



**Universidad Autónoma de Ciudad Juárez**

**Instituto de Ciencias Biomédicas**

**Departamento de Ciencias Veterinarias**

**Maestría en Ciencia Animal**

**Evaluación de la adición de quercetina en semen  
criopreservado de ovino sobre la fertilidad *in vivo***

Tesis para obtener el grado de

Maestro en Ciencia Animal

**M.V.Z. Edson Eduardo Jiménez Aguilar**

**“Becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología”**

**Bajo la dirección del Dr. José María Carrera Chávez**

Ciudad Juárez, Chihuahua noviembre de 2020

## **APROBACIÓN DE LA TESIS**

Evaluación de la adición de quercetina en semen criopreservado de ovino sobre la fertilidad *in vivo*, reporte de investigación preparado por Edson Eduardo Jiménez Aguilar 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**

**ASESOR**

---

**PhD. Ernesto Orozco Lucero**

**ASESOR**

---

**Dr. Mateo Fabián Itzá Ortiz**

**ASESOR**

---

**M en C. Mario Alejandro Prieto Caraveo**

**ASESOR**

**DECLARACIÓN INSTITUCIONAL**  
**EVALUACIÓN DE LA ADICIÓN DE QUERCETINA EN SEMEN**  
**CRIOPRESERVADO DE OVINO SOBRE LA FERTILIDAD *in vivo***

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

---

**Dr. José María Carrera Chávez**

**COORDINADOR DE LA MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

---

**Dr. Ramón Rivera Barreno**

**JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VETERINARIAS**

---

**C.D. Salvador David Nava Martínez**

**DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS**

## **DEDICATORIA**

A mis padres, hermanos, maestros y amigos.

GRACIAS

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Isidro Jiménez González y Celina Aguilar Lozano que siempre me apoyaron en mis proyectos y en el transcurso de mi carrera. A mis hermanos Ángel Alfredo Jiménez Aguilar, Dante Isidro Jiménez Aguilar y Eddie Emerson Jiménez Aguilar que siempre que los necesite estuvieron para ayudarme y al pendiente de mí.

A mis maestros que me ayudaron durante el transcurso de mi maestría, por todo lo que me enseñaron y el tiempo que me brindaron. Al Dr. José María Carrera Chávez por ayudarme a realizar este proyecto y el tiempo que dedicó para poder realizarlo. Al Dr. Juan Alberto Quintero Elisea por la ayuda brindada en este proyecto, la ayuda a lo largo de mi carrera, los conocimientos y experiencias obtenidas. Dr. Andrés Quezada por el apoyo y al M en C. Mario Prieto y a la Granja El Papalote por el apoyo durante el proyecto.

Gracias a la Lechería Escobar por el apoyo que me brindo en mi proyecto, en especial para el Lic. Rómulo Escobar y al Ing. Rómulo Escobar, por darme la oportunidad y abrirme las puertas de su empresa para poder llevar a cabo mi proyecto de investigación. Al MVZ Jesús Gutiérrez y trabajadores por siempre tener el tiempo para ayudarme con el trabajo de campo en la lechería.

A mis amigos Cinthia Irigoyen, Theisy Patricia Acosta Pérez, Mónica Bojórquez, Julián Guedea y Jaqueline Gallegos por todo el apoyo.

## RESUMEN

### **Evaluación de la adición de quercetina en semen criopreservado de ovino sobre la fertilidad *in vivo***

Por:

Edson Eduardo Jimenez Aguilar

Existen deficiencias al momento de la criopresevación del semen debido a varios impactos físicos y químicos, y estos causan una baja en la fertilidad de los espermatozoides. Debido a lo anterior, se busca reducir estos daños utilizando antioxidantes en los diluyentes del semen. En este estudio se evaluó el efecto de la adición de quercetina en semen criopreservado de ovino sobre las características espermáticas de motilidad (motilidad, motilidad progresiva y motilidad rápida), vitalidad, daño acrosomal y sobre la fertilidad *in vivo*. Se colectó el semen de tres sementales ovinos utilizando vagina artificial. Para la dilución se utilizó un diluyente a base de TRIS y yema de huevo, para luego dividir las muestras en cinco tratamientos: control (antibiótico convencional); testigo (sin aditivos); quercetina 200  $\mu\text{M}$ ; vitamina E 100  $\mu\text{M}$ ; y la combinación de quercetina y vitamina E (Q + VE). Una vez diluido el semen, se envasó en pajillas de 0.25 mL y se realizó la refrigeración del semen. La criopreservación se efectuó en una hielera a vapores. Se evaluaron las características espermáticas de motilidad mediante un sistema de evaluación de semen asistido por computadora. La integridad del acrosoma se evaluó mediante la tinción azul tripano y Giemsa. Para probar la fertilidad *in vivo* se inseminaron 201 ovejas por la técnica laparoscopia. Las variables se analizaron con un ANOVA y se compararon con una prueba de Duncan; para la tasa de gestación se utilizó la prueba de chi cuadrada. En la evaluación de las características espermáticas de motilidad no hubo una diferencia estadísticamente significativa en los diferentes tratamientos. En la variable espermatozoides vivos con acrosoma intacto, el tratamiento con mayor porcentaje fue quercetina 200  $\mu\text{M}$  ( $22.33 \pm 2.51\%$ ) comparado con los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ); en la variable espermatozoides vivos con acrosoma dañado los tratamientos quercetina 200  $\mu\text{M}$  ( $58.66 \pm 1.52\%$ ), testigo ( $50.00 \pm 6.00\%$ ) y vitamina E ( $52.00 \pm 5.29\%$ ) tuvieron una diferencia significativa en comparación con los tratamiento de testigo ( $48.33 \pm 4.00\%$ ) y la combinación de quercetina y vitamina E ( $41.33 \pm 3.21\%$ ) ( $P < 0.05$ ). En la fertilidad del semen criopreservado adicionado con los diferentes tratamientos no hubo diferencia estadística significativa, pero sí mostró una diferencia numérica en el porcentaje de gestación con la adición de 200  $\mu\text{M}$  de quercetina en comparación a los demás tratamientos. En conclusión, la adición de 200  $\mu\text{M}$  de quercetina en el semen de ovino criopreservado mostró una mejora significativa en los daños estructurales del espermatozoide, aunque

esta mejora no fue capaz de incrementar el porcentaje de fertilidad *in vivo* después de la inseminación artificial.

Palabras clave: Antioxidante; congelación; inseminación artificial; laparoscopia; características espermáticas

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
RESUMEN .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISION DE LITERATURA .....	2
2.1 Métodos de colección de semen .....	2
2.1.1 Electroeyaculador .....	2
2.1.2 Vagina artificial .....	2
2.2 Criopreservación .....	3
2.2.1 Estrés oxidativo .....	3
2.3. Propiedades de <i>Moringa oleifera</i> .....	4
2.3.1 Capacidad antioxidante de <i>Moringa oleifera</i> .....	5
2.4 Antioxidantes .....	5
2.4.1 Vitamina E .....	5
2.4.3 Ácido docosahexaenoico .....	6
2.4.4 Quercetina .....	6
2.5 Evaluación de la integridad espermática .....	8
2.5.1 Integridad del acrosoma (Tición azul tripano/Giemsa) .....	9
2.6.1 Métodos de sincronización de estro .....	10
2.7 Inseminación artificial .....	12
2.8 Técnicas inseminación artificial .....	12
2.8.1 Inseminación vaginal .....	13
2.8.2 Inseminación cervical .....	13
2.8.3 Inseminación artificial por laparoscopia .....	13
3. HIPÓTESIS .....	15
4. OBJETIVO GENERAL .....	15
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
5.1 Área de estudio y animales .....	16
5.2 Colección de semen y evaluación pre-criopreservación .....	16
5.3 Evaluación macroscópica .....	16

<b>5.4 Evaluación microscópica .....</b>	<b>17</b>
<b>5.5 Dilución del semen.....</b>	<b>17</b>
<b>5.6 Refrigeración y equilibramiento del semen .....</b>	<b>17</b>
<b>5.7 Proceso de criopreservación del semen .....</b>	<b>18</b>
<b>5.8 Evaluación de características seminales post-criopreservación.....</b>	<b>18</b>
<b>5.9 Estudios previos.....</b>	<b>18</b>
<b>5.10 Tratamientos.....</b>	<b>18</b>
<b>5.11 Evaluación del daño en la membrana acrosomal .....</b>	<b>19</b>
<b>5.12 Sincronización y detección de estro .....</b>	<b>19</b>
<b>5.13 Inseminación artificial por laparoscopia.....</b>	<b>20</b>
<b>5.14 Diagnóstico de gestación .....</b>	<b>22</b>
<b>5.15 Análisis estadístico.....</b>	<b>22</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>32</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de la revisión de literatura de la utilización de vitamina E como aditivo en los diluyentes de semen.....	7
Tabla 2. Resumen de la revisión de literatura de la utilización de quercetina como aditivo en los diluyentes de semen.....	10
Tabla 3. Efecto de las diferentes concentraciones de vitamina E sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media $\pm$ desviación estándar) .....	23
Tabla 4. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media $\pm$ desviación estándar).....	24
Tabla 5. Estudio dos con diferentes concentraciones de quercetina sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media $\pm$ desviación estándar) .....	24
Tabla 6. Efecto de la adición de los diferentes tratamientos sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media $\pm$ desviación estándar).....	25
Tabla 7. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la vitalidad y daño de acrosoma de los espermatozoides en semen criopreservado de ovino (Media $\pm$ desviación estándar). .....	27
Tabla 8. Efecto de la adición de quercetina y vitamina E en el semen criopreservado de ovino sobre la tasa de gestación a los 35 días en ovejas inseminadas mediante inseminación artificial por laparoscopia..	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colocación de esponja intravaginal para sincronización de estro en ovejas.....	20
Figura 2. Inseminación de una oveja con la técnica laparoscopia.....	21
Figura 3. Ecografía de una oveja.....	22

## 1. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides al momento de la criopreservación se exponen a varios impactos físicos y químicos que dificultan la viabilidad y la fertilidad de los espermatozoides (Mata-Campuzano *et al.*, 2015). La criopreservación del semen se acompaña de algunas deficiencias, por ejemplo, la disminución de la motilidad y viabilidad del espermatozoide. Esto se debe en parte al hecho de que la criopreservación induce estrés oxidativo y como resultado la formación de especies reactivas al oxígeno conocidas como ROS, por sus siglas en inglés (reactive oxygen species). Los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana son susceptibles al daño de ROS, ya que su citoplasma contiene bajas concentraciones de las enzimas que capturan los radicales libres (Karimfar *et al.*, 2015). Es importante la adición de antioxidantes en los diluyentes para reducir el daño a los espermatozoides por las bacterias, estrés oxidativo y los ROS al momento de la criopreservación. Debido a lo anterior se debe reducir el daño al momento a la criopreservación. La adición de antioxidantes en los diluyentes para la congelación de semen produce una mejora en la post-criopreservación del semen ya que protegen a los ácidos grasos poliinsaturados de los espermatozoides, previniendo así el daño por estrés oxidativo y ROS. Se ha demostrado que numerosas plantas tienen un efecto antioxidante, como por ejemplo *Moringa oleifera*, que contiene flavonoides con capacidades antioxidantes como la quercetina, vitaminas antioxidantes como C, E, y A (Bukar, 2010; Berkovich *et al.*, 2013). La quercetina es un flavonoide que elimina los ROS y se ha demostrado que mejora la calidad del semen después de la post-criopreservación en semen de borrego (Silva *et al.*, 2012; Gibb *et al.*, 2013). El alfa-tocoferol o vitamina E es el principal antioxidante lipofílico que protege los ácidos grasos insaturados contra la peroxidación ya que es un potente eliminador de radicales peróxido e inhibidor importante de la reacción en cadena de lipoperoxidación en animales (Allai *et al.*, 2018). La adición de vitamina E en los diluyentes de congelación produce una mejora en la post-criopreservación del semen, previniendo el daño por estrés oxidativo (Jeong *et al.*, 2009). Existen métodos para la mejora genética en la producción de ovinos como la inseminación artificial (IA) es un método de reproducción asistida donde se realiza de forma manual y por medio de instrumentos especiales. La IA por laparoscopia se utiliza esta técnica debido a los daños que ocurren en los espermatozoides al momento de la criopreservación por lo cual mejora la fertilidad utilizando semen criopreservado en comparación a las otras técnicas (Salamón *et al.*, 2000; Hafez y Hafez, 2002; Allai *et al.*, 2018). No se tiene ningún reporte del uso de los antioxidantes como la quercetina y la vitamina E en semen de ovino criopreservado probando la fertilidad *in vivo* utilizando la técnica de laparoscopia. El objetivo de este estudio fue evaluar la adición de quercetina, vitamina E y la combinación de estas en semen criopreservado de ovino sobre características espermáticas y la fertilidad *in vivo*.

## **2. REVISION DE LITERATURA**

### **2.1 Métodos de colección de semen**

El primer paso para la criopreservación del semen es el uso de un método efectivo de colección de semen (Marco-Jímenez *et al.*, 2005). Aunque existen diferentes técnicas para recolectar semen, las más utilizadas son la vagina artificial, la electroeyaculación y el masaje transrectal de las glándulas sexuales accesorias, sin embargo, el uso de cada técnica está en dependencia a la especie (Sylla *et al.*, 2015). En los ovinos, los métodos comunes de recolección de semen son el electroeyaculador y la vagina artificial, esta última con ventajas en cuanto a concentración de semen y bienestar animal (Aguirre *et al.*, 2005; Alomar *et al.*, 2016).

#### **2.1.1 Electroeyaculador**

Es un método muy útil para obtener muestras de semen de carneros cuando no resulta posible el uso de vagina artificial o animales que no están entrenados para colecta de semen con vagina artificial y animales imposibilitados para la monta. La electroeyaculación es el método de elección cuando es necesario obtener semen de un gran número de sementales (Marco-Jímenez *et al.*, 2005). Colectar el semen con electroeyaculador proporciona un mayor volumen de semen, pero con menos concentración de espermatozoides que la vagina artificial y existe peligro de contaminación del semen con la orina (Fallis, 2013). Esta técnica implica aplicar una serie de corriente corta de bajo voltaje a los nervios pélvicos; la mayoría de los electroeyaculadores utilizan un pulso de onda sinusoidal a una frecuencia de 20-30 ciclos/s y con impulsos eléctricos < 8 o 9 V, con cada estimulación la intensidad del voltaje aumenta de manera constante y se mantiene durante 1 a 2 s, seguido 1 a 2 s de reposo con el fin de que la estimulación lleve a la protrusión del pene, la erección y finalmente la recolección de semen (Marco-Jímenez *et al.*, 2005; Palmer, 2005).

#### **2.1.2 Vagina artificial**

El mejor procedimiento para recolectar semen es con una vagina artificial, de construcción simple, que simula la cópula natural. La unidad proporciona temperatura, presión y lubricación para producir la eyaculación y tiene un tubo calibrado unido para recolectar semen (Hafez y Hafez, 2002).

El uso de vagina artificial para la colección de semen da como resultado muestras de semen de mayor calidad, en comparación con el semen obtenido mediante electroeyaculación, con el cual generalmente las características del semen como el volumen, la concentración, los espermatozoides vivos y la motilidad de los espermatozoides generalmente se ven afectadas (Malenaje *et al.*, 2014).

La colección de semen con la vagina artificial requiere de un entrenamiento previo de los machos. Para el entrenamiento y colección de semen se utilizan ovejas en estro, ovejas tratadas con hormonas, ovejas

que no estén en estro y maniqués. Debido a la estacionalidad sexual de las ovejas y los efectos negativos del tratamiento hormonal continuo en las ovejas, la opción recomendada para lograr la recolección continua de semen es el entrenamiento con ovejas que no están en estro (Ambrosi *et al.*, 2018)

## **2.2 Criopreservación**

La criopreservación del semen contribuye a la expansión de técnicas reproductivas, tales como inseminación artificial, la transferencia de embriones y fertilización *in vitro* (Medeiros *et al.*, 2002). La criopreservación de semen facilita estas técnicas reproductivas, ya que ofrece ventajas prácticas, ya que no existe dependencia del tiempo y la distancia, y se puede preservar indefinidamente la genética de un animal. El proceso de criopreservación consta de cinco etapas: dilución, refrigeración, congelación y descongelación (Zamiri, 2020). Las membranas de los espermatozoides contienen ácidos grasos poliinsaturados y por esta razón son susceptibles al estrés oxidativo. Para evitar los daños del estrés oxidativo, se han estado utilizando antioxidantes en los últimos años (Toker, 2016; Banday, 2017). El proceso de criopreservación expone a los espermatozoides a varios impactos físicos, químicos y se acompaña de algunas deficiencias (Ávila *et al.*, 2006; Barbas y Mascarenhas, 2009; Banday, 2017). Estos impactos físicos y químicos dificultan la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides y también pueden provocar la capacitación espermática prematura por una fluidez en la membrana, así como por la entrada del ion calcio; esta permeabilidad provoca una reacción acrosómica prematura, la cual afecta la capacidad del espermatozoide de fertilizar el ovocito al momento de la inseminación artificial (Cormier y Bailey, 2003). Todo esto se debe a la formación de cristales de hielo intracelulares, daños osmóticos y por enfriamiento que causan daño a las células espermáticas, fracturas citoplasmáticas o incluso efectos en las estructuras del citoesqueleto o el genoma (Isachenko, 2003). Salamon y Maxwell (2000) demostraron que en este proceso pueden existir diversos cambios bioquímicos, como la pérdida de transaminasas oxaloacético glutámicas, inactivación de las hialuronidasas e incluso una desnaturalización del ácido desoxiribonucléico (ADN). La criopreservación puede ocasionar la producción excesiva de ROS y estrés oxidativo (Mata-Campuzano *et al.*, 2015).

### **2.2.1 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es el daño a las células causados por un desbalance de los radicales libres derivados del oxígeno conocido como especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad de respuesta antioxidante del organismo (Galina *et al.*, 2018). Los ROS afectan la integridad genómica de los espermatozoides induciendo entrecruzamientos de la cromatina, oxidación de bases nitrogenadas y rupturas en las hebras del ADN, lípidos, azúcares y proteínas que protegen la célula, alterando los sistemas enzimáticos y las vías de señalización celular, provocando la muerte celular. Los espermatozoides necesitan pequeñas cantidades de ROS para varias funciones, aunque niveles altos

provocan impactos negativos en la calidad del espermatozoide y perjudican su capacidad de fertilización (Tvrdá, 2011). En espermatozoides, la estructura de ADN es muy sensible al estrés oxidativo; cuando el ADN pasa por un proceso oxidativo se producen cambios mutagénicos que afectan la calidad de los espermatozoides, minimizando su capacidad de fertilización. Los cambios oxidativos juegan un papel importante en la apoptosis y en el daño al ADN (Mehraban *et al.*, 2020). Como se mencionó, los ROS también pueden iniciar una cadena de reacciones que por último llevan a la apoptosis. La apoptosis es un proceso natural en el cual el cuerpo remueve células viejas. Esto puede ayudar a remover células anormales y prevenir su sobreproducción (Agarwal y Allamaneni, 2006).

Los espermatozoides son extremadamente susceptibles al estrés oxidativo durante largos periodos de almacenamiento aeróbico debido a que sus membranas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados. En particular, los espermatozoides de ovinos son sensibles a la peroxidación de los fosfolípidos de membrana con una consecuente producción de ROS si se compara con otras especies (Falchi, 2018). Lo anterior ya que es rica en ácidos grasos poliinsaturados y sensible al daño inducido por el oxígeno mediado por la peroxidación lipídica, lo cual resulta en un descenso en la motilidad espermática, presumiblemente por una pérdida rápida de ATP intracelular, lo cual lleva a un descenso en la viabilidad espermática, y a un incremento en los defectos morfológicos de la parte media del espermatozoide con efectos perjudiciales en la capacitación espermática y la reacción del acrosoma (Bansal y Bilaspuri, 2011). Como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que pequeñas cantidades de ROS son necesarias para varias funciones normales de los espermatozoides (capacitación y reacción acrosomal), sin embargo, niveles excesivos pueden tener un impacto negativo en la calidad de los espermatozoides y perjudicar su capacidad total de fertilización (Tvrdá, 2011), ya que un desequilibrio puede afectar la función espermática durante el almacenamiento prolongado. Los mecanismos antioxidantes involucran sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, 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. Sin embargo, durante el procesamiento, la concentración de los antioxidantes presentes en el semen se puede reducir por dilución, y los espermatozoides producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno que disminuye la motilidad de los espermatozoides después del descongelamiento (Falchi *et al.*, 2018).

### **2.3. Propiedades de *Moringa oleifera***

El uso de las plantas es una de las diferentes alternativas naturales que nos ayudan a prevenir daños a los espermatozoides esta tiene diferentes partes que contienen un perfil importante de minerales, y son una buena fuente de proteínas, vitaminas, aminoácidos, betacarotenos y varios fenólicos. La planta moringa posee propiedades antitumorales, antipiréticas, antiépilépticas, antiinflamatorias, antiulcerosas,

antiespasmódicas, diuréticas, antihipertensivas, disminuye el colesterol, antioxidantes, antidiabéticas, hepatoprotectoras, antibióticas y antifúngicas. Además, las semillas de *Moringa oleifera* poseen poderes purificantes del agua, floculando las células bacterianas Gram positivas y Gram negativa (Bukar, 2010)

### **2.3.1 Capacidad antioxidante de *Moringa oleifera***

Tiene componentes antioxidantes naturales como fenoles, flavonoides, ácido ascórbico, vitamina E,  $\beta$  carotenos, zinc, selenio, los cuales poseen potencial antioxidante, además de vitamina A y B, riboflavina, ácido nicotínico, ácido fólico, piridoxina, aminoácidos, minerales y compuestos fenólicos (Moyo *et al.*, 2012; Vongsak *et al.*, 2013). Wang *et al.* (2017) afirman que los antioxidantes tales como flavonoides tienen la habilidad de tomar los radicales libres y reducir el riesgo de muerte celular. Como se mencionó anteriormente, la quercetina es un flavonoide que elimina las especies reactivas de oxígeno y se ha demostrado que mejora la calidad del semen después de la post-descongelación en semen de borrego (Silva *et al.*, 2012; Gibb *et al.*, 2013).

Rivas (2002) afirma que los flavonoides poseen una elevada afinidad de unión con proteínas y con otras macromoléculas biológicas; los sistemas de defensa fisiológica frente al daño generado por radicales libres se clasifican en tres categorías: antioxidantes que previenen la formación de radicales libres, antioxidantes captadores de radicales libres, que inhiben la iniciación del proceso oxidativo o bien interfieren en el proceso de propagación, y antioxidantes que actúan revirtiendo el proceso de oxidación.

Drago *et al.* (2006) mencionan que los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas con actividad antioxidante, que incluye los fenoles ácidos y flavonoides, básicamente, la actividad antioxidante es la inhibición del daño ocasionado por reacciones oxidativas.

## **2.4 Antioxidantes**

### **2.4.1 Vitamina E**

La vitamina E es el principal antioxidante lipofílico que protege los ácidos grasos insaturados contra la peroxidación, ya que es un potente eliminador de radicales peroxilo e inhibidor importante de la reacción en cadena de lipoperoxidación en animales (Cabrita *et al.*, 2011; Allai *et al.*, 2018). Por lo tanto, participa en la disminución del estrés oxidativo, influyendo en el control de la peroxidación lipídica (Satorre *et al.*, 2013).

La peroxidación lipídica de la membrana, mediada por ROS y el estrés oxidativo, causan daños durante la criopreservación a los espermatozoides y es importante mencionar que los antioxidantes pueden proteger al espermatozoide contra los ROS; la vitamina E puede romper los enlaces covalente que los ROS han formado entre las cadenas laterales de ácidos grasos en los lípidos de la membrana y es uno

de los principales protectores de la membrana contra los ROS y la peroxidación de la membrana (Vasconcelos *et al.*, 2014).

La adición de vitamina E en los diluyentes para congelación produce una mejora en la post-descongelación del semen, previniendo el daño al estrés oxidativo y evita la apoptosis (Jeong *et al.*, 2009). Silvia *et al.* (2013) menciona que la adición de vitamina E tuvo un efecto positivo en la integridad de membrana plasmática de los espermatozoides y en la motilidad progresiva del semen. Kheradmand *et al.* (2006) informaron que la adición de 1.0 o 2.0 mg/mL de vitamina E al diluyente basado en yema de huevo/buffer citrato mejoró la motilidad y la integridad de la membrana espermática en el semen de refrigerado.

Se han realizado varios estudios donde demuestran los efectos que tiene el uso de vitamina E en los diluyentes del semen de los ovinos, a continuación, se muestra la Tabla 1, con la revisión de algunos artículos en los cuales se le adiciono vitamina E en los diluyentes en diferentes concentraciones, en base a esta revisión bibliográfica se eligió la concentración a utilizar en las pruebas preliminares en este estudio.

#### **2.4.2 Ácido ascórbico**

El ácido ascórbico es eliminador de radicales libres de origen natural (Korhonen *et al.*, 2012). El ácido ascórbico, también conocido como vitamina C, es una vitamina que es esencial para el funcionamiento del cuerpo y se ha asociado con la fertilidad. Se ha observado que la adición de ácido ascórbico al diluyente reduce el estrés oxidativo y aumenta la motilidad del espermatozoide (Hu *et al.*, 2010; Paudel *et al.*, 2010). El ácido ascórbico puede tener un papel en el mantenimiento de la integridad genética de las células espermáticas mediante la prevención del daño oxidativo al ADN inducido por H2O2 de los espermatozoides (Allai *et al.*, 2018; Brininger *et al.*, 2011).

#### **2.4.3 Ácido docosahexaenoico**

El ácido docosahexaenoico es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga que puede aumentar la resistencia de la membrana plasmática a los daños causados por el enfriamiento, cumpliendo como función antioxidante (Hu *et al.*, 2010; Nasiri *et al.*, 2012). Gholami *et al.* (2011) han propuesto que la utilización del ácido docosahexaenoico a altas concentraciones puede incrementar la flexibilidad del espermatozoide y con ello incrementar la resistencia estructural.

#### **2.4.4 Quercetina**

La quercetina es un flavonoide antioxidante que suprime la formación del ion superóxido y los quelatos de hierro, además de inhibir la formación de radicales peroxilipídicos está comúnmente presente en alimentos como frutas verduras. Tiene varias actividades biológicas, incluyendo antioxidantes y

actividad antimicrobial (Abdallah *et al.*, 2011; Nitiema *et al.*, 2012). Los compuestos fenólicos actúan como captadores de radicales libres y, a veces, como quelatos metálicos, actuando tanto en la etapa de iniciación como en la propagación del proceso oxidativo (Soares, 2002). Este antioxidante dietético se compone de dos anillos de benceno conectados por un oxígeno que contiene un anillo de pireno (Lakhanpal, 2007). La presencia y ubicación de las sustituciones de hidroxilo (-OH) y el anillo B de tipo catecol hacen de la quercetina un antioxidante eficaz que posee una actividad captadora de ROS más intensa que la vitamina E o C (Stojanovic *et al.*, 2002). En el semen, reduce la peroxidación lipídica de los espermatozoides durante la congelación y evita su capacitación prematura antes de la inseminación artificial (Restrepo *et al.*, 2016).

Tabla 1. Resumen de la revisión de literatura de la utilización de vitamina E como aditivo en los diluyentes de semen.

<b>Referencia</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>Resultados</b>
Upreti (1997)	1.6, 1.8 ,3.6 mM	Los resultados obtenidos mostraron un leve incremento en la motilidad de los espermatozoides, pero no fueron significativos en las tres dosis utilizadas.
Sarlós (2001)	0.5, 1, 2.5, 5 mg/mL	La concentración mayor, 5 mg/mL, mostró que protege mejor la integridad de la membrana y acrosoma en comparación con las otras concentraciones.
Breininger <i>et al.</i> (2005)	200 µg/mL	Al adicionar 200 µg/mL de vitamina E mostró mejor resultado en comparación con los otros tratamientos.
Jeong <i>et al.</i> (2009)	100, 200, 400, 600,800 µM	Motilidad espermática, expresiones proteicas, niveles de apoptosis. Se encontró que los rangos de las características a evaluar una viabilidad elevada, así como la integridad acrosomal se vio favorecida a dosis de 100 y 200 µM.
Da Silva <i>et al.</i> (2009)	50 µM	La vitalidad de los espermatozoides se mostró mejor con la concentración de 50 µM de vitamina E.
Membrillo-Ortega <i>et al.</i> (2011)	5 mg/mL	Mostró mejor resultado en motilidad adicionando una concentración de 5 mg/mL de vitamina E en comparación con el control.
Silva <i>et al.</i> (2013)	60, 120 µM	Incrementó la integridad de las membranas plasmática y mitocondrial, así como los parámetros de motilidad.
Abdi-benemar <i>et al.</i> (2015)	150 µM	La concentración de 150 µM de vitamina E en el diluyente mostro mejores resultados en comparación con los otros tratamientos.
Benhenia <i>et al.</i> (2016)	1 mg/mL	La adición de vitamina E con concentración de 1 mg/mL aumentó significativamente la motilidad progresiva y la velocidad espermática.

Gibb *et al.* (2013) reportan que al utilizar quercetina en una concentración de (0.15 mM) en semen criopreservado de equino mostró mejor resultado en la motilidad de los espermatozoides al momento de la descongelación y también presentó un mayor porcentaje en espermatozoides con el acrosoma intacto en comparación con los otros tratamientos. En otro estudio Seifi- Jamadi *et al.* (2016) utilizaron diferentes concentraciones de quercetina en semen criopreservado de equino teniendo mejor resultado la concentración de 0.1 mM comparado con los otros tratamientos, presentando un mejor resultado en la motilidad y en la vitalidad e integridad de membrana no mostro un efecto significativo. La quercetina se ha probado en fertilización *in vitro* utilizando semen de ovino colectado directo del epidídimo y criopreservado; se evaluaron las concentraciones de 5 y 10 µg/mL, que mostraron una diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos (0, 20 y 50 µg/mL de quercetina); estas concentraciones mostraron mejor resultado en el número de embriones obtenidos en la etapa de cigoto, mórula y blastocisto (Ardeshirnia *et al.*, 2017).

Hay estudios en los cuales demuestran los efectos de uso de quercetina en los diluyentes del semen de ovino. La Tabla 2 muestra una revisión de algunos artículos en los cuales se les adicionó quercetina en los diluyentes en diferentes concentraciones, con base a esta revisión bibliográfica se eligió la concentración a utilizar en las pruebas preliminares en este estudio (Tabla 2).

El único artículo encontrado donde probaron la quercetina en la fertilidad *in vivo* fue el reporte realizado por Ahmed *et al.* (2019), en el cual demostraron que la fertilidad *in vivo* al utilizar quercetina en el semen criopreservado de búfalo con concentraciones de 150 µM (61.82%) y 200 µM (65.22%) se incrementó comparado contra el control (46.90%).

## **2.5 Evaluación de la integridad espermática**

La integridad de la membrana es un requisito fundamental para la viabilidad del espermatozoide y el éxito de la fertilización (Martínez-Pastor *et al.*, 2004). La integridad de la membrana plasmática resulta de gran importancia al momento de evaluar la viabilidad fundamental para la viabilidad del espermatozoide y el éxito de la fertilización (Martínez-Pastor *et al.*, 2004). Como se ha mencionado, se ha asociado al estrés oxidativo con la reducción de la motilidad espermática, reducción de la fluidez e integridad de la membrana plasmática, cambios en la función mitocondrial, alteraciones en la cromatina, daño al sistema antioxidante enzimático, y daños a la membrana acrosomal. Como resultado, se observa una reducción en la función espermática y las células espermáticas pueden ser incapaces de fertilizar al óvulo y producir una preñez viable (Affonso *et al.*, 2017). Por lo anterior, la evaluación de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal es fundamental, ya que se considera que este daño es uno de los principales factores perjudiciales durante la criopreservación. Esto es particularmente importante cuando el semen criopreservado es de la especie ovina, que contiene una mayor cantidad de fosfolípidos

en su membrana, lo que ocasiona que sea más difícil para criopreservar comparado con otros animales de granja (Alcay *et al.*, 2015).

Un espermatozoide debe mantener un acrosoma intacto hasta el momento en que se une a la zona pelúcida del ovocito. El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación lo que hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. La observación del estado del acrosoma es uno de los datos más importantes en la determinación morfológica. Su daño parcial o total en los espermatozoides conlleva a una incapacidad para fertilizar. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja (Hidalgo *et al.*, 2005). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la liberación de oxígeno molecular, formando bajas concentraciones de ROS, se requiere para que el espermatozoide pueda realizar la capacitación y la reacción acrosomal, con la consiguiente capacidad de fertilización. Es cuando hay un exceso de ROS, cuando se perjudica la motilidad y capacidad de fertilización (Bucak *et al.*, 2007).

### **2.5.1 Integridad del acrosoma (Tinción azul tripano/Giemsa)**

Existen una variedad de métodos que permiten evaluar la integridad del acrosoma en muestras teñidas. Normalmente, estas técnicas requieren de la tinción de la región acrosomal, y puede incluir una tinción para evaluar la vitalidad de los espermatozoides. En la tinción azul tripano/Giemsa, el uso de azul tripano distingue a los espermatozoides vivos y muertos y Giemsa evalúa los acrosomas dañados. El azul tripano penetra la membrana dañadas de los espermatozoides muertos tiñéndolas de color azul y los espermatozoides vivos no se tiñen de ningún color. Giemsa se acumula en los espermatozoides con el acrosoma intacto tiñéndolo de color purpura (Tartaglione y Ritta, 2004). De esta forma, los espermatozoides se pueden clasificar en las siguientes categorías: vivos con el acrosoma intacto, vivos con el acrosoma dañado, muertos con el acrosoma intacto y muertos con el acrosoma dañado (Gholami *et al.*, 2012).

### **2.6 Sincronización de estro**

La inducción y sincronización del estro y de la ovulación en ovejas consiste en el uso de métodos naturales y farmacológicos efectivos que permiten manipular la fisiología reproductiva de las hembras ovinas, permitiendo la implementación de programas reproductivos que permiten optimizar la producción y reproducción, como es la inseminación artificial y la transferencia de embriones (Córdova *et al.*, 2008; Lozano *et al.*, 2012).

Tabla 2. Resumen de la revisión de literatura de la utilización de quercetina como aditivo en los diluyentes de semen.

<b>Bibliografía</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>Resultados</b>
Rosatti <i>et al.</i> (2003)	50 $\mu$ M	La concentración de 50 $\mu$ M mostró diferencia significativa en comparación con el control, obteniendo una mejora en la motilidad y en la integridad del acrosoma.
Silva <i>et al.</i> (2012)	5 $\mu$ g/mL 10 $\mu$ g/mL 15 $\mu$ g/mL 20 $\mu$ g/mL	Motilidad progresiva, acrosoma y membrana no mostró diferencia significativa al comparar los tratamientos.
Gibb <i>et al.</i> (2013)	0.15 mM	El semen criopreservado mostró mejor resultado en la motilidad de los espermatozoides al momento de la descongelación y también presentó un mayor porcentaje en espermatozoides con el acrosoma intacto en comparación con los otros tratamientos (catalasa y cisteína).
Restrepo <i>et al.</i> (2016)	100 $\mu$ M	No obtuvo una diferencia significativa en comparación de los otros tratamientos siendo perjudicial para los espermatozoides.
Seifi- Jamadi <i>et al.</i> (2016)	0.1 mM 0.2 mM 0.3 mM	La concentración de 0.1 mM mostró mejor resultado comparado con los otros tratamientos, presentando un mejor resultado en la motilidad y en la vitalidad; en integridad de membrana no mostró un efecto significativo.
Seifi-Jamadi <i>et al.</i> (2017)	0 $\mu$ M 10 $\mu$ M 20 $\mu$ M	La concentración de 10 $\mu$ M mostró mejores resultados en motilidad, motilidad progresiva, viabilidad, integridad de la membrana.
Banday <i>et al.</i> (2017)	5 $\mu$ g/mL	Se evaluó motilidad y integridad acrosomal, pero no hubo diferencias significativas
Ahmed <i>et al.</i> (2019)	50 $\mu$ M 100 $\mu$ M 150 $\mu$ M 200 $\mu$ M	Se compararon diferentes concentraciones de quercetina en semen criopreservado de búfalo. Se evaluaron características espermáticas y la fertilidad <i>in vivo</i> . Las concentraciones que mostraron mejores resultados fueron las de 150 $\mu$ M con un porcentaje de 61.82% y 200 $\mu$ M con un porcentaje de 65.22% en la fertilidad <i>in vivo</i> .

## 2.6.1 Métodos de sincronización de estro

### 2.6.1.1 Efecto macho

El efecto macho, es otro de los muchos factores que pueden influir en el comportamiento reproductivo del rebaño. La presencia súbita del macho con ovejas que han estado separadas durante un tiempo ejerce un estímulo que se traduce en la presencia de estros, en especial en ovejas que están en un proceso de transición de la época de anestro a la de estro o viceversa. También sirve para estimular aquellas que aún, estando dentro de la estación de apareamiento, no están presentando estro (Buratovich, 2010).

### **2.6.1.2 Esponja intravaginal**

Es el método tradicional para la sincronización de estros en pequeños rumiantes en épocas reproductivas y no reproductivas (Lozano *et al.*, 2012). La eficiencia de la sincronización de estro con esponja intravaginal depende de algunos factores como lo son la especie, raza, manejo y sistema de empadre (Martemucci *et al.*, 2011; Kulaksiz *et al.*, 2013).

Las esponjas vaginales son dispositivos fabricados a partir de espuma de alta densidad de poliuretano impregnadas con progestágenos 30, 40 o 45 mg de acetato de fluorogestona (FGA) o con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Aköz *et al.*, 2006; Abecia *et al.*, 2011). Estas esponjas se insertan en el fondo de la vagina en contacto con el cérvix y tiene como ventajas su fácil aplicación y su liberación continua de la hormona (Dias *et al.*, 2001; Swelum *et al.*, 2015).

Los tratamientos con progestágenos utilizados por 12-14 días, son comunes en la sincronización de estro en pequeños rumiantes. Como resultado del tratamiento, un alto porcentaje de ovejas muestran estro, pero la fertilidad es inferior a la de celo natural. Esta baja fertilidad posiblemente es debido a los cambios hormonales, dando como resultado una asincronía entre el estro, la ovulación y transporte espermático (Mellisho y Terrel, 2007).

Kalyan *et al.* (2016) realizaron un protocolo utilizando esponja intravaginal impregnada con progesterona y eCG para la sincronización. Se insertó la esponja intravaginal (AVIKESIL-S) y se dejó en la vagina un periodo de 12 días; después retiró esponjas y administró 200 UI de eCG (Folligon, Intervet) vía intramuscular al momento del retiro de la esponja. El 100 % de las ovejas mostraron signos de estro y fueron inseminadas a las 56 horas de retirada la esponja vía cervical a las hembras que presentaron estro.

Kermani *et al.* (2012) reporta que luego de retirado el dispositivo, se aplica la eCG ya sea dos días antes de la retirada del dispositivo o al momento de la retirada. La dosis que se aplica es de 250 a 400 UI vía intramuscular como dosis única dependiendo de la condición corporal del animal. El porcentaje de hembras que presentan estro es de 96.7% (Avendaño *et al.*, 2007) a 100% (Uribe-Velásquez *et al.*, 2008). El estro se manifiesta de 36 a 48 h después de retirado el dispositivo y aplicada la eCG, y la ovulación de 10 a 12 h después del estro (Naim *et al.*, 2009).

### **2.6.1.3 Dispositivo de liberación interna controlada de progesterona**

Dispositivo hecho de elastómero de silicón impregnado con 300-400 mg de progesterona (Lozano *et al.*, 2012; Balcázar *et al.*, 2013). Con los dispositivos siliconados, la presentación de vaginitis e infecciones vaginales son casi inexistentes (Tondello *et al.*, 2010; Abecia *et al.*, 2012).

Fraire *et al.* (2013) mencionan en un estudio que el 99% de las ovejas entran en estro con el uso del dispositivo de liberación interna controlada de progesterona (CIDR) de 0.3 g de progesterona durante nueve días. En el séptimo día se aplicó vía intramuscular 1.0 mL de un análogo de PGF2 $\alpha$  a todas las borregas, con la finalidad de lisar cualquier cuerpo lúteo presente y homogeneizar el estado fisiológico del ciclo estral. En el día ocho del protocolo de sincronización se aplicaron por vía intramuscular 300 UI de eCG con la finalidad de incrementar el número de ovulaciones y homogeneizar la presentación del estro. El día nueve del protocolo, se retiraron los dispositivos de progesterona, iniciando la detección de estros 12 h después, con intervalos de 4 h, durante 120 h.

## **2.7 Inseminación artificial**

La inseminación artificial (IA) es un método de reproducción asistida en el que se deposita semen en el aparato reproductor de la hembra de forma manual y por medio de instrumentos especiales. Existen diferentes tipos de inseminación artificial (Córdova *et al.*, 2008). En el caso de las ovejas, la inseminación transcervical simple, tiene uso reducido debido principalmente a la compleja anatomía del cérvix ovino, que no permite el paso de un catéter de inseminación y por la pobre calidad del semen congelado (Falchi, 2018), ya que en esta especie están estrechamente vinculados a la vía de aplicación de los espermatozoides que se utiliza en la IA (Alvarez *et al.*, 2019). Por lo anterior, la IA en esta especie se realiza vía intrauterina con la ayuda de un laparoscopio, aunque el uso repetido de este método sigue siendo una preocupación para el bienestar animal (Candappa, 2011).

Los primeros reportes sobre la inseminación artificial fueron realizados en Rusia por Ivanow en 1907. En la producción de ovinos, se tiene registro que en el año 1933 el científico Walton fue de los primeros en realizar esta técnica de inseminación en un lote de borregas, años después se llevó a programas de inseminación en Rusia (Córdova *et al.*, 2008).

La inseminación artificial, cuando se utiliza en conjunto con esquemas de pruebas de progenie precisas, puede incrementar de forma significativa el progreso genético, incluyendo la especie ovina; sin embargo, para poder maximizar estos beneficios, utilizar semen criopreservado es fundamental. Sin embargo, en las ovejas, por la limitación natural del cérvix, se requieren técnicas especializadas para obtener resultados aceptables (Donovan *et al.*, 2004).

## **2.8 Técnicas inseminación artificial**

Aunque la inseminación cervical con semen fresco es la técnica más utilizada a nivel mundial para la inseminación en oveja, ya que provee un método económico de utilizar el semen, generalmente no es efectivo cuando se utiliza semen congelado-descongelado. En ovejas, el cérvix no solo es un reservorio de espermatozoides, si no que funciona como una barrera, además de que dificulta la deposición

profunda del semen. Por lo anterior, se han generado diversas técnicas de inseminación artificial en ovejas, diferentes en complejidad, costo y efectividad, siendo las más comunes la inseminación vaginal, la inseminación cervical (o transcervical cuando es posible atravesar el cérvix) y la inseminación por laparoscopia (Evans, 1988).

### **2.8.1 Inseminación vaginal**

También conocida como “tiro en la oscuridad”. Esta técnica consiste en depositar el semen en la parte craneal de la vagina sin intentar localizar el cuello uterino. Los requisitos de este método son mínimos, tanto en manejo técnico y de las borregas. Sin embargo, se requiere de mayor número de espermatozoides por inseminación y no es realmente susceptible de ser utilizado con semen congelado. Además, las tasas de concepción también son bajas después de la sincronización farmacológica del estro, por lo que se utiliza después de la detección del estro durante la temporada de reproducción natural (Evans, 1988).

### **2.8.2 Inseminación cervical**

Consiste en pasar la pipeta de inseminación a través del cérvix. Es más complicada en los ovinos, ya que el canal cervical es más estrecho y tiene pliegues cervicales, por lo que generalmente el depósito del semen se realiza en la entrada del canal del cérvix (Kershaw *et al.*, 2005).

Para alcanzar a lograr la fertilización, el espermatozoide migra a través del aparato reproductor de la hembra cruzando barreras fisiológicas y anatómicas, siendo el cuello uterino y el istmo las principales barreras para los espermatozoides después de la IA cervical en borregas (Santoloria *et al.*, 2015).

Este método, con semen fresco, provee una manera económica y relativamente efectiva de usar el semen; sin embargo, no es suficientemente efectivo cuando se utiliza semen congelado-descongelado. Por ello, se desarrolló la técnica de inseminación intrauterina mediante laparoscopia (Evans, 1988).

### **2.8.3 Inseminación artificial por laparoscopia**

Esta técnica se realiza con la deposición del semen directamente dentro del lumen uterino, evitando la barrera natural del cérvix, lo que mejora de una forma radical la fertilidad (Salamón *et al.*, 2000; Hafez y Hafez, 2002). Para llevar a cabo la inseminación intrauterina, se introduce en la cavidad abdominal un trócar y cánula de 5 a 7 mm a la izquierda de la línea media de la oveja y a unos 5 cm de la ubre, cuidando de no perforar las venas visibles a simple vista. Antes de introducir el trócar y cánula de 5 mm a la derecha de la línea media, es conveniente dejar ingresar aire dentro de la cavidad abdominal, lo que facilita la visualización de los órganos internos. Reemplazando el trócar de 5 a 7 mm por el laparoscopio, se examina la cavidad abdominal para la localización de los cuernos uterinos. A través de la cánula de 5 mm, se introduce el transcap con la vaina o aspic de inseminación, con el volumen requerido de semen.

La inseminación de la dosis seminal se realiza mediante inyección en el tercio medio y en dorsal del cuerno uterino, depositándose la mitad de la dosis de semen. El semen debe fluir libremente hacia el interior del útero. Se repite el procedimiento en el otro cuerno uterino (Hafez y Hafez, 2002).

El semen congelado se usa comúnmente para el mejoramiento genético de los animales. Debe depositarse el semen en la luz uterina para mejorar tasa de gestación después de la inseminación artificial. La inseminación artificial por laparoscopia implica el depósito de semen directamente en los cuernos uterinos, proporcionando una tasa de gestación más alta que la inseminación artificial cervical (Martínez-Rojero *et al.*, 2007).

Masoudi *et al.* (2017) comparo tres técnicas de inseminación en ovinos (vaginal, transcervical y laparoscopica) utilizando semen congelado comparando dos tratamientos, lecitina de soya y yema de huevo, reportando que los mejores resultados de fertilidad fueron utilizando la técnica de laparoscopia en los dos tratamientos con 44% con la lecitina de soya y 42% con la yema de huevo.

### **3. HIPÓTESIS**

La adición de quercetina en el semen criopreservado de ovino incrementa la fertilidad *in vivo*.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la adición de quercetina en el semen criopreservado de ovino sobre la fertilidad *in vivo*.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el efecto de la adición de quercetina sobre las características espermáticas de motilidad en semen criopreservado de ovino.

Valorar el efecto de la adición de quercetina en el semen criopreservado de ovino sobre la vitalidad y daño acrosomal de los espermatozoides.

Evaluar la fertilidad *in vivo* del semen criopreservado de ovino adicionado con quercetina mediante inseminación artificial en ovejas sincronizadas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Área de estudio y animales

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio Reproducción e Investigación Animal del Departamento de Ciencias Veterinarias del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB), perteneciente a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). El trabajo de campo se realizó en una granja ubicada en Ciudad Juárez 31°43'12.9"N 106°27'39.0"W al norte del Estado de Chihuahua (INEGI, 2020).

Se utilizaron tres sementales de la raza Katahdin, con una edad promedio de 3 años con un peso aproximado de 80-120 kg y con una condición corporal de 4 (escala de 1-5 descrita por Russel *et al.*, 1969), originarios de rebaños de productores de la ciudad. Los animales se alimentaron con alfalfa molida con maíz rolado y agua *ad libitum*. También se llevó a cabo un manejo de medicina preventiva desparasitando y vacunando. Los animales fueron alojados en corrales de manejo con medidas de 3x3 metros en el Área de Investigación de Rumiantes, localizada dentro del ICB; en esta misma área se llevó a cabo la recolección de semen.

Se sincronizaron y se inseminaron por laparoscopia 201 hembras. Las hembras fueron alojadas en corrales los cuales cuentan con sombra y un espacio mínimo de 2x2 metros por animal. Son alimentadas con alfalfa y concentrado comercial y agua *ad libitum*. Al momento de trabajar se llevaron las hembras a un corral de manejo el cual cuenta con una manga o chute de manejo para evitar el mayor estrés de los animales.

El estudio comenzó en el mes de septiembre del año 2018 y finalizó en el mes de mayo del 2020.

### 5.2 Colección de semen y evaluación pre-criopreservación

Se trabajó individualmente cada uno de los sementales para la colección de semen, utilizando la técnica de vagina artificial descrita por Hafez y Hafez (2002). Una vez recolectadas las muestras de semen, fueron conservadas a baño maría a 37.5 °C (Presicion Water, Thermo Scientific, Estados Unidos de América). Se colectó semen de tres borregos, trabajándolos dos veces por semana durante seis semanas.

### 5.3 Evaluación macroscópica

Al momento de obtener la muestra de semen se observaron los valores de volumen, color y densidad. Estos indicaron si la muestra era apta para ser criopreservada. Se observó el volumen del eyaculado  $\geq 0.5$  mL (Banday *et al.*, 2017); el color del semen tenía que ser blanco, blanco cremoso y presentar una densidad cremosa (Hafez y Hafez, 2002).

#### **5.4 Evaluación microscópica**

Utilizando una pipeta (Pipet Lite; Rainin Instrument, LLC., Estados Unidos de América) se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra de semen, la cual se depositó en una cámara de recuento estándar de 20  $\mu\text{m}$  con cuatro áreas de conteo (Leja, Leja Products, Holanda), y se evaluó mediante el análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision, Minitube, Alemania). Mediante el análisis CASA, se obtuvieron los siguientes datos: motilidad (%), motilidad local (%), motilidad progresiva (%), motilidad circular (%), motilidad lenta (%), motilidad rápida (%) y concentración (cels/mL) para poder realizar la dilución del semen. La muestra para poder ser criopreservada necesitaba cumplir con los siguientes requisitos tener un volumen de 0.5 mL, una motilidad progresiva,  $\geq 80\%$ ; y concentración,  $3 \times 10^9$  espermatozoides / mL (Câmara *et al.*, 2011).

#### **5.5 Dilución del semen**

Se realizó un protocolo de diluyentes basado en TRIS (hidroximetil aminometano) y yema de huevo dividido en dos fracciones, utilizando un diluyente comercial (Two Step; Continental Plastic Corp., Estados Unidos de América). Para realizar la dilución se utilizaron dos mezclas del diluyente comercial: mezcla A, que contiene 12.1 g de Tris, 6.9 g de ácido cítrico monohidrato, 5.0 g de fructosa y 170 mL de agua destilada estéril. La mezcla B, que contiene 12.10 g de Tris, 6.9 g de ácido cítrico monohidrato, 5.00 g de fructosa, 70 mL de glicerol y 170 mL de agua destilada estéril. Llevando el 7% (v/v) de glicerol en la mezcla final; el tratamiento control fue en el único que se utilizó el antibiótico comercial y en los otros tres tratamientos se sustituyó el antibiótico comercial (60 mg de tilosina, 300 mg de gentamicina, 360 mg de espectinomicina y 180 mg de lincomicina) por diferentes concentraciones de quercetina y vitamina E; todo se trabajó a una temperatura de 37 °C.

El volumen de eyaculado obtenido se diluyó con la mezcla A y B (estos a una temperatura de 37 °C); después de realizar el análisis de los datos volumen, concentración espermática, motilidad progresiva y porcentaje de células vivas en una hoja de cálculo (Microsoft Office, Excel, Estados Unidos de América) hasta obtener una concentración de  $120 \times 10^6$  espermatozoides móviles por mL de forma que en cada pajilla tuvo una concentración de  $30 \times 10^6$  espermatozoides móviles por mL.

#### **5.6 Refrigeración y equilibramiento del semen**

Una vez diluido, el semen se envasó en pajillas de 0.25 mL, las cuales fueron depositadas en un recipiente que contiene agua a 37 °C y depositadas en un refrigerador a 5 °C para lograr que la temperatura disminuyera paulatinamente a una velocidad de 0.5 °C por minuto durante una hora de refrigeración. Una vez que se alcanzó una temperatura de 5 °C en el recipiente con las pajillas, se dejaron una hora más dentro del refrigerador para que la muestra se equilibrará a 5 °C.

### **5.7 Proceso de criopreservación del semen**

Una vez que las pajillas fueron refrigeradas y equilibradas a 5 °C, se colocaron en una hielera con nitrógeno líquido, se colocaron las pajillas en una rejilla a 5 cm del espejo de nitrógeno durante 10 minutos, luego se dejaron caer al nitrógeno y se dejaron reposar por 5 minutos. Después, las pajillas fueron colocadas en un termo criogénico lleno de nitrógeno a una temperatura -196 °C para su conservación; permanecieron ahí hasta el momento de su análisis y posteriormente la inseminación artificial por laparoscopia.

### **5.8 Evaluación de características seminales post-criopreservación**

El descongelamiento del semen se llevó a cabo colocando cada pajilla a baño maría (Presicion Water 282, Thermo Scientific, Estados Unidos de América) a 37 °C durante 40 segundos; se secó la pajilla, se abrió la pajilla y se colocaron 10 µL en la cámara de recuento estándar y después de este proceso se evaluaron motilidad (%), motilidad progresiva (%) y motilidad rápida (%), lo cual se evaluó mediante el análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision, Minitube, Alemania).

### **5.9 Estudios previos**

Se realizaron estudios previos para definir la concentración de quercetina en base a la revisión de literatura. Se trabajaron tres borregos y se congeló dos veces por semana durante seis semanas. Primero se hizo un estudio probando tres concentraciones diferentes. Las concentraciones que se utilizaron en los estudios de prueba fueron 10, 50, 100 µM de quercetina y se compararon contra un testigo al cual se le adicionó agua esteril y un control el cual llevaba antibiótico convencional (tilosina 55 µg/mL, gentamicina 275 µg/mL, espectinomicina 330 µg/mL, lincomicina 165 µg/mL). Al analizar los resultados hubo una tendencia de que la concentración mayor mostró mejores resultados y se hizo un segundo estudio utilizando otras tres concentraciones de quercetina 100, 200 y 300 µM. La concentración que obtuvo mejores resultados fue la elegida para utilizarse en el estudio (ver resultados).

También para definir la concentración a utilizar de la vitamina E se realizaron estudios previos para elegir la concentración a utilizar en el estudio, se utilizaron tres borregos congelando dos veces por semana durante seis semanas. Las concentraciones que se utilizaron en estudios previos fueron 100, 200, 300 µM de vitamina E y se compararon contra un testigo y un control. La concentración que mostro mejor resultado fue la que se eligió para la investigación (ver resultados).

### **5.10 Tratamientos**

Al preparar los diluyentes, las muestras diluidas se fraccionaron en cinco porciones similares y se realizaron cinco tratamientos:

Tratamiento control: Se realizó de forma convencional utilizando antibiótico convencional (tilosina 55 µg/mL; gentamicina 275 µg/mL; espectinomicina 330 µg/mL; lincomicina 165 µg/mL).

Tratamiento testigo: Se reemplazó el antibiótico convencional y se le agregó agua estéril.

Tratamiento quercetina: Se reemplazó el antibiótico convencional y se agregó quercetina 200 µM.

Tratamiento vitamina E: Se reemplazó el antibiótico convencional y se le agregó vitamina E 100 µM.

Tratamiento Q + VE: Se reemplazó el antibiótico convencional y se le agregó la combinación de quercetina 200 µM y vitamina E 100 µM.

### **5.11 Evaluación del daño en la membrana acrosomal**

Se tomaron 10 µL de la muestra de semen y se depositaron en un microtubo (Eppendorf, Alemania) de 1 mL y se agregaron 10 µL del reactivo azul tripano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), se mezcló bien la muestra y se colocaron 10 µL en un portaobjetos y se realizó un frotis dejándolo secar al aire libre a temperatura ambiente. Posteriormente, se fijó el frotis con etanol por dos minutos, después se enjuagó gentilmente con agua destilada y se dejó secar al aire libre a temperatura ambiente. Una vez terminada la fijación con tinción de azul tripano, los portaobjetos se colocaron en un recipiente con tinción Giemsa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) donde permanecieron 18-20 horas. Después, el portaobjetos se enjuagó gentilmente para eliminar el exceso de colorante con agua destilada, y se dejó secar al aire libre a temperatura ambiente. De esta forma, los espermatozoides muertos se tiñeron de color azul (azul tripano) y los espermatozoides vivos no se tiñeron de ningún color. Asimismo, los espermatozoides con el acrosoma intacto se tiñeron de color púrpura en la región acrosomal (Giemsa) y los espermatozoides que no acumularon la tinción en la región acrosomal se consideraron con daño en la membrana acrosomal (Tartaglione y Ritta, 2004). Con esto, los espermatozoides se clasificaron en tres categorías: espermatozoides vivos con acrosoma intacto, espermatozoides vivos con acrosoma dañado y espermatozoides muertos.

La evaluación de la tinción y conteo de las células espermáticas se realizó por microscopía óptica a 100X (PrimoStar, Carl Zeiss, Alemania). Se realizaron tres frotis por tratamiento, haciendo un conteo de 100 espermatozoides por frotis.

### **5.12 Sincronización y detección de estro**

Se sincronizó el estro de las borregas utilizando esponjas intravaginales (Cronogest CR<sup>®</sup>, Intervet international B.V. Boxmeer, Holanda) impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA). El tratamiento consistió en la inserción de esponjas vía vaginal en cada una de las hembras, para ser posteriormente retiradas al día 12, aplicando simultáneamente 200 UI de gonadotropina coriónica equina

(eCG; Novormon® 5000 Virbac, Argentina), vía intramuscular. Todo manejo se realizó en un corral de manejo el cual cuenta con una manga de manejo para evitar el mayor estrés de los animales. Se colocaron las esponjas con un aplicador de esponjas (Cronogest CR®, Intervet international B.V. Boxmeer, Holanda) se lubricó antes de ser introducida a la vagina y se aseguró que este bien colocada (Figura 1). Se limpió y desinfectó el aplicador antes de cada aplicación. Todo procedimiento estuvo supervisado por un médico veterinario zootecnista.

La detección de estro se realizó introduciendo a un semental a un corral con las hembras previamente sincronizadas. Se marcaron las hembras que mostraron comportamiento de estro. El indicador de que la hembra entró en celo (estro) es la aceptación del macho al momento de la monta (Alhamada *et al.*, 2017).



Figura 1. Colocación de esponja intravaginal para sincronización de estro en ovejas.

### **5.13 Inseminación artificial por laparoscopia**

Se pusieron en ayuno 24 horas antes de la inseminación retirando agua y alimento. Se inseminaron las borregas que entraron en celo por medio de la técnica de laparoscopia. Se les aplicó xilazina al 10% (Cloridrato de xilazina 10%, Procin Equus, PISA Agropecuaria S.A. de C.V., México) vía intramuscular (0.5 mg/ kg de peso) antes de la intervención, esto para tranquilizar a la oveja. Se coloca la oveja en posición decúbito dorsal, sujetando sus cuatro extremidades sobre una camilla, y se coloca a 45 °.

Se esquiló la región abdominal de la oveja y se desinfectó con cloruro de benzalconio al 1% (Dermoclean CBD Concentrado, Degasa, México), se aplicó un anestésico local (clorhidrato de lidocaína al 2%; Pisacaina, PISA, México), vía subcutánea, por punto de incisión. Se hicieron dos incisiones con un bisturí (numero 21) de aproximadamente 0.5 a 1 cm en la región abdominal. Después, se introdujo un trocar de 7 mm (Miltex Inc. Estados Unidos de América) del lado izquierdo de la línea media de la oveja y a unos 5 cm de la ubre para introducir el laparoscopio que permitió observar el útero. Se insufló con CO<sub>2</sub> la cavidad abdominal para observar mejor el útero y se introdujo del lado derecho de la línea media el trocar de 5mm para introducir el aspic (Aspic IVM Cassou L'Aigle, Francia). Se descongelaron las pajillas en un termo para descongelar (Cito Products Incorporated, Estados Unidos de América) a 37.5 °C por 40 segundos. El semen se aplicó vía intrauterina con ayuda del laparoscopio y el aspic (Aspic IVM, Francia), la dosis de inseminar (0.25 mL), se repartió entre los dos cuernos uterinos. Al terminar el procedimiento se aplicó un cicatrizante, en cada incisión y se le aplica una inyección de antibiótico (Oxitetraciclina 1 ml/10 kg de peso vía intramuscular) para impedir una posible infección y se aplica en caso de ser necesario un antipirético, analgésico, antiespasmódico y coadyuvante antiinflamatorio para disminuir la inflamación y dolor por la herida quirúrgica (Figura 2). Después se devolvió la oveja a su corral para recuperación. Los procedimientos de la inseminación artificial por laparoscopia se realizaron en un tiempo menor a los 5 minutos por borrega.

Para probar la fertilidad solo se utilizaron los tratamientos de testigo, quercetina, vitamina E y Q + VE. No se inseminó con el tratamiento control debido a que no se le adicionó ninguna sustancia que tenga un efecto antioxidante y antimicrobiano.



Figura 2. Inseminación de una oveja con la técnica laparoscopia.

### 5.14 Diagnóstico de gestación

Se realizó diagnóstico de gestación con ultrasonido (Kaixin, Xuzhou Kaixin Electronic Instrument CO. China) a los 35 días después de la inseminación por laparoscopia a todas las ovejas inseminadas, independientemente del tratamiento realizado al semen criopreservado. Se realizó en un corral que cuenta con un chute de manejo para la sujeción de los animales. El diagnóstico se realizó de manera rectal lubricando el transductor lineal 6.5 MHz con gel estéril (Figura 3).



Figura 3. Ecografía de una oveja. Flecha roja indica la presencia de saco amniótico y embrión a los 35 días de gestación.

### 5.15 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SAS 9.0 (Inst. Cary, NC, Estados Unidos de América). 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; motilidad progresiva, motilidad rápida, concentración, viabilidad de la membrana, integridad del acrosoma. Se realizó un modelo completamente al azar usando el PROC GLM del SAS, 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. Para la tasa de gestación se utilizó la prueba de chi cuadrado. Las diferencias se consideraron estadísticamente diferentes al nivel de  $P \leq 0.05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 3 se observan los resultados de las diferentes concentraciones de vitamina E, control y testigo que se utilizaron en los estudios preliminares para elegir la concentración a utilizar en la investigación. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes concentraciones ( $P>0.05$ ), aunque la concentración de 100  $\mu\text{M}$  de vitamina E fue mayor numéricamente, por lo que se eligió el tratamiento para utilizarse en la investigación al presentar los mejores resultados en las características espermáticas.

Tabla 3. Efecto de las diferentes concentraciones de vitamina E sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media  $\pm$  desviación estándar).

<b>Tratamiento</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>Motilidad progresiva (%)</b>	<b>Motilidad rápida (%)</b>
Control	43.63 $\pm$ 5.88 <sup>a</sup>	37.06 $\pm$ 6.22 <sup>a</sup>	12.94 $\pm$ 3.60 <sup>a</sup>
Testigo	52.17 $\pm$ 5.59 <sup>a</sup>	47.89 $\pm$ 5.79 <sup>a</sup>	15.24 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>
Vit E 100 $\mu\text{M}$	56.35 $\pm$ 5.08 <sup>a</sup>	50.17 $\pm$ 5.83 <sup>a</sup>	21.31 $\pm$ 6.12 <sup>a</sup>
Vit E 200 $\mu\text{M}$	34.95 $\pm$ 5.60 <sup>a</sup>	29.06 $\pm$ 5.94 <sup>a</sup>	7.55 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>
Vit E 400 $\mu\text{M}$	36.23 $\pm$ 6.64 <sup>a</sup>	31.18 $\pm$ 6.67 <sup>a</sup>	8.39 $\pm$ 2.52 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ); Vit E: Vitamina E

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la comparación de las diferentes concentraciones de quercetina que se utilizaron para elegir la concentración a utilizar en la investigación (estudio preliminar 1). No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa ( $P>0.05$ ); sin embargo, la concentración que tuvo mayor porcentaje en las tres variables de motilidad evaluadas (motilidad, motilidad progresiva y motilidad rápida) fue de 100  $\mu\text{M}$  de quercetina. En base a los resultados obtenidos en este estudio preliminar, se decidió realizar un segundo estudio para elegir la concentración de quercetina, utilizando concentraciones mayores para observar si la tendencia de mayor concentración mejoraría las características espermáticas del semen.

En la Tabla 5 se muestran los resultados del estudio preliminar 2 de quercetina. De forma similar al estudio preliminar 1, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P>0.05$ ). Sin embargo, la concentración que obtuvo mayor porcentaje (numéricamente) fue la de 200  $\mu\text{M}$  de quercetina, razón por la que fue elegida para utilizarse en la investigación.

Tabla 4. Efecto de las diferentes concentraciones de quercetina sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino; estudio preliminar 1 (Media  $\pm$  desviación estándar).

<b>Tratamiento</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>Motilidad progresiva (%)</b>	<b>Motilidad rápida (%)</b>
Control	43.63 $\pm$ 5.88 <sup>a</sup>	37.06 $\pm$ 6.22 <sup>a</sup>	12.94 $\pm$ 3.60 <sup>a</sup>
Testigo	52.17 $\pm$ 5.59 <sup>a</sup>	47.89 $\pm$ 5.79 <sup>a</sup>	15.24 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>
Q 10 $\mu$ M	34.43 $\pm$ 4.26 <sup>a</sup>	28.59 $\pm$ 3.76 <sup>a</sup>	6.20 $\pm$ 1.40 <sup>a</sup>
Q 50 $\mu$ M	38.50 $\pm$ 6.62 <sup>a</sup>	33.48 $\pm$ 6.30 <sup>a</sup>	7.93 $\pm$ 1.88 <sup>a</sup>
Q 100 $\mu$ M	51.34 $\pm$ 5.97 <sup>a</sup>	49.37 $\pm$ 6.51 <sup>a</sup>	15.81 $\pm$ 3.53 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa (P<0.05); Q: Quercetina.

Tabla 5. Estudio dos con diferentes concentraciones de quercetina sobre las características espermáticas de semen criopreservado de ovino; estudio preliminar 2 (Media  $\pm$  desviación estándar).

<b>Tratamiento</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>Motilidad progresiva (%)</b>	<b>Motilidad rápida (%)</b>
Control	43.63 $\pm$ 5.88 <sup>a</sup>	37.6 $\pm$ 6.22 <sup>a</sup>	12.94 $\pm$ 3.60 <sup>a</sup>
Testigo	52.17 $\pm$ 5.59 <sup>a</sup>	47.89 $\pm$ 5.79 <sup>a</sup>	15.24 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>
Q 100 $\mu$ M	51.34 $\pm$ 5.97 <sup>a</sup>	49.37 $\pm$ 3.76 <sup>a</sup>	20.36 $\pm$ 5.54 <sup>a</sup>
Q 200 $\mu$ M	64.05 $\pm$ 7.16 <sup>a</sup>	57.73 $\pm$ 9.13 <sup>a</sup>	23.81 $\pm$ 5.54 <sup>a</sup>
Q 300 $\mu$ M	55.02 $\pm$ 7.74 <sup>a</sup>	50.05 $\pm$ 8.41 <sup>a</sup>	20.82 $\pm$ 6.80 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.05); Q: Quercetina.

Con base a lo anterior, en la Tabla 6 se muestran los resultados del efecto de los diferentes tratamientos sobre las características espermáticas de motilidad evaluadas. En el estudio se encontró que ningún tratamiento presentó diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos (P>0.05). Sin embargo, numéricamente, el tratamiento que presentó mayor porcentaje de motilidad fue el tratamiento de quercetina 200  $\mu$ M con 71.57% y de motilidad progresiva también mostró los mejores resultados comparados con los otros tratamientos con un 68.13%. Sin embargo, en la motilidad rápida el tratamiento con mayor porcentaje fue el tratamiento de vitamina E con 31.84%.

Tabla 6. Efecto de la adición de quercetina y vitamina E sobre las características espermáticas de motilidad de semen criopreservado de ovino (Media  $\pm$  desviación estándar).

<b>Tratamiento</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>Motilidad progresiva (%)</b>	<b>Motilidad rápida (%)</b>
Control	67.20 $\pm$ 20.82 <sup>a</sup>	63.52 $\pm$ 21.31 <sup>a</sup>	26.65 $\pm$ 16.68 <sup>a</sup>
Testigo	67.55 $\pm$ 9.81 <sup>a</sup>	61.82 $\pm$ 12.05 <sup>a</sup>	24.55 $\pm$ 11.57 <sup>a</sup>
Q	71.57 $\pm$ 6.40 <sup>a</sup>	68.13 $\pm$ 6.57 <sup>a</sup>	27.31 $\pm$ 8.22 <sup>a</sup>
Vit E	69.36 $\pm$ 11.41 <sup>a</sup>	65.92 $\pm$ 12.62 <sup>a</sup>	31.48 $\pm$ 13.15 <sup>a</sup>
Q + Vit E	60.07 $\pm$ 13.16 <sup>a</sup>	53.95 $\pm$ 14.50 <sup>a</sup>	16.93 $\pm$ 8.72 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.05); Q: Quercetina, Vit E: Vitamina E

Quercetina: 200  $\mu$ M; Vitamina E: 100  $\mu$ M; Q + Vit E: 200  $\mu$ M de quercetina +100  $\mu$ M de vitamina E.

Como se mencionó anteriormente, la criopreservación tiene como objetivo mantener la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides a bajas temperaturas, pero esta provoca daños y deficiencias en los espermatozoides. Estas alteraciones se deben a la formación de cristales de hielo intracelulares, daños osmóticos y por enfriamiento que causan daño a las células espermáticas, fracturas citoplasmáticas o incluso efectos en las estructuras del citoesqueleto o el genoma (Isachenko, 2003). Asimismo, la criopreservación induce el estrés oxidativo como resultado la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en exceso, que es el responsable de afectar la estructura de los espermatozoides, provocando una deficiencia en las características espermáticas, pudiendo llegar afectar el ADN, lípidos y proteínas que le dan protección a la estructura de los espermatozoides, ya que alteran los sistemas enzimáticos y las vías de señalización celular lo cual puede provocar la muerte de las células. Los daños espermáticos causados por los ROS ocurren al momento de la criopreservación y post-criopreservación e incluso durante el almacenamiento en nitrógeno líquido. Es importante mencionar que los espermatozoides generan pequeñas cantidades de ROS que son importantes para diferentes procesos fisiológicos de los espermatozoides tales como capacitación, hiperactivación y fecundación del espermatozoide al ovocito (Mata-Campuzano *et al.*, 2015; Aitken, 2017); sin embargo, una vez que estos niveles fisiológicos sobrepasan los mecanismos de control oxidante, se ocasiona el estrés oxidativo. Por lo anterior, para reducir el daño provocado por los efectos de las ROS, se ha empleado la suplementación de antioxidantes a los medios de congelación-descongelación, como la vitamina E y el ácido ascórbico (Bathgate, 2011); como lo realizado en este estudio, en el cual la adición de quercetina, el cual, aunque no mostró una diferencia significativa, mostró un mayor porcentaje (numéricamente) en comparación con los demás tratamientos en la motilidad y en la motilidad progresiva. Esto se puede deber a que la quercetina inhibe los radicales libres, ya que es un potente

antioxidante y evita la capacitación espermática prematura antes de la inseminación artificial y la reacción acrosomal durante su almacenamiento, por lo que mejora el tiempo de vida de los espermatozoides (Restrepo *et al.*, 2016; Seifi-Jamadi *et al.*, 2016).

En este estudio, al adicionar una concentración de 200  $\mu\text{M}$  de quercetina en comparación a los demás tratamientos, este obtuvo mayor porcentaje en la motilidad y motilidad progresiva (numéricamente) debido a que es un potente antioxidante que actúa en los espermatozoides, inhibiendo los radicales libres, y posee una actividad captadora de ROS más intensa que la vitamina E (Stojanovic *et al.*, 2002), evitando la capacitación espermática prematura antes de la inseminación artificial y la reacción acrosomal durante su almacenamiento, por lo que mejora el tiempo de vida de los espermatozoides (Restrepo *et al.*, 2016; Seifi-Jamadi *et al.*, 2016). En este sentido, la motilidad pudo mejorarse numéricamente con la adición de 200  $\mu\text{M}$  de quercetina, debido a que la criopreservación ocasiona en el espermatozoide daños letales y modificaciones responsables de una reducción de las características espermáticas de motilidad. El estrés oxidativo y el daño osmótico causado durante los procesos de congelación y descongelación alteran los lípidos y composición proteica de la membrana espermática, disminuyendo la motilidad y la viabilidad (Membrillo-Ortega *et al.*, 2011). Similar a lo encontrado en el presente estudio, Ardeshirnia *et al.* (2017) demostraron que al utilizar quercetina en semen de ovino extraído del epidídimo al momento de la post-criopreservación los espermatozoides mostraron mejor viabilidad al utilizar las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{g/mL}$  en los diluyentes del semen, pero la motilidad y motilidad progresiva no se vieron afectadas en comparación con el tratamiento testigo (0  $\mu\text{g/mL}$ ). Por otra parte, Ahmed *et al.* (2019) utilizaron 150 y 200  $\mu\text{M}$  de quercetina en semen criopreservado de búfalo y al evaluarlo post-criopreservación, estos tratamientos fueron mejores en comparación con los demás tratamientos (control, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de quercetina) en la motilidad progresiva, así como en la integridad de la membrana plasmática en comparación con el control.

En la Tabla 7 se presentan los porcentajes de los espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI), espermatozoides vivos con acrosoma dañado (VAD) y espermatozoides muertos obtenidos en los diferentes tratamientos. El tratamiento de quercetina, a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ , mostró una diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos en los espermatozoides vivos con acrosoma intacto ( $P < 0.05$ ). Con respecto a los espermatozoides vivos con acrosoma dañado no hubo una diferencia entre los tratamientos control (antibiótico), vitamina E (100  $\mu\text{M}$ ) y quercetina (200  $\mu\text{M}$ ), pero sí tuvieron una diferencia comparándolos contra los tratamientos testigo (sin ningún aditivo) y la combinación de vitamina E (100  $\mu\text{M}$ ) y quercetina (200  $\mu\text{M}$ ) ( $P < 0.05$ ). Asimismo, y en concordancia con lo establecido anteriormente, el tratamiento de quercetina (200  $\mu\text{M}$ ) fue el que mostró una diferencia

significativa teniendo menos espermatozoides muertos en comparación con los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ).

Estos resultados pueden deberse a que, como se mencionó anteriormente, al momento de la criopreservación ocurren deficiencias en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, y esto se debe a el daño que causan los ROS (Karimfar *et al.*, 2015). Aunque los ROS son productos normales del metabolismo celular, cuando existen niveles altos de estos, los ROS son dañinos para los espermatozoides, y se generan tanto en el momento de criopreservación y post-criopreservación, dañando la morfología del espermatozoide, lo que ocasiona que no se cumplan procesos fisiológicos como la capacitación espermática, hiperactivación y la fecundación del ovocito por el espermatozoide (Aitken, 2017).

Tabla 7. Efecto de la adición de quercetina y vitamina E sobre la vitalidad y daño de acrosoma de los espermatozoides en semen criopreservado de ovino (Media  $\pm$  desviación estándar).

Tratamiento	Vivos Acrosoma	Vivos Acrosoma	Muertos (%)
	Intacto (%)	Dañado (%)	
Control	8.66 $\pm$ 4.50 <sup>b</sup>	48.33 $\pm$ 4.50 <sup>b</sup>	43.00 $\pm$ 4.00 <sup>ab</sup>
Testigo	10.66 $\pm$ 2.08 <sup>b</sup>	50.00 $\pm$ 6.00 <sup>a</sup>	39.33 $\pm$ 6.80 <sup>ab</sup>
Q	22.33 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	58.66 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	19.00 $\pm$ 2.64 <sup>c</sup>
Vit E	10.66 $\pm$ 2.08 <sup>b</sup>	52.00 $\pm$ 5.29 <sup>a</sup>	38.33 $\pm$ 6.08 <sup>b</sup>
Q + Vit E	11.33 $\pm$ 2.08 <sup>b</sup>	41.33 $\pm$ 3.21 <sup>b</sup>	47.33 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ); Q: Quercetina, Vit E: vitamina E

La integridad de la membrana es importante para mantener la viabilidad de los espermatozoides y es donde ocurren las principales lesiones al momento de la criopreservación. La reducción e incremento de la temperatura ocasiona daños ultraestructurales y funcionales. La integridad de la membrana es un requisito fundamental para la viabilidad del espermatozoide y el éxito de la fertilización (Martínez-Pastor *et al.*, 2004). En este sentido, el daño parcial o total del acrosoma de los espermatozoides provoca una incapacidad para fertilizar. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja. El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación, lo que hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. La observación del estado del acrosoma es uno de los datos más importantes en la determinación morfológica, ya que un espermatozoide debe mantener un acrosoma intacto hasta el momento en que se une a la zona pelúcida del ovocito (Hidalgo *et al.*, 2005).

Como se mencionó, el uso de quercetina en el semen reduce la peroxidación lipídica de los espermatozoides durante la congelación y evita su capacitación prematura antes de la inseminación artificial (Restrepo *et al.*, 2016). Y esto se debe a que la presencia y ubicación de las sustituciones de hidroxilo (-OH) y el anillo B de tipo catecol hacen de la quercetina un antioxidante eficaz, ya que posee una actividad captadora de ROS más intensa que la vitamina E (Stojanovic *et al.*, 2002).

En este sentido, al utilizar quercetina en una concentración de 0.15 mM en semen de equino criopreservado, no solo mostró mejor resultado en la motilidad de los espermatozoides al momento de la descongelación, sino también presentó un mayor porcentaje en espermatozoides con el acrosoma intacto en comparación con los otros tratamientos (200 U/mL de catalasa y 0.2 mg/mL de cisteína; Gibb *et al.*, 2013). Sin embargo, Seifi- Jamadi *et al.* (2016) utilizaron una concentración de 0.1 mM de quercetina en semen criopreservado de equino y reportaron que tuvo un mejor resultado en la motilidad, pero en la vitalidad e integridad de membrana no mostró un efecto significativo.

Similar a lo encontrado en el presente estudio, Ahmed *et al.* (2019) al utilizar 150 y 200  $\mu$ M de quercetina en semen criopreservado de búfalo se mostró que utilizando estas concentraciones los espermatozoides mostraron menor daño de la integridad de la membrana y daño acrosomal en comparación a los demás tratamientos (control, 50 y 100  $\mu$ M de quercetina). En el presente estudio se utilizaron concentraciones similares de 200  $\mu$ M de quercetina en semen criopreservado de ovino y fue la que obtuvo una diferencia significativa con los demás tratamientos en los espermatozoides vivos con acrosoma intacto, y los tratamientos que mostraron una diferencia significativa en los espermatozoides vivos con el acrosoma dañado fueron quercetina 200  $\mu$ M, antibiótico convencional y vitamina E en comparación con el tratamiento testigo y la combinación de quercetina y vitamina E. De igual forma, el tratamiento que mostró menos espermatozoides muertos con una diferencia significativa fue el tratamiento de quercetina 200  $\mu$ M ( $P > 0.05$ ).

Respecto a los efectos de la adición de vitamina E, diversos autores han evaluado la adición de vitamina E a los medios de criopreservación de semen de ovinos, reportando efectos favorables en la integridad acrosomal (Sarlós *et al.*, 2002), vitalidad (Da Silva *et al.*, 2009), y motilidad (Membrillo-Ortega *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013; Abdi-benemar *et al.*, 2015). No obstante, en el presente estudio no se encontró un efecto favorable de la adición de vitamina E como antioxidante en las variables de motilidad evaluadas y en la protección de la membrana acrosomal. El efecto favorable se esperaba debido a la función biológica de la vitamina E, previniendo la peroxidación lipídica de las membranas espermáticas (Sarlós *et al.*, 2002). Sin embargo, otros autores incluso han reportado efectos adversos de la adición de vitamina E en el semen de ovinos (Upreti *et al.*, 1997). Los efectos contradictorios de la adición de vitamina E pueden deberse a diferentes componentes de los diluyentes, ya que Sarlós *et al.* (2002)

menciona que el efecto de la vitamina varía en respuesta al azúcar y amortiguador utilizado en los diluyentes. Esto también podría explicar porque en el tratamiento donde se combinó la vitamina E y la quercetina no existió un efecto favorable en las variables evaluadas.

Finalmente, en la Tabla 8 se muestran los resultados de fertilidad (tasa de gestación) en las ovejas inseminadas por laparoscopia con el semen criopreservado de ovinos adicionado con los diferentes tratamientos. Sin embargo, y contrario a lo esperado debido a que el tratamiento con quercetina mejoró la protección al acrosoma, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Es importante mencionar que solo se utilizaron cuatro tratamientos para la inseminación artificial, excluyendo el tratamiento control (sin aditivos), ya que a este no se le adicionó ninguna sustancia que pudiera proteger contra bacterias que se pudieran dispersar durante el proceso de la inseminación artificial, pudiendo incluso ocasionar infecciones en los tractos reproductivos de las hembras inseminadas. Sin embargo, el tratamiento que mostró mayor resultado porcentual (numéricamente) en comparación a los demás tratamientos en la tasa de gestación fue el tratamiento de quercetina 200  $\mu\text{M}$  con resultado de 51.92% de fertilidad diagnosticado a los 35 días de gestación. En el caso del tratamiento que incluye la adición de vitamina E, la disminución numérica pudiera deberse a lo mencionado con anterioridad respecto a que los efectos de este antioxidante dependen de los compuestos utilizados (azúcares y amortiguadores) en la formulación del diluyente (Sarlós *et al.*, 2002). Aunado a lo anterior, no existen reportes donde se hayan evaluado los efectos en la fertilidad *in vivo* de la adición de vitamina E en los diluyentes, por lo que es necesario generar más información para dilucidar estos aparentes efectos contradictorios.

Es bien conocido que la criopreservación dificulta la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides. La baja fertilidad reportada en inseminación artificial cuando se utiliza semen criopreservado podría deberse a los daños ocasionados en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Santiani *et al.*, 2007; Barbas y Mascarenhas, 2009), es decir, la etapa de congelación-descongelación del semen provoca una reducción significativa de la calidad del espermatozoide (Sousa *et al.*, 2016).

Los daños en las células suelen provocar desestabilización e incluso ruptura de las membranas, y pérdida de componentes intracelulares, por ejemplo, enzimas metabólicas y el ATP, con la consiguiente pérdida de la viabilidad espermática (Bailey *et al.*, 2003). La importancia de que la integridad de la membrana se encuentre intacta al momento de la post-criopreservación es porque juega un papel importante en la viabilidad del espermatozoide y del éxito en la fertilización del ovocito (Martínez-Pastor *et al.*, 2004).

Tabla 8. Efecto de la adición de quercetina y vitamina E en el semen criopreservado de ovino sobre la tasa de gestación a los 35 días en ovejas inseminadas mediante inseminación artificial por laparoscopia.

<b>Tratamiento</b>	<b>Tasa de gestación (%)</b>
Control	23/50 (46.00%) <sup>a</sup>
Q	27/52 (51.92%) <sup>a</sup>
Vit E	17/50 (34.00%) <sup>a</sup>
Q + Vit E	21/49 (42.82%) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.05); Q: Quercetina, Vit E: vitamina E

De igual forma, el daño de la cromatina por lo general comienza en la región peri-acrosomal y las regiones basales del espermatozoide y posteriormente se expande a otras regiones del núcleo durante la criopreservación (Sousa *et al.*, 2016), afectando considerablemente el estado del acrosoma o incluso la vitalidad del espermatozoide. Su daño parcial o total en los espermatozoides conlleva a una incapacidad para fertilizar. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja (Hidalgo *et al.*, 2005). Sin embargo, los daños producidos en los espermatozoides podrían ser prevenidos usando antioxidantes adecuados en los diluyentes del semen (Banday, 2017).

La quercetina es un antioxidante que actúa en membrana, mitocondrias y acrosoma de los espermatozoides protegiéndolos al momento del descenso de la temperatura durante la criopreservación (Seifi-Jamadi *et al.*, 2016). En un estudio realizado por McNiven y Richardson (2006) determinaron que la inclusión de 0.05 a 0.3 mmol de quercetina en la criopreservación de semen de equino redujo significativamente el porcentaje de espermatozoides que sufrieron capacitación y reacción acrosomal al momento de la descongelación.

En el presente estudio, se utilizó la misma concentración de 200 µM de quercetina que utilizaron Ahmed *et al.* (2019), quienes reportaron incremento en la fertilidad *in vivo* en búfalos; sin embargo, aunque en el presente estudio no fue estadísticamente diferente, mostró un mayor porcentaje (numéricamente) en la tasa de gestación (51.92%) en comparación a los demás tratamientos evaluados. De igual forma, Ardeshirnia *et al.* (2017) probaron la fertilidad *in vitro* del semen criopreservado de ovino colectado del epidídimo, la cual aumentó significativamente con el uso de quercetina con las concentraciones de 5 y 10 µg/mL en comparación con los demás tratamientos; además, estas concentraciones aumentaron el número de embriones en la etapa de cigoto, mórula y blastocisto. Asimismo, en el estudio realizado por Ahmed *et al.* (2019), quienes utilizaron semen criopreservado de búfalo, demostraron que la fertilidad

*in vivo* al utilizar quercetina en el semen criopreservado de búfalo con concentraciones de 150 y 200  $\mu\text{M}$  fue mayor (61.82 y 65.22%, respectivamente) comparado contra el control (sin ningún aditivo; 46.90%). Lo anterior quizá pueda relacionarse con la prueba de vitalidad y daño del acrosoma, ya que, con esta concentración de quercetina, mostró una diferencia significativa en los espermatozoides vivos con el acrosoma intacto en comparación con los demás tratamientos, lo que indica que la fertilidad del semen criopresevado puede incrementarse mediante la adición de antioxidantes como la quercetina en el diluyente.

## 7. CONCLUSIONES

La adición de quercetina en el semen criopreservado de ovino mostró una diferencia significativa en los espermatozoides vivos con el acrosoma intacto utilizando la concentración 200  $\mu$ M en comparación con los demás tratamientos, indicando que cumplió con sus funciones antioxidantes al proteger los espermatozoides a los daños provocados por las bajas temperaturas al momento de la criopreservación. Esto trajo consigo un mayor porcentaje en la tasa de gestación en comparación con los demás tratamientos; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente diferente. Se recomienda seguir realizando estudios con diferentes concentraciones e incrementar los estudios con antioxidantes en pruebas *in vivo*.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, B.F., N. Zribi, L. Ammar-Keskes. 2011. Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa *in vitro*. *Andrologia*. 43: 261 -265.
- Abdi-Benemar, H., M. Jafaroghli, B. Khalili, M.J. Zamiri, H. Ezazi, A.A. Shadparvar. 2015. Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and  $\alpha$ - tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Rumin. Res.* 130: 166–170.
- Abecia, J., F. Forcada, A. González-Bulnes. 2012. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 130: 173-179.
- Abecia, J.A., F. Forcada, A. González. 2011. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. *Vet. Clinics of North America: Food Animal Practice.* 27: 67-79.
- Affonso F. J., H. F. Carvalho, R. Lançoni, K. M. Lemes, T. G. Leite, L. Z. Oliveira, E. C.C. Celeghini, R. P. de Arruda. 2017. Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. *J Equine Vet Sci.* 59:57-63.
- Agarwal A., S. Allamaneni. 2006. Oxidative stress and human reproduction. In: Singh, K. K. (ed.) *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Imperial College Press, New York. p. 687–703.
- Aguirre F.V., V.R. Reyes, O.T. Agustin. 2005. Entrenamiento de carneros para recolección de semen mediante vagina artificial, utilizando como estímulo objetos inanimados. *Vet. Mex.* 36: 105-111.
- Ahmed, H., S. Jahan, MM. Salman, F. Ullah. 2019. Stimulating effects of Quercetin (QUE) in tris citric acid extender on post thaw quality and *in vivo* fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology* 134: 18-23.
- Aitken, R.J. 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* 84: 1039-1052.
- Aköz, M., B. Bülbel, M. Bozkurt. 2006. Induction of multiple births in akkaraman cross-bred sheep synchronized with short duration and different doses of progesterone treatment combined with PMSG outside the breeding season. *Bull Vet. Inst. Pulawy.* 50: 97-100.

- Alcay, S., M. B. Toker, E. Gokce, B. Ustumer, N. T. Onder, H. Sagirkaya, Z. Nur, M. K. Soyulu. 2015. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology* 71: 329-333.
- Alhamada, M., N. Debus, A. Lurette, F. Bocquier. 2017. Automatic oestrus detection system enables monitoring of sexual behaviour in sheep. *Small Rumin. Res.* 149: 105–111.
- Allai L., B. Anass, M. Da silva, B. Nasser, B. El-Amari. 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Anim. Reprod. Sci.* 192: 6-17.
- Alomar M., A. Soukouti, M. Alden, M. Zarkawi. 2016. Testosterone and cortisol patterns and the effects of electro-ejaculation and copulation in Awassi rams. *Arch. Anim. Breed.* 59: 139-144.
- Alvarez M., L. Anel-Lopez, J. C. Boixo, C. Chamorro, M. Neila-Montero, R. Montes-Garrido, L. Anel. 2019. Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reprod. Domes. Anim.* 54: 32–40.
- Ambrosi C., N. Rubio, G. Gimenez, A. Venturino, E. Aisen, M. Lopez. 2018. Modeling of behavioral responses for successful selection of easy-to-train rams for semen collection with an artificial vagina. *Anim. Reprod. Sci.* 193: 90-97.
- Ardeshirnia, R., M. Zandi, M.R. Sanjabi. 2017. The effect of quercetin on fertility of frozen-thawed ram epididymal spermatozoa. *South African J. Anim. Sci.* 47: 237-244.
- Avendaño L., F. Álvarez, L. Molina. 2007. Reproduction performance of pelibuey ewes in response to estrus synchronization and artificial insemination in Northwestern Mexico. *J. Anim. Vet. Advances.* 6: 807-812.
- Ávila-Portillo L. M., J. I. Madero, C. López, M. F. León, L. Acosta, C. Gómez, L. G. Delgado, C. Gómez, J. M. Lozano, M. T. Reguero. 2006. Fundamentos de Criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 29: 291-300.
- Bailey, J.L., A. Morrier, N. Cormier. 2003. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 393-401.
- Balcázar S.J.A., V.E. Eli, A.A. Porras, M.B. Rodríguez. 2013. Sincronización del estro y fertilidad en ovejas Dorper aplicando un esquema corto de progesterona. *Ciencia Veterinaria.* 5.

- Banday, M. N., F. A. Lone, F. Rasool, M. Rashid, A. Shiraki. 2017. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*. 74: 25-30.
- Bansal, A. K., G. S. Bilaspuri. 2008. Effect of ferrous sulphate and ascorbic acid on motility, viability and lipid peroxidation of crossbred cattle bull spermatozoa. *Animal* 2: 100–104.
- Barbas, J. P., R. D. Mascarenhas. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10: 49-62.
- Bathgate, R. 2011. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. *Reprod. Domest. Anim.* 46 Suppl 2: 23-35.
- Benhenia, K., A. Lamara, S. Fatmi, M. Iguer-Ouada. 2016. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Rum. Res.* 141: 29–35.
- Berkovich L., G. Earon, I. Ron, A. Rimmon, A. Vexler, S. Lev-Ari. 2013. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor- kappa B and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complement Altern. Med.* 13:212-218.
- Breining E., A. Descalzo, L. Rossetti, D. Abramovich, M.T. Beconi. 2011. Boar sperm functionality is related to a atocopherol content after freezing-thawing. *Andrologia*. 43: 409-415.
- Bucak, M. N., A. Ateşşahin, O. Varişli, A. Yüce, N. Tekin, A. Akçay. 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.
- Bukar, A., A. Uba, T.I. Oyeyi. 2010. Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* lam. Extracts against some food – borne microorganisms. *Bajopas*. 3: 43-48.
- Buratovich O. Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que la afectan. Parte 1: La alimentacion. *Sitio Argentino de Produccion Animal*. 2010; p. 1-4.
- Cabrita E., P. Diogo, P.S. Martinez, C. Sarasquete, M.T. Dinis. 2011. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Anim. Reprod. Sci.* 125: 189-195.

- Câmara D.R., S.V. Silva, F.C. Almeida, J.F. Nunes, M.M.P. Guerra. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*. 76: 342–350.
- Candappa I. B.R., P. M. Bartlewski. 2011. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *The Open Reprod. Sci. J.* 3: 162-175.
- Córdova A., M.S. Jiménez, C.A. Córdova, J.E. Guerra. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Vet.* 19: 67–79.
- Cormier, N., J.L. Bailey. 2003. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 69: 177-185.
- Da Silva M., S.D. Bicudo, H.C. Azevedo, C.C. Sicherle, D.B. de Sousa, L. Rodello. 2009. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with antioxidants. *Small Rumin. Res.* 85: 85–90.
- Dias, F., S. Lopes, A. Villarroel. 2001. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. *Brazilian J. Vet. Anim. Sci.* 53: 618-623.
- Donovan, A., J. P. Hanrahan, E. Kummer, P. Duffy, M. P. Boland. 2004. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen thawed semen at a natural or synchronized oestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 359-368.
- Drago, M., M. López, T. Saínez. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 37: 56-68.
- Evans, G. 1988. Current topics in artificial insemination of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 41: 103-116.
- Falchi, L., G. Galleri, M. T. Zedda, S. Pau, L. Bogliolo, F. Ariu, S. Ledda. 2018. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livest Sci.* 207: 1-6.
- Fallis A. 2013. Sistemas de producción y reproducción en el ganado ovino de carne y leche. *J. Chem. Info. Model.* 53: 1689–1699.

Fraire S., A. Pro, G. Ramírez, C. Sánchez, J. Gallegos. 2013. Selenio y vitamina E en la fertilidad de ovejas pelibuey sincronizadas con progesterona. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Campus Montecillo. Estado de México.

Galina, H. M.A., R.M. Ortiz, C.M. Guerreo. 2018. Oxidative stress and antioxidants. *Avances Invest. Agropec.* 22: 47-61.

Gholami H., M. Chamani, A. Towhidi, F. Hashem. 2011. Improvement of semen quality in Holstein bull during heat stress by dietary supplementation of omega-3 fatty acids. *Int. J. Fertil. Steril.* 4: 160-167.

Gholami, M., Z. Faraji, M. J. Zamiri. 2012. Effect of egg yolk of four avian species on the cryopreserved ram spermatozoa. *Iran, J. Vet. Res.* 13: 23-27.

Gibb Z., T. Butler, L. Morris, W. Maxwell, C. Grupen. 2013. Quercetin improves the post thaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and non-sorted stallion sperm. *Theriogenology.* 79: 1001-1009.

Hafez E., B. Hafez. 2002. *Reproduction in farm animals.* Seventh Edition. USA. ISBN. 0-083-30577-8 pp. 172-181.

Hidalgo C.A., C. Tamargo, C. Diez. 2005. Análisis del semen bovino. *Boletín informativo del SERIDA* N° 2.

Hu J., W. Tian, X. Zhao, L. Zan, H. Wang, Q. Li. 2010. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Anim. Reprod. Sci.* 121: 72-77.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2017. Calendario GPS y Coordenadas RGNA ITRF08. Marzo 2017, de INEGI Sitio web: [http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geodesia/doc/cale2017\\_itrf2008.pdf](http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geodesia/doc/cale2017_itrf2008.pdf)

Isachenko, E. 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod. Biomed. Online* 6: 191-200.

Jeong, Y.J., M.K. Kim, H.J. Song, E.J. Kang, S.A. Ock, B. Kumar, G.J. Rho. 2009. Effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology,* 58: 181–189.

- Kalyan D., D. Kumar, K. Balaganur, R. Gulyani, K. Naqvi. 2016. Effect of breeding season on fertility of sheep following estrus synchronization and fixed-time artificial insemination under field conditions in semi-arid tropical region. *Biol. Rhythm Res.* 47: 787-795.
- Karimfar, M.H., F. Niazvand, K. Haghani, S. Ghafourian, R. Shirazi, S. Bakhtiyari. 2015. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 28: 69-76.
- Kermani H., H. Kohram, A. Zareh. 2012. Ovarian response and pregnancy rate following different doses of eCG treatment in Chall ewes. *Small Rumin. Res.* 102: 63-67.
- Kershaw C., M. Khalid, M. McGowan, K. Ingram, S. Leethongdee, G. Wax, R. Scaramuzzi. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 64: 1225-1235.
- Kheradmand, A., H. Babaei, J. Abshenas. 2006. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled-stored ram semen. *Iran. J. Vet. Res.* 7: 40-45.
- Korhonen K., H. Julkunen, K. Kananen, P. Bredbacka, T. Tiirikka, M. Raty. 2012. The effect of ascorbic acid during biopsy and cryopreservation on viability of bovine embryos produced *in vivo*. *Theriogenology.* 77: 201-205.
- Kulaksiz R., O. Ucar, A. Daskin. 2013. Effects of FGA sponge and Ovsynch based protocols on reproductive performance of fat-tailed ewes during the breeding season. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 19: 629-33.
- Lakhanpal P., D.K. Rai. 2007. Quercetin: a versatile flavonoid. *Internet J. Med. Update.* 2: 22-37.
- Lozano J.F., L.F. Uribe, J.H. Osorio. 2012. Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas (*Ovis aries*). *Vet. Zootec.* 6:134-147.
- Malenaje C., J. Greyling, M. Raito. 2014. Seasonal variation in semen quality of dorper rams using different collection techniques. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 44: 26-32.
- Marco-Jiménez F., S. Puchades, J. Gadea, J. S. Vicente, M. P. Viudes-de-Castro. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64: 1756-1765.

- Martemucci G., A.G. D'Alessandro. 2011. Synchronization of oestrus and ovulation by short time combined FGA, PGF2a, GnRH, eCG treatments for natural service or AI fixed-time. *Anim. Reprod. Sci.* 123: 32–39.
- Martinez–Pastor F., A. Johannisson, J. Gil, M. Kaabi, L. Anel, P. Paz, H. Rodriguez–Martinez. 2004. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC–1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen–thawed ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 121-133.
- Martínez-Rojero R., J. Hernández, L. Reyna, R. Santos. 2007. Intrauterine insemination with frozen-thawed semen in Creole goats synchronized in estrous during the nonbreeding season. *Res. J. Anim. Sci.* 1: 76-80.
- Masoudi R., A. Shahneh, A. Towhidi, H. Kohram, A. Akbarisharif, M. Sharafi. 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Criobiology.* 74: 77-80.
- Mata-Campuzano, M., M. Álvarez-Rodríguez, M. Álvarez, J. Tamayo-Canul, L. Anel, P. de Paz, F. Martínez-Pastor. 2015. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology.* 83: 520-528.
- McNiven M., G. Richardson. 2006. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preserv Technol.* 4: 169-177
- Medeiros, C. M., F. Forrel, A. T. Oliveira, J. L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology.* 57: 327-344.
- Mehraban F., M. Mostafazadeh, H. Sadeghi, A. Azizi, M. Akbartabar Toori, B. Gramizadeh, V. Barati, H. Sadeghi. 2020. Anticancer activity of *Astragalus ovinus* against 7, 12 dimethyl benz (a) anthracene (DMBA)-induced breast cancer in rats. *Avicenna J Phytomed.* 10: 533-545.
- Mellisho E., W. Terrel. 2007. Tasa de no retorno después de inseminación intrauterina vía laparoscópica con semen congelado de carneros australianos. *Sitio Argentino de Producción Animal. APPA – ALPA.* 1-4.
- Membrillo-Ortega, A., A. Córdova-Izquierdo, J.J. Hicks-Gómez, J.J. Valencia-Méndez, H. Castillo-Juárez. 2011. Effect of the addition of antioxidants in the extender of semen of male goat before freezing and after thawing. *Rev. Vet.* 22: 85-90.

- Moyo B., S. Oyedemi, P. J. Masika, V. Muchenje. 2012. Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. *Meat Sci.* 91: 441-447.
- Naim P., M. Cueto, A. Gibbons. 2009. Timed artificial insemination with ram chilled semen. *Archiv. Zootec.* 58: 435-440.
- Nasiri A. H., A. Towhid, S. Zeinoaldini. 2012. Combined effect of DHA and atocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia.* 44: 550-55.
- Nitiema L., A. Savadogo, J. Simporé, D. Dianou, A. Traore. 2012. *In vitro* antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. *Int. J. Microbiol. Res.* 3: 183-187.
- Palmer C. W. 2005. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology.* 64: 469-479.
- Paudel K., S. Kumar, S. Meur, A. Kumaresan. 2010. Ascorbic acid catalase and chlorpromazine reduce cryopreservation-induced damages to crossbred bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 45: 256-262.
- Restrepo G., J.B. Montoya Rojano. 2016. Capacidad antioxidante y calidad post- descongelación del semen equino criopreservado con quercetina y ergotioneina. *Rev. Med. Vet. Zoo.* 63: 167-178.
- Rivas G., A. Garcia. 2002. Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alimen, Nutr. Salud* 2: 31-38.
- Rosatti, M.I., M.T. Beconi, M. Córdoba. 2003. Proacrosin-acrosin activity in capacitated and acrosome reacted sperm from cryopreserved bovine semen. *Biocell.* 28: 311-316.
- Russel, A., J. Doney, R. Gunn. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *J. Agric. Sci.* 72: 451.
- Salamon S., W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.
- Santiani A., L. Ruiz, R. Sandoval, S. Evangelista, M. Urviola, N. Catacora, et al. 2007. Incremento de la tasa de no retorno de celo en ovejas utilizando un antioxidante análogo de superóxido dismutasa (Tempo) durante la criopreservación de semen. En: XX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Cusco, Perú: Asociación Peruana de Producción Animal.

- Santolaria, P., S. Vicente-Fiel, I. Palacín, E. Fantova, M.E. Blasco, M.A. Silvestre, J.L. Yániz. 2015. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 163: 82–88.
- Sarlós, P., A. Molnár, M. Kókai, G.Y. Gábor, J. Rátky. 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet. Hung.* 50: 235–245.
- Satorre M.M., E. Bereinger, M.T. Beconi. 2013. Cryopreservation with  $\alpha$ -tocopherol and sephadex filtration improved the quality of boar sperm. *Theriogenology*. 78: 1548-1556.
- Seifi-Jamadi, A., H. Kohram, A.Z. Shahneh, M. Ansari, B. Macías-García. 2016. Quercetin ameliorate motility in frozen-thawed turkmen stallions sperm. *J. Equine Vet. Sci.* 45: 73–77.
- Seifi-Jamadi, A., E. Ahmad, M. Ansari, H. Kohram. 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*. 75: 15-20.
- Silva E., J. Cajueiro, S. Silva, P. Soares, M. Guerra. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*. 77: 1722-1726.
- Silva, S.V., A.T. Soares, A.M. Batista, F.C. Almeida, J.F. Nunes, C.A. Peixoto, M.M.P. Guerra. 2013. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 137: 37–44.
- Silvia S., A. Soares, F. Almeida, J. Nunes, C. Peixoto, M. Guerra. 2013. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 137: 37–44.
- Soares SE. 2002. Phenolic acids as antioxidants. *Rev Nutr.* 15: 71– 81.
- Sousa, P.C., E.E., Santos, A.M. Silva, J.A. Bezerra, A.L. Souza, G.L. Lima, M.F. Oliveira, A.L. Silva. 2016. Identification of ultrastructural and functional damages in sperm from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) due to cryopreservation. *Pesq. Vet. Bras.* 36:767-774.
- Stojanovic S., H. Sprinz, O. Brede. 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Arch Biochem Biophys.* 391: 79–89.

- Swelum, A.A.A., A.N. Alowaimer, M.A. Abouheif. 2015. Use of fluorogestone acetate sponges or controlled internal drug release for estrus synchronization in ewes: Effects of hormonal profiles and reproductive performance. *Theriogenology*. 84: 498–503.
- Sylla L., C. Palombi, G. Stradaoli, A. Vagniluca y M. Monaci. 2015. Effect of semen collection by transrectal massage of accessory sexual glands or artificial vagina on the outcome of breeding soundness examinations of Italian yearling beef bulls. *Theriogenology*. 83: 779–785.
- Tartaglione, C.M., M.N. Ritta. 2004. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 62: 1245–1252.
- Toker M.B., S. Alcaay, E. Gokce, B. Ustuner. 2016. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resiliencie. *Cryobiology*. 72: 205-209.
- Tondello, L., P. Dos Santos, S. Gaudêncio. 2010. Microbiological and functional evaluation of an alternative device (OB®) for estrous synchronization in ewes. *Ciencia Rural*. 49: 389-395.
- Tvrda E., Z. Kňazická, L. Bárdos, P. Massányi, N. Lukáč. 2011. Impact of oxidative stress on male fertility- a review. *Acta Vet. Hung.* 59: 465-484.
- Upreti, G.C., K. Jensen, J.E. Oliver, D.M. Duganzich, R. Munday, J.F. Smith. 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 269–278.
- Uribe-Velásquez L., O.E. Lara-Herrera C. 2002. Respostas endócrinas e ovarianas associadas com o folículo da primeira onda folicular em ovelhas sincronizadas com CIDR ou PGF2 $\alpha$ . *R. Bras. Zootec.* 31: 944-953.
- Vasconcelos, J., A. Chaveiro, F. Moreira. 2014. Effect of Freezing Rates and Supplementation of  $\alpha$ -Tocopherol in the Freezing Extender in Equine Sperm Cryosurvival. *J. Equine Vet. Sci.* 34: 992-997.
- Vongsak B., P. Sithisarn, W. Gritsanapan. 2013. Bioactive contents and free radical scavenging activity of Moringa oleífera leaf extract under different storage conditions. *Ind. Crops Prod.* 49: 419-421.
- Wang Y., Y. Gao, H. Ding, S. Liu, J. Gui, D. Liu. 2017. Subcritical extraction of flavonoids from *moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. *Food Chem.* 218: 152-58.

Zamiri, M. 2020. Update on semen cryopreservation in sheep and goats: A review. *J. Livest. Sci. Tech.* 8: 1-15.