy, U.S.A) con un factor de ampliación de 200X, se reconocieron visualmente los espermatozoides utilizando un objetivo Neofluar (20X).

### **5.3. Determinación de la actividad antimicrobiana**

Se descongelaron las muestras de semen correspondientes a los cinco tratamientos. Luego se prepararon diluciones 1:100 tomando 100 µL de la muestra de semen y mezclando con 9.9 mL de agua estéril; posteriormente, se colocó 1 mL de la solución en caja de Petri y se vaciaron 25 mL de medio Mueller Hinton (Becton Dickinson GmbH, Alemania). Las placas se incubaron a 37 °C y a las 24 h se hizo un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC). Para el caso de las cajas de Petri que presentaron un crecimiento microbiano masivo o UFC incontable, se consideró un número de 301 UFC para el análisis estadístico (Gajdziok *et al.*, 2015).

### **5.4. Análisis de la actividad antioxidante**

#### **Ensayo Potencial Reductor Férrico (FRAP)**

El ensayo FRAP se llevó a cabo según lo establecido por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. Para la preparación del buffer acetato se utilizó 1.3g de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) y 8 mL de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH). Se mezclaron estos componentes con 300 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 3.6 y posteriormente se aforó hasta obtener 500 mL de solución total. El cloruro de hierro (FeCl<sub>2</sub> 20 mM) se preparó con 2.609 g de FeCl<sub>2</sub> y se aforó con agua destilada hasta obtener 500 mL de solución. El reactivo TPTZ (2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina) se preparó con 31.23 mg de TPTZ y 33 µL de ácido clorhídrico. Se aforó a 10 mL con agua destilada y fue almacenado en ausencia de luz.

Para la preparación del plasma seminal, se descongeló el semen en baño maría (Precision, Thermo Scientific, USA) a 37 °C por 30 segundos. Después se centrifugó a 800 x g por 10 min a 4 °C, se tomó el sobrenadante (plasma seminal) 100 µL y se añadió metanol 1:10. El reactivo FRAP se preparó utilizando 1.0 mL del reactivo TPTZ y 1.0 mL de FeCl<sub>2</sub> 20 mM. Posteriormente se aforó con buffer acetato hasta obtener 10 mL. Después se incubó a 37 °C durante 30 min. Una vez terminado el tiempo de incubación se añadieron a cada pocillo de la microplaca 24 µL de plasma

seminal. El cual se descongeló a temperatura ambiente y 180  $\mu\text{L}$  del reactivo FRAP para su posterior lectura a 595 nm a 37 °C, en un espectrofotómetro de microplaca (xMark, BioRad, Hercules, CA) a 37 °C. A la par se realizó una curva estándar con estándar de Trolox y los resultados se expresaron como milimoles equivalentes de Trolox (mmol ET).

## **5.5. Fertilización *in vitro* heteróloga**

### **5.5.1. Colección de los ovocitos**

Para este trabajo se utilizaron ovarios procedentes de vacas sacrificadas en el rastro. Los ovarios se transportaron en un recipiente con cloruro de sodio al 0.9 % (9 g de NaCl/ litro) en agua destilada a una temperatura de 37 a 38 °C.

Una vez que llegaron los ovarios al laboratorio, se lavaron con la solución de transporte. Luego fueron depositados en un recipiente con agua destilada y 0.9 % (9 g de NaCl/ litro) al interior del baño María a 37 °C para después empezar a aspirar los folículos. Se aspiraron los folículos de 2 a 8 mm de diámetro utilizando una aguja 18 g y una jeringa de 5 mL y se depositó el líquido folicular en placas de Petri de 35 X 35 mm. Se mantuvo a una temperatura de 37 °C sobre una termoplatina (Barnstead®, Lab-Line, USA). Una vez obtenidos los ovocitos, se seleccionaron bajo estereoscopio (Minitube® e6303 HT 50, USA) evaluando la apariencia general. Se seleccionaron ovocitos de clasificación uno y dos. Aquellos ovocitos provistos de un citoplasma oscuro y homogéneo, con un complejo de células del cúmulus de tres o más capas, el cual se le considera grado uno. El grado dos: son ovocitos con un citoplasma oscuro y homogéneo y de un complejo de células del cúmulus de tres o menos capas. El grado tres y cuatro: tienen un citoplasma irregular y carecen del complejo de células de cúmulus o tiende a estar expandido las células lo cual se le considera que el ovocito está maduro (De Loos *et al.*, 1989).

### **5.5.2. Maduración *in vitro* de los ovocitos**

Se precalentó medio Bo Wash (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) a 35 °C y se depositaron 200  $\mu\text{L}$  de medio en un plato de cuatro pocillos (Thermo Scientific® Nunc, USA), se lavaron tres veces. Esto consistió en que los ovocitos seleccionados se pasaron al pocillo número uno, de ahí se fueron pasando por cada pocillo utilizando una micropipeta (Eppendorf® Research Plus, Alemania). Después de esto, los ovocitos se sometieron al proceso de maduración *in vitro* (IVM). Fueron equilibrados 200  $\mu\text{L}$  de medio BO-IVM (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) por pozo a 38.8 °C y 6.5 %  $\text{CO}_2$  en aire atmosférico humidificado (21 %  $\text{O}_2$ ) mínimo por 2 horas. Una vez equilibrado el medio BO-IVM se pasaron los ovocitos seleccionados a los pozos con el medio de IVM (Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido). Después de esto, se incubaron a 38.5 °C y 6.5 % de  $\text{CO}_2$  en aire atmosférico humidificado (21 % de  $\text{O}_2$ ) por un periodo de 21 a 24 horas.

### **5.5.3. Fertilización *in vitro* (FIV)**

Fueron equilibrados cuatro pozos con 200  $\mu\text{L}$  de medio BO-IVF (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) en una incubadora a 38.5 °C y 6.5 % de CO<sub>2</sub> con aire atmosférico humidificado (21 % de O<sub>2</sub>) por un mínimo de 2 horas antes de ser usados.

Los platos de BO-IVM con los ovocitos maduros se retiraron de la incubadora después de 21 a 24 horas, luego se colocaron los ovocitos en pozos con medio IVF equilibrado, después los platos con los ovocitos se colocaron en la incubadora, a 38.5 °C y 6.5 % de CO<sub>2</sub> con aire atmosférico humidificado (21 % de O<sub>2</sub>) mientras el semen se preparaba.

### **5.5.4 Preparación del semen de ovino**

Para la purificación y capacitación del semen se prepararon 8.0 mL del medio BO-SemenPrep (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) y se precalentó el medio antes de ser usado.

Fue tomada una pajilla de semen congelado de ovino por cada tratamiento y se colocaron inmediatamente en baño María (Precision, Thermo Scientific, USA) a 37 °C durante 30 segundos. Se colocaron las pajillas descongeladas dentro de la campana de flujo laminar y se secaron con una gasa estéril, se cortó la pajilla de un extremo y se colocó el semen en un tubo Falcón debajo del medio BO-SemenPrep (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) se utilizó 1.0 mL de medio por tubo.

Se centrifugó durante 5 min a 2500 rpm. Después se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 350  $\mu\text{L}$  de suspensión de espermatozoides y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm, una vez más se retiró el sobrenadante, dejando solamente el pellet formado y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de medio BO-IVF (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) para diluir el pellet.

Para calcular la concentración de espermatozoides para realizar la fertilización de los ovocitos se utilizó una concentración final de espermatozoides de  $2.0 \times 10^6$  /mL.

Se agregó el volumen calculado de la suspensión de espermatozoides a cada pocillo de fertilización y se colocaron los platos en la incubadora a 38.5 °C y 6.5 % de CO<sub>2</sub> con aire atmosférico humidificado (21 % de O<sub>2</sub>). Se incubó durante un tiempo de 16 a 20 horas.

### **5.5.5 Cultivo de embriones *in vitro* (IVC)**

Se preparó un plato de cuatro pocillos de BO-IVC con 200  $\mu\text{L}$  de BO-IVC (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) y se cubrió los pocillos con una capa de 400  $\mu\text{L}$  de aceite mineral. Se equilibró durante la noche en la incubadora a 38.5 °C y 6.5 % de CO<sub>2</sub> con aire atmosférico humidificado (21 % de O<sub>2</sub>) para usarlo al día siguiente.

Se retiraron los platos de BO-IVF (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) de la incubadora y se transfirieron todos los ovocitos inseminados a los criotubos de 10 mL ya que contiene 1 mL de BO-Wash (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) y se agitó en vortex durante 1 min a alta velocidad, esto con el fin de eliminar por completo el complejo de células del cumulus.

El contenido fue vertido (medios y ovocitos inseminados) del criotubo de 10 mL en un plato vacío de 35 mm. Se agregó 1 mL de BO-Wash (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) al tubo y se volvió a verter en el mismo plato.

Se transfirieron todos los ovocitos inseminados a otro plato que contenía BO-Wash (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido). Por último se volvieron a pasar los ovocitos inseminados a un tercer plato que contiene BO-Wash (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido). Se contaron el número de ovocitos inseminados y se enjuagaron los ovocitos inseminados en el plato equilibrado de 35 mm de BO-IVC (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) sin aceite.

Se transfirieron los ovocitos inseminados del plato de 35 mm a los pocillos con BO-IVC (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) con aceite mineral que se equilibró durante la noche. Se contaron los ovocitos inseminados y mediante una micropipeta se colocaron en cada pocillo.

Por último se incubó los pocillos a 38.5 °C, en una atmósfera humidificada de 6 % de O<sub>2</sub>, 6.5 % de CO<sub>2</sub> y 88 % de N<sub>2</sub>. Los ovocitos fertilizados se observaron con un estereoscopio a las 40 h para evaluar la división celular de 2 a 8 células (Soler *et al.*, 2008; García-Álvarez *et al.*, 2009).

## **5.6. Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SAS 9,0 (Inst. Cary, NC, USA). Los datos porcentuales se transformaron en arcoseno antes del análisis estadístico, esto con el fin de transformar los datos porcentuales a datos numéricos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para las variables numéricas; actividad antimicrobiana, capacidad antioxidante, motilidad progresiva, motilidad rápida, concentración, viabilidad de la membrana, integridad del acrosoma, actividad mitocondrial y FIV. Se realizó un modelo completamente al azar. Con PROC GLM se ajustaron modelos lineales generalizados, para la evaluación por ANOVA de las características espermáticas post-criopreservado. La comparación de las medias entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de Duncan. El nivel de significancia considerado para todas las evaluaciones fue  $P < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se pueden observar los resultados de los cultivos microbianos a partir de las muestras de semen, que indican que todos los tratamientos que incluyeron extracto de semilla de *M. oleifera* mostraron inhibición de UFC en comparación con el tratamiento testigo ( $P < 0.05$ ), en el cual existe un grado de contaminación mucho mayor. Este elevado número de UFC se debe a que en las muestras de semen de ovino del tratamiento testigo no contenía ningún tipo de agente antimicrobiano. La inhibición obtenida en los tratamientos que incluían extracto de semilla de *M. oleifera* fue similar a la del control.

**Tabla 2.** Efecto del extracto de la semilla de *Moringa oleifera* sobre la contaminación bacteriana en el semen criopreservado de ovino (Media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamiento	Unidades formadoras de colonias (UFC)
Testigo	65.25 $\pm$ 67.67 <sup>b</sup>
Control	4.75 $\pm$ 3.44 <sup>a</sup>
50.0 mg/mL	5.50 $\pm$ 4.53 <sup>a</sup>
10.0 mg/mL	9.70 $\pm$ 6.30 <sup>a</sup>
1.0 mg/mL	6.87 $\pm$ 6.38 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes (entre columnas) indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

El semen es considerado como un medio que favorece el crecimiento bacteriano y probablemente la presencia de bacterias en semen almacenado a temperatura ambiente se atribuye con la muerte de los espermatozoides, quizá debido a la acumulación de los productos metabólicos de las bacterias. Los microorganismos identificados en el semen son extremadamente variables e incluyen *Corynebacterium renale*, *Leptospira* spp., *Escherichia coli*, *Corynebacterium pyogenes*, *Brucela abortus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus* spp. *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, bacilos, mohos y micoplasma en el 94% de las muestras de semen, de casi todos los animales de granja (Trujillo y Rivera, 2002). Es por esto que se debe incluir un antimicrobiano en el diluyente del semen debido a la proliferación de bacterias, los resultados en este estudio indican que cualquier concentración de la *M. oleifera* utilizadas en este estudio puede sustituir al antibiótico convencional.

La contaminación bacteriana del eyaculado en animales clínicamente sanos usados como donantes de semen puede ser debida a la flora microbiana normal de la uretra y el prepucio (Varner *et al*, 1998). Esta flora puede afectar directamente la calidad del semen o inducir procesos inflamatorios en el tracto genital de la hembra. Cuando la flora normal es alterada, bacterias potencialmente patógenas como *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsella pneumonie* pueden colonizar el pene y el prepucio. (Trujillo y Rivera 2002). Trujillo y Rivera (2002) mencionan que ciertas bacterias pueden producir toxinas y productos metabólicos nocivos para la viabilidad del semen. Por otra parte estos mismos autores informaron que existe un efecto marcadamente

deletéreo de la toxina de *E. coli* al momento de la recolección de semen, más que de la eliminación de los microorganismos desde el tracto reproductivo al momento de la eyaculación. Además indican que *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas* han sido asociadas con cambios metabólicos en el semen o con la pérdida de fertilidad y muerte embrionaria.

La capacidad fertilizante de cualquier muestra de semen puede estar afectada por el número de bacterias presentes. El recuento bacterial de las muestras de semen recolectadas por medio de la vagina artificial varía desde 1.000 hasta 22, 000,000 de bacterias/mL. Sin embargo, existen recuentos bacteriales más bajos variando desde 100 hasta 960,000 bacterias/mL con un promedio de 200 bacterias/mL, encontrando diferencias marcadas en las muestras (Trujillo y Rivera 2002). Yániz *et al.* (2010) indican que el eyaculado de carneros puede con frecuencia contener flora bacteriana en concentraciones de hasta  $10^8$  UFC/ml. Estos mismos autores mencionan que el origen pueden ser las infecciones sistémicas y locales del tracto reproductivo, así como la introducción de microorganismos durante la recolección, procesamiento o almacenamiento del semen. Estos mismos autores mencionan que la bacteria *E. coli* tiene efecto negativo en los espermatozoides. Esta bacteria Gram-negativa reduce la motilidad a través de la adhesión y aglutinación del espermatozoide; causa alteraciones morfológicas como cambios en el nivel de la pieza intermedia, la membrana, acrosoma y altera la función espermática, y aumenta la translocación de fosfatidilserina (Yániz *et al.*, 2010).

Trujillo y Rivera (2002) indican que a medida que se aumenta el número de microorganismos en la muestra se incrementa la demanda sobre los nutrientes presentes en el semen, en una vía metabólica que conduce a la formación y liberación de ácidos que bajan el pH del medio, afectando desfavorablemente la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides, quienes a su vez compiten con las bacterias por los nutrientes presentes en un medio cada vez más escaso.

Es importante mencionar que en este estudio se utilizó yema de huevo en el diluyente para el semen. Yodmingkwana *et al.* (2016) indican que el componente efectivo de la yema de huevo es la lipoproteína de baja densidad, proteína que previene el shock frío. Además, los fosfolípidos de la yema, como la fosfatidilcolina, son muy importantes para el mantenimiento de la membrana espermática en el proceso de congelación-descongelación. Estos mismos autores señalan que este es el componente más común en los diluyentes, ya que protege a los espermatozoides de un daño durante el proceso de congelación-descongelación. Sin embargo, la yema de huevo tiene algunos problemas, ya que aumenta el riesgo de contaminación microbiana que puede conducir a la producción de endotoxinas que pueden reducir la capacidad de fertilización de los espermatozoides y aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades en el intercambio de semen almacenado (Purdy, 2006; Salmani *et al.*, 2014; Yodmingkwana *et al.*, 2016).

En este estudio la adición de 1.0, 10.0 y 50.0 mg/mL del extracto de semilla de *M. oleifera* tuvo un efecto antimicrobiano similar al antibiótico convencional. El uso de *M. oleifera* para el control de diversas infecciones provocadas por microorganismos es bien conocido, se han generado resultados que confirman su actividad antimicrobiana. Estudios *in vitro* han comprobado la actividad de diferentes partes de la planta sobre los microorganismos patógenos así como la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. (Martin *et al.*, 2013). Estudios bacteriológicos demostraron la actividad antimicrobiana de los extractos de semillas de moringa, los cuales floculan bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su acción bacteriostática consiste en la disrupción de la membrana celular por inhibición de enzimas esenciales. El principal ingrediente responsable de dicha actividad antimicrobiana es el 4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocionato de bencilo, el cual tiene acción bactericida sobre varias especies patógenas, incluyendo aislados de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Legionella* resistentes a antibióticos (Martin *et al.*, 2013).

Viera *et al.* (2010) reportan que los principios activos contenidos en las semillas de moringa, inhibieron satisfactoriamente el crecimiento de *Mycobacterium phlei* con 40 micromoles / L y la de *Bacillus subtilis* con 56 micromoles / L. Estos mismos autores indican que las sustancias bactericidas en las semillas de moringa como *pterygospermin*, *moringine* y los glucósidos 4- ( $\alpha$ -L-ramnosiloxi) -isotiocianato de bencilo y 4- ( $\alpha$ -L-ramnosiloxi) –fenilacetnitrilo han demostrado que inhiben principalmente a *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Shigella* y *Streptococcus*. Los efectos del extracto vegetal pueden explicarse por la presencia de un amplio espectro de sustancias bactericidas, o por la acción de toxinas producidas por la planta. Por otra parte Raj *et al.* (2011) reportan que los extractos acuosos de semilla de *Moringa oleifera* inhibieron *Staphylococcus aureus* (19-25 mm), *Vibrio cholerae* (21,25 mm) y *Escherichia coli* (16-23 mm) a una concentración de 50, 100, 150, 200  $\mu$ L / placa. También mostró una fuerte actividad contra *Bacillus subtilis* (18.75 mm), *Staphylococcus aureus* (18 mm) y *Fusarium solani* (30.5 mm) a una concentración de 15 mg/mL.

Saadabi y Zaid (2011) mencionan que la actividad antimicrobiana del extracto también podría deberse a la presencia de compuestos lipofílicos que podrían unirse dentro de la membrana citoplásmica. Martin *et al.* (2013) indica que existe actividad antimicrobiana de extractos de semillas de *M. oleifera* sobre las bacterias *Salmonella typhii*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, causantes de la fiebre tifoidea, el cólera y la gastroenteritis, respectivamente.

Varios tipos de antibióticos, tradicionalmente estreptomina y penicilina, se han agregado a los extensores del semen para controlar el crecimiento bacteriano, pero algunas bacterias han demostrado resistencia a estas moléculas. La combinación de gentamicina (500 g/mL), tilosina (100 g/mL) y lincoespectina (300 y 600 g/mL, respectivamente) fueron antibióticos efectivos para

controlar las bacterias. Sin embargo, esta combinación no fue capaz de eliminar completamente el micoplasma del semen congelado artificialmente infectado (Gloria *et al.*, 2014)

La criopreservación, más que el enfriamiento, parece estar relacionada con un aumento en el crecimiento bacteriano en muestras sin antibióticos (muestras testigo). Este hallazgo confirmó la incapacidad de la reducción de la criopreservación o el crecimiento de las bacterias. Además, el procedimiento de descongelación parecía ser el punto en el que se replicaban las bacterias. Estos hallazgos podrían ser comparables con las condiciones en el campo. En consecuencia, cuando una bacteria es resistente al antibiótico, la descongelación del semen podría considerarse un punto crucial (Gloria *et al.*, 2014).

En la Tabla 3 se muestra la capacidad antioxidante del extracto de semilla de *M. oleifera*, la cual mostró un incremento estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en el efecto reductor oxidante en el plasma del semen criopreservado de ovino en los tratamientos de concentraciones de 10.0 y 50.0 mg/mL. Estos dos tratamientos no mostraron una diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) con respecto a los tratamientos testigo y de 1.0 mg/mL. Sin embargo, el tratamiento control tuvo menor efecto antioxidante y mostró diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) siendo diferente con respecto a los tratamientos de 50.0 y 10.0 mg/ mL.

**Tabla 3.** Efecto de la capacidad antioxidante del extracto de semilla de *M. oleifera* en el semen criopreservado de ovino (Media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamientos	Efecto Antioxidante FRAP <sup>1</sup> (mmol ET)
Testigo	3325.0 $\pm$ 552.9 <sup>ab</sup>
Control	2898.1 $\pm$ 979.0 <sup>b</sup>
50.0 mg/mL	3537.5 $\pm$ 249.4 <sup>a</sup>
10.0 mg/ mL	3364.3 $\pm$ 242.5 <sup>a</sup>
1.0 mg/mL	3322.5 $\pm$ 477.2 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup> Poder reductor férrico (FRAP), medido en milimoles equivalentes de Trolox (mmol ET).

<sup>a, b</sup> Letras diferentes (entre columnas) indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

Las diferentes partes de *M. oleifera* contienen más de 40 compuestos con actividad antioxidante (Martin *et al.*, 2013). Entre los compuestos con este potencial, ya sea por actividad de captación de radicales libres o por capacidad de formación de quelatos de iones metálicos identificados en las semillas de *M. oleifera*, se encuentran compuestos fenólicos como el kaempferol y los ácidos gálico y elágico. Estudios *in vitro* han demostrado que los extractos de hojas, frutos y semillas de *M. oleifera*, debido a sus propiedades antioxidantes, protegen las células vivas del daño oxidativo del ADN asociado con el envejecimiento, el cáncer y las enfermedades degenerativas; también se indicó que dichos extractos inhiben la peroxidación lipídica y el crecimiento bacteriano, y se propuso a *M. oleifera* como un candidato ideal para las industrias farmacéutica, nutracéutica y de alimentos funcionales. Por otro lado la fracción extraída con acetato de etilo, la cual es rica en ácidos fenólicos y flavonoides, presenta el mayor poder antioxidante entre las fracciones extraídas con distintos disolventes (Martin *et al.*, 2013).

Los extractos de semillas de *M. oleifera* pueden ser usados en terapias antioxidantes para disminuir la genotoxicidad del arsénico y otros metales pesados, cuyos mecanismos de acción carcinogénica están relacionados con especies reactivas de oxígeno. El polvo de tales semillas reduce la concentración de arsénico y protege contra las alteraciones hematológicas y el estrés oxidativo inducidos por ese metal. Los coagulantes naturales de la semilla de *M. oleifera*, su alto contenido de aminoácidos como metionina y cisteína, y de antioxidantes como las vitaminas C y E, y  $\beta$ -caroteno son los responsables de la remediación del estrés oxidativo (Martin *et al.*, 2013).

Luqman *et al.* (2012) indican que la *M. oleifera* contiene actividad antioxidante y por lo tanto suprime la formación de radicales libres. Además, encontraron que el extracto de *M. oleifera* activa las enzimas antioxidantes, e inhibe las oxidasas. Asimismo, Peixoto *et al.* (2011) y El-Harairy *et al.* (2016) mencionan que la *M. oleifera* es un antioxidante natural por su capacidad para proteger organismos y células de daño oxidativo del ADN asociado al envejecimiento, cáncer, enfermedades degenerativas, debido a la presencia de compuestos polifenólicos, que pueden ser los responsables del potencial antioxidante general de la *M. oleifera*.

Dentro de los principales factores perjudiciales durante la criopreservación figuran los ocasionados por los radicales libres que se forman en este proceso, siendo los responsables del daño oxidativo. El daño a bajas temperaturas ocurre en la membrana plasmática, en la membrana acrosomal, en la mitocondria y en la vaina del axonema y aunque fisiológicamente se forman radicales libres durante la respiración mitocondrial, es importante tener en cuenta que las anomalías en la mitocondria pueden contribuir a la producción excesiva de los radicales libres (Cabrera *et al.*, 2010; Membrillo *et al.*, 2011; El-Sheshtawy *et al.*, 2017). La generación de ROS, inducidas por el proceso de crioconservación, puede ser responsable del daño al espermatozoide en mamíferos. La producción de ROS se ha asociado con la reducción de la motilidad de los espermatozoides, y disminuye la capacidad para la fusión espermatozoide-ovocito. Los espermatozoides son sensibles a la peroxidación lipídica debido a su alto contenido en grasas poliinsaturadas (Michael *et al.*, 2007; Peris *et al.*, 2007).

El proceso de peroxidación induce alteraciones estructurales, un proceso rápido y pérdida irreversible de la motilidad, un cambio profundo en el metabolismo y un aumento en la tasa de liberación de componentes intracelulares (Peña *et al.*, 2003).

El espermatozoide está protegido por un sistema antioxidante en el plasma seminal, en las membranas y en el citoplasma, pero este sistema se elimina parcialmente y se altera severamente durante la crioconservación. La elección del crioprotector es fundamental para el éxito de la congelación del espermatozoide. La yema de huevo ha sido la elección preferida para suplementar extensores en muchas especies. Sin embargo, la yema de huevo podría presentar contaminación, algunos componentes podrían afectar negativamente la crioconservación del espermatozoide y la

estandarización es desafiada por la variabilidad entre lotes (Mata-Campuzano *et al.*, 2015). Sin embargo, Cámara *et al.* (2011) demostraron que los agregados de lípidos en la yema de huevo se adsorben a la membrana espermática y previene la aparición del daño peroxidativo. La membrana plasmática del espermatozoide de mamífero es particularmente rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Este predominio de PUFA hace que los espermatozoides sean altamente susceptibles a los lipoperóxidos (LPO), que se produce como resultado de la oxidación de la membrana lipídica, por moléculas de oxígeno parcialmente reducida tales como superóxido, hidróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo (Bucak *et al.*, 2009). Bucak *et al.* (2007) mencionan que la membrana de espermatozoides de carnero tiene una particular composición que dificulta una congelación exitosa. Adicionalmente, la composición lipídica del espermatozoide, la membrana es una determinante importante en la motilidad, viabilidad, peroxidación lipídica y el choque frío del espermatozoide. Las diferencias en la composición de ácidos grasos y los índices de clase de lípidos en los espermatozoides entre las especies son factores importantes en la congelación de los gametos masculinos. La presencia de altas concentraciones de PUFA dentro de la estructura lipídica de las células espermáticas requiere sistemas antioxidantes eficientes para defenderse del daño peroxidativo y disfunción asociada del espermatozoide (Bucak *et al.*, 2007; Peris *et al.*, 2007). Los sistemas antioxidantes protectores en el diluyente de los espermatozoides son principalmente de origen citoplasmático. Esto consiste en que desechan la mayor parte de su citoplasma durante la etapa terminal, de diferenciación, y carecen de componentes citoplásmicos que contiene antioxidantes que contrarrestan los efectos dañinos de los ROS y de la peroxidación lipídica. Debido a esto, los espermatozoides son susceptibles a la peroxidación lipídica durante la criopreservación y descongelación (Bucak *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2013).

La criopreservación también genera productos físicos, químicos, estrés en la membrana espermática, asociado a estrés oxidativo y ROS generados por espermatozoides muertos y por el oxígeno atmosférico o molecular del medio ambiente, induciendo disminuciones en la motilidad, integridad de la membrana y potencial de fertilización de los espermatozoides. La liberación de oxígeno molecular, formando bajo concentraciones de ROS, se requiere para el mantenimiento de la fertilización y capacitación / reacción acrosomal de los espermatozoides. Un exceso de ROS perjudica la motilidad y capacidad de fertilización (Bucak *et al.*, 2007). La sobreproducción de ROS en los espermatozoides conduce a una alteración de la estructura de la matriz lipídica. Estos ataques, en última instancia, conducen a la alteración de la función del espermatozoide (motilidad espermática, integridad de membrana funcional y fertilidad), daño al espermatozoide, a través del estrés oxidativo y la producción de aldehídos (Bucak *et al.*, 2009). Las moléculas antioxidantes podrían reducir el impacto de estrés oxidativo, y así mejorar la calidad del semen después del deshielo. El objetivo de los tratamientos antioxidantes no debe ser la eliminación completa de ROS. Los mecanismos de los antioxidantes juegan un papel importante en el control fisiológico

de las funciones espermáticas en los mamíferos, cuando los ROS se encuentran en bajas concentraciones, actúan como mediadores de las funciones normales de los espermatozoides, mientras cuando se producen en exceso son altamente tóxico para la célula. Varios agentes antioxidantes, tales como vitaminas E y C, catalasa, dimetilsulfóxido, taurina, hipotaurina y N-acetilcisteína han sido probado *in vitro* o en estudios *in vivo* relacionados con humanos, semen de bovino, jabalí, conejo y carnero con eficacia controvertida (Michael *et al.*, 2007; Gürler *et al.*, 2016). Bucak *et al.* (2007) indican que el sistema antioxidante que comprende GSH, GSH-Px, CAT y SOD, se ha descrito que funciona como defensa contra la peroxidación en el semen, y son importantes para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides. Se han realizado estudios sobre diluyentes en el semen de borrego, incluidos la taurina, la trehalosa, selenio, y compuestos surfactantes, para mejorar motilidad, viabilidad e integridad de la membrana de espermatozoides post-descongelación (Bucak *et al.*, 2007). El GSH es una molécula ubicua encontrada en rango de mM en varias celdas, y es capaz de reaccionar con muchos ROS directamente. El GSH es también un cofactor para GSH-Px que cataliza la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tóxico e hidroperóxidos, que protegen las células de mamíferos de estrés oxidativo, y el nivel intracelular de tioles en el espermatozoide que se reduce por la criopreservación (Bucak *et al.*, 2007). Bucak *et al.* (2007) mencionan que la vitamina E es el principal componente del sistema antioxidante de los espermatozoides, y es uno de los principales protectores de membrana contra las ROS y la peroxidación lipídica. Los ROS en el eyaculado son producidos por los espermatozoides por sí mismos y por los leucocitos, que son un infiltrado en el semen. Los espermatozoides son vulnerables al daño de los ROS debido a su alto contenido en grasas poliinsaturadas. El uso de antioxidantes podrían reducir el impacto negativo de las ROS a los espermatozoides (Michael *et al.*, 2007).

Los resultados del presente trabajo indican un efecto antioxidante de la adición de *M. oleifera* en la concentraciones de 1.0, 10.0 y 50.0 mg/mL, lo cual mejora las diferentes características espermáticas evaluadas en este estudio. Mara *et al.* (2007) mencionan que un factor limitante en la preservación del semen es su exposición a la luz durante la manipulación antes del almacenamiento, dando lugar a la formación de ROS con daño al espermatozoide, a la motilidad celular y la integridad genómica. Este problema puede superarse mediante la adición de antioxidantes en el medio de conservación. La *M. oleifera* puede ayudar a limitar estos efectos negativos mencionados por Mara *et al.* (2007).

La concentración espermática no presentó diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos ( $P > 0.05$ ). Respecto a la motilidad progresiva y rápida el tratamiento de 10.0 mg/mL presentó mayor motilidad progresiva y rápida ( $P < 0.05$ ), el resto de los tratamientos fueron similares.

En relación a la evaluación post-criopreservación de las características espermáticas con diferentes concentraciones de *M. oleifera*, en la Tabla 4 se observan los resultados. Referente a la concentración espermática no presentó diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos ( $P > 0.05$ ). Con respecto a esto, es lo que se esperaba pues la *M. oleifera* no debe de tener ningún efecto en la concentración. Respecto a la motilidad progresiva y rápida, tanto los tratamientos testigo, control y 50.0 y 1.0 mg/mL no mostraron una diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre ellos. El tratamiento de 10.0 mg/mL mostró diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), con respecto al tratamiento control, y siendo el tratamiento 10.0 mg/mL el que presentó mayor motilidad progresiva y rápida con respecto a los demás tratamientos.

**Tabla 4.** Efecto del extracto de semilla de *Moringa oleifera* sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamiento	Concentración espermática $10^9$ /mL	Motilidad Progresiva (%)	Motilidad Rápida (%)
Testigo	0.102 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	29.52 $\pm$ 6.94 <sup>ab</sup>	7.15 $\pm$ 1.94 <sup>ab</sup>
Control	0.098 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	27.10 $\pm$ 17.60 <sup>b</sup>	6.82 $\pm$ 6.29 <sup>b</sup>
50.0 mg/mL	0.099 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	33.00 $\pm$ 14.90 <sup>ab</sup>	8.70 $\pm$ 7.49 <sup>ab</sup>
10.0 mg/mL	0.108 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	40.75 $\pm$ 16.12 <sup>a</sup>	12.80 $\pm$ 10.90 <sup>a</sup>
1.0 mg/mL	0.100 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	31.55 $\pm$ 5.59 <sup>ab</sup>	6.15 $\pm$ 1.94 <sup>ab</sup>

<sup>a, b</sup> Letras diferentes (entre columnas) indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

En la Tabla 5 se presentan los porcentajes de viabilidad de membrana, integridad acrosomal y actividad mitocondrial obtenidos en los espermatozoides en los distintos tratamientos. Los tratamientos de 1.0 y 10.0 mg/mL mostraron viabilidad de membrana significativamente superior que el grupo control. Los tratamientos de 50.0 mg/mL y testigo no presentaron una diferencia estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ) siendo similar a los demás tratamientos. Con respecto al porcentaje de acrosomas intactos, se puede observar que el tratamiento que presentó un mayor porcentaje de integridad de acrosoma fue el tratamiento de 1.0 mg/mL y mostraron diferencia estadísticamente significativa con los tratamientos control y testigo respectivamente y siendo similar a los tratamientos 10.0 y 50.0 mg/mL. El porcentaje de mitocondrias activas mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos control y de 10.0 mg/mL, siendo este último el que presentó mayor porcentaje de mitocondrias activas, pero sin tener un efecto estadísticamente significativo ( $P > 0.05$ ) con los tratamientos testigo, 1.0 y 50.0 mg/mL.

**Tabla 5.** Efecto de la adición del extracto de semilla de *Moringa oleifera* en el semen criopreservado de ovino sobre la viabilidad de la membrana, viabilidad del acrosoma y la actividad mitocondrial (Media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamiento	Viabilidad de membrana (%)	Integridad acrosomal (%)	Actividad mitocondrial (%)
Testigo	83.0 $\pm$ 12.15 <sup>ab</sup>	36.6 $\pm$ 13.97 <sup>c</sup>	93.3 $\pm$ 4.69 <sup>ab</sup>
Control	69.4 $\pm$ 25.74 <sup>b</sup>	38.0 $\pm$ 8.37 <sup>bc</sup>	87.6 $\pm$ 10.07 <sup>b</sup>
50.0 mg/mL	77.7 $\pm$ 6.95 <sup>ab</sup>	47.5 $\pm$ 15.16 <sup>ab</sup>	94.6 $\pm$ 5.67 <sup>ab</sup>
10.0 mg/mL	84.1 $\pm$ 12.93 <sup>a</sup>	54.1 $\pm$ 6.87 <sup>ab</sup>	95.5 $\pm$ 3.42 <sup>a</sup>
1.0 mg/mL	85.8 $\pm$ 9.76 <sup>a</sup>	56.6 $\pm$ 15.71 <sup>a</sup>	90.0 $\pm$ 11.75 <sup>ab</sup>

<sup>a, b, c</sup> Letras diferentes (entre columnas) indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

Se sabe que la criopreservación daña el espermatozoide en una variedad de formas lo que resulta en daños letales y modificaciones responsables de una corta esperanza de vida de las células espermáticas. El daño oxidativo y osmótico, durante los procesos de congelación y descongelación alteran los lípidos y composición proteica; disminuye la motilidad y la viabilidad; causa daño a mitocondrias, acrosomas y colas del espermatozoide; y aumenta la fragmentación del ADN. Por otra parte, durante el proceso de congelación y descongelación induce la reorganización de las membranas lipídicas, lo que resulta en mayor fluidez y calcio intracelular, que eventualmente inicia los cambios parecidos a la capacitación en los espermatozoides criopreservados (criocapacitación) (Cabrera *et al.*, 2010; Membrillo *et al.*, 2011; El-Sheshtawy *et al.*, 2017; Mostek *et al.*, 2017).

Vichas *et al.* (2017) mencionan que, durante el procedimiento de congelación, el área de temperatura entre -10 y -25 °C es crucial para los espermatozoides de carnero. Además, las tasas rápidas de congelación inducen la muerte del espermatozoide, mientras que los espermatozoides de borrego son particularmente susceptibles al shock por frío, debido a que tienen niveles bajos de colesterol y una alta relación de ácidos grasos insaturados a saturados.

Jafaroghli *et al.* (2011) reportan en su estudio, donde valoraron características espermáticas después de la congelación y la descongelación, una motilidad en borrego de (60.6  $\pm$  1.9 %), y con una viabilidad (60.6  $\pm$  2.5 %) e integridad de membrana (58.2  $\pm$  2.1 %). Alcay *et al.* (2015) reportan una motilidad progresiva de 45.7 % y 67.9 % post-descongelación del semen de borrego. Los resultados de este estudio muestran que la motilidad post-descongelación fue más baja en relación a la reportada por Jafaroghli *et al.* (2011) y similar con la que reportan Alcay *et al.* (2015) pero en cuanto a integridad de membrana fue superior al estudio de Jafaroghli *et al.* (2011). Los resultados positivos en este estudio sugieren que se debe a que los tratamientos en base al extracto de semilla de *M. oleifera* hubo una inhibición de bacterias y tuvo un efecto antioxidante en el semen lo cual ayudó a preservar las diferentes características espermáticas en este caso la viabilidad de membrana.

Peixoto *et al.* (2011) y El-Harairy *et al.* (2016) indican que tanto el extracto de la hoja como la semilla contienen compuestos con amplio espectro de actividad antimicrobiana, capaz de inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas y negativas. En este estudio se encontró un efecto positivo de la adición del extracto de semilla de *M. oleifera* al semen criopreservado de ovino, ya que existió un grado de mejora en cuanto a la motilidad progresiva usando una concentración de 10.0 mg/mL, lo que quizá se debió a la capacidad antimicrobiana y antioxidante del extracto de *M. oleifera*. Sokunbi *et al.* (2015) encontraron un efecto positivo de la adición del extracto de *M. oleifera* en cuanto a la motilidad progresiva, ya que incrementó significativamente en semen de toro que contenía 12 mL de extracto crudo de *M. oleifera* en comparación cuando utilizaron 0.8 y 16 mL de extracto crudo de *M. oleifera*. Resultados similares reportó Ghodiah (2016) indicando un marcado aumento en la motilidad progresiva espermática en el semen de conejo extendido con Tris y suplementado con 2.0 o 4.0 mg de extracto de moringa. El-Harairy *et al.* (2016) mencionan que el extracto de *M. oleifera* puede tener impacto en la función del espermatozoide durante la crioconservación y reportan una motilidad progresiva 73.33 % de semen de carnero con una concentración de 1000 µg de *M. oleifera*.

Alcay *et al.* (2015) reportan en su estudio que los resultados post-criopreservación en cuanto a motilidad, viabilidad de la membrana plasmática, y daño en acrosoma fueron  $79.0 \pm 1.87$  %,  $89.2 \pm 1.24$  %, y  $7.6 \pm 0.60$  % respectivamente. Jerez *et al.* (2016) indican porcentajes donde se observó que la viabilidad de la membrana de los espermatozoides fue de  $65.40 \pm 6.10$  e integridad del acrosoma de  $60.40 \pm 9.1$  en semen de carnero post-criopreservado. Los resultados del presente estudio muestran que la viabilidad de la membrana post-descongelación son superiores a ambos estudios mencionados, y similar en cuanto a la integridad del acrosoma. Estos resultados positivos sugieren que se debe a que los tratamientos en base al extracto de semilla de *M. oleifera* mostró un efecto positivo ya que hubo una inhibición de bacterias y tuvo un efecto antioxidante en el semen lo cual ayudo a preservar las diferentes características espermáticas en este caso la viabilidad de membrana, integridad del acrosoma y la actividad mitocondrial.

Autores como Alcay *et al.* (2015) han reportado que la crioconservación es perjudicial para la viabilidad de la membrana de los espermatozoides de los mamíferos afectando la motilidad, la integridad acrosomal y el ADN. Específicamente, el semen de carnero ha demostrado ser más difícil para crioconservar comparado el semen de otros animales de granja. Cabrera *et al.* (2008) afirman que durante el proceso de criopreservación se produce una disminución aproximada del 50 % en la viabilidad espermática, debido principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica, ocurriendo cambios en la organización morfológica de las células, tales como la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular. En relación a lo anterior en el presente estudio se observó que al adicionar 1.0, 10.0 y 50.0 mg/mL del extracto de semilla de *M. oleifera* en el semen de borrego mejoró estas variables indicando un

efecto protector debido a que los resultados sugieren que el extracto de semilla de *M. oleifera* tuvo un efecto positivo en la inhibición de bacterias y un efecto antioxidante preservando estas características espermáticas.

Finalmente en la Tabla 6 se muestra la capacidad de fecundación analizada usando el porcentaje de segmentación utilizando espermatozoides de borrego en ovocitos de vaca mediante la FIV heteróloga, la cual presentó cigotos con dos o más células en cada uno de los tratamientos con extracto de semilla de *M. oleifera* en las diferentes concentraciones utilizadas en este estudio. La tasa de fecundación en el tratamiento control fue menor ( $P < 0.05$ ) en comparación con los tratamientos testigo y con el tratamiento de 10.0 mg/mL. Los tratamientos de 50.0 y 1.0 mg/mL no mostraron diferencia con los demás tratamientos ( $P > 0.05$ ).

**Tabla 6.** Efecto de la adición del extracto de semilla de *Moringa oleifera* sobre la capacidad de fecundación del semen criopreservado de ovino mediante la fertilización *in vitro* heteróloga (Media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamientos	Porcentaje de segmentación (n)
Testigo	82.50 $\pm$ 9.97 <sup>a</sup> (262/315)
Control	73.77 $\pm$ 9.10 <sup>b</sup> (228/305)
50.0 mg/mL	78.24 $\pm$ 14.72 <sup>ab</sup> (245/305)
10.0 mg/ mL	82.99 $\pm$ 10.06 <sup>a</sup> (255/304)
1.0 mg/mL	81.47 $\pm$ 13.50 <sup>ab</sup> (250/302)

<sup>a, b</sup> Letras diferentes (entre columnas) indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

La importancia sobre la FIV heteróloga queda confirmada por los hallazgos sobre la capacidad de fertilización evaluada mediante esta técnica, con el uso de espermatozoides de ovino para inseminar ovocitos maduros de bovino *in vitro*. La razón detrás de esto es principalmente la relativa escasez de disponibilidad de ovarios de borrega. Longobardi *et al.*, (2017) informaron que las tasas de penetración espermática y de segmentación embrionaria después de la FIV heteróloga están altamente correlacionadas con aquellas observadas después de la FIV homóloga. Además, estos mismos autores mencionan que es bien sabido que los espermatozoides adquieren capacidad de fertilización durante la capacitación y por lo tanto, la evaluación de la penetración de ovocitos, así como las tasas de escisión, son de suma importancia (Longobardi *et al.*, 2017).

Gloria *et al.* (2014) mencionan que por la contaminación bacteriana del semen es un determinante importante de la calidad del semen, ya que incita a la producción de macrófagos y granulocitos polimorfonucleares como primera línea de defensa contra estos organismos. Esta entrada conduce a la producción de ROS, que son perjudiciales para la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides. Además, la presencia de microorganismos, especialmente bacterias, puede afectar la fertilización directamente, o puede hacerlo por la inducción de la reacción del acrosoma. En seres humanos, se descubrió que *E. coli* afectaba la motilidad del espermatozoide tanto por adherencia como por aglutinación, o por la inducción de cambios estructurales en el semen, viabilidad de la membrana y viabilidad del acrosoma (Gloria *et al.*, 2014). Los resultados del

presente estudio sugieren que los tratamientos en base al extracto de semilla de *M. oleifera* mostró un efecto positivo, debido a la inhibición de bacterias y efecto antioxidante ya que protegieron a la membrana espermática del daño oxidativo, por lo que este efecto tuvo un impacto ya que mejoró la motilidad progresiva de los espermatozoides, además ayudó a preservar las diferentes características espermáticas, por consiguiente se obtuvieron altas tasas de fertilización.

En el estudio de García-Álvarez *et al.* (2009) utilizaron ovocitos de vaquilla madurados *in vitro* (n = 716) se inseminaron con semen de borrego descongelado, cultivado *in vitro* durante 40 h. En general, al momento de la descongelación, la variabilidad entre los machos con respecto a la calidad del espermatozoide fue alta. A pesar de esta variabilidad, mencionan que no hubo diferencias ( $P < 0.05$ ) entre grupos de fertilidad. Las tasas de fertilidad *in vitro* heterólogas variaron de 31 % hasta el 59 % con un valor medio del 47 % lo cual no generó diferencias significativas entre los machos para la FIV heteróloga *in vitro*. Sin embargo, los machos clasificados como de alta fertilidad (55.11 %  $\pm$  3.06 %) tuvo una fertilidad *in vitro* significativamente mayor que las de baja fertilidad (38.90 %  $\pm$  3.06 %). Los resultados del presente estudio sugieren que los tratamientos en base al extracto de semilla de *M. oleifera* mostró un efecto positivo, debido a la inhibición de bacterias, efecto antioxidante, todo esto ayudó a preservar las diferentes características espermáticas, además de los medios utilizados en este estudio para realizar la FIV *in vitro* se obtuvieron altas tasas de fertilización comparadas con el trabajo de García-Álvarez *et al.* (2009). Estos mismos autores mencionan que los embriones híbridos pueden ocurrir casi exclusivamente entre especies estrechamente relacionadas. Además reportan en su trabajo produjo embriones híbridos a las ocho etapas celulares por FIV de ovocitos bovinos madurados *in vitro* con semen de borrego y otros obteniendo embriones híbridos a la misma etapa utilizando ovocitos bovinos y espermatozoides de diferentes especies de antílopes (García-Álvarez *et al.*, 2009).

Sessions-Bresnahan *et al.* (2014) reportaron que utilizaron ovocitos bovinos fertilizados con espermatozoide de equino mostraron pronúcleos masculinos y femeninos en 22 horas, y formación de pronúcleos a 24 y 26 horas después de la incubación. Los embriones estuvieron presentes antes de las 26 horas. Un retraso en la formación de pronúcleos no fue aparente.

Sessions-Bresnahan *et al.* (2014) indican que para una fertilización exitosa, los espermatozoides deben someterse a una capacitación y reacción acrosomal en el momento correcto. La capacitación es una serie de funciones bioquímicas y modificaciones funcionales, incluida la remoción de acrosomas, factor estabilizador de la membrana plasmática, flujo de salida de colesterol, aumento de bicarbonato intracelular ( $\text{HCO}_3$ ) y concentraciones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fosforilación de proteínas, y polimerización de actina. Después de estos cambios, el espermatozoide puede adquirir motilidad hiperactiva, y es capaz de unirse a la Zona pelúcida (ZP)

del ovocito, donde sufre la reacción acrosomal, penetra la ZP y finalmente se fusione con el oolemma. Después de la capacitación, el espermatozoide debe adquirir hiperactividad. La motilidad, unida a la ZP del ovocito, se somete al acrosoma reacciona, penetra en la ZP, y finalmente se fusiona al oolemma. En los sementales, el éxito de la FIV es pobre e inconsistente. La razón de esto es aún desconocida, es posible que el espermatozoide no se capacita adecuadamente o exhibe motilidad hiperactiva insuficiente cuando se capacita *in vitro* (De Vasconcelos *et al.*, 2016). Sessions-Bresnahan *et al.* (2014) mencionan que la reacción acrosomal ocurre solo en espermatozoides capacitados. La reacción acrosomal libera enzimas hidrolíticas acrosómicas que digieren un agujero a través de la ZP. El espermatozoide entra en el espacio peri vitelino PV, se une y se fusiona con el oolemma, y dispara la activación de ovocitos. La inducción de la capacitación y la reacción acrosomal *In vitro* es crítico para la FIV. Por otra parte Taberner *et al.* (2010) mencionan que los ovocitos de bovino libres de ZP fueron inseminados con espermatozoides de burro, los cuales obtuvieron mayores tasas de penetración en muestras de semen frescas y muestras congeladas-descongeladas, que con espermatozoides de bajo volumen para muestras frescas y congeladas-descongeladas, muestras respectivamente. Se asociaron espermatozoides de alta viabilidad con un mayor número de espermatozoides penetrados por ovocito ( $P > 0.05$ ) que el espermatozoide tanto para fresco como para muestras congeladas-descongeladas. En consecuencia, las muestras de espermatozoides mostraron mayores porcentajes de monospermia y se observó que los espermatozoides de burro podían fusionarse con el oolema, se dé condense y se formaran pronúcleos masculinos. Los ensayos de penetración del espermatozoide se pueden evaluar mediante varias funciones simultáneamente, por ejemplo; motilidad, capacidad de someterse a una reacción acrosomal, penetración de ovocitos y descondensación de ADN (Taberner *et al.*, 2010).

Comizzoli *et al.* (2001) mencionan que la capacidad de fertilización depende de la suplementación del medio de FIV y la muestra de semen, sin embargo, la FIV heteróloga con ovocitos sin zona pelúcida no logra medir el potencial de penetración. Los espermatozoides con reacción acrosomal podrían penetrar en los ovocitos sin ZP, ya que hay una correlación positiva entre las tasas de FIV heteróloga y FIV homóloga, la hipótesis de que los espermatozoides capacitados penetran principalmente en ovocitos sin ZP. Además, los espermatozoides unidos a los ovocitos sin ZP indicaron que los espermatozoides fueron capacitados.

Pruebas de FIV heteróloga que utilizan ovocitos sin ZP se han utilizado para evaluar al espermatozoide. Sin embargo, se han utilizado pruebas de hámster sin ZP para estudiar la relación con fertilidad *in vivo*. Sin embargo, la zona libre en ensayo de hámster evalúa solo una parte del proceso de fertilización, ya que no mide la capacidad de espermatozoides para unir y penetrar en la zona pelúcida y más adelante en la tasa de escisión (García-Álvarez *et al.*, 2009). En el presente

trabajo se usó ovocitos con ZP, lo que es similar a lo que pasa *in vivo*, y por lo tanto, es una prueba adecuada para medir capacidad de fecundación.

El uso de FIV heteróloga en especies silvestres tiene más ventajas sobre FIV homóloga, como la accesibilidad a ovocitos y la posibilidad del desarrollo de sistemas de maduración *in vitro*. Debido a la especificidad de la ZP, la aplicación de FIV heteróloga generalmente se limita a una relación filogenéticamente relacionada en especies. La FIV heteróloga ha tenido éxito cuando se incuban conjuntamente ovocitos y espermatozoides de gato y tigre, bovinos y caprinos, carneros o antílopes y ovejas y ciervos respectivamente. A veces, ha sido necesario eliminar la ZP para lograr una FIV heteróloga. La ausencia de ZP elimina la especificidad de la especie y proporciona información sobre la reacción acrosomal y la capacidad de los espermatozoides para fusionarse con la membrana vitelina. Por otro lado la eliminación de ZP impide obtener información sobre las funciones básicas de los espermatozoides, Como la interacción esperma-zona y la penetración (Sánchez-Calabuig *et al.*, 2015).

La formación de pronúcleos masculinos depende de la naturaleza del ovocito, pero también de las características estructurales de la cromatina nuclear del espermatozoide. Este proceso de condensación se inicia en el testículo. Durante la espermatogénesis, las histonas somáticas, ricas en lisina, son reemplazados por pequeñas proteínas altamente básicas conocidas como protaminas que contienen gran número de residuos de arginina y cisteína, este último se une a  $Zn^{2+}$  a través de su grupo tiol. A medida que los espermatozoides migran a través del epidídimo, los grupos tiol de la cisteína comienzan a oxidarse para formar enlaces disulfuro. Este proceso se completa después de la eyaculación, cuando el zinc presente en el plasma seminal se reduce gradualmente durante el proceso de la capacitación, este facilita la formación de enlaces disulfuro adicionales conduciendo a una alta cromatina estable. Cierta grado de compacidad es necesario para el ADN transitorio, así como para la inactivación y protección. Sin embargo, la hipersistencia puede conducir a un retraso en la formación pronuclear y muerte embrionaria temprana (Sánchez-Calabuig *et al.*, 2015)

La interacción y el éxito de la fertilización no solo dependen del reconocimiento entre los receptores de gametos, cuyas regiones conservadas tienen pocas probabilidades de ser abundantes entre especies filogenéticamente distantes, sugiere que otros factores, como el empuje físico o aquellos capaces de reducir la especificidad de la ZP puede facilitar la interacción entre estos. El empuje parece el más obvio factor que está relacionado con la motilidad del espermatozoide (Sánchez-Calabuig *et al.*, 2015).

En el estudio de Sánchez-Calabuig *et al.* (2015) revelaron una característica interesante que también puede contribuir a los valores de interacción observados en la FIV heteróloga, el estado de la cromatina en espermatozoides congelados-descongelados, mostraron valores de interacción

más altos que los espermatozoides frescos, cuando se incubaron con ovocitos de bovino, también mostró una cromatina más estable. Esta observación sugiere que el estado de la cromatina del espermatozoide puede influir en la interacción e incluso penetración de la ZP. En este sentido, los espermatozoides adheridos a la ZP presentaron niveles más bajos de la fragmentación del ADN y propusieron que una estructura de cromatina estable proporciona al espermatozoide rigidez para facilitar la interacción y penetración (Sánchez-Calabuig *et al.*, 2015).

De Vasconcelos *et al.* (2016) informaron que la sobreproducción de ROS y estrés oxidativo, podría alterar la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide necesaria para la reacción acrosomal (AR) y procesos de penetración de ovocitos. La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol y derivados) es un lipídico soluble antioxidante que suprime la peroxidación de lípidos de la membrana, mejorando así la motilidad del espermatozoide, un requisito esencial para la fertilización de ovocitos. El  $\alpha$ -tocoferol estabiliza las membranas para formar complejos con componentes lipídicos de membrana que tienen una tendencia a desestabilizar la estructura de dos capas, contrarrestando así sus efectos y haciendo que la membrana sea más estable, este antioxidante también puede prevenir la LPO por incorporación en las membranas de la célula. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la *M. oleifera* puede ofrecer un mecanismo similar a lo comentado por De Vasconcelos *et al.* (2016). La FIV heteróloga parece ser un método confiable para evaluar el espermatozoide después de los procedimientos de congelación-descongelación y para evaluar la respuesta de espermatozoides a diferentes tratamientos de capacitación *in vitro* (Comizzoli *et al.*, 2001). Los datos obtenidos para las características espermáticas se complementan con los datos obtenidos en la fertilización en este estudio.

Viera *et al.* (2010) y Sokunbi *et al.* (2015) indican que los extractos de hojas, semillas y raíces de *M. oleifera* han sido ampliamente estudiados, para muchos usos potenciales ya que tienen actividad antimicrobiana y antioxidante. Esto indica que la adición del extracto de la semilla de *M. oleifera* de 10 mg /mL compite favorablemente en la preservación de las diferentes características espermáticas de semen criopreservado de ovino, en este caso, a la adición de *M. oleifera*, debido a sus propiedades antioxidantes, pudo mejorar la motilidad progresiva, la viabilidad de la membrana de los espermatozoides, la integridad del acrosoma y disminuyó el daño a mitocondrias. Por todo lo anterior esta concentración de 10 mg/mL del extracto de semilla de *M. oleifera* tuvo un efecto positivo, ya que mostró capacidad fertilizante de los espermatozoides.

## 7. CONCLUSIÓN

Los valores obtenidos en este estudio tanto para la inhibición de UFC, la capacidad antioxidante, la motilidad progresiva y rápida, así como la viabilidad de la membrana, integridad del acrosoma, mitocondrias activas y la capacidad de fecundación de semen criopreservado de ovino mediante la FIV heteróloga a través de los tratamientos, indican que el extracto de semilla de *M. oleifera* sería una buena opción para estas variables. El nivel de inclusión de 10.0 mg/mL del extracto de *M. oleifera* mostró ser un buen sustituto del componente del antibiótico convencional en el diluyente del semen de ovino ya que por sus propiedades antimicrobianas disminuyó la formación de UFC y por su capacidad antioxidante preservó las diferentes características espermáticas del semen criopreservado de ovino y por lo anterior mejoró las tasas de fecundación.

## 8. REFERENCIAS

- Alcay, S, Berk Toker, M, Gokce, E Ustuner B., Tekin Onder, N, Sagirkaya H, Kemal Soyly M. 2015. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*, 71(2), 329–333.
- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B., El Amiri, B. 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 192, 6–17.
- Althouse, G.C., Kuster, C.E., Clark, S.G., Weisiger, R.M., 2000. Field investigations of bacterial contaminants and their effects on extended porcine semen. *Theriogenology*, 53(5):1167-1176.
- Ancco, E., Dipaz, D., Quispe, C., Oriundo, K., Mellisho, E. 2015. Desarrollo de embriones bovinos *in vitro* después de la fecundación de ovocitos usando semen de diferentes toros. *Spermova*. 5(1): 129-133.
- Baghshahi, H., Riasi, A., Mahdavi, A.H., Shirazi, A., 2014. Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. *Cryobiology* 69, 482–487
- Barakat, A.H., Wagdy, K.B., Himaidia, A.R. 2015. *Moringa oleifera* extract modulates the expression of fertility related genes and elevation of calcium ions in sheep oocytes. *Small Ruminant Research* 130: 67–75.
- Barszcz, K., Wiesetek, D., Wąsowicz, M., Kupczyńska, M.2012. Bull Semen Collection and Analysis for Artificial Insemination. *Journal of Agricultural Science* 4;3.
- Bastidas, P., Fernández, A., Trocóniz, J.1997. Fertilización *in vitro* heterologo en búfalos. *Arch. Latino America Produccion Animal*. 5(Supl. 1): 415-416.
- Bell, B., Schellevis, F., Stobberingh, E, Goossens, H., Pringle, M. 2014. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *Biomedcentral Infectious Diseases*. 14:13.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J.1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem*. 239: 70-76.
- Bó, G.A., Mapletoft, R.J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod*. 10:3, 344-348.

- Bucak, M.N., Ateşşahin, A., Varişli, O., Yüce, A., Tekin, N., Akçay, A., 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67, 1060–1067.
- Bucak, M, N., Sariözkan, S., Barbaros, P., Pınar, T., Ulutas, A., Akc. 2009. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Ruminant Research* 81: 90–95.
- Bury, M, N. 2014. Reproducción asistida en los animales domésticos. *Revista Científica*. 25: 1, 7-9.
- Cabrera, V.P., Pantoja, C.A. 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 Inv Vet*. 19 (2): 152-159.
- Cabrera, P.V., Yoong, W.K., Gamarra, G.L. 2009. Evaluación de la fertilidad *in vitro* del semen de toros jóvenes nacionales en ovocitos provenientes de ovarios de animales beneficiados. *Revista Inv Veterinaria*. 20 (1): 28-32.
- Cabrera, P., Orellana, J., Pantoja, C.A. 2010. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. *Rev Inv Vet*. 21 (2): 154-160.
- Cámara, D. R., Silva, S. V., Almeida, F. C., Nunes, J. F., & Guerra, M. M. P. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*, 76(2), 342–350.
- Chenoweth, P, J., McPherson, F, J. 2016. Bull breeding soundness, semen evaluation and cattle productivity. *Animal Reproduction Science* 169:32–36.
- Comizzoli, P., Mauget, R., & Mermillod, P. 2001. Assessment of *in vitro* fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes. *Theriogenology*, 56(2), 261–274.
- Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, B., Carluccio, A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology* 74: 424–435
- Córdova-Izquierdo, A., Saltijeral, O.J., Muñoz, R.M., Córdova, J.S., Córdova, J.A., Guerra, J.E. 2006. Efecto del método de obtención de semen de ovino sobre la calidad espermática. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 8: 8.
- Córdova-Izquierdo, A., Ruiz, C.G., Campos, V.X., Jiménez, M.S., Jiménez, C.A. 2011. Biotecnologías de reproducción animal con posibilidad de aplicación para optimizar el

potencial reproductivo y productivo de los animales. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias. 5(2):1-10

- David, I., Kohnked, G.L., Praudf, O., Plouarbouef, F., Degondg, P., Druartda, X. 2015. Mass sperm motility is associated with fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*. 161: 75–81.
- De Loos, FC, Vliet V, Van Maurk P, Kruip AM. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res*. 24(2): 197–204.
- De Paz, P., Estesó, M.C., Alvarez, M., Mata, M., Chamorro, C.A., Anel, L., 2010. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology* 74, 663–671.
- De Vasconcelos, Franco, J. S., Faheem, M., Chaveiro, A., & Moreira da Silva, F. 2016. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and freezing rates on the quality and heterologous *in vitro* fertilization capacity of stallion sperm after cryopreservation. *Theriogenology*, 86(4), 957–962.
- Dorado, J., Rodríguez, I., Hidalgo, M. 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.
- El-Harairy, M.A., Abdel-Khalek, A.E., Khalil, W.A., Khalifa, E.I., El-Khateeb, A.Y., Abdulrhmn, A.M. 2016. Effect of Aqueous Extracts of Moringa oleifera leaves or arctium lappa Roots on Lipid Peroxidation and Membrane Integrity of Ram Sperm Preserved at Cool Temperature. *Journal Animal and Poultry Production*. Vol.7 (12): 467- 473.
- El-Sheshtawy, R.I., El-Nattat, W.S. 2017. Impact of silymarin enriched semen extender on bull sperm preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 6(2): 81-84.
- Falchi, L., Galleri, G., Zedda, M, T., Pau, S., Bogliolo, L., Ariu, F., Ledda S. 2018. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science* 207: 1–6.
- García-Álvarez, O, Maroto-Morales A., Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M. R., Estesó, M. C., Pérez-Guzmán, M. D., & Soler, A. J. 2009. Heterologous *in vitro* fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 71(4), 643–650.
- Ghidiah, AE. 2016. Physiological studies on some factors affecting semen quality and preservation of rabbit bucks fed moringa. Ph.D. Thesis, Faculty of Agric., Mansoura Univ., Egypt.

- Gibbons, A., Cueto, M. 2009. Inseminación artificial con semen congelado en ovinos. Revista Presencia No.53. 32-34
- Gloria, A., Contri, A., Wegher, L., Vignola, G., Dellamaria, D., & Carluccio, A. 2014. The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen–thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 150(1-2), 15–23.
- Gürler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., & Bollwein, H. 2016. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562–571.
- Hafez, E.S., Hafez, B. 2001. *Reproduction in farm animals*. Seventh Edition. USA. ISBN. 0-083-30577-8 pp. 172-181.
- Hernández-Avilés, C., Serafini, R., Love, C. C., Teague, S. R., LaCaze, K. A., Lawhon, S. D., Varner, D. D. 2018. The effects of antibiotic type and extender storage method on sperm quality and antibacterial effectiveness in fresh and cooled-stored stallion semen. *Theriogenology*.
- Herradón, P.G., Quintela, L.A., Becerra, J.J., Ruibal, S., Fernández, M. 2007. Fecundación *in vitro*: alternativa para la mejora genética en bovinos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* Vol. 15.
- Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., Zamirid, M.J. 2011. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research* 96: 58–63.
- Jerez, R, González N, Olaciregui M, Luño V, Blas I. de, & Gil L. 2016. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 134, 34–38.
- Jiménez, P.R., Ramóna, M., García, O.A., Maroto, A.M., Del Olmo, E., Pérez, M.D, Bisbalb, A., Fernández, M.R., Garde, J.J., Soler, A.J.2012. Effect of semen collection method (artificial vagina vs. electroejaculation), extender and centrifugation on post-thaw sperm quality of Blanca-Celtibérica buck ejaculates. *Animal Reproduction Science* 132: 88– 95.
- Karayat, N., Katiyar, R., Chaudhary, G, R., Mishra, G, K., Balmurugan, B., Patel, M. 2016. Bull Breeding Soundness Examination For Better Quality Semen Production. *Indian Farmer* 3(2):121-125.
- Kouba, A.J., Atkinson, M.W., Gandolf, A.R., Roth, T.L. 2001. Species-Specific Sperm-Egg Interaction Affects the Utility of a Heterologous Bovine *In Vitro* Fertilization System for Evaluating Antelope Sperm. *Biology of Reproduction*. 65, 1246–1251.

- Leboeuf, B., Restall, B., Salomon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62:113-141.
- Ledesma, A., Manes, J., Cesari, A., Alberio, C., Hozbor, F. 2014. Electroejaculation Increases Low Molecular Weight Proteins in Seminal Plasma Modifying Sperm Quality in Corriedale Rams. *Reprod Dom Anim*: 10.1111/12279.
- Longobardi, V., Zullo, G., Salzano, A., De Canditiis, C., Cammarano, A., De Luise, L., Gasparini, B. (2017). Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*, 88, 1–8.
- Luqman, S, Srivastava S, Kumar R, Maurya AK, & Chanda D. 2012. Experimental Assessment of Moringa oleifera Leaf and Fruit for Its Antistress, Antioxidant, and Scavenging Potential Using In Vitro and In Vivo Assays. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–12.
- Mara, L., Dattena, M., Pilichi, S., Sanna, D., Branca, A., Cappai, P. 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal Reproduction Science* 102: 152–157.
- Marjuki. 2011. Hand-made Artificial Vagina for Goat Semen Collection in Artificial Insemination Program in the Villages. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*. 8)875-879.
- Martin, C, Martín G, García A, Fernández T, Hernández E, Puls J. 2013. Potenciales aplicaciones de Moringa oleifera. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*, Vol. 36, No. 2, 137-149, 137.
- Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Tamayo-Canul, J., Anel, L., de Paz, P., & Martínez-Pastor, F. 2015. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*, 83(4), 520–528.
- Membrillo, O.A., Córdova-Izquierdo, A., Gómez, J.J., Méndez, J.J., Juárez, H. 2011. Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. *Revista Veterinaria*. 22: 2, 85-90.
- Menchaca, A.C., Rubianes, E.A. 2004. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 16, 403–413.
- Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P., & Boscós, C. 2007. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 68(2), 204–212.

- Morrell, JM. 2016. Antimicrobials in Boar Semen Extenders – A Risk/ Benefit Analysis. *J Antimicro* 2: 107. doi:10.4172/2472-1212.1000107.
- Morrell, J. M., Núñez-González, A., Crespo-Félez, I., Martínez-Martínez, S., Martínez Alborcia, M.-J., Fernández-Alegre, E, Martínez-Pastor, F. 2019. Removal of bacteria from boar semen using a low-density colloid. *Theriogenology*, 126, 272–278.
- Nainga, S.W., Wahida, H., Azamc, K.M., Rosninaa, Y., Zukib, A.B., Kazhala, S., Bukara, M.M., Theind, M., Kyawe, T., Sane, M.M. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 122: 23–28.
- Nakagawa, T., Yokozawa, T., 2002. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 40, 1745–1750.
- Núñez-Gastélum JA, Hernández-Rivas R, Rodrigo-García J, de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Díaz-Sánchez ÁG, Muñoz-Bernal OA, Cota-Ruíz K, Martínez-Martínez A. 2018. Polyphenolics content, antioxidant and antimicrobial activities of *Ibervillea sonorae* root. *Biotecnia*. 20:23-27.
- Núñez-Gastélum JA, Rodríguez-Núñez JR, de la Rosa LA, Díaz-Sánchez AG, Alvarez-Parrilla E, Martínez-Martínez A, Villa-Lerma G. 2019. Screening of the physical and structural properties of chitosan-polycaprolactone films added with *Moringa oleifera* leaf extract. *Rev Mex Ing Quím.* 18:99-105.
- Papadopoulos, S., Theodosiadou, E., Kantas, D., Valasi, I. 2015. The application of *in vitro* fertilization techniques for the evaluation of ram fertility. *Journal Hellenic Veterinary Medicine Social.* 66(2): 63-69.
- Peixoto, J.R., Silva, G.C., Costa, R.A., Fontenelle, J.L., Vieira, G.H., Filho, A.A., Vieira, R.H. 2011. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.* 201-204.
- Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodriguez Martinez, H. 2003. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 78(1-2), 85–98.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 63: 215–225.

- Raj, AJ, Gopalakrishnan VK, Yadav SA, Dorairaj S. Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* (Lam.) Root Extract. 2011. *Journal of Pharmacy Research*, 4(5),1426-1427.
- Restrepo, G., Úsuga, A., Rojano, B. 2013. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8 (1), 69-81.
- Saadabi, MA, Zaid IEA.2011. An In vitro Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* L. Seed Extracts Against Different Groups of Microorganisms. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(5): 129-134.
- Salamon, S., Maxwell, W. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 62:77-111.
- Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., Sharafi, M. 2014. *In vitro* assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*. 68:276–280.
- Sánchez-Calabuig, M, Fuente Jdl, Laguna-Barraza R, Beltrán-Breña P, Martínez-Nevado E, Johnston S, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Gutiérrez J. 2015.Heterologous murine and bovine IVF using bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa, *Theriogenology*.
- Sancho, S., Briz, M., Yeste, M., Bonet, S., & Bussalleu, E. 2017. Effects of the antimicrobial peptide protegrin 1 on sperm viability and bacterial load of boar seminal doses. *Reproduction in Domestic Animals*, 52, 69–71.
- Shaoyong W, Li Q, Ren Z-q, Wei C-s, Chu G-y, Dong W-z, Yang G-s, Pang W-j. 2019. Evaluation of  $\epsilon$ -polylysine as antimicrobial alternative for liquid-stored boar semen, *Theriogenology*.
- Schulze, M., Dathe, M., Waberski, D., Müller, K. 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.
- Sessions-Bresnahan, D. R., Graham, J. K., & Carnevale, E. M. 2014. Validation of a heterologous fertilization assay and comparison of fertilization rates of equine oocytes using in vitro fertilization, perivitelline, and intracytoplasmic sperm injections. *Theriogenology*, 82(2), 274–282.
- Silva, E. C. B., Cajueiro, J. F. P., Silva, S. V., Soares, P. C., & Guerra, M. M. P. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722–1726.

- Soberano-Martínez, A., Bravo-Patiño, A., Olivo-Zepeda, I., Toscano-Torres, I., Cajero-Juárez, M., Herrera-Camacho, J., Navarro-Maldonado, MC., Segura-Correa, JC. Fertilización de ovocitos caprinos madurados en dos medios de cultivo. 2011. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14: 301 – 307.
- Sokunbi, O.A., Ajani, O.S., Lawanson, A.A., Amao, E.A. 2015. Antibiotic Potential of Moringa Leaf (*Moringa oleifera* Lam.) Crude Extract in Bull Semen Extender. *European Journal of Medicinal Plants*. 9(2): 1-8.
- Soler, A.J., Poulin, N., Ferna, M.R., Santos, N., Cognie, M.C., Garde, J.J., Mermillod, P. 2008. Heterologous *In Vitro* Fertility Evaluation of Cryopreserved Iberian Red Deer Epididymal Spermatozoa with Zona-intact Sheep Oocytes and its Relationship with the Characteristics of Thawed Spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 43, 293–298.
- Surendra, T.V., Roopan, S.M. 2016. Photocatalytic and antibacterial properties of phytosynthesized CeO<sub>2</sub> NPs using *Moringa oleifera* peel extract. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 161: 122–128.
- Taberner, E., Morató, R., Mogas, T., & Miró, J. 2010. Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. *Animal Reproduction Science*, 118(2-4), 354–361.
- Trujillo, LE y Rivera M. 2002. Estudio comparativo de dos tratamientos con antibióticos sobre la calidad bacteriológica y espermática del semen bovino. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. Vol.55, No.1.p.1457-1472.
- Valente, S., Pereira, R.M., Baptista, M.C., Marques, C.C., Vasques, M.I., Pereira, M.V., Horta, E.M., Barbas, J.P. 2009. *In vitro* and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders, *Animal Reproduction Science*.04.007.
- Vichas, L., Tsakmakidis, I, A., Vafiadis, D., Tsousis, G., Malama, E., Boscós, C, M. 2017. The effect of antioxidant agents' addition and freezing method on quality parameters of frozen thawed ram semen. *Cell Tissue Bank*. 1007.10561-017-9633-6.
- Viera, G.H., Mourao, J.A., Angelo, A.M., Costa, R.A., Viera, R.H. 2010. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(3), 129–132.
- Yaniz, J.L., Aguado, M.A., Pilar, A.M. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Animal Reproduction Science*. 122: 142–149.

- Yodmingkwana, P., Guntapromb, S., Jaksamritc, J., Lertchunhakiata, K. 2016. Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. Agriculture and Agricultural Science Procedia 11: 125 – 130.
- Young, Q.W., G., Yujie, D. Hui, D., Shejiang, L., Xu, H., Jianzhou, G., y Dan, L. 2017. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. Food Chemistry. 218: 152–158.