



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2021; 11:1-14. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.36>
Artículo Original. Recibido: 11/06/2021. Aceptado: 30/09/2021. Publicado: 30/10/2021. Clave: e2021-38.

Evaluación de la adición de quercetina y vitamina E al medio de criopreservación de semen ovino sobre la fertilidad *in vivo*

Evaluation of the addition of quercetin and vitamin E to the cryopreservation medium of ram semen on *in vivo* fertility

Jiménez-Aguilar Eduardo*¹ ID, Quezada-Casasola Andrés¹ ID, Prieto-Caraveo Mario² ID, Orozco-Lucero Ernesto¹ ID, Itzá-Ortiz Mateo¹ ID, Carrera-Chávez José**¹ ID

¹Departamento de Ciencias Veterinarias, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Ciudad Juárez, Chihuahua, México. ²Animal Health and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture. El Paso, Texas, USA. *Autor responsable. **Autor de correspondencia: Carrera-Chávez José, Anillo envolvente y Estocolmo, Ciudad Juárez, Chihuahua, México CP 32310. Correo: jose.carrera@uacj.mx, al182903@alumnos.uacj.mx, aquezada@uacj.mx, mario.a.prieto@usda.gov, ernesto.orozco@uacj.mx, mateo.itza@uacj.mx

RESUMEN

La criopreservación induce estrés oxidativo que tiene efectos adversos en la calidad post-descongelado del semen. El objetivo fue evaluar el efecto de la adición de quercetina al medio de criopreservación de semen ovino. El semen se colectó de tres sementales ovinos mediante vagina artificial, y se utilizó un diluyente comercial. Los tratamientos fueron: control; quercetina 200 µM; vitamina E 100 µM; y la combinación de quercetina y vitamina E. Se evaluó la vitalidad, motilidad, integridad del acrosoma y fertilidad *in vivo*. Las variables numéricas se analizaron con un ANOVA y la tasa de gestación con ji cuadrado. En la evaluación de las características espermáticas de motilidad no se encontró diferencia significativa entre tratamientos. El tratamiento con mayor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto fue quercetina 200 µM (22.33±2.51%) comparado con los demás tratamientos (P<0.05). La fertilidad *in vivo* no fue estadísticamente significativa, pero se encontró una diferencia numérica en el porcentaje de gestación con la adición de 200 µM de quercetina (51.92%) en comparación a los demás tratamientos. En conclusión, la adición de 200 µM de quercetina al medio de criopreservación de semen ovino mejoró la vitalidad e integridad del acrosoma, pero no el porcentaje de fertilidad *in vivo*.

Palabras clave: antioxidante, congelación, tasa de gestación, características espermáticas.

ABSTRACT

Cryopreservation induces oxidative stress that has adverse effects on post-thawed semen quality. The objective was to evaluate the effect of adding quercetin to sheep semen cryopreservation medium. Semen was collected from three sheep stallions by artificial vagina, and a commercial diluent was used. Treatments were: control; quercetin 200 µM; vitamin E 100 µM; and the quercetin and vitamin E combination. Vitality, motility, acrosome integrity and fertility were evaluated *in vivo*. Numerical variables were analyzed with ANOVA and gestation rate with chi-square. In the evaluation of sperm motility characteristics, no significant difference was found between treatments. The treatment with the highest percentage of live spermatozoa with intact acrosome was quercetin 200 µM (22.33±2.51%) compared to the other treatments (P<0.05). *In vivo* fertility was not statistically significant, but a numerical difference in the percentage of gestation was found with the addition of 200 µM quercetin (51.92%) compared to the other treatments. In conclusion, the addition of 200 µM quercetin to the ovine semen cryopreservation medium improved the vitality and integrity of the acrosome, but not the *in vivo* fertility percentage.

Keywords: antioxidant, freezing, gestation rate, sperm characteristics.



INTRODUCCIÓN

El objetivo de la criopreservación es mantener la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides a bajas temperaturas; sin embargo, esta provoca daños y deficiencias en los espermatozoides. Al momento de la criopreservación, los espermatozoides se exponen a impactos físicos y químicos que dificultan la viabilidad, disminuyen la motilidad, dañan el acrosoma y disminuyen su fertilidad (Mata-Campuzano *et al.*, 2015). Esto se debe en parte al hecho de que la criopreservación induce estrés oxidativo, como resultado de la formación excesiva de especies reactivas al oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés; El-Khawagah *et al.*, 2020), ya que los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana son susceptibles al daño por ROS, y el citoplasma de los espermatozoides contiene bajas concentraciones de las enzimas que capturan los radicales libres (Karimfar *et al.*, 2015).

La adición de antioxidantes en los diluyentes para la congelación de semen produce una mejora en las características post-descongelación, ya que protegen a los ácidos grasos poli-insaturados de los espermatozoides, previniendo así el daño por estrés oxidativo. Se ha demostrado que numerosas plantas tienen un efecto antioxidante, ya que contienen flavonoides con capacidades antioxidantes como la quercetina, y vitaminas antioxidantes como C, E y A (Berkovich *et al.*, 2013). La quercetina es un flavonoide antioxidante comúnmente presente en vegetales, capaz de eliminar las ROS (El-Khawagah *et al.*, 2020) y se ha reportado que mejora la calidad del semen de borrego post-descongelación (Silva *et al.*, 2012; Gibb *et al.*, 2013). La vitamina E es un antioxidante lipofílico que protege los ácidos grasos insaturados contra la peroxidación, ya que es un potente eliminador de radicales peroxilo y un inhibidor importante de la reacción en cadena de lipo-peroxidación en animales (Allai *et al.*, 2018), y es comúnmente utilizado como antioxidante en la criopreservación de semen (Abdi-Benemar *et al.*, 2015; Benhenia *et al.*, 2016).

En comparación con otras técnicas de inseminación, la inseminación artificial por laparoscopia se utiliza como alternativa para la utilización de semen criopreservado, ya que los daños que ocurren en los espermatozoides al momento de la criopreservación limitan la fertilidad post-inseminación con técnicas vaginales o cervicales (Allai *et al.*, 2018). Sin embargo, no se tiene ningún reporte de la evaluación de la fertilidad *in vivo* tras la adición de antioxidantes como la quercetina y la vitamina E en semen criopreservado de ovino. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de quercetina en el medio de criopreservación de semen ovino sobre características espermáticas y fertilidad *in vivo*.



MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio y animales

El estudio se realizó en el Laboratorio de Investigación y Reproducción Animal de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ). La inseminación artificial se realizó en una granja ubicada en Ciudad Juárez en las coordenadas 31°43'12.9" N y 106°27'39.0" O, al norte del Estado de Chihuahua. El procesamiento del semen y la inseminación artificial se realizaron durante la época reproductiva (julio a febrero).

El semen se colectó de tres sementales de la raza Katahdin, con una edad aproximada de tres años, con una condición corporal de 4 (escala de 1-5). Para evaluar la fertilidad del semen criopreservado, se inseminaron 201 hembras de encaste racial de pelo (Katahdin, Pelibuey, Blackbelly), con una edad entre 2 y 4 años de edad y una condición corporal entre 2 y 4 de la escala 1-5. Los animales fueron alimentados con alfalfa, concentrado comercial y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos en el presente estudio se realizaron de acuerdo a las técnicas de cuidado animal y salud en México (NOM-051-ZOO-1995) y con la aprobación del Comité Institucional de Ética y Bioética de la UACJ (CIEB-2019-1-093).

Colección de semen y evaluación pre-criopreservación

Se trabajó individualmente cada uno de los sementales para la colección de semen, con la técnica de vagina artificial. Una vez recolectadas las muestras, fueron conservadas a baño maría a 37.5 °C (Presicion Water 282, Thermo Scientific, EUA) mientras se colectaban y evaluaban las tres muestras. La colección de semen se realizó dos veces por semana, durante seis semanas. Se evaluaron 12 eyaculados por borrego, con un total del 36 eyaculados evaluados.

La evaluación pre-criopreservación se realizó tomando 10 µL de cada muestra mediante una pipeta (Magnetic-Assist Pipette, Rainin, EUA), la cual se depositó en una cámara de recuento estándar de 20 µm (Cámara Leja, Leja Products, Holanda), para ser evaluada mediante un análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision, Minitube, Alemania) con un microscopio vertical (AxioScope.A1, Zeiss, Alemania). Se evaluó la motilidad progresiva (%) y la concentración espermática (células/mL). Se establecieron como niveles mínimos requeridos para congelar: volumen del eyaculado ≥ 0.5 mL, motilidad progresiva $\geq 80\%$, y una concentración de 3×10^9 espermatozoides/mL ([Cámara et al., 2011](#)).

Dilución y procesamiento del semen

Los eyaculados se procesaron individualmente, ya que se utilizaron para la inseminación artificial. Se realizó un protocolo de dilución con un diluyente comercial (Two Step; Continental Plastic Corp., EUA) con 6% de glicerol (v/v) y 10% de yema de huevo (v/v). La dilución se trabajó a una temperatura de 37 °C. El eyaculado obtenido se diluyó hasta obtener una concentración de 120×10^6 espermatozoides móviles por mL. Una vez diluido,



el semen se envasó en pajillas de 0.25 mL, con una concentración de 30×10^6 espermatozoides motiles por pajilla, y se almacenó a 5 °C por dos horas. Una vez que las pajillas fueron refrigeradas y equilibradas a 5 °C, se colocaron en una hielera 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 para su conservación; permanecieron ahí hasta el momento de su análisis y posteriormente para su uso en la inseminación artificial por laparoscopia.

Tratamientos

Las muestras diluidas se fraccionaron en cuatro porciones similares y se realizaron cuatro tratamientos: tratamiento control, se realizó de forma convencional; tratamiento quercetina (Q), se adicionaron 200 μ M de quercetina (Q4951, Sigma Aldrich, EUA); tratamiento vitamina E (VE), se adicionaron 100 μ M de vitamina E (47786, Sigma Aldrich, EUA); y tratamiento Q + VE, se adicionó una combinación de quercetina (200 μ M) y vitamina E (100 μ M).

Descongelación de las muestras seminales

El descongelamiento del semen se llevó a cabo colocando cada pajilla en baño maría (Presicion Water 282, Thermo Scientific, EUA) a 37.5 °C durante 40 segundos. Para evaluar las características seminales y la integridad del acrosoma, se seleccionaron y descongelaron al azar un total de seis pajillas por cada tratamiento por borrego (24 pajillas).

Evaluación de características seminales post-descongelación

Para evaluar las características seminales se colocaron 10 μ L de semen en la cámara de recuento estándar para evaluar motilidad (%), motilidad progresiva (%) y motilidad rápida (%), mediante el sistema CASA. En el Cuadro 1 se indica la configuración del sistema CASA utilizado para evaluar el semen de borrego.

Evaluación del daño en la membrana acrosomal

Se tomaron 10 μ L de la muestra de semen y se depositaron en un microtubo de 1 mL (Eppendorf, Alemania) y se mezcló con 10 μ L del reactivo azul tripano (T8154, Sigma Chemical Co., EUA), y se colocaron 10 μ L de la mezcla en un portaobjetos para realizar un frotis. Posteriormente, el frotis se fijó con etanol por dos minutos, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Una vez terminada la fijación, los portaobjetos se colocaron en un recipiente con tinción Giemsa (48900, Sigma Chemical Co., EUA) donde permanecieron 18-20 horas. Después, el portaobjetos se enjuagó para eliminar el exceso de colorante con agua destilada y se dejó secar. La evaluación de la tinción de las células espermáticas se realizó por microscopía óptica a 100X (PrimoStar, Carl Zeiss, Alemania). Para obtener una media representativa de cada pajilla, se realizaron tres frotis por pajilla haciendo un conteo de 100 espermatozoides por frotis. Los espermatozoides se



clasificaron en tres tipos: espermatozoides vivos con acrosoma intacto (teñidos color púrpura en la región acrosomal), espermatozoides vivos con acrosoma dañado (sin acumulación de color púrpura en la región acrosomal) y espermatozoides muertos (citoplasma teñido color azul).

Cuadro 1. Configuración del sistema CASA* utilizado para evaluar el semen de borrego

Variable	Configuración
Resolución horizontal/vertical	1024 pixeles x 1024 pixeles
Tamaño del pixel horizontal/vertical	5.5 μm x 5.5 μm
Cuadros por segundo	Arriba de 101 cuadros por segundo
Área	10-100
Detección de la cola	5 μm
Profundidad de la cámara	20 μm
Relación del pixel	0.54 μm
Volumen de referencia	
Ancho	555.12 μm
Alto	555.12 μm
Espermatozoides in-motiles	ALC < 20.00 $\mu\text{m s}^{-1}$ y FBC < 10.00 $\mu\text{m s}^{-1}$
Motilidad	
Motilidad local	VCL < 20.00 $\mu\text{m s}^{-1}$ y VLR < 10.00 $\mu\text{m s}^{-1}$
Motilidad progresiva	
Motilidad circular	Radio > 10.00 $\mu\text{m s}^{-1}$ a < 80.00 $\mu\text{m s}^{-1}$ y rotación > 0.70 $\mu\text{m s}^{-1}$
Motilidad lenta	VCL < 80.00 $\mu\text{m s}^{-1}$
Motilidad rápida	VCL < 80.00 $\mu\text{m s}^{-1}$

* Androvision, Minitube, Alemania.

ALC, amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza; FBC, frecuencia de batido de la cola; VCL, velocidad curvilínea; VLR, velocidad en línea recta.

Inseminación artificial por laparoscopia y diagnóstico de gestación

El estro de las ovejas se sincronizó utilizando esponjas intravaginales (Cronogest CR[®], Intervet International, Holanda) impregnadas con 40 mg de acetato de fluorogestona por 12 días. Al retiro de la esponja, se aplicaron 200 UI de gonadotropina coriónica equina (Novormon[®] 5000, Virbac, Argentina) a cada oveja. La detección de estro se realizó introduciendo un semental sujeto con una cuerda (sin permitir la monta a la hembra) a un corral con las hembras previamente sincronizadas, 16 h previas a la inseminación (Alhamada *et al.*, 2017). Las hembras en estro se inseminaron 55 h después del retiro de la esponja por medio de la técnica de laparoscopia. Antes de la inseminación, las pajillas se descongelaron en un termo para descongelar (Cito Products Incorporated, EUA) a 37.5 °C por 40 segundos. El semen se aplicó vía intrauterina con ayuda de un laparoscopio (250 W Halogen, Wolf, EUA) y un áspic (Aspic, IVM, Francia). La dosis de inseminación (0.25 mL) se repartió equitativamente en ambos cuernos uterinos. Se inseminaron 201 ovejas, repartidas por tratamiento de la siguiente manera: control, 50 ovejas; quercetina (Q), 52 ovejas; vitamina E (VE), 50 ovejas; y tratamiento Q + VE, 49 ovejas.

El diagnóstico de gestación se realizó mediante ultrasonido con un transductor lineal 6.5 MHz (Kaixin, Xuzhou Kaixin Electronic Instrument CO., China), vía rectal, 35 días después de la inseminación, independientemente del tratamiento realizado en el



diluyente utilizado para la criopreservación del semen. La fertilidad (tasa de gestación) se determinó obteniendo el porcentaje de hembras que resultaron gestantes del total de hembras inseminadas por tratamiento.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SAS 9.0 (Inst. Cary, NC, Estados Unidos de América). Los datos porcentuales se transformaron en arco seno antes del análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza usando el procedimiento Modelo Lineal General para las variables numéricas: motilidad, motilidad progresiva, motilidad rápida, e integridad del acrosoma. 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 ji cuadrado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas al nivel de $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del efecto de los diferentes tratamientos sobre las características espermáticas de motilidad evaluadas se muestran en el Cuadro 2. En el estudio, ningún tratamiento presentó diferencia significativa estadísticamente ($P > 0.05$) en las variables de motilidad, motilidad progresiva y motilidad rápida. No obstante, numéricamente, el tratamiento que presentó mayor porcentaje de motilidad (71.57%) y motilidad progresiva (68.13%) fue el tratamiento de quercetina comparado con los otros tratamientos. Sin embargo, en la variable motilidad rápida, el tratamiento con mayor porcentaje (numéricamente) fue el tratamiento vitamina E con 31.48 %.

Como se mencionó, la criopreservación induce estrés oxidativo como resultado la formación de ROS en exceso, lo cual afecta la estructura de los espermatozoides, y afecta en las características espermáticas, provoca daño en el ADN, lípidos y proteínas que le dan protección a la estructura de los espermatozoides, ya que altera los sistemas enzimáticos y las vías de señalización celular, lo cual puede provocar la muerte de las células. Los daños espermáticos causados por ROS ocurren al momento de la criopreservación y la descongelación, e incluso durante el almacenamiento en nitrógeno líquido. Es importante mencionar que los espermatozoides normalmente generan pequeñas cantidades de ROS que son importantes para diferentes procesos fisiológicos de los espermatozoides como capacitación, hiperactivación y fecundación del 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 (El-Khawagah *et al.*, 2020). Por lo anterior, para reducir el daño provocado por los efectos negativos de las ROS, diversos autores han propuesto la suplementación de antioxidantes a los medios de congelación, como la vitamina E y quercetina. Por ejemplo, Sarlós *et al.* (2002), Silva *et al.* (2012), y Abdi-Benemar *et al.* (2015) han evaluado la adición de vitamina E a los medios de criopreservación de semen de ovinos, y reportan



efectos favorables en la integridad acrosomal, vitalidad y motilidad. Sin embargo, en el presente estudio, no se encontró un efecto favorable de la adición de vitamina E como antioxidante en las variables de motilidad evaluadas. Estos efectos contradictorios de la adición de vitamina E pueden deberse a diferentes componentes de los diluyentes, ya que [Sarlós et al. \(2002\)](#) mencionan que el efecto de la vitamina E 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 tampoco existió un efecto favorable en las variables evaluadas. En el presente estudio, el diluyente utilizado contiene fructuosa como fuente de energía y tris aminometano (TRIS) como amortiguador y [Sarlós et al. \(2002\)](#) indican que la adición de vitamina E es más efectiva cuando los diluyentes basados en sacarosa contienen glucosa y TRIS.

Cuadro 2. Efecto de la adición de quercetina y vitamina E sobre las características espermáticas de motilidad de semen criopreservado de ovino (Media \pm desviación estándar)

Tratamiento	Motilidad (%)	Motilidad progresiva (%)	Motilidad rápida (%)
Control	67.20 \pm 20.82 ^a	63.52 \pm 21.31 ^a	26.65 \pm 16.68 ^a
Q	71.57 \pm 6.40 ^a	68.13 \pm 6.57 ^a	27.31 \pm 8.22 ^a
Vit E	69.36 \pm 11.41 ^a	65.92 \pm 12.62 ^a	31.48 \pm 13.15 ^a
Q + Vit E	60.07 \pm 13.16 ^a	53.95 \pm 14.50 ^a	16.93 \pm 8.72 ^a

^a Distintas literales entre filas indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$); Q = 200 μ M de quercetina; Vit E = 100 μ M de vitamina E.; Q + Vit E = 200 μ M de quercetina +100 μ M de vitamina E.

De la misma forma, se ha reportado que la adición de quercetina en los medios de criopreservación de semen de diferentes especies produce efectos favorables en la motilidad e integridad acrosomal ([Gibb et al., 2013](#); [Seifi-Jamadi et al., 2016](#); [Seifi-Jamadi et al., 2017](#); [Ahmed et al., 2019](#); [El-Khawagah et al., 2020](#)), aunque algunos autores han reportado que no existen efectos positivos de la adición de quercetina ([Silva et al., 2012](#); [Banday et al., 2017](#)) o incluso reportan efectos negativos ([Restrepo et al., 2016](#)). En el presente estudio, aunque la adición de quercetina no mostró una diferencia estadística en las variables de motilidad evaluadas, mostró un mayor porcentaje (numéricamente) en comparación con los demás tratamientos en las variables motilidad y motilidad progresiva. La falta de un efecto estadísticamente diferente quizá pueda deberse a los excelentes resultados de motilidad obtenidos post-descongelación del semen en todos los tratamientos, ya que normalmente se reporta un rango de entre 30 a 50% para la motilidad post-descongelación ([Motlagh et al., 2014](#); [Abdi-Benemar et al., 2015](#); [Masoudi et al., 2017](#)), y en el presente estudio en todos los tratamientos los valores de motilidad fueron superiores a 60 %.

En este estudio, al adicionar una concentración de 200 μ M de quercetina, se 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 ([Stojanović et al., 2001](#)), evita la capacitación espermática prematura antes de la inseminación



artificial y la reacción acrosomal durante su almacenamiento, lo que mejora el tiempo de vida de los espermatozoides (Restrepo *et al.*, 2016; Seifi-Jamadi *et al.*, 2016). Acorde con lo anterior, El-Khawagah *et al.* (2020) reportan que la inclusión de quercetina reduce los niveles de H₂O₂ y de peroxidación lipídica, que son indicadores de su efecto antioxidante. Asimismo, el efecto positivo en las variables de motilidad puede estar relacionado con la interacción con la Ca²⁺-ATPasa, enzima clave para la regulación de la motilidad, ya que la quercetina tiene un efecto inhibidor en la bomba Ca²⁺-ATPasa en la membrana plasmática, y resulta en una elevación de los niveles de Ca²⁺, que tiene un papel fundamental en la producción de adenosin monofosfato cíclico (cAMP), factores que controlan la motilidad en los espermatozoides (El-Khawagah *et al.*, 2020).

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 descongelación los espermatozoides mostraron mejor viabilidad al utilizar las concentraciones de 5 y 10 µg/mL en el diluyente del semen, pero la motilidad y motilidad progresiva no se afectó en comparación con el tratamiento control (0 µg/mL). Por otra parte, Ahmed *et al.* (2019) utilizaron 150 y 200 µM de quercetina en semen criopreservado de búfalo, y en la evaluación post-descongelación, estos tratamientos fueron mejores para motilidad progresiva e integridad de la membrana plasmática en comparación con los demás tratamientos (control, 50 y 100 µM de quercetina).

En el Cuadro 3 se presentan los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI), espermatozoides vivos con acrosoma dañado (VAD) y espermatozoides muertos, obtenidos en los diferentes tratamientos. El tratamiento de quercetina mostró una diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos en los espermatozoides VAI (P<0.05). Con respecto a los espermatozoides VAD se encontró una diferencia entre los tratamientos vitamina E (100 µM) y quercetina (200 µM), en comparación con los tratamientos control (convencional) y la combinación de vitamina E (100 µM) y quercetina (200 µM) (P<0.05). El tratamiento de quercetina (200 µM) mostró una diferencia significativa, teniendo menos espermatozoides muertos en comparación con los demás tratamientos (P<0.05), lo que indica una mayor viabilidad.

Cuadro 3. Efecto de la adición de quercetina y vitamina E sobre la vitalidad y daño del acrosoma de los espermatozoides en semen criopreservado de ovino (Media ± desviación estándar)

Tratamiento	Vivos Acrosoma Intacto (%)	Vivos Acrosoma Dañado (%)	Muertos (%)
Control	8.66±4.50 ^b	48.33±4.50 ^b	43.00±4.00 ^{bc}
Q	22.33±2.51 ^a	58.66±1.52 ^a	19.00±2.64 ^a
Vit E	10.66±2.08 ^b	52.00±5.29 ^a	38.33±6.08 ^b
Q + Vit E	11.33±2.08 ^b	41.33±3.21 ^b	47.33±1.52 ^c

^{a,b,c} Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa (P <0.05); Q = 200 µM de quercetina; Vit E = 100 µM de vitamina E.; Q + Vit E = 200 µM de quercetina +100 µM de vitamina E.



Estos resultados pueden deberse a que, como se mencionó anteriormente, los antioxidantes tienen un efecto protector, ya que 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 la criopreservación y en la descongelación, dañando la morfología del espermatozoide (Aitken, 2017), afectando los lípidos y proteínas que protegen a los espermatozoides, lo que puede provocar la muerte de las células (Ardeshirnia *et al.*, 2017).

En este sentido, Ahmed *et al.* (2019), al utilizar 150 y 200 μM de quercetina en semen criopreservado de búfalo, encontraron que los espermatozoides mostraron menor daño en la integridad de la membrana y daño acrosomal en comparación a los demás tratamientos (control, 50 y 100 μM de quercetina). En el presente estudio, se utilizaron concentraciones similares, 200 μM de quercetina, en el medio de criopreservación para semen de ovino y con este tratamiento se obtuvo una diferencia significativa para la variable espermatozoides VAI, comparado con los demás tratamientos. Lo anterior indica un efecto protector de la quercetina en la membrana acrosomal.

La integridad de la membrana es importante para mantener la viabilidad de los espermatozoides y es precisamente aquí donde ocurren las principales lesiones al momento de la criopreservación-descongelación, ya que 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; El-Khawagah *et al.*, 2020). El daño parcial o total del acrosoma de los espermatozoides provoca una incapacidad para fertilizar, ya que las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja. El uso de quercetina en el semen reduce la peroxidación lipídica de los espermatozoides durante la congelación (El-Khawagah *et al.*, 2020) y evita su capacitación prematura antes de la inseminación artificial (Restrepo *et al.*, 2016). 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.*, 2001).

Gibb *et al.* (2013) reportan que la quercetina en una concentración de 150 μM en semen criopreservado de equino, mejoró la motilidad de los espermatozoides al momento de la descongelación, y también incrementó el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto, en comparación con los tratamientos con 200 U/mL de catalasa y 0.2 mg/mL de cisteína. Sin embargo, en el estudio realizado por Seifi-Jamadi *et al.* (2016), al añadir 100 μM de quercetina al medio de criopreservación para semen de equino, obtuvieron un mejor resultado en la motilidad, pero en la vitalidad e integridad de membrana no encontraron un efecto significativo.



Finalmente, en el Cuadro 4 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 antioxidantes. Contrario a lo esperado, debido a que el tratamiento con quercetina mejoró la protección al acrosoma, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P > 0.05$). 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 μM con 51.92% de fertilidad diagnosticado a los 35 días de gestación.

Los daños en las células provocan 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. La membrana juega un papel importante en la viabilidad del espermatozoide y del éxito en la fertilización del ovocito, por lo que es importante que se encuentre intacta al momento del descongelamiento (Martínez-Pastor *et al.*, 2004). El daño de la cromatina por lo general comienza en la región peri-acrosomal, las regiones basales del espermatozoide y posteriormente se expande a otras regiones del núcleo durante la criopreservación (Sousa *et al.*, 2016), afecta considerablemente el estado del acrosoma o incluso la vitalidad del espermatozoide, lo que conlleva a una incapacidad para fertilizar. 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-descongelación (Sousa *et al.*, 2016). Por lo anterior, se ha propuesto la adición de antioxidantes en el semen para prevenir los daños producidos en los espermatozoides y mejorar la fertilidad del semen en la inseminación artificial.

La quercetina es un antioxidante que actúa en la 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 & Richardson (2006) determinaron que la inclusión de 50 a 300 μM 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.

Cuadro 4. Efecto de la adición de quercetina y vitamina E en el semen criopreservado de ovino sobre la tasa de gestación en ovejas inseminadas mediante inseminación artificial por laparoscopia

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

^a Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$); Q = 200 μM de quercetina; Vit E = 100 μM de vitamina E.; Q + Vit E = 200 μM de quercetina +100 μM de vitamina E.



Ardeshirnia et al. (2017) reportan incremento de la fertilidad *in vitro* del semen de ovino, colectado de epidídimo, y criopreservado con la adición de quercetina en concentraciones de 5 y 10 µg/mL, en comparación con los demás tratamientos (0, 15, 20 y 50 µg/mL). Con estas concentraciones de quercetina, aumentó el número de embriones en la etapa de cigoto, mórula y blastocito. En el estudio realizado por *Ahmed et al. (2019)*, al adicionar quercetina en concentraciones de 150 y 200 µM, en el semen criopreservado de búfalo, la fertilidad *in vivo* fue mayor (61.82 y 65.22%, respectivamente) comparada con el tratamiento control (sin ningún aditivo; 46.90%). En el presente estudio, el incremento numérico en la tasa de fertilidad observado en el tratamiento adicionado con quercetina, quizá pueda relacionarse con el incremento en la vitalidad y la protección del acrosoma, ya que esta concentración de quercetina mostró una diferencia significativa en los espermatozoides VAI en comparación con los demás tratamientos, lo que indica que la fertilidad del semen criopreservado podría incrementarse mediante la adición de antioxidantes como la quercetina en el diluyente, ya que la calidad del semen post-descongelación es uno de los factores que más influyen en la probabilidad de gestación después de la inseminación (*Ahmed et al., 2019*). Sin embargo, es necesario realizar más estudios donde se evalúen diferentes concentraciones de quercetina y la evaluación de la fertilidad *in vivo* se realice con un mayor número de ovejas.

CONCLUSIONES

La adición de 200 µM de quercetina en el semen criopreservado de ovino incrementó el porcentaje de espermatozoides vivos con el acrosoma intacto y vivos con el acrosoma dañado, lo que implica una reducción en el porcentaje de espermatozoides muertos en comparación con los demás tratamientos, lo cual indica que cumplió con sus funciones antioxidantes al proteger a los espermatozoides de los daños provocados por la criopreservación; sin embargo, esto no trajo consigo un incremento en la tasa de gestación. Se recomienda seguir realizando estudios con diferentes concentraciones de quercetina e incrementar los estudios con antioxidantes en pruebas *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto INFR201501- 251729 y a la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez a través del proyecto UACJ- PIVA 312-17-15.

LITERATURA CITADA

ABDI-BENEMAR H, Jafaroghli M, Khalili B, Zamiri MJ, Ezazi H, Shadparvar AA. 2015. Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α- tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*. 130:166–170. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.06.013>



AHMED H, Jahan S, Salman MM, Ullah F. 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. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.012>

AITKEN RJ. 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular Reproduction and Development*. 84:1039-1052. ISSN: 1098-2795. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>

ALLAI L, Anass B, Da silva M, Nasser B, El-Amari B. 2018. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*. 192:6-17. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>

ALHAMADA M, Debus N, Lurette A, Bocquier F. 2017. Automatic oestrus detection system enables monitoring of sexual behaviour in sheep. *Small Ruminant Research*. 149:105–111. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.003>

ARDESHIRNIA R, Zandi M, Sanjabi MR. 2017. The effect of quercetin on fertility of frozen-thawed ram epididymal spermatozoa. *South African Journal of Animal Science*. 47:237-244. ISSN: 2221-4062. <http://dx.doi.org/10.4314/sajas.v47i2.16>

BANDAY MN, Lone FA, Rasool F, Rashid M, Shiraki A. 2017. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*. 74:25-30. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.008>

BENHENIA K, Lamara A, Fatmi S, Iguer-Ouada M. 2016. Effect of cyclodextrins, cholesterol and vitamin E and their complexation on cryopreserved epididymal ram semen. *Small Ruminant Research*. 141:29–35. ISSN: 0921-4488. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.06.009>

BERKOVICH L, Earon G, Ron I, Rimmon A, Vexler A, Lev-Ari S. 2013. *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor- κ B and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 13:212-218. ISSN: 2662-7671. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-212>

CÂMARA DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MMP. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology*. 76:342–350. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.013>



EL-KHAWAGAH ARM, Kandiel MMM, Samir H. 2020. Effect of quercetin supplementation in extender on sperm kinematics, extracellular enzymes release, and oxidative stress of egyptian buffalo bulls frozen–thawed semen. *Frontiers in Veterinary Science*. 7:604460. ISSN: 2297-1769. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.604460>

GIBB Z, Butler T, Morris L, Maxwell W, Grupen C. 2013. Quercetin improves the post thaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and non-sorted stallion sperm. *Theriogenology*. 79:1001-1009. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.032>

KARIMFAR MH, Niazvand F, Haghani K, Ghafourian S, Shirazi R, Bakhtiyari S. 2015. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 28:69-76. ISSN: 2058-7384. <https://doi.org/10.1177/0394632015572080>

MARTINEZ–PASTOR F, Johannisson A, Gil J, Kaabi M, Anel L, Paz P, Rodriguez–Martinez H. 2004. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC–1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen–thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*. 84:121-133. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.006>

MASOUDI R, Shahnen AZ, Towhidi A, Kohram H, Akbarisharif A, Sharafi M. 2017. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*. 74:77-80. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.012>

MATA-CAMPUZANO M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P, Martínez-Pastor F. 2015. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology*. 83:520-528. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.018>

MCNIVEN M, Richardson G. 2006. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. *Cell Preservation Technology*. 4:169-177. ISSN: 1557-8119. <https://doi.org/10.1089/cpt.2006.4.169>

MOTLAGH MK, Sharafi M, Zhandi M, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Skakeri M, Soleimani M, Zeinoaldini S. 2014. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. *Cryobiology*. 69:217-22. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.007>



RESTREPO G, Montoya JD, Rojano B. 2016. Antioxidant capacity and post-thaw quality of stallion semen cryopreserved with quercetin and ergothioneine. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 63:167-178. ISSN 0120-2952. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v63n3.62747>

SARLÓS P, Molnár A, Kókai M, Gábor GY, Rátky J. 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*. 50:235–245. ISSN: 1588-2705. <https://doi.org/10.1556/avet.50.2002.2.13>

SEIFI-JAMADI A, Kohram H, Shahneh AZ, Ansari M, Macías-García B. 2016. Quercetin ameliorate motility in frozen-thawed turkmen stallions sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*. 45:73–77. ISSN: 0737-0806. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.078>

SEIFI-JAMADI A, Ahmad E, Ansari M, Kohram H. 2017. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*. 75:15-20. ISSN: 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.03.002>

SILVA E, Cajueiro J, Silva S, Soares P, Guerra M. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*. 77:1722-1726. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023>

SOUSA PC, Santos EAA, Silva AM, Bezerra JAB, Souza ALP, Lima GL, Oliveira MF, Silva AR. 2016. Identification of ultrastructural and functional damages in sperm from six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) due to cryopreservation. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 36:767-774. ISSN: 1678-5150. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000800015>

STOJANOVIĆ S, Sprinz H, Brede O. 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 391:79–89. ISSN: 0003-9861. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2388>