



XII Congreso de la Asociación Latinoamericana

de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos

Por una producción sostenible y una Latinoamérica unida



MAYO
18 al 21
2022

Valledupar, Cesar - Colombia

En el marco del evento se realizará

- ◆ Talleres: Mayo 15 al 17
- ◆ Giras técnicas: Mayo 21

II Encuentro
de los Representantes de la
International Goat Association
(IGA) Latinoamérica

II Foro
Género y Mujeres
en la ganadería de
pequeños rumiantes

Este evento integrará

III Seminario Regional para el Desarrollo de la Cadena Ovino Caprina Caribe Seco

IV Congreso Nacional e Internacional en Producción Ovino Caprina Tropical

V Congreso Internacional Ovino y Caprino / 2 do. Foro Nacional

Asamblea Ordinaria ALEPRyCS e IGA Capítulo Latinoamérica

Más información: <https://alepryocs.wixsite.com/alepryocs>



Fisiología y reproducción animal

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

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

Quercetina y vitamina E en fertilidad

José Maria Carrera-Chávez^{1*}, Edson Eduardo Jiménez-Aguilar¹, Andrés Quezada-Casasola¹, Mario Alejandro Prieto-Caraveo², Mateo Fabian Itzá-Ortiz¹

¹Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Veterinarias. Anillo Envoltente del Pronaf y Estocolmo s/n, Zona Pronaf 35315 Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

²Animal Health and Inspection Service, U.S. Department of Agriculture. El Paso, Texas, USA

*Correspondencia: jose.carrera@uacj.mx

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el efecto de la adición de quercetina y vitamina E al medio de criopreservación de semen ovino. **Materiales y métodos.** 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. **Resultados.** 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 \pm 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. **Conclusiones.** 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.

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) (El-Khawagah et al., 2020).

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).

La integridad de la membrana es un requisito fundamental para la viabilidad del espermatozoide y el éxito de la fertilización (El-Khawagah et al, 2020), y es precisamente aquí donde ocurren las principales lesiones al momento de la criopreservación-descongelación. Asimismo, 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). En este sentido, 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. 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.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la adición de quercetina y vitamina E en el medio de criopreservación de semen ovino sobre características espermáticas y fertilidad *in vivo*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez en las coordenadas 31°44'53,3" N y 106°26'39,6" O. El procesamiento del semen y la inseminación artificial se realizaron durante la época reproductiva (julio a febrero).

El semen se colectó individualmente de tres sementales de la raza Katahdin mediante vagina artificial, colectando dos veces por semana durante seis semanas. Los procedimientos 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). Se realizó un protocolo de dilución con un diluyente comercial (Two Step; Continental Plastic Corp., EUA) con 6% de glicerol y 10% de yema de huevo hasta obtener una concentración de 30×10^6 espermatozoides móviles por pajilla (0,25 mL). Las pajillas fueron congeladas siguiendo un protocolo convencional en un baño de nitrógeno hasta llegar a una temperatura final de $-196 \text{ }^\circ\text{C}$, almacenando 32 pajillas por eyaculado. Las muestras se fraccionaron en cuatro tratamientos: tratamiento control, se realizó de forma convencional; tratamiento quercetina (Q), se adicionaron $200 \text{ } \mu\text{M}$ de quercetina; tratamiento vitamina E (VE), se adicionaron $100 \text{ } \mu\text{M}$ de vitamina E y tratamiento Q + VE, se adicionó una combinación de quercetina ($200 \text{ } \mu\text{M}$) y vitamina E ($100 \text{ } \mu\text{M}$).

El descongelamiento del semen se realizó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 40 segundos y se evaluó la motilidad, motilidad progresiva y la motilidad rápida mediante un análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision, Minitube, Alemania). La evaluación del daño en la membrana acrosomal se realizó con una tinción de azul tripano y Giemsa. Los espermatozoides se clasificaron en tres tipos: vivos con acrosoma intacto, vivos con acrosoma dañado y espermatozoides muertos.

El estro se sincronizó utilizando esponjas intravaginales impregnadas con 40 mg de

acetato de fluorogestona por 12 d. Al retiro de la esponja, se aplicaron 200 UI de gonadotropina coriónica equina. Las hembras se inseminaron vía intrauterina 55 h después del retiro de la esponja por medio de la técnica de laparoscopia. Se inseminaron 201 ovejas, repartidas 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 transductor lineal 6.5 MHz (Kaixin, Xuzhou Kaixin Electronic Instrument CO., China), vía rectal, 35 d después de la inseminación.

Para el análisis, los datos porcentuales se transformaron en arcoseno antes del análisis, se realizó un análisis de varianza y se compararon las medias mediante la prueba de Duncan. Para la tasa de gestación se utilizó la prueba de ji cuadrado (SAS, 2009 / STAT versión 9.3).

RESULTADOS

Los resultados del efecto de los diferentes tratamientos sobre las características espermáticas de motilidad evaluadas se muestran en la Tabla 1. 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.

En la Tabla 2 se presentan los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI), espermatozoides vivos con acrosoma dañado (VAD) y espermatozoides muertos. El tratamiento de quercetina obtuvo mayor porcentaje de VAI en comparación con los demás tratamientos ($P < 0,05$). Con respecto a los espermatozoides VAD, los tratamientos vitamina E (100 μM) y quercetina (200 μM) tuvieron mayor porcentaje 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) incrementó significativamente la viabilidad de los espermatozoides ($P < 0,05$). También en la Tabla 2 se muestran los resultados de fertilidad *in vivo* (tasa de gestación). Contrario a lo esperado, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$). Sin embargo, el tratamiento que mostró mayor resultado porcentual (numéricamente) en la tasa de gestación fue el tratamiento de quercetina con 51,92% de fertilidad.

Tabla 1. 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 ($P < 0,05$).

Tabla 2. Efecto de la adición de quercetina y vitamina E sobre la vitalidad, daño del acrosoma y fertilidad *in vivo* en semen criopreservado de ovino (Media \pm desviación estándar).

Tratamiento	Vivos Acrosoma Intacto (%)	Vivos Acrosoma Dañado (%)	Muertos (%)	Tasa de gestación (%)
Control	8,66 \pm 4,50 ^b	48,33 \pm 4,50 ^b	43,00 \pm 4,00 ^{bc}	23/50 (46,00%) ^a
Q	22,33 \pm 2,51 ^a	58,66 \pm 1,52 ^a	19,00 \pm 2,64 ^a	27/52 (51,92%) ^a
Vit E	10,66 \pm 2,08 ^b	52,00 \pm 5,29 ^a	38,33 \pm 6,08 ^b	17/50 (34,00%) ^a
Q + Vit E	11,33 \pm 2,08 ^b	41,33 \pm 3,21 ^b	47,33 \pm 1,52 ^c	21/49 (42,82%) ^a

^{a,b,c} Distintas literales indican diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

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 en 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 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 por qué en el tratamiento donde se combinó la vitamina E y la quercetina tampoco existió un efecto favorable.

De la misma forma, se ha reportado que la adición de quercetina en semen de diferentes especies, produce efectos favorables en la motilidad e integridad acrosomal (Gibb et al, 2013; 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) 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 las variables motilidad y motilidad progresiva. La falta de un efecto estadísticamente significativo 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 (Abdi-benemar et al, 2015).

Estos resultados pueden deberse a que 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 las ROS. Aunque las ROS son productos normales del metabolismo celular, cuando existen niveles altos de estas, son dañinas 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. En el presente estudio, se utilizó una concentración de 200 μM de quercetina, que incrementó el porcentaje con VAI comparado con los demás tratamientos. Lo anterior indica un efecto protector de la quercetina en la membrana acrosomal.

En un estudio realizado por Ahmed et al. (2019), al adicionar 150 y 200 μM quercetina 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 con quercetina, quizá pueda relacionarse con el incremento en la vitalidad y la protección del acrosoma, ya que esta concentración de quercetina mostró un incremento 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).

En conclusión, 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 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*.

REFERENCIAS

- Abdi-Benemar, H., Jafaroghli, M., Khalili, B., Zamiri, M.J., Ezazi, H., Shadparvar, A.A. 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 Rum. Res.* 130:166-170.
- Ahmed, H., Jahan, S., Salman, M.M., 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.
- Aitken, R.J. 2017. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Develop.* 84:1039-1052.
- 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. *Anim. Reprod. Sci.* 192:6-17.
- 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 Complement. Altern. Med.* 13:212-218.
- El-Khawagah, A., Kandiel, M.M.M., 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 Vet. Sci.* 7:604460.
- 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.
- 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.
- Restrepo, G., Montoya, J.D., Rojano, B. 2016. Antioxidant capacity and post-thaw quality of stallion semen cryopreserved with quercetin and ergothioneine. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.* 63:167-178.
- Sarlós, P., Molnár, A., Kókai, M., Gábor, G.Y., Rátky, J. 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet. Hung.* 50:235-245.
- 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.