



Revista Mexicana de Agroecosistemas
Vol. 6 (Suplemento 2), 2019

16-18 de octubre

ISSN:2007-9559

Revista Mexicana de Agroecosistemas

Oaxaca, Volumen IV (Suplemento 2), 2019
Memoria de artículos en extenso y resúmenes



XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria

Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A. C.





Revista Mexicana de Agroecosistemas
 Vol. 6 (Suplemento 2), 2019 16-18 de octubre ISSN:2007-9559
 Memoria de artículos en extenso y resúmenes
 “XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción
 Animal y Seguridad Alimentaria, A. C.”



Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Equinos A.C.



THE DONKEY SANCTUARY



WorldHorseWelfare



SADER

SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SECTUR
 Secretaría de Turismo



Revista Mexicana de Agroecosistemas
Vol. 6 (Suplemento 2), 2019 16-18 de octubre ISSN:2007-9559
Memoria de artículos en extenso y resúmenes
“XLVI Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción
Animal y Seguridad Alimentaria, A. C.”

REVISTA MEXICANA DE AGROECOSISTEMAS, Vol 6, (Suplemento 2) Julio-Diciembre 2019, es una publicación de la Secretaría de Educación Pública-Tecnológico Nacional de México, editada a través del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca por la División de Estudios de Posgrado e Investigación. Domicilio conocido, Ex hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca, México, C.P. 56230, Tel y Fax. 01 (951) 5170444 y 5170788. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2014-060211581800-203 e ISSN 2007-9559, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor.

Responsable de la última actualización de este número en la División de Estudios de Posgrado e Investigación: Dr. Gerardo Rodríguez-Ortiz y Dr. José Cruz Carrillo Rodríguez, Domicilio conocido, Ex hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca, México, C.P. 71233, Tel y Fax. 01 (951) 5170444 y 5170788, <http://www.voaxaca.tecnm.mx/revista/>, rmae.itvo@gmail.com. Fecha de última modificación, 20 de diciembre de 2019.

Su objetivo principal es difundir los resultados de investigación científica de las áreas agropecuaria, forestal, recursos naturales, considerando la agrobiodiversidad y las disciplinas biológicas, ambientales y socioeconómicas.

Para su publicación, los artículos son sometidos a arbitraje, su contenido es de la exclusiva responsabilidad de los autores y no representa necesariamente el punto de vista de la Institución; las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.



EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE SEMILLA DE *Moringa oleifera* SOBRE LA CALIDAD Y CAPACIDAD DE FECUNDACIÓN DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE OVINO

[EFFECT OF THE ADDITION OF *Moringa oleifera* SEED EXTRACT ON THE QUALITY AND CAPACITY OF FERTILIZATION OF THE CRYOPRESERVED SHEEP SEMEN]

José María Carrera-Chávez^{1S}, José Julian Guedea-Betancourt¹, José Alberto Núñez-Gástelum¹, Ernesto Lucero-Orozco¹, Angelica María Ávila-Escárcega¹, Andrés Quezada-Casasola¹

¹ Departamento de Ciencias Veterinarias / Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Chihuahua México. ^SAutor para correspondencia: (jose.carrera@uacj.mx).

RESUMEN

La contaminación bacteriana puede afectar la calidad del semen, además de que el uso de antibióticos contribuye al desarrollo de resistencia bacteriana. El objetivo fue evaluar el efecto de la adición de extracto de semilla de *Moringa oleifera* sobre la actividad antimicrobiana, la capacidad antioxidante y de fecundación en el semen criopreservado de ovino. Se utilizaron seis sementales de razas de pelo (Kathadin, Pelibuey, Blackbelly). El semen se recolectó utilizando la técnica de vagina artificial. Se fraccionó el total del semen diluido en cinco tratamientos (T): T1, control, sin antibiótico; T2, antibiótico convencional; y tres tratamientos con concentraciones de *M. oleifera* de: T3, 1.0 mg mL⁻¹; T4, 10.0 mg mL⁻¹; y T5, 50.0 mg mL⁻¹. Se evaluaron características espermáticas post-criopreservación, actividad antimicrobiana y capacidad antioxidante. Se realizó la técnica de fertilización *in vitro* heteróloga para medir la capacidad fecundante. Se realizó un ANOVA y la comparación de las medias se realizó mediante la prueba de Duncan. Los tratamientos que incluían extracto de semilla de *M. oleifera*, mostraron una inhibición de UFC similar a la obtenida en el T2. La capacidad antioxidante del extracto de semilla de *M. oleifera*, mostró diferencia ($p < 0.05$) en los tratamientos T4 y T5 en relación al T2. En las características motilidad progresiva y rápida, el T4 mostró diferencia ($p < 0.05$) con respecto al T2. La tasa de fecundación fue menor en el T2 ($p < 0.05$) en comparación con T1 y T4. En conclusión, el nivel de inclusión de 10.0 mg mL⁻¹ del extracto de semilla de *Moringa oleifera* podría ser un buen sustituto del antibiótico convencional en el diluyente del semen de ovino, ya que por sus propiedades antimicrobianas como antioxidantes inhibe la formación de UFC y preserva las diferentes características espermáticas del semen criopreservado de ovino.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, criopreservación, *Moringa oleifera*, ovino.

ABSTRACT

Bacterial contamination can affect semen quality, in addition, the use of antibiotics for the development of bacterial resistance. The objective was to evaluate the effect of the addition of *Moringa oleifera* seed extract on antimicrobial activity, antioxidant capacity and fertilization in



ram cryopreserved semen. Six rams of hair breeds were used (Kathadin, Pelibuey, Blackbelly). The semen was recollected using the technique of the artificial vagina. The total of the diluted semen was divided into five treatments (T): T1, control, without antibiotic; T2, conventional antibiotic; and three treatments with concentrations of *M. oleifera* of: T3, 1.0 mg mL⁻¹; T4, 10.0 mg mL⁻¹ and T5, 50.0 mg mL⁻¹. Spermatic characteristics post-cryopreservation, antimicrobial activity and antioxidant capacity were evaluated. The heterologous *in vitro* fertilization technique was used to measure fertilizing capacity. An ANOVA was performed and the comparison of the means was made by the Duncan test. Treatments that included *M. oleifera* seed extract showed an inhibition of CFU similar to that obtained in the T2. The antioxidant capacity of the seed extract of *M. oleifera*, showed difference ($p < 0.05$) in T4 and T5 in relation to the T2. In the characteristics progressive and rapid motility, T4 showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) with respect to the T2. The fertilization rate was lower in the T2 showing a significant statistical effect ($p < 0.05$) compared to T1 and T4. In conclusion, the inclusion level of 10.0 mg mL⁻¹ of the *Moringa oleifera* seed extract could be a good substitute for the conventional antibiotic in the ram semen diluent, since by its antimicrobial properties as antioxidants it inhibits the formation of CFU and preserves the different sperm characteristics of the cryopreserved ram semen.

Index words: *Moringa oleifera*, cryopreserved, antimicrobial, CASA, ram

INTRODUCCIÓN

Aun con la adición del diluyente, el proceso de congelación y descongelación del semen afecta negativamente la calidad de los espermatozoides. El congelamiento induce estrés osmótico, alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), daño al ADN del espermatozoide, desestabilización de la membrana espermática y disfunción de mitocondrias espermáticas (Vichas *et al.*, 2017). Otra problemática que afecta la calidad y vialidad del semen es la contaminación que tiene efectos nocivos en los espermatozoides. Una variedad de bacterias de diferente género ha sido identificada después del cultivo aeróbico prolongado de muestras de semen, y ciertas bacterias tienen efectos perjudiciales sobre su calidad. Para minimizar estos efectos adversos, se han incluido antibióticos en la composición de los diluyentes de semen de carneros para evitar la proliferación de bacterias (Yániz *et al.*, 2010). Sin embargo, para contrarrestar la posible resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales, se deben desarrollar agentes antimicrobianos con diferentes mecanismos (Schulze *et al.*, 2016). Una opción ante la problemática causada por estrés oxidativo, resistencia y contaminación bacteriana son las plantas que cuentan con actividad antioxidante y antibacteriana. Por ejemplo, *Moringa oleifera* tiene gran actividad antibacteriana y antioxidante (Vieira *et al.*, 2010; Sokunbi *et al.*, 2015). Por lo anterior, el objetivo fue evaluar el efecto de la adición del extracto de semilla de *Moringa oleifera* sobre la actividad antimicrobiana, la capacidad antioxidante y de fecundación en el semen criopreservado de ovino.



MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se desarrolló en el Departamento de Ciencias Veterinarias del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Se utilizaron seis sementales de razas de pelo (Katahdin, Black Belly, Pelibuey) (dos a cinco años de edad).

Se seleccionaron tres sementales por sesión para la toma de muestras, las cuales se colectaron dos veces por semana durante cuatro semanas utilizando la técnica de vagina artificial. El semen se evaluó microscópicamente con el sistema de análisis de semen asistido por computadora (CASA; AndroVision®, Minitube, Alemania). Se evaluó concentración, motilidad progresiva y motilidad rápida. Después de la evaluación del semen, se mezclaron las tres muestras obtenidas, esto para eliminar las diferencias individuales de cada una. La dilución del semen se llevó a cabo utilizando un diluyente comercial (Two step®, Continental Plastic Corp, U.S.A.) más agua bidestilada y yema de huevo. Se fraccionó el total del semen diluido en cinco tratamientos (T): T1, control, sin antibiótico (solo se adicionó solución salina fisiológica); T2, antibiótico convencional (gentamicina 300 mg mL⁻¹, espectinomicina 360 mg mL⁻¹, lincomicina 180 mg mL⁻¹); T3, se adicionó 1.0 mg mL⁻¹ de extracto de semilla de *Moringa oleifera*; T4, se adicionó 10.0 mg mL⁻¹ de extracto de semilla de *Moringa oleifera*; y T5, se adicionó 50.0 mg mL⁻¹ de extracto de semilla de *Moringa oleifera*. Para la obtención del extracto de *Moringa oleifera* se utilizaron semillas desengrasadas y liofilizadas, procesadas según el método descrito por Núñez-Gastélum *et al.* (2015).

Las muestras se colocaron en pajillas de plástico de 0.25 mL (40x10⁶ de espermatozoides/mL⁻¹) y se congelaron (Cryobath®CL-8800, CryoLogic, Australia). Después del proceso de congelación, las pajillas se colocaron en un termo con nitrógeno líquido. Las pajillas se descongelaron durante 30 s a 37 °C y se evaluó la concentración, la motilidad progresiva y la motilidad utilizando el sistema CASA.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se preparó una dilución 1:100 del semen y se colocó la muestra en agar nutritivo (BD Mueller Hinton Agar, Becton Dickinson GmbH, Alemania). Las placas se incubaron a 24 h a 37 °C y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC). La evaluación de la actividad antioxidante se realizó mediante el ensayo FRAP (Benzie y Strain, 1996). Se descongeló el semen y se centrifugó a 800 x g por 10 min a 4 °C, se tomaron 24 µL del sobrenadante (plasma seminal) y se añadieron 180 µL del reactivo FRAP para su posterior lectura a 595 nm a 37 °C, los resultados se compararon con una curva patrón de Trolox.

Los ovarios que se utilizaron para la fertilización *in vitro* heteróloga se obtuvieron de ovarios de vacas proporcionados por el Rastro Municipal de Ciudad Juárez y se transportaron a 37 °C al laboratorio. Se aspiraron los folículos de 2 a 8 mm de diámetro. Se seleccionaron ovocitos provistos de un citoplasma oscuro y homogéneo, con un complejo de células del cúmulus de tres o más capas. La maduración *in vitro* de los ovocitos se realizó en medio BO-IVM (IVF Bioscience®, Bickland Industrial Park, Reino Unido) a 38.8 °C y 6.5 % CO₂ en aire atmosférico humidificado (21 % O₂) por un período de 21 h. La fertilización *in vitro* se realizó utilizando BO-IVF a 38.8 °C y 6.5 % de



CO₂ con aire atmosférico humidificado. El semen descongelado se preparó medio BO-SemenPrep, calculando 2.0×10^6 /mL espermatozoides para la fertilización. El cultivo de los presuntos cigotos se realizó en un medio BO-IVC a 38.8 °C, en una atmósfera humidificada de 6 % de O₂, 6.5 % de CO₂ y 88 % de N₂. Los ovocitos se observaron con un microscopio a las 40 h para evaluar la división (García-Álvarez *et al.*, 2009).

Los datos porcentuales se transformaron en arcoseno antes del análisis estadístico. Se realizó un ANOVA y la comparación de las medias entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de Duncan (SAS 9.0, Inst. Cary, NC, USA). El nivel de significancia considerado para todas las evaluaciones fue $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se observan los resultados de los cultivos microbianos a partir de las muestras de semen, que indican que todos los tratamientos que incluían extracto de semilla de *M. oleifera*, mostraron una inhibición de UFC mayor en comparación con el tratamiento control. Existen reportes que la contaminación bacteriana del eyaculado en animales clínicamente sanos puede ser debida a la flora microbiana normal de la uretra y el prepucio (Varner *et al.*, 1998). Bacterias potencialmente patógenas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsella pneumoniae* pueden colonizar el pene y el prepucio (Trujillo y Rivera, 2002) y producir toxinas y productos metabólicos nocivos para la viabilidad del semen. Yániz *et al.* (2010) mencionan que las bacterias tienen efecto negativo en los espermatozoides, reduciendo la motilidad a través de la adhesión y aglutinación del espermatozoide y causando alteraciones morfológicas como cambios en el nivel de la pieza intermedia, la membrana, acrosoma y alterando la función espermática. Además, Trujillo y Rivera (2002) indican que a medida que se aumenta el número de microorganismos en la muestra se incrementa la demanda sobre los nutrientes presentes en el semen, en una vía metabólica que conduce a la formación y liberación de ácidos que bajan el pH del medio, afectando desfavorablemente la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides, quienes a su vez compiten con las bacterias por los nutrientes presentes en un medio cada vez más escaso. Asimismo, esto conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que son perjudiciales para la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides. Además, la presencia de microorganismos, especialmente bacterias, puede afectar la fertilización directamente, o puede hacerlo por la inducción de la reacción del acrosoma (Gloria *et al.*, 2014).

En este estudio, la adición de 1.0, 10.0 y 50.0 mg mL⁻¹ de extracto de semilla de *M. oleifera* tuvo un efecto antimicrobiano similar al antibiótico convencional. Estudios *in vitro* han comprobado la actividad de diferentes partes de la planta sobre los microorganismos patógenos (Martin *et al.*, 2013). Su acción bacteriostática y bactericida consiste en la disrupción de la membrana celular por inhibición de enzimas esenciales. El principal ingrediente responsable de dicha actividad es el 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocionato de bencilo, el cual tiene acción bactericida sobre varias especies patógenas (Martin *et al.*, 2013).



Cuadro 1. Efecto del extracto de la semilla de *Moringa oleifera* sobre la contaminación bacteriana y la capacidad antioxidante en el semen criopreservado de ovino.

Tratamiento	Unidades formadoras de colonias (UFC)	Efecto Antioxidante
Control (T1)	65.25 ± 67.67 ^a	3325.0 ± 552.9 ^{ab}
Antibiótico convencional (T2)	4.75 ± 3.44 ^b	2898.1 ± 979.0 ^b
1 mg mL ⁻¹ (T3)	6.87 ± 6.38 ^b	3322.5 ± 477.2 ^{ab}
10 mg mL ⁻¹ (T4)	9.70 ± 6.30 ^b	3364.3 ± 242.5 ^a
50 mg mL ⁻¹ (T5)	5.50 ± 4.53 ^b	3537.5 ± 249.4 ^a

*Letras diferentes (entre columnas) indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

En el Cuadro 1 se muestra la capacidad antioxidante del extracto de semilla de *M. oleifera*, lo cual muestra una diferencia ($p < 0.05$) en el efecto reductor en el plasma del semen criopreservado de ovino en los tratamientos de concentraciones de 10.0 y 50.0 mg mL⁻¹ en relación al tratamiento control. En relación a la actividad antioxidante, las diferentes partes de *M. oleifera* contienen más de 40 compuestos con actividad antioxidante (Martin *et al.*, 2013). Entre los compuestos con este potencial, ya sea por actividad de captación de radicales libres o por capacidad de formación de quelatos de iones metálicos identificados en las semillas de *M. oleifera*, se encuentran compuestos fenólicos como el kaempferol y los ácidos gálico y elágico. También se ha indicado que dichos extractos inhiben la peroxidación lipídica por acción de antioxidantes como las vitaminas C y E, y β-caroteno, responsables de la remediación del estrés oxidativo (Martin *et al.*, 2013). El espermatozoide está protegido por un sistema antioxidante en el plasma seminal, en las membranas y en el citoplasma, pero este sistema se elimina parcialmente y se altera severamente durante la criopreservación. La criopreservación también produce productos físicos, químicos, estrés en la membrana espermática, asociado a estrés oxidativo y ROS generados por espermatozoides muertos y por el oxígeno atmosférico o molecular del medio ambiente, induciendo disminuciones en la motilidad, integridad de la membrana y potencial de fertilización de los espermatozoides. La liberación de oxígeno molecular, formando bajo concentraciones de ROS, se requiere para el mantenimiento de la fertilización y capacitación / reacción acrosomal de los espermatozoides. Un exceso de ROS perjudica la motilidad y capacidad de fertilización (Bucak *et al.*, 2007).

Los resultados del presente trabajo indican un efecto antioxidante de la adición de *M. oleifera* en las concentraciones de 1.0, 10.0 y 50.0 mg mL⁻¹, lo cual mejora las diferentes características espermáticas evaluadas en este estudio (Cuadro 2). Mara *et al.* (2007) mencionan que un factor limitante en la preservación del semen es su exposición a la luz durante la manipulación antes del almacenamiento, dando lugar a la formación de ROS con daño al espermatozoide, a la motilidad celular y la integridad genómica.

En relación a la evaluación post-criopreservación de las características espermáticas con diferentes concentraciones de *M. oleifera*, en el Cuadro 2 se observa que, en la motilidad progresiva y rápida, el tratamiento de 10.0 mg mL⁻¹ (T4) mostró una diferencia ($P < 0.05$), con respecto al



tratamiento con antibiótico convencional (T2). Peixoto *et al.* (2011) y El-Harairy *et al.* (2016) indican que tanto el extracto de la hoja como la semilla contienen compuestos con amplio espectro de actividad antimicrobiana, capaz de inhibir el crecimiento de bacterias G+ y G-. En este estudio se encontró un efecto positivo de la adición del extracto de semilla de *M. oleifera* al semen criopreservado de ovino, ya que existió un grado de mejora en cuanto a la motilidad progresiva usando una concentración de 10.0 mg mL⁻¹, lo que quizá se debió a la capacidad antimicrobiana y antioxidante del extracto de *M. oleifera*. Sokunbi *et al.* (2015) encontraron un efecto positivo de la adición del extracto de *M. oleifera* en cuanto a la motilidad progresiva, ya que incrementó significativamente en semen de toro que contenía 12 mL de extracto crudo de *M. oleifera* en comparación cuando utilizaron 0.8 y 16 mL de extracto crudo de *M. oleifera*. El-Harairy *et al.* (2016) mencionan que el extracto de *M. oleifera* puede tener impacto en la función del espermatozoide durante la crioconservación y reportan una motilidad progresiva 73.33% de semen de carnero con una concentración de 1000 µg de *M. oleifera*.

Cuadro 2. Efecto del extracto de semilla de *Moringa oleifera* sobre las características espermáticas y capacidad de fecundación de semen criopreservado de ovino.

Tratamiento	Concentración 10 ⁹ /mL	Motilidad Progresiva %	Motilidad Rápida %	Porcentaje de fecundación (n)
Control (T1)	0.102 ± 0.01 ^a	29.52 ± 6.94 ^{ab}	7.15 ± 1.94 ^{ab}	79.99 ± 11.03 ^a (162/201)
Antibiótico convencional (T2)	0.098 ± 0.01 ^a	27.10 ± 17.60 ^b	6.82 ± 6.29 ^b	69.96 ± 7.28 ^b (142/202)
1 mg mL ⁻¹ (T5)	0.100 ± 0.02 ^a	31.55 ± 5.59 ^{ab}	6.15 ± 1.94 ^{ab}	74.65 ± 14.31 ^{ab} (157/210)
10 mg mL ⁻¹ (T4)	0.108 ± 0.01 ^a	40.75 ± 16.12 ^a	12.80 ± 10.90 ^a	80.63 ± 9.91 ^a (170/212)
50 mg mL ⁻¹ (T3)	0.099 ± 0.01 ^a	33.00 ± 14.90 ^{ab}	8.70 ± 7.49 ^{ab}	79.17 ± 14.20 ^{ab} (163/206)

*Letras diferentes (entre columnas) indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

En el Cuadro 2 se muestra la capacidad de fecundación de espermatozoides de borrego en ovocitos de vaca mediante la FIV heteróloga. La tasa de fecundación en el tratamiento control mostró una disminución en la fecundación mostrando un efecto estadístico significativo ($p < 0.05$) en comparación con los tratamientos testigo y con el tratamiento de 10.0 mg mL⁻¹. Los resultados positivos del presente estudio se deben a que los tratamientos adicionados con extracto de semilla de *M. oleifera* mostraron un efecto positivo, debido a la inhibición de bacterias y a la actividad antioxidante, lo que ayudó a preservar las diferentes características espermáticas, obteniendo altas tasas de fertilización. Sessions-Bresnahan *et al.* (2014) indican que, para una fertilización exitosa, los espermatozoides deben someterse a una capacitación y reacción acrosomal (RA) en el momento correcto. Después de estos cambios, el espermatozoide puede adquirir motilidad hiperactiva, y es capaz de unirse a la zona pelúcida (ZP) del ovocito, donde sufre la reacción acrosomal, penetra la ZP y finalmente se fusiona con el oolemma. De Vasconcelos *et al.* (2016) informaron que la sobreproducción de ROS y estrés oxidativo, podría alterar la fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide necesaria para la RA y procesos de penetración de ovocitos. El α -tocoferol es



un lipídico soluble antioxidante que suprime la peroxidación de lípidos de la membrana, mejorando así la motilidad del espermatozoide, un requisito esencial para la fertilización de ovocitos. Los datos obtenidos para las características espermáticas, previamente discutidos, se complementan con los datos de la prueba de fecundación *in vitro* heteróloga obtenidos en este estudio.

CONCLUSIONES

Los valores obtenidos en este estudio tanto para la inhibición de UFC, la capacidad antioxidante, la motilidad progresiva y rápida, así como la capacidad de fecundación de semen criopreservado de ovino mediante la fertilización *in vitro* heteróloga, indican que el nivel de inclusión de 10.0 mg mL⁻¹ del extracto de semilla de *Moringa oleifera* podría ser un buen sustituto del componente del antibiótico convencional en el diluyente del semen de ovino, preservando las diferentes características espermáticas del semen criopreservado de ovino.

LITERATURA CITADA

- Bucak, M.N., A. Ateşşahin, O. Varişli, A. Yüce, N. Tekin and 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.
- De Vasconcelos, J. S. Franco, M. Faheem, A. Chaveiro and F. Moreira da Silva. 2016. Effects of α -tocopherol and freezing rates on the quality and heterologous *in vitro* fertilization capacity of stallion sperm after cryopreservation. *Theriogenology*. 86:957–962.
- El-Harairy, M.A., A. E. Abdel-Khalek, W. A. Khalil, E. I. Khalifa, A. Y. El-Khateeb and A. M. Abdulrhmn. 2016. Effect of aqueous extracts of *Moringa oleifera* leaves or *Arctium lappa* roots on lipid peroxidation and membrane integrity of ram sperm preserved at cool temperature. *Journal Animal and Poultry Production*. 7:467- 473.
- García-Álvarez, O., A. Maroto-Morales, F. Martínez-Pastor, M. R. Fernández-Santos, M. C. Esteso, M. D. Pérez-Guzmán and A. J. Soler. 2009. Heterologous *in vitro* fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, 71:643–650.
- Gloria, A., A. Contri, L. Wegher, G. Vignola, D. Dellamaria and A. Carluccio. 2014. The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen–thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*. 150:15-23.
- Mara, L., M. S. Dattena, Pilichi, D. Sanna, A. Branca and P. Cappai, 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. *Animal Reproduction Science*. 102:152–157.
- Martin, C., G. Martín, A. García, T. Fernández, E. Hernández y J. Puls. 2013. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*. 36:137-149.
- Núñez-Gastélum, J. A., E. Álvarez-Parrilla, L. A. de la Rosa, N. R. Martínez-Ruiz, G. A. González-Aguilar and J. Rodrigo-García. 2015. Effect of harvest date and storage duration on chemical composition, sugar and phenolic profile of ‘Golden Delicious’ apples from northwest Mexico. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 43:214-221.
- Peixoto, J.R., G. C. Silva, R. A. Costa, J. L. Fontenelle, G. H. Vieira, A. A. Filho and R. H. Vieira. 2011. *In vitro* antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4:201-204.



- Schulze, M., M. Dathe, D. Waberski and K. Müller. 2016. Liquid storage of boar semen: Current and future perspectives on the use of cationic antimicrobial peptides to replace antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 85:39–46.
- Sessions-Bresnahan, D.R., J. K. Graham and E. M. Carnevale. 2014. Validation of a heterologous fertilization assay and comparison of fertilization rates of equine oocytes using *in vitro* fertilization, perivitelline, and intracytoplasmic sperm injections. *Theriogenology*. 82:274–282.
- Sokunbi, O.A., O. S. Ajani, A. A. Lawanson and E. A. Amao. 2015. Antibiotic Potential of Moringa Leaf (*Moringa oleifera* Lam.) Crude Extract in Bull Semen Extender. *European Journal of Medicinal Plants*. 9:1-8.
- Trujillo, L.E. y M. Rivera, 2002. Estudio comparativo de dos tratamientos con antibióticos sobre la calidad bacteriológica y espermática del semen bovino. *Revista de la Facultad Nacional Agraria de Medellín*. 55:11457-1472.
- Varner, D.D., C. M. Scanlan, J. A. Thompson, G. W. Brumbaugh, T. L. Blanchard, C. M. Carlton, and L. Johnson. 1998. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology*. 50:559-573.
- Vichas, L., I. A. Tsakmakidis, D. Vafiadis, G. Tsousis, E. Malama and C. M. Boscós. 2017. The effect of antioxidant agents' addition and freezing method on quality parameters of frozen thawed ram semen. *Cell and Tissue Banking*. 19:113-121.
- Vieira, G.H., J. A. Mourao, A. M. Angelo, R. A. Costa and R. H. Vieria. 2010. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against gram positive and gram negative bacteria. *Revista Institucional Medicina Tropical Sao Paulo*. 52:129-132.
- Yániz, J., M. A. Aguado and A. M. Pilar. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Animal Reproduction Science*. 122:142–149. **OV-40**