



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://aleprycs.wixsite.com/aleprycs>



Evaluación del efecto antimicrobiano de la quercetina y vitamina E en semen criopreservado de ovino

Evaluation of the antimicrobial effect of quercetin and vitamin E in cryopreserved ram semen

Quercetina y Vitamina E como antimicrobiano semen ovino

Mónica Edith Bojorquez-Salcedo¹, José Maria Carrera-Chávez^{1*}, Andrés Quezada-Casasola¹, Claudia Carolina Hernández-Peña², Florinda Jiménez-Vega², Mateo Fabian Itzá-Ortiz¹

¹Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Veterinarias

²Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Anillo Envoltente del Pronaf y Estocolmo s/n, Zona Pronaf 35315 Ciudad Juárez, Chihuahua, México.

*Correspondencia: jose.carrera@uacj.mx

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la actividad antibiótica de la quercetina y el α -tocoferol en el semen criopreservado de ovino. **Materiales y métodos.** Se trabajó con cuatro sementales ovinos. Se utilizó un diluyente a base de TRIS y yema de huevo y se realizaron diferentes tratamientos: Control (antimicrobiano convencional), Testigo (Etanol), Quercetina (200 μ M), Vitamina E (100 μ M) y Vitamina E + Quercetina. Se realizó la dilución, refrigeración y criopreservación de semen y posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la viabilidad del semen mediante un sistema CASA. Se realizó la evaluación antimicrobiana mediante cultivos sólidos, pruebas bioquímicas, tinciones y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Resultados.** En la evaluación de semen post-criopreservación, así como en la inhibición bacteriana, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$); sin embargo, numéricamente se mostró mejoría en el tratamiento Vitamina E + Quercetina. **Conclusiones.** La adición de quercetina (200 μ M) y α -tocoferol (100 μ M) indica una inhibición de la proliferación de distintas bacterias, entre las que destacan *Actinobacillus* spp., *Staphylococcus* spp. y *P. aureginosa* durante el proceso de criopreservación del semen de ovino, sin alterar negativamente características espermáticas como la motilidad y viabilidad de los espermatozoides.

Palabras clave: borrego; criopreservación; antimicrobiano; flavonoides.

INTRODUCCIÓN

La contaminación que se presenta en el semen es debido a la presencia de microorganismos propios del tracto urinario y es común que las muestras de semen se contaminen durante el proceso de conservación, ya sea durante la toma de muestras, el manejo previo a la congelación o incluso después de la misma (Morrel, 2016). Por lo anterior, se recomienda el uso de antimicrobianos para reducir el riesgo de transmisión de enfermedades. Sin embargo, la resistencia a múltiples sustancias es un problema actual que se observa a nivel mundial. Entonces,

aunque la adición de antimicrobianos es deseable para el control del crecimiento bacteriano, los antimicrobianos pueden ocasionar un incremento de especies reactivas de oxígeno que afectan a los espermatozoides, además de que el uso de antimicrobianos puede contribuir a la generación de resistencia a los antimicrobianos (Morrel, 2016).

evitar la resistencia bacteriana, se considera como una opción viable el uso de alternativas naturales como la implementación de extractos de plantas en los diluyentes del semen, por sus componentes antioxidantes naturales tales

como fenoles, flavonoides, vitamina C, vitamina E, β carotenos, zinc, y selenio, los cuales se ha documentado poseen un fuerte potencial antioxidante (Bustos, 2016) y antimicrobiano (Bukar et al, 2010; Mandal et al. 2017). Considerando lo anterior y debido a la posible variabilidad de los extractos naturales según su origen y condiciones agroclimáticas, así como de los diferentes mecanismos de respuesta de las diferentes bacterias, se recomienda el uso de los componentes en específico como los flavonoides y vitaminas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición quercetina y vitamina E, como antimicrobianos no convencionales en semen criopreservado de ovino.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez ubicada en las coordenadas geográficas 31°44'53,3" N y 106°26'39,6" O. Para la toma de muestras seminales se utilizaron cuatro ovinos raza Katahdin, la cual se realizó dos veces por semana durante tres semanas, utilizando la técnica de vagina artificial.

El semen se diluyó con un diluyente comercial (TwoStep, Continental, USA) basado en TRIS y 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 (CryoLogic CL-8800, Australia) hasta llegar a una temperatura final de -120 °C, almacenando 32 pajillas por eyaculado. El descongelamiento del semen se realizó colocando cada pajilla a baño maría (37 °C) por 30 segundos y se evaluó la motilidad progresiva (%), la motilidad rápida (%), la motilidad lenta (%) y células motiles (%) mediante un análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision, Minitube, Alemania).

Al momento de la preparación del diluyente, las muestras fueron fraccionadas en cinco tratamientos: Testigo, no se adicionó ningún tipo de antimicrobiano y en su lugar se utilizó etanol, (debido a que la quercetina y la vitamina E se diluyen en etanol); Control, adicionado con antimicrobiano convencional (tilosina 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$, gentamicina 275 $\mu\text{g}/\text{mL}$, espectinomycin 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lincomicina 165 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Quercetina, adicionado con quercetina 200 μM ; Vitamina E,

adicionado con vitamina E 100 μM ; y Quercetina + vitamina E, adicionado con quercetina 200 μM y vitamina E 100 μM . En total se utilizaron 18 pajillas por tratamiento, analizando tres pajillas por eyaculado en seis repeticiones.

La actividad antimicrobiana se realizó mediante diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000 (semen y agua estéril). Se colocaron 100 μL de la solución en caja Petri y se vaciaron 25 mL de agar soya tripticaseina incubando a 37 °C y a las 48 h se realizó un recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC).

Para poder llevar a cabo la identificación de las bacterias, se realizó el aislamiento de las bacterias según su tratamiento. La morfología de colonia se realizó mediante la observación de la apariencia de las colonias. La identificación bacteriana se llevó a cabo mediante la tinción de Gram. Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: Agar hierro triple azúcar; Lisina hierro agar; Motilidad indol ornitina; Sulfuro indol motilidad; Agar hierro Kligler; Citrato de Simmons; Caldo Urea; Prueba de catalasa y Prueba de oxidasa.

Para el análisis, los datos porcentuales se transformaron en arcoseno antes del análisis estadístico. Se realizó un análisis de varianza y se realizó una comparación de medias mediante la prueba de Tukey (SAS, 2009 / STAT versión 9.3).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los resultados de los conteos de unidades formadoras de colonia (UFC), en los cuales se puede observar que existe inhibición del crecimiento bacteriano cuando la quercetina y la vitamina E se utilizaron en combinación en relación a cuando solo se utilizó quercetina o vitamina E ($P < 0,05$), mostrando una actividad antimicrobiana similar a la encontrada para el antimicrobiano convencional (tratamiento Control). Sin embargo, no existió diferencia significativa con los demás tratamientos. En las características espermáticas no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0,05$).

En la Tabla 2 se presenta la clasificación y géneros de las bacterias identificadas en el semen criopreservado de ovino adicionado con quercetina y vitamina E.

Tabla 1. Efecto de la quercetina y vitamina E en la contaminación bacteriana y las características espermáticas de semen criopreservado de ovino (Media ± desviación estándar).

Tratamiento	UFC	Motilidad	Motilidad progresiva	Motilidad rápida
Control	177,55±23,04 ^{ab}	71,55±5,88 ^a	67,67±6,33 ^a	24,45±9,10 ^a
Testigo	214,44±52,56 ^{ab}	71,23±5,44 ^a	67,52±5,95 ^a	36,49±6,19 ^a
Quercetina	213,55±63,20 ^{ab}	66,26±4,80 ^a	62,70±5,06 ^a	25,16±3,51 ^a
Vitamina E	242,11±52,38 ^a	67,44±5,81 ^a	63,63±6,06 ^a	31,30±4,71 ^a
Vitamina E + Quercetina	168,0±21,67 ^b	49,88±5,63 ^a	44,54±5,92 ^a	15,50±3,17 ^a

^{a,b} Letras diferentes entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa (P<0,05).

Tabla 2. Géneros bacterianos encontrados mediante pruebas bioquímicas en semen criopreservado de ovino adicionado quercetina y vitamina E.

Bacterias	Tratamientos				
	Testigo	Control	Quercetina	Vitamina E	Quercetina + Vitamina E
Pseudomonas spp.	+	+		+	
Corynebacterium spp.	+		+	+	+
E. coli.	+	+	+	+	+
Actinobacillus spp.	+		+		
Staphylococcus spp.	+	+			
Salmonella spp.	+	+	+	+	+

+ indica la presencia del género en el tratamiento.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que cuando se utiliza quercetina y vitamina E de forma individual, el crecimiento bacteriano es similar a los obtenidos en el tratamiento testigo (sin adición de ninguna sustancia antibiótica). Sin embargo, cuando se adicionaron quercetina y vitamina E de forma conjunta, los resultados fueron similares a los obtenidos en el tratamiento Control, que incluyó la adición de antimicrobianos convencionales. La vitamina E, que es un potente antioxidante liposoluble, puede causar defectos en la membrana celular de bacterias resultando en un aumento de la permeabilidad. Se ha demostrado su poder antimicrobiano en bacterias como *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*. Además, se ha mencionado que el uso de vitamina E como antimicrobiano puede ser potenciado si es combinado con componentes naturales

tales como extractos de plantas (Naguib et al, 2018) como es la quercetina (Mandal et al, 2017). Debido a lo anterior, se considera que la combinación de la quercetina con la vitamina E resultó en una mayor inhibición de las UFC, que, si bien no se encontró una diferencia significativa en cuanto al crecimiento bacteriano, se considera como un resultado prometedor la combinación de ambos tratamientos.

Mediante la información recopilada de las pruebas bioquímicas realizadas a las muestras, se obtuvo como resultado la identificación de seis géneros bacterianos en los distintos tratamientos. Esta información puede servir como un indicador de la eficacia de los aditivos ante los distintos géneros encontrados. En este sentido, se ha reportado una gran variedad de microorganismos en semen tales como *Actinobacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Brucella spp.* e *Histophilus spp.* (Saunders et al, 2007). La

variabilidad encontrada en los cultivos demuestra que, aun habiendo crecimiento de varios géneros bacterianos, estos no se encuentran en las todas muestras después de los tratamientos. Lo anterior indica que la quercetina y la vitamina E, funcionan como inhibidores de ciertos géneros bacterianos. Sin embargo, la mayoría de las bacterias encontradas en los cultivos son gram negativas, que pueden ser resistentes a múltiples fármacos (Fariñas et al, 2013).

De acuerdo con lo expresado por Morrel (2016), bacterias como *Staphylococcus* y *Streptococcus spp.* se encuentran en piel, mucosa y tracto respiratorio de animales sanos. Lo anterior pudiera explicar la presencia de *Staphylococcus spp.* en distintos tratamientos y al ser bacterias "comunes" en el organismo de los ovinos, es probable que sea un factor que ha contribuido a que este género haya desarrollado resistencia a numerosos antimicrobianos (Carrada et al, 2018). Es importante mencionar que este género no fue encontrado en los tratamientos adicionados con quercetina, esto quizá debido a que uno de los principales factores de virulencia de estos es una alfa toxina, una proteína formadora de poros con actividad citotóxica, por lo tanto, la inhibición de la secreción de esta es una alternativa en el control de las infecciones causadas por este microorganismo. La quercetina es un flavonoide de origen natural, que disminuye la secreción de esta alfa toxina (Carrada et al, 2018). En el caso de *E. coli* y *Salmonella spp.*, fueron encontradas en todos los tratamientos, esto quizá debido a que son bacterias comúnmente encontradas no solo en el medio ambiente, si no en el organismo de los animales y al ser enterobacteria responsables de distintas infecciones gastrointestinales, han sido reportadas con altos porcentajes de resistencia a antimicrobianos (Puig et al, 2011).

El semen puede contaminarse durante la extracción mediante el uso de vagina artificial, debido a la presencia de bacterias en el prepucio y la uretra como *E. coli* y *Pseudomonas* (Ortega et al, 2009). Tal es el caso de *Pseudomona*

aureginosa, la cual crece fácilmente en distintos medios y sus requerimientos nutritivos son escasos, además de que es resistente a la mayoría de las penicilinas, cefalosporinas, entre otros antimicrobianos (Fariñas et al, 2013).

En relación con las características espermáticas, aunque no se encontró un incremento significativo entre los tratamientos, numéricamente, se puede apreciar una motilidad progresiva ligeramente más alta de los espermatozoides en los tratamientos testigo y control. Esto puede ser debido a la variedad de géneros bacterianos que se encontraron en todos los tratamientos, lo que indica que, aunque la quercetina y la vitamina E funcionan para la inhibición de algunas bacterias, pueden no tener el mismo efecto en otras, y la presencia de las bacterias puede provocar reacciones prematuras del acrosoma, aglutinación espermática y producción de macrófagos y granulocitos como línea de defensa del organismo, lo que promueve la producción de estrés oxidativo, lo que deriva en la disminución de la motilidad y viabilidad del semen (Morrel, 2016). Sin embargo, al no existir diferencias significativas en las características espermáticas entre los tratamientos, se puede considerar que la adición de quercetina y vitamina E no afectaron a los espermatozoides, lo que hace necesario seguir realizando estudios que permitan dilucidar si diferentes concentraciones de quercetina y vitamina E de forma individual o conjunta pueden contribuir al control bacteriano, sin afectar las características de motilidad espermática (motilidad, motilidad progresiva y motilidad rápida) en semen criopreservado.

En conclusión, la adición de quercetina y vitamina E redujo las unidades formadoras de colonia, lo que indica una inhibición de la proliferación de distintas bacterias, entre las que destacan *Actinobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *P. aureginosa* durante el proceso de criopreservación del semen de ovino sin alterar negativamente características espermáticas como la motilidad y viabilidad de los espermatozoides.

REFERENCIAS

- Bukar, A., Uba, A., Oyeyi, T.I. 2010. Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* lam. extracts against some food – borne microorganisms. Bayero J. Pure Appl. Sci. 3: 43-48.
- Bustos, P.M., Deza-Ponzio, R., Páez, P.L., Albesa, I., Cabrera, J.L., Virgolini, M.B., Ortega, M.G. 2016. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress *in vitro* and *in vivo* in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity, Environm. Toxicol. Pharmacol. 48:253-264.
- Carrada, L., Castañon, S. 2017. Quercetina atenúa la virulencia de *Staphylococcus aureus* al disminuir la secreción de alfa toxina. Rev. Argen. Microbiol. 50:131-135.
- Fariñas M.C., Martínez- Martínez, L. 2013. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multiresistentes enterobacterias, *Pseudomonas aureginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Formación médica continuada: Infección nosocomial. Enferm. Infecc. Microbiol. 31:402-409.
- Mandal, S.M., Dias, R.O., Franco, O.L. 2017. Phenolic compounds in antimicrobial therapy. J. Med. Food. 0:1-8.
- Morrel, J.M. 2016. Antimicrobials in Boar Semen Extenders – A Risk/Benefit Analysis. J. Antimicro. 2:107.
- Naguib, M.M., Valvano, M.A. 2018. Vitamin E increases antimicrobial sensitivity by inhibiting bacterial lipocalin antibiotic binding. mSphere 3:e00564-18.
- Ortega, C., González, L., Muriel, A., Macías, B., Rodríguez, H., Tapia, J.A., Alonso, J.M., Peña, F.J. 2009. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? Reprod. Dom. Anim. 44:518-522.
- Puig, P.Y., Espino, H.M., Leyva, C.V. 2011. Resistencia antimicrobiana de salmonella y *E.coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. Panorama Cuba y Salud 6:30-38.
- Saunders, V.F., Reddacliff, L.A., Berg, T., Hronitzky, M. 2007. Multiplex PCR for the detection of *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Histophilus somni* in ram semen. Prod. Anim. 85:72- 77.