



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Uso de extracto acetónico de nopal (*Opuntia ficus* var. *copena* F1) como aditivo en la congelación de semen ovino

TESIS

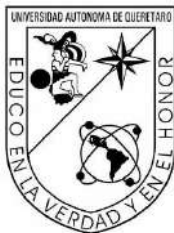
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ. Oscar Olvera Bermúdez

Dirigido por: Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila

Querétaro, Qro. a 29 de Octubre de 2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Uso de extracto acetónico de nopal (*Opuntia ficus* var. copena F1) como
aditivo en la congelación de semen ovino

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ. Oscar Olvera Bermúdez

Dirigido por:

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila

Presidente

Dr. Luis Javier Montiel Olguín

Secretario

Dr. Héctor Jiménez Severiano

Vocal

M.C. Eleazar Pérez Trejo

Vocal

Dr. José Guadalupe Gómez Soto

Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Octubre 2020

México

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mis padres.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por apoyarme a seguir estudiando.

A los integrantes de mi comité tutorial por el apoyo que me brindaron a lo largo del programa.

Al programa de la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable.

A la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al CONACYT por el apoyo económico.

Al personal del Laboratorio de Nutrición Animal del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias)

Al personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales/UAQ.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de adicionar un antioxidante natural (extracto acetónico de nopal; *Opuntia ficus* var. Coopena F1) a un diluyente comercial para congelación de semen de carnero, sobre la viabilidad post-descongelado de los espermatozoides. Se utilizaron tres diferentes niveles de adición del extracto (0.5, 1.0 y 1.5%) y un control, con 10 réplicas. Se evaluó la motilidad progresiva al término del enfriamiento (MP-Enf) y post descongelado (MP-Des). Con respecto al control, la adición de 1.5% de extracto de nopal al diluyente afectó la MP-Enf y la MP-Des (68.5 vs 16.0 % MP-Enf y 38.7 vs 8.2 % MP-Des en Control vs 1.5% de extracto; $P < 0.05$), mientras que la de 0.5% la mejoró (68.5 vs 72.5 % MP-Enf y 38.7 vs 44.2 % MP-Des en Control vs 0.5% de extracto; $P < 0.05$). También se evaluó la integridad de membrana por medio de la prueba de expansión hipo-osmótica HOST (H+). Con respecto al control, la adición de 1.5 % de extracto de nopal al diluyente afectó la integridad de membrana (61.12 vs 38.62 % H+ en Control vs 1.5% de extracto; $P < 0.05$). Además se evaluó el semen post-descongelado mediante el sistema CASA. Con respecto al control la adición de 0.5% de extracto de nopal al diluyente mejoró la rectitud 62.58 vs 74.11, linealidad 32.75 vs 40.78, motilidad progresiva 7.72 vs 12.75 y velocidad progresiva 54.47 vs 65.10 en Control vs 0.5% de extracto; $P < 0.05$. Finalmente se evaluó el porcentaje de sobrevivencia espermática post-descongelado por la tinción supravital eosina-nigrosina. Con respecto al control la adición de 1.0 y 1.5 % de extracto de nopal al diluyente, afectó el porcentaje de espermatozoides vivos al post-descongelado; ($P < 0.05$). El extracto acetónico de nopal tiene potencial para ser utilizado como aditivo en el diluyente para congelar semen de carnero, mejorando la motilidad progresiva post descongelado de las células espermáticas, sin afectar la integridad de membrana y la sobrevivencia espermática post-descongelado.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of adding a natural antioxidant (acetone extract of cactus; *Opuntia ficus* var. *Coopena* F1) to a commercial extender for ram semen freezing, on the post-thaw viability of sperm cells. We used 3 different levels of extract addition (0.5, 1.0 y 1.5%) and one control, with 10 replicates. Progressive motility was assessed at the end of cooling (MP-Enf) and post-thaw (MP-Des). With respect to control, the addition of 1.5% of the extract to the extender affected the MP-Enf and the MP-Des (68.5 vs 16.0 % MP-Enf and 38.7 vs 8.2 % MP-Des for Control vs 1.5% extract; $P < 0.05$) while the 0.5% improved it (68.5 vs 72.5 % MP-Enf and 38.7 vs 44.2 % MP-Des for Control vs 0.5% extract; $P < 0.05$). Membrane integrity was also assessed using the HOST (H+) hypo-osmotic expansion test. Regarding the control, the addition of 1.5% of the extract affected the membrane integrity (61.12 vs 38.62% H+ in Control vs 1.5% of extract; $P < 0.05$). Furthermore, post-thawed semen was evaluated using the CASA system. Regarding the control, the addition of 0.5% of nopal extract to the diluent improved the straightness 62.58 vs 74.11, linearity 32.75 vs 40.78, progressive motility 7.72 vs 12.75 and progressive velocity 54.47 vs 65.10 for Control vs 0.5% extract; $P < 0.05$. Finally, the post-thaw sperm survival was evaluated through supravital eosin-nigrosin staining. With respect to the control, the addition of 1.0 and 1.5% of cactus extract affected the percentage of post-thaw live sperm. The acetone extract of cactus has potential to be used as an additive in the extender for ram semen freezing, improving post-thaw sperm cells progressive motility, without affecting membrane integrity and sperm survival.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 La ovinocultura	3
2.2 Técnica de inseminación artificial (IA)	5
2.2.1 Ventajas y desventajas de la inseminación artificial	7
2.3 Evaluación del semental	8
2.4.1 Daños a la membrana espermática durante la criopreservación ...	9
2.4.2 Peroxidación de lípidos en las células espermáticas	11
2.5 Tipos de diluyentes y sus componentes	13
2.6 Uso de antioxidantes en la congelación de semen ovino	14
2.7 Características antioxidantes del nopal	15
2.8 Técnica DPPH para evaluar capacidad antioxidante	15
2.9 Técnicas para evaluar viabilidad espermática post-congelación	16

2.9.1 Prueba hipo-osmótica (HOST).....	16
2.9.2 Microscopía de contraste de fase	16
2.9.3 Sistema CASA	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo General	20
5.2 Objetivos específicos	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	21
VII. RESULTADOS.....	23
VI. DISCUSIÓN	26
VII. CONCLUSIONES	31
VIII. ANEXOS.....	32
IX. REFERENCIAS.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Eventos durante el desarrollo de la inseminación artificial	5
2	Porcentaje de motilidad progresiva individual al término del enfriamiento (MP Enf) y descongelado (MP Des) de espermatozoides de carnero procesados utilizando como aditivo del diluyente 0% (T0), 0.5% (T0.5), 1.0% (T1) y 1.5% (T1.5) de extracto acetónico de nopal.	23
3	Porcentaje de espermatozoides de carnero con buena integridad de membrana post descongelado evaluada mediante la prueba de expansión hipo-osmótica HOST (H+), procesados utilizando como aditivo del diluyente 0 (T0), 0.5 (T0.5), 1.0 (T1) y 1.5 % (T1.5) de extracto acetónico de nopal.	24
4	Porcentaje de espermatozoides vivos de carnero post descongelado evaluados mediante la prueba supravital eosina-nigrosina, procesados utilizando como aditivo del diluyente 0 (T0), 0.5 (T0.5), 1.0 (T1) y 1.5 % (T1.5) de extracto acetónico de nopal.	24
5	Patrones de motilidad en células espermáticas de carnero evaluados al post-descongelado por el sistema CASA, procesados utilizando como aditivo del diluyente diluyente 0 (T0), 0.5 (T0.5), 1.0 (T1) y 1.5 % (T1.5) de extracto acetónico de nopal.	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Población ovina mundial de 1961 a 2016.	3
2	Producción ovina por continentes en 2016.	4
3	Inventario ovino en México de 1961 a 2016.	5
4	Efecto de incubación a 37°C en la capacitación y reacción acrosómica de espermatozoides de carnero frescos y congelados, basado en patrones fluorescentes evaluados después de la tinción con clortetraciclina.	11
5	Capacitación y reacción acrosómica espermática.	11
6	Inhibición de la formación de ATP por acción de las especies reactivas a oxígeno.	12
7	Placa con muestras por triplicado para prueba de DPPH	36
8	Representación esquemática de espermatozoides expuestos a estrés hipo-osmótico	37

I. INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de carnero son muy susceptibles a sufrir daño por oxidación a causa de Especies Reactivas a Oxígeno (ERO) ya que contienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana (Mehdipour et al., 2016). El enfriamiento y congelación de semen de carnero reduce la motilidad y afecta la integridad de la membrana espermática, estos cambios son asociados con una pérdida de la capacidad fertilizante; aunque muchos espermatozoides tienen motilidad después del descongelado, sus membranas se desestabilizan de manera similar a lo que ocurre durante la capacitación espermática pudiendo presentarse reacciones acrosómicas prematuras (Maxwell & Watson, 1996). Una de las causas del deterioro en la calidad del semen es por la acción de las especies reactivas a oxígeno, porque producen una inhibición en la producción de ATP por parte del espermatozoide y del movimiento progresivo, teniendo como resultado una pérdida irreversible de motilidad y fertilidad (Perumal, 2014).

La producción excesiva de especies reactivas a oxígeno puede afectar las vías de señalización celular en los espermatozoides y puede disminuir la motilidad espermática provocando una reducción en su potencial de fertilización (Cuevas , Romero, & Parodi, 2013). El mecanismo de defensa contra la peroxidación lipídica por parte del semen para mantener la viabilidad y motilidad espermática comprende la producción de glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Bucak, 2008). El estrés oxidativo en los espermatozoides se da por un exceso en la producción de especies reactivas a oxígeno, debido a que el metabolismo del espermatozoide es incapaz de regular estas especies reactivas a oxígeno, sin embargo se ha demostrado que los espermatozoides necesitan de pequeñas cantidades de especies reactivas a oxígeno para mantener su función de manera normal, siempre y cuando no se rebase el sistema antioxidante del espermatozoide (Córdova *et al.*, 2017).

Agregando antioxidantes al diluyente durante el proceso de congelación de semen, puede disminuirse el estrés oxidativo causado por las ERO y con ello mantener las funciones normales de los espermatozoides porque los niveles de antioxidantes disminuyen debido a la dilución del semen (Perumal, 2014, Mehdipour et al., 2016). El mecanismo de acción de los antioxidantes se clasifica de tres maneras distintas, ya sea previniendo la formación de radicales libres, inactivando los radicales libres o reparando el daño oxidativo (Perumal, 2014).

En un estudio reciente, se evaluó el efecto de adición de extracto de nopal (*Opuntia ficus-indica*) al diluyente utilizado en el proceso de enfriamiento de semen de carnero (Allai et al., 2016). Los autores, encontraron una mejora en motilidad y viabilidad espermática, así como disminución en el porcentaje de espermatozoides anormales y peroxidación de lípidos de membrana, al incorporar 1% del extracto en el diluyente. Este efecto protector durante el enfriamiento podría ser de utilidad para mejorar la viabilidad espermática cuando las células son conservadas por congelación, sin embargo, es un aspecto que queda por confirmar y que se aborda en el presente trabajo.

II. ANTECEDENTES

2.1 La ovinocultura

La ovinocultura se desarrolla prácticamente en todo el mundo, por ello se debe destacar la importancia de la misma, en la Figura 1, se muestra la población ovina mundial a través de los años, de 1961 a 2016, es importante destacar la tendencia de incremento del año 2009 al 2016.

Por otra parte la Figura 2 muestra la distribución de la población ovina por continentes en el año 2016, donde se observa que el continente con mayor producción ovina es Asia (FAOSTAT, 2018).



Figura 1. Población ovina mundial de 1961 a 2016 (FAOSTAT, 2018)

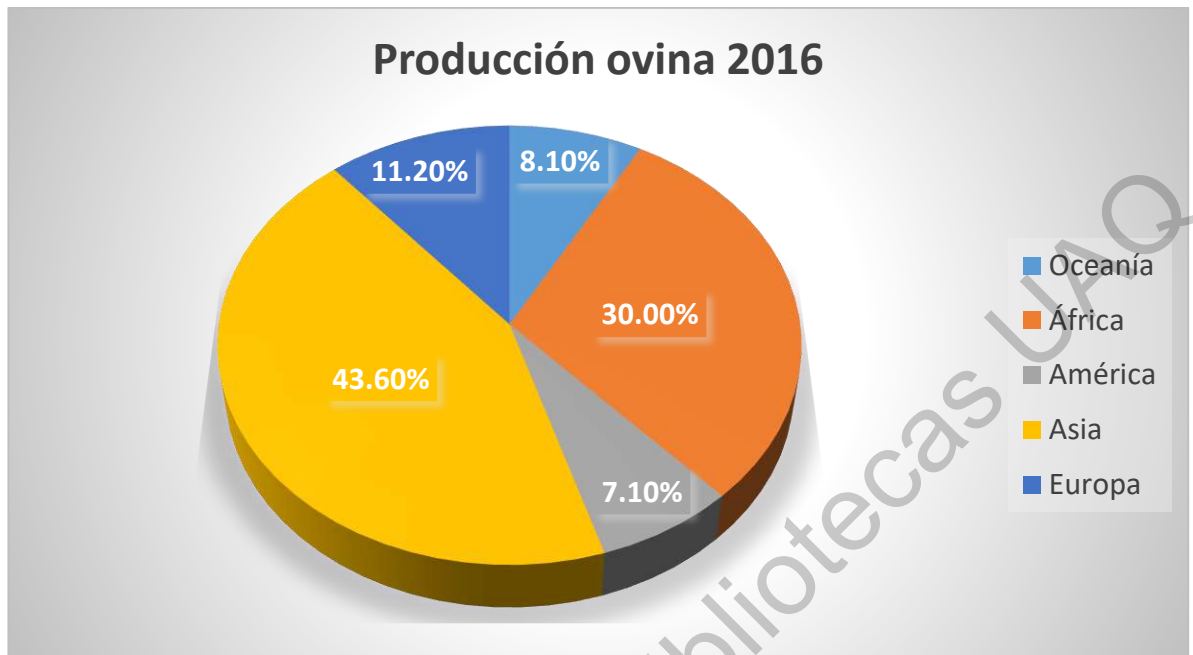


Figura 2. Producción ovina por continentes en 2016 (FAOSTAT, 2018).

En México, en el año, 2016 la producción nacional ovina fue casi de 118 mil toneladas de ovinos en pie, siendo el Estado de México el que cuenta con mayor producción, seguido de Hidalgo y Veracruz (SAGARPA, 2017). En el SIAP (2018) se reportó por última vez en 2016 un total de 8,792,663 cabezas de ovinos en el año 2016 dato que difiere un poco de la cifra que maneja la FAOSTAT de 8,834,241 cabezas como se muestra en la Figura 3. En esta figura se presenta el historial del inventario ovino en el país desde el año 1961 al 2016, donde se aprecia que a partir de 1998 la población ovina empezó a incrementar, conservando esa tendencia al menos hasta el año 2016.

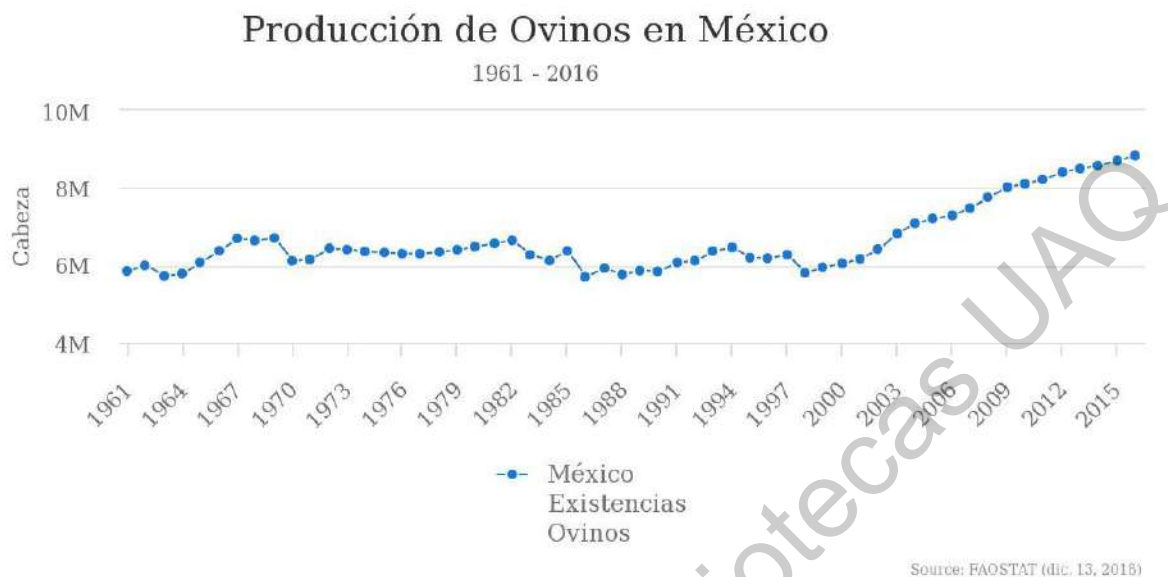


Figura 3. Inventario ovino en México de 1961 a 2016 (FAOSTAT, 2018)

2.2 Técnica de inseminación artificial (IA)

La inseminación artificial (IA) se utiliza en diferentes especies animales, su uso va desde el abejorro hasta el elefante. En el Cuadro 1 se muestran algunos de los acontecimientos más importantes para el desarrollo de esta tecnología. Cabe resaltar la aplicación de la IA en caballos por los árabes en el siglo XIII (Gordon, 2004).

Cuadro 1. Eventos durante el desarrollo de la inseminación artificial

Año	Evento	Investigador
1677	Descubrimiento de espermatozoides mediante el uso de una lupa.	Anton van Leeuwenhoek
1780	IA de una perra y el nacimiento de sus cachorros 62 días después.	Spallanzani
1803	Se congela el esperma de caballo en la nieve y se recupera la motilidad después del calentamiento.	Spallanzani
1890	La IA en caballos se intentó por primera vez en Francia.	Repiquet

1899	Se comenzó a trabajar en la IA de equinos en la Universidad Estatal de Moscú.	Ivanov
1912	La IA en caballos, logró resultados de fertilidad comparables a los obtenidos por el servicio natural. Se logró el éxito de la IA del ganado vacuno y ovino y se capacitó a cientos de inseminadores.	Ivanov
1914	Inicio del trabajo en Italia con el uso de una vagina artificial para la recolección de semen en perros.	Amantea
1920s y 1930s	En Rusia desarrollo de vaginas artificiales para su uso en toros, caballos y carneros; desarrollo de diluyentes simples.	Milanov
1936	Envío de semen de carnero desde Cambridge en el Reino Unido a Polonia; nacimiento de un cordero después de IA.	Arthur Walton
1937	Desarrollo en Dinamarca del método rectovaginal de la IA en el ganado bovino.	Varios investigadores daneses
1941	Desarrollo de diluyente de semen a base de citrato y yema de huevo para ganado.	Glenn Salisbury
1946	Uso de antibióticos (penicilina y estreptomicina) para controlar los microorganismos patógenos en el semen utilizado para la IA.	Almquist
1949	Descubrimiento del método de congelación de espermatozoides de varias especies.	Chris Polge
1952	Primer becerro nacido (Frosty I) después de usar semen de toro congelado-descongelado en Cambridge.	Chris Polge y Tim Rowson
1960	El nitrógeno líquido se convirtió en el refrigerante de elección para preservar el semen de toro. La mayoría de los países utilizan el 100% de semen congelado de toro.	Varios investigadores

		en distintos países
--	--	---------------------

Traducido de (Gordon, 2004).

La inseminación artificial es una técnica que permite utilizar material genético de machos superiores al promedio, hablando de ciertas características deseables, como lo son las características productivas. Ofrece ventajas y desventajas como cualquier otra técnica (Galina & Valencia, 2008).

Un gran impulso para la inseminación artificial fue su potencial para el mejoramiento genético con el uso de toros con una genética élite. Los centros de inseminación artificial comenzaron en Dinamarca en 1936 y después se replicaron o distribuyeron internacionalmente (Perry, 1945).

Gracias a la inseminación artificial se ha dado una rápida dispersión de genes valiosos en el sector de ganado lechero donde para los productores es el método de elección para mejorar genéticamente su ganado a una velocidad considerablemente rápida (Vishwanath, 2003).

2.2.1 Ventajas y desventajas de la inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) de animales domésticos es una técnica que permite utilizar el eyaculado de un macho para inseminar o cubrir un mayor número de hembras que se encuentren en celo y no únicamente una hembra. Además gracias a la IA se pueden cruzar animales con grandes diferencias en tamaño y peso. También el uso de esta técnica permite utilizar el semen de machos que hayan sufrido alguna lesión y por este motivo no puedan montar, o incluso de machos que se encuentren muertos pero que su semen hubiera sido congelado antes de morir. Con la IA se evita el contacto del macho con hembras desconocidas, disminuyendo el riesgo de contraer enfermedades por el coito (Ivanoff, 1922).

La IA es una tecnología con la que se puede mejorar genéticamente el ganado en un tiempo razonable, por lo que los espermatozoides deberían ser

preservados por un periodo largo de tiempo con el menor daño posible para que conserven su capacidad fertilizante al máximo (Allai *et al.*, 2016).

En el año 2014, en México, se inseminaron alrededor de 100 mil borregas esperando llegar a 120 mil en el año 2015 y se ha logrado un gran avance genético gracias a la misma inseminación artificial (SAGARPA, 2015).

2.3 Evaluación del semental

Es de gran interés lograr una evaluación de capacidad reproductiva para el semental, y algunos factores que se consideran son: la capacidad de montar, libido, cantidad y calidad del semen. Aunque existe una confusión con la edad apta para el servicio en machos, el peso y la edad tienen una correlación cuando el eyaculado es apto para el apareamiento (Ruiz *et al.*, 1998)

2.4 Problemas del semen ovino para su congelación

Los espermatozoides de carnero son más susceptibles a sufrir daño por oxidación a causa de ERO (Especies Reactivas a Oxígeno) debido a que contienen un mayor número de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana (Mehdipour, 2016).

Las lesiones por shock frío son daños a la estructura y función de la célula ocasionados por una reducción repentina de la temperatura. En particular las membranas pierden su permeabilidad selectiva teniendo como resultado una liberación de iones, lípidos y proteínas, además el sodio y calcio obtienen acceso al interior de la célula provocando una disminución de su actividad metabólica y cambios secundarios como desnaturalización de proteínas. La susceptibilidad al daño por shock frío está influenciada por la composición de membrana y en gran parte a la participación de los lípidos de membrana (Watson & Morris, 1987)

El daño oxidativo que sufren los espermatozoides es el resultado de las Especies Reactivas al Oxígeno generadas por los componentes celulares del semen, que a su vez ocasiona una disminución en la motilidad espermática y por ende una disminución en la capacidad fertilizante de los mismos (Bucak, 2008).

La función de los espermatozoides congelados-descongelados se ve afectada por alteraciones en la capacitación espermática, disminuyendo su capacidad de fertilización (Medeiros *et al.*, 2002). Debido a que durante el proceso de criopreservación los espermatozoides sufren daños letales o sub-letales que comprometen su función (Stornelli *et al.*, 2005)

Los espermatozoides que son afectados funcionalmente durante su conservación no se mueven o pueden moverse lentamente disminuyendo su supervivencia en el tracto reproductor de la hembra (Lopyrin & Rabocev, 1968)

La investigación en relación al semen congelado se debe dirigir a la mejora de los protocolos de congelación, concentrándose en la composición del diluyente para proteger a los espermatozoides durante el proceso de congelación, y con ello permitir incluir un menor número de espermatozoides por dosis congelada (Vishwanath & Shannon, 2000). Evaluar el estado de estrés oxidativo seminal está emergiendo como una herramienta debido a que la interacción de las sustancias antioxidantes en el eyaculado es esencial y la adición de estas puede mejorar la composición del diluyente (Marti *et al.*, 2007).

2.4.1 Daños a la membrana espermática durante la criopreservación

El procesamiento de semen de carnero reduce la motilidad y afecta la integridad de membrana espermática, estos cambios son asociados con una pérdida de su capacidad fertilizante y aunque muchos espermatozoides conservan su motilidad después de su almacenamiento, sus membranas se desestabilizan y reducen su vida útil fértil (Maxwell & Watson, 1996).

Gracias a la criopreservación de semen se ha logrado la producción de crías en diferentes especies, pero con un bajo porcentaje de fertilidad en la mayoría de especies de animales domésticos, esta reducción en la fertilidad del semen congelado se asocia a alteraciones en la estructura y función de la membrana espermática durante el enfriamiento, congelación y descongelación (Parks & Graham, 1992).

Los espermatozoides muestran una sensibilidad extrema al desafío osmótico, que puede ser el determinante más importante en la proporción de espermatozoides que sobreviven a la congelación, mismos que muestran una fertilidad más baja atribuible a un daño en sus características funcionales (Watson, 1995).

Los espermatozoides congelados-descongelados pueden sufrir alteraciones en su membrana equivalentes a la capacitación espermática, por esa razón se requiere un diluyente que proporcione un ambiente para conservar la integridad y función de la membrana (Watson, 1995).

El cambio que se provoca en los espermatozoides congelados en comparación de espermatozoides frescos se muestra en la figura 4, observando que al descongelado la proporción de espermatozoides capacitados es mucho mayor que en espermatozoides frescos y al paso de 6 horas en espermatozoides congelados la fracción de espermatozoides con reacción acrosómica es mucho mayor. Con estos datos podemos darnos cuenta como la congelación de los espermatozoides induce cambios en la membrana y a su vez induce a la capacitación espermática y una reacción acrosómica prematura, cambios que se ilustran como ocurren de manera natural en la figura 5 al existir un reconocimiento de gametos dentro del tracto reproductivo de la hembra.

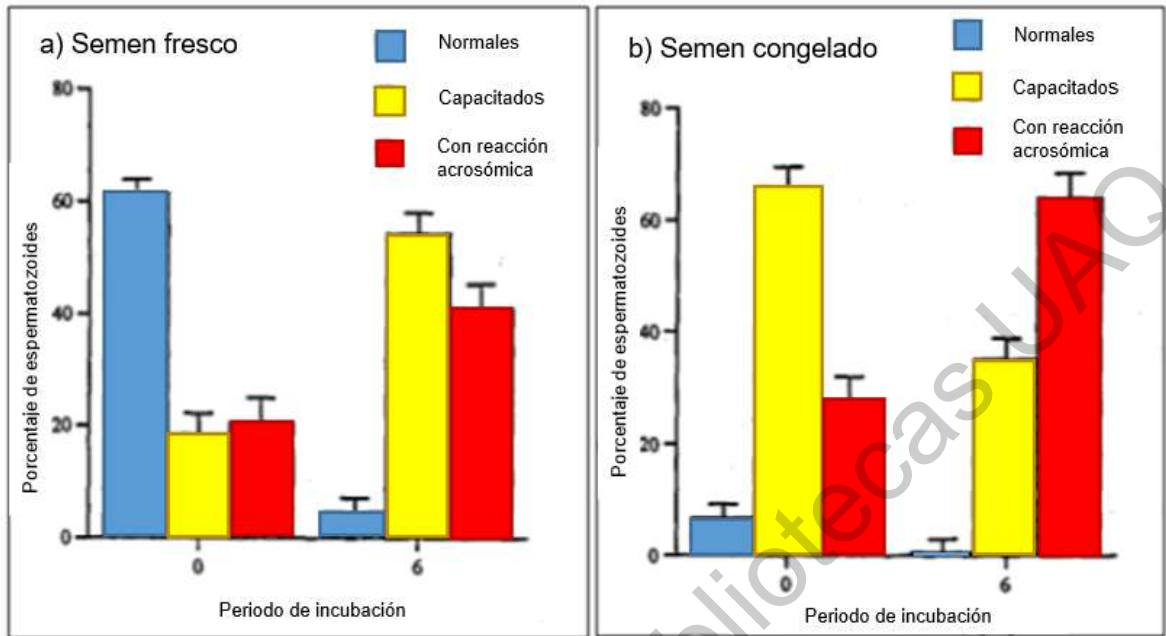


Figura 4. Efecto de incubación a 37°C en la capacitación y reacción acrosómica de espermatozoides de carnero frescos y congelados, basado en patrones fluorescentes evaluados después de la tinción con clortetraciclina según Saling y Storey (1979). (Datos de Gillan et al., 1995) modificado por Olvera 2018.



Figura 5. Capacitación y reacción acrosómica espermática (Olivera *et al.*, 2006)

2.4.2 Peroxidación de lípidos en las células espermáticas

La peroxidación lipídica puede considerarse como un proceso fisiológicamente relevante para la pérdida de la función de los espermatozoides de mamíferos debido a la toxicidad del oxígeno (Álvarez, 1987). Una de las causas del

deterioro en la calidad del semen es por la acción de las especies reactivas a oxígeno, porque producen una inhibición en la producción de ATP por parte del espermatozoide y del movimiento progresivo (Figura 6), teniendo como resultado una pérdida irreversible de motilidad y fertilidad (Perumal, 2014).

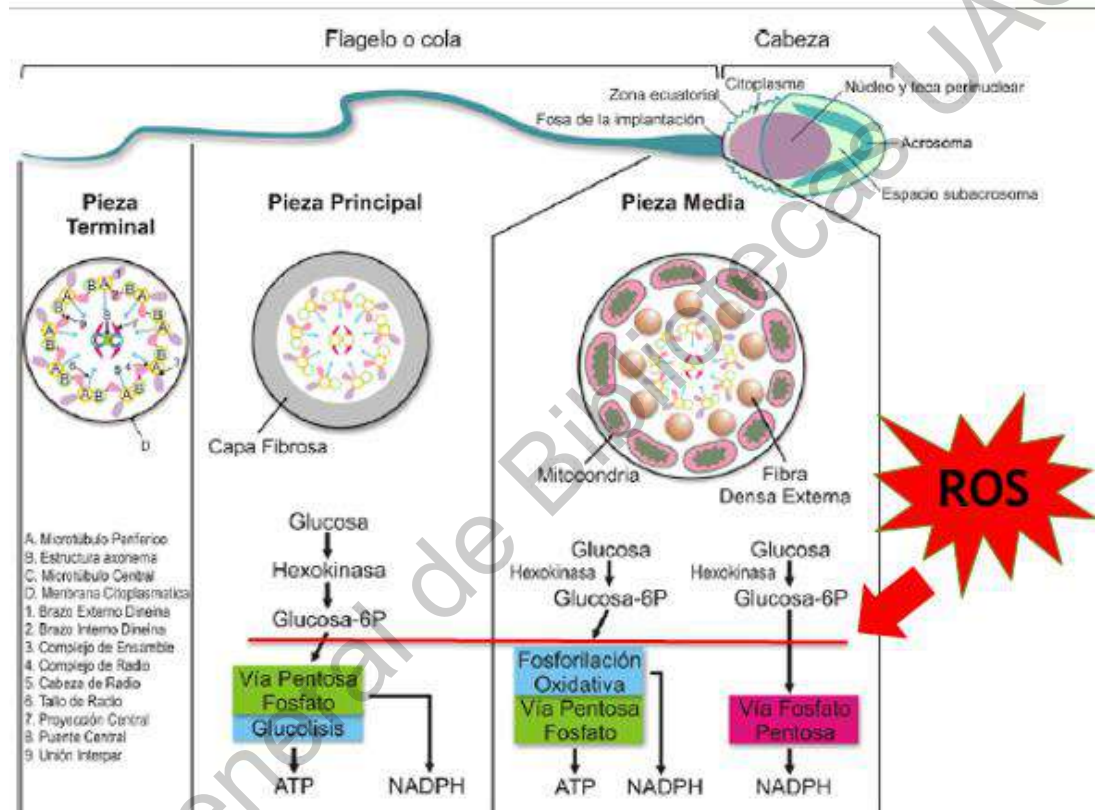


Figura 6: Inhibición de la formación de ATP por acción de las especies reactivas a oxígeno. Adaptado de (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006).

Los espermatozoides inmaduros, inmóviles o morfológicamente anormales constituyen las principales fuentes de especies reactivas a oxígeno, así como los espermatozoides morfológicamente funcionales pero anormales funcionalmente, las especies reactivas a oxígeno alteran la membrana celular por la peroxidación lipídica, misma que da como resultado cambios degenerativos que afectan la función de la membrana (Tortolero *et al.*, 2005).

El estrés oxidativo en los espermatozoides se da por un exceso en la producción de especies reactivas a oxígeno, debido a que el metabolismo del espermatozoide es incapaz de regular estas especies reactivas a oxígeno, sin embargo se ha demostrado los espermatozoides necesitan de pequeñas cantidades de especies reactivas a oxígeno para mantener su función de manera normal, siempre y cuando no se rebase el sistema antioxidante del espermatozoide (Córdova, *et al.*, 2017).

2.5 Tipos de diluyentes y sus componentes

Los componentes básicos que debe de tener un diluyente para la congelación de semen son prácticamente los mismos que los que se utilizan para el almacenamiento de este a temperatura ambiente. Los requerimientos generales son:

- Sustancias iónicas o no iónicas para mantener la osmolaridad.
- Una fuente de lipoproteína de alto peso molecular como la yema de huevo o la leche, para prevenir el shock térmico al frío.
- Glicerol, para ofrecer un efecto crioprotector.
- Glucosa o fructosa como fuente de energía.
- Otros aditivos como antibióticos y enzimas (Vishwanath & Shannon, 2000)

Se ha demostrado que la fracción de proteínas de baja densidad y alto peso molecular de la yema de huevo proporciona protección contra el shock térmico al frío y previene cambios degenerativos en el acrosoma durante su almacenamiento del semen (Salamon & Maxwell, 2000)

2.6 Uso de antioxidantes en la congelación de semen ovino

El mecanismo de acción de los antioxidantes se clasifica de tres maneras distintas, ya sea previniendo la formación de radicales libres, inactivando los radicales libres o reparando el daño oxidativo (Perumal, 2014).

Agregando antioxidantes en el diluyente durante el proceso de congelación de semen, puede disminuir el estrés oxidativo causado por la cantidad de ERO (Especies Reactivas a Oxígeno) y con ello mantener las funciones normales de los espermatozoides (Mehdipour, 2016).

La adición de vitamina E sola, ya sea como acetato o fosfato, resultó en una pérdida total de la viabilidad de los espermatozoides, pero la suplementación adicional con proteínas de plasma seminal produjo una mejora en la integridad de membrana, encontrando una interacción positiva entre el fosfato de vitamina E y las proteínas de plasma seminal (Pérez-Pe *et al.*, 2001).

En un estudio realizado por Membrillo-Ortega *et al.*, (2011) utilizaron la prueba del ácido tiobarbitúrico para comparar la adición de vitamina E y C solas y combinadas cuando se adicionaron a eyaculados de machos cabríos para su congelación, donde encontraron que la combinación de dichos antioxidantes redujo el grado de oxidación de la membrana espermática de forma sinérgica, disminuyendo la cantidad de nanomoles de malondialdehído por miligramo de proteína, además la misma combinación de vitaminas obtuvo el mejor promedio de motilidad espermática en semen descongelado.

Un estudio reciente evaluó el efecto de la adición de extracto de nopal (*Opuntia ficus-indica*) en el proceso de enfriamiento de semen de carnero y encontró mejores resultados con la adición del 1% de extracto nopal (*Opuntia ficus-indica*) obteniendo una mejor motilidad y viabilidad espermática así como una disminución en el porcentaje de anomalías y a disminución en la peroxidación de lípidos (Allai *et al.*, 2016).

Estudios empíricos han llevado a mejorar la técnica de criopreservación de semen, sin embargo, en las mejores condiciones solo sobrevive el 50% de los espermatozoides (Duncan, 1992).

2.7 Características antioxidantes del nopal

En un estudio reciente Allai *et al.*, (2016) realizaron un análisis de compuestos fenólicos a un extracto de nopal, donde se identificaron flavonoides, ácidos fenólicos, aldehído fenólico y flavonoides glucosados.

Se debe tomar en cuenta que la composición de los nopales varía en función de su edad o grado de madurez (Sáenz *et al.*, 2006). La composición química por cada 100g de nopales frescos entre 15 y 25cm de acuerdo a Rodríguez-Félix & Cantwell (1988) es de 91.7g de agua, 1.1g de proteína, 0.2g de lípidos, 1.3g de cenizas, 1.1g de fibra cruda, 4.6g de carbohidratos, 12.7 mg de ácido ascórbico y 28.9µg de carotenos.

Durante el desarrollo de los nopales los componentes que más varían son los carotenos, la acidez titulable y los carbohidratos que aumentan de acuerdo al grado de madurez, mientras que la proteína disminuye (Rodríguez-Félix & Cantwell, 1988). La cantidad de compuestos fenólicos totales también varía dependiendo de la etapa de desarrollo del nopal y de la variedad a la que pertenecen. El tratamiento térmico puede modificar o afectar la cantidad de compuestos fenólicos, pero depende que tan drástico se realice (Flores-Álvarez *et al.*, 2011). El secado convectivo parece no tener un efecto significativo en la degradación de compuestos antioxidantes como lo son los compuestos fenólicos (Rózek *et al.*, 2008).

2.8 Técnica DPPH para evaluar capacidad antioxidante

Es un método utilizado para estimar la capacidad antioxidante de una solución por el uso del radical libre estable, el hidracilo α , α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH). Se caracteriza como un radical libre estable por la deslocalización de un

electrón, misma que provoca un color violeta en la solución, que al mezclarse con una sustancia que pueda donar un átomo de hidrógeno se produce una decoloración de ese color violeta (Molyneux, 2004)

La actividad de captación de radicales libres se puede calcular utilizando la fórmula: (% de inhibición = ((Absorbancia de la muestra blanco – Absorbancia de la muestra)/ Absorbancia de la muestra blanco) x 100 (Dudonné *et al.*, 2009).

2.9 Técnicas para evaluar viabilidad espermática post-congelación

2.9.1 Prueba hipo-osmótica (HOST)

Se utiliza para evaluar la integridad funcional de la membrana espermática, es precisa y se encuentra relacionada estrechamente con la capacidad de fertilización in vitro de los espermatozoides, gracias a estas características, la prueba hipo-osmótica puede ser útil realizarla en un análisis de semen estándar. En condiciones hipo-osmóticas los espermatozoides se hinchan por la afluencia de agua y la expansión de las membranas (Jeyendran *et al.*, 1984). Esta prueba se basa en la permeabilidad de membrana, es por ello que puede evaluar la integridad funcional de la misma (Bedoya *et al.*, 2003).

Al trabajar con semen fresco y congelado-descongelado de caninos se destaca el uso de la prueba hipo-osmótica como una técnica simple para evaluar la integridad de la membrana espermática (Sánchez *et al.*, 2002). La prueba hipo-osmótica puede ser utilizada para el diagnóstico de la función de la membrana espermática (England & Plummer, 1993).

2.9.2 Microscopía de contraste de fase

Cuando se tiñen los espermatozoides para diferenciar vivos y muertos, los muertos tienden a teñirse, esto asociado al daño estructural que sufren (Hancock, 1952). Para evaluar el daño en el acrosoma se puede utilizar la solución Hancock y observar al microscopio de contraste de fases. En los espermatozoides vivos

examinados con el microscopio de contraste de fase, el acrosoma interno es más prominente que el acrosoma externo y el borde posterior del acrosoma externo puede verse como una línea que atraviesa ecuatorialmente por la cabeza del espermatozoide (Valencia *et al.*, 1955).

2.9.3 Sistema CASA

Se han desarrollado herramientas como el análisis de semen asistido por computadora por sus siglas en inglés (CASA Computer-assisted semen analysis) para hacer evaluaciones más objetivas y detalladas del semen (Larsen *et al.*, 2000). El sistema CASA además mide otros parámetros como la velocidad curvilínea (VCL) o la velocidad en línea recta (VSL), donde VCL se refiere a la trayectoria que recorre la cabeza del espermatozoide en un periodo de tiempo, mientras VSL toma en cuenta la distancia en línea recta entre el punto de inicio y el punto final del recorrido del espermatozoide, también se mide la linealidad, obtenida con la siguiente fórmula: $\text{Linearidad} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$. Otro parámetro medido es la rectitud del espermatozoide, obtenida al dividir la velocidad en línea recta entre la distancia del trayecto y multiplicarla por 100 (Mortimer, 2000).

Los nuevos sistemas computarizados para el análisis de motilidad espermática permiten obtener información sobre la calidad de los espermatozoides de forma rápida y precisa (Muiño *et al.*, 2005). Un sistema CASA cuenta con un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de video que envía la imagen a un monitor, el software analiza la trayectoria individual por espermatozoide y describe parámetros comunes de movimiento espermático (Boyers *et al.*, 1989).

III. JUSTIFICACIÓN

La congelación de semen ovino permite realizar la inseminación artificial y con ello lograr un mejoramiento genético en los rebaños de México.

En la actualidad, aunque existen varios diluyentes para el procesamiento de semen, no logran conservar al máximo la integridad de los espermatozoides. El proceso de enfriamiento y congelación provoca una peroxidación de lípidos de membrana y daña la integridad de ésta, gracias a estos cambios un gran número de espermatozoides muere en el proceso y otros son afectados sub-lealmente. Estos efectos detrimentales provocan la necesidad de buscar nuevas alternativas para utilizar en conjunto con los diluyentes actuales, que sirvan como un protector adicional para minimizar dichos problemas.

IV. HIPÓTESIS

Adicionando extracto acetónico de nopal a un diluyente comercial para congelación de semen de carnero, mejorarán los patrones de motilidad espermática, el porcentaje de células con integridad de membrana y la sobrevivencia espermática post-descongelado, debido a la disminución del estrés oxidativo asociado a la congelación/descongelación.

Dirección General de Bibliotecas UAG

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Obtener un extracto acetónico de nopal con buena capacidad antioxidante y evaluar la viabilidad de espermatozoides de carnero post-descongelado, utilizando el extracto acetónico de nopal como aditivo en un diluyente comercial para congelación.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de dos diferentes métodos para la obtención de un extracto acetónico de nopal, sobre su capacidad antioxidante.
- Determinar el efecto del extracto usado como aditivo en un diluyente comercial para congelación sobre:
 - Los patrones de motilidad espermática
 - El porcentaje de células espermáticas con integridad funcional de membrana
 - La sobrevivencia de los espermatozoides

Todo lo anterior posterior a la congelación/descongelación.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales/Universidad Autónoma de Querétaro, ubicado en el municipio de El Marqués, Qro (21°40' LN, 99°2' LO, altitud 1900 m.s.m., temperatura y precipitación media anual 15°C y 570 mm; INEGI 2012).

Se utilizaron pencas de nopal de tamaño uniforme, cultivado en invernadero (*Opuntia ficus var. copena F1 forrajero*) para obtener un extracto acetónico. Éste se obtuvo en el Laboratorio de Nutrición Animal del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias) de dos diferentes formas, con secado por convección y por medio de liofilización (anexo A). Posterior a su obtención se analizó la capacidad antioxidante de los 2 extractos (anexo B) y se utilizó en el experimento subsecuente el que presentó mayor capacidad antioxidante.

Se utilizaron carneros Black Belly como donadores de semen, mismos que fueron previamente entrenados y alimentados con una dieta de mantenimiento, formulada para cubrir el 100% de sus requerimientos nutricionales.

Se usó un diluyente comercial (OPTIDYL, CRYO-VET) para el procesamiento de los eyaculados, utilizando como aditivo del diluyente 0% (T0), 0.5% (T0.5), 1.0% (T1) y 1.5% (T1.5) de extracto acetónico de nopal, con 10 repeticiones. Solamente se usaron eyaculados con motilidad progresiva $\geq 70\%$ (evaluación a 400X en diferentes campos de la muestra diluida). El volumen total para cada repetición se obtuvo mezclando varios eyaculados y esa mezcla se fraccionó para aplicar cada uno de los 4 tratamientos y controlando así el efecto de individuo y eyaculado.

Los procedimientos para colección de los eyaculados, su dilución, enfriamiento y congelación fueron los establecidos en el Laboratorio de Reproducción Animal-FCN/UAQ (García, 2018).

Una vez congeladas las 10 repeticiones, se evaluó al post-descongelado:

- El porcentaje de motilidad progresiva individual por observación al microscopio (400 X, promedio de 5 campos), tanto al término del proceso de enfriamiento como al post descongelado.
- Integridad funcional de la membrana espermática por medio de la prueba de expansión hipo-osmótica (HOST) (anexo C), y valoración de 200 células por triplicado en cada repetición y tratamiento.
- Porcentaje de sobrevivencia espermática por medio de frotis con la tinción de Eosina-Nigrosina por observación al microscopio (400 X) y valoración de 200 células por triplicado en cada repetición y tratamiento
- Morfología espermática por fijación en solución de Hanckock (anexo D), microscopia de contraste de fase a 100 X y valoración de 200 células por triplicado en cada repetición y tratamiento.

Para su análisis estadístico los resultados expresados como porcentaje se transformaron a arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción con el fin de normalizarlos. El análisis estadístico fue por ANOVA para un diseño de bloques completos al azar con la repetición como criterio de bloque.

VII. RESULTADOS

El extracto de nopal con mayor capacidad antioxidante se obtuvo cuando el secado fue por convección, con un 74.3% vs 22.7% de inhibición de DPPH equivalentes a 150 y 18.6 µg/ml de ácido ascórbico en secado por convección vs liofilización.

La motilidad progresiva (MP) al término del enfriamiento y post descongelado fue afectada por el tratamiento (Cuadro 2, $P < 0.001$). Al término del enfriamiento se observó que el nivel más alto de adición de extracto de nopal afectó la MP mientras que el nivel de 0.5% tendió a mejorarla con respecto al grupo control (16.0 y 72.5 vs 68.5 % en T 1.5, T0.5 y T0). Al post descongelado se observó una situación similar, con el nivel de adición de extracto de 0.5 % mejorando la MP con respecto al grupo control (44.2 vs 38.7 %) y el nivel más alto afectando esta variable (8.2 vs 38.7 %). La disminución de MP entre enfriamiento y post descongelado también fue afectada por el tratamiento siendo menor en el mayor nivel de adición del extracto que en los otros grupos (-29.7^a, -28.2^a, -29.2^a, -7.7^b puntos porcentuales para 0, 0.5, 1.0 y 1.5 % de adición de extracto, $P < 0.001$).

Cuadro 2. Porcentaje de motilidad progresiva individual al término del enfriamiento (MP Enf) y descongelado (MP Des) en espermatozoides de carnero procesados utilizando como aditivo del diluyente 0% (T0), 0.5% (T0.5), 1.0% (T1) y 1.5% (T1.5) de extracto acetónico de nopal.

Variable	T 0	T 0.5	T 1.0	T 1.5	e.e.m.	P
MP Enf	68.5 ^{ab}	72.5 ^a	63.0 ^b	16.0 ^c	2.7	< 0.001
MP Des	38.7 ^a	44.2 ^b	33.7 ^c	8.2 ^d	1.3	< 0.001

^{a,b,c,d} Literales diferentes en la misma fila indican diferencia estadística

La integridad de membrana post descongelado mediante la prueba de expansión hipo-osmótica HOST (H+) solo fue afectada por el tratamiento con mayor adición de extracto acetónico de nopal (Cuadro 3, $P < 0.001$), mientras que los otros tres tratamientos no mostraron diferencias significativas.

Cuadro 3. Porcentaje de espermatozoides de carnero con buena integridad de membrana post descongelado evaluada mediante la prueba de expansión hiposmótica HOST (H+), procesados utilizando como aditivo del diluyente 0 (T0), 0.5 (T0.5), 1.0 (T1) y 1.5 % (T1.5) de extracto acetónico de nopal.

Variable	T 0	T 0.5	T 1.0	T 1.5	e.e.m.	P
H+	71.12 ^a	68.38 ^a	64 ^a	38.62 ^b	2.4	< 0.05

a,b,c Literales diferentes dentro de fila indican diferencia estadística.

La sobrevivencia espermática post descongelado mediante la tinción supravital eosina-nigrosina fue afectada por los tratamientos con mayor adición de extracto acetónico de nopal (cuadro 4, P<0.05), mientras que el tratamiento de menor adición de extracto no mostró diferencias significativas respecto al grupo control.

Cuadro 4. Porcentaje de espermatozoides vivos de carnero post descongelado evaluados mediante la prueba supravital eosina-nigrosina, procesados utilizando como aditivo del diluyente 0 (T0), 0.5 (T0.5), 1.0 (T1) y 1.5 % (T1.5) de extracto acetónico de nopal.

Variable	T 0	T 0.5	T 1.0	T 1.5	e.e.m.	P
% Vivos	57.14 ^a	58.4 ^a	48.46 ^b	39.17 ^c	1.5	< 0.05

a,b,c Literales diferentes dentro de fila indican diferencia estadística.

La motilidad progresiva, velocidad progresiva, rectitud y linealidad post descongelado evaluados mediante el sistema CASA, mostraron una mejoría significativa con la menor adición de extracto de nopal con respecto al grupo control (Cuadro 5, P<0.05).

Cuadro 5. Patrones de motilidad en células espermáticas de carnero evaluados al post-descongelado por el sistema CASA, procesados utilizando como aditivo del diluyente 0 (T0), 0.5 (T0.5), 1.0 (T1) y 1.5 % (T1.5) de extracto acetónico de nopal.

Variable	T0	T0.5	T1.0	T1.5	e.e.m.	P
% Móviles progresivos	7.72 ^a	12.75 ^b	5.79 ^a	1.69 ^c	0.8	< 0.05
% Móviles	38.00 ^a	34.05 ^a	22.35 ^b	15.38 ^b	1.9	< 0.05
Velocidad progresiva µm/s	54.47 ^{ab}	65.10 ^c	58.09 ^b	50.04 ^a	1.4	< 0.05
Rectitud %	62.58 ^a	74.11 ^b	85.24 ^c	87.50 ^c	1.8	< 0.05
Linealidad %	32.55 ^a	40.78 ^b	53.75 ^c	55.79 ^c	1.8	< 0.05

a,b,c Literales diferentes dentro de fila indican diferencia estadística.

VI. DISCUSIÓN

En la actualidad diversos investigadores han estudiado el uso de la adición de diferentes antioxidantes para el procesamiento y congelación de semen de carnero con el fin de mejorar la viabilidad del mismo. Dentro de los trabajos realizados con antioxidantes utilizándolos como aditivo se pueden mencionar los realizados por: Pérez-Pe *et al.* (2001) utilizando vitamina E; Membrillo-Ortega *et al.* (2011) trabajando con vitamina C y vitamina E; Silva *et al.* (2012) usando resveratrol y quercetina. Otros investigadores estudiaron el uso de extractos de plantas como Mehdi pour *et al.* (2016) quienes utilizaron extracto de té verde (*Camellia sinensis*), o Allai *et al.* (2016) que estudiaron el uso de extracto de nopal (*Opuntia ficus*).

En este trabajo se analizó la capacidad antioxidante del extracto acetónico de nopal y se obtuvo un valor equivalente a 150 µg/ml de ácido ascórbico y un 74.3% de inhibición del DPPH con el extracto en que el secado fue por convección. Este resultado indica que puede considerarse como un buen agente antioxidante. Al igual que lo encontrado por Soto-Herrera (2018) en pasto de cebada también se observó que el secado por liofilización del material fresco afecta severamente la actividad antioxidante del extracto.

El valor más bajo de adición de extracto antioxidante 0.5 % (correspondiente a 5mg/ml), permitió una mejora de la motilidad progresiva al finalizar el proceso de enfriamiento, de manera similar a lo encontrado por Allai *et al.* (2016), aunque en ese trabajo el efecto protector se observó con adición de 1 % del extracto. Esta diferencia puede explicarse por características del material vegetativo a partir del cual se obtiene el extracto, como estado de madurez y también por condiciones de cultivo; Rodríguez-Félix & Cantwell, (1988). Lo anterior resalta la necesidad de estandarizar esas condiciones para obtener extractos con características similares.

Con la adición de 0.5% de extracto acetónico de nopal equivalente a 75 µg/ml de ácido ascórbico en términos de capacidad antioxidante, se observó una mejoría

en la MP al congelado/descongelado. Este resultado contrasta con los datos de Membrillo-Ortega *et al.*, (2011) quienes adicionaron al diluyente para congelar directamente vitamina C a razón de 5mg/ml y obtuvieron un decremento en la MP del 10%, decremento que relacionan directamente con una reducción del pH. Esta comparación nos muestra que el efecto antioxidante que se requiere para proteger a los espermatozoides durante el proceso de congelación, aparentemente no necesita ser muy alto y que además se deben considerar los efectos negativos secundarios potenciales del agente antioxidante para determinar el nivel en que se puede usar como aditivo.

El análisis de la MP del semen por medio del microscopio es una técnica subjetiva y puede variar entre un laboratorio y otro, razón por la cual no se pueden comparar los resultados de MP de diferentes laboratorios, por ello se han desarrollado herramientas como el análisis de semen asistido por computadora por sus siglas en inglés (CASA Computer-assisted semen analysis) para hacer evaluaciones más objetivas y detalladas del semen (Larsen *et al.*, 2000). El sistema CASA además mide otros parámetros como la velocidad curvilínea (VCL) o la velocidad en línea recta (VSL), donde VCL se refiere a la trayectoria que recorre la cabeza del espermatozoide en un periodo de tiempo, mientras VSL toma en cuenta la distancia en línea recta entre el punto de inicio y el punto final del recorrido del espermatozoide, también se mide la linealidad, obtenida con la siguiente fórmula: $\text{Linealidad} = (\text{VSL}/\text{VCL}) \times 100$. Otro parámetro medido es la rectitud del movimiento de los espermatozoides, obtenida al dividir la velocidad en línea recta entre la distancia del trayecto y multiplicarla por 100 (Mortimer, 2000).

Los resultados obtenidos en el sistema CASA (Hamilton Thorne Bioscience, IVOS, Version 12, USA) muestran que la adición de 0.5% de extracto acetónico de nopal mejoró la motilidad progresiva, velocidad progresiva, linealidad y rectitud de los espermatozoides al post descongelado, sin afectar la integridad de membrana y sobrevivencia espermática, con respecto al grupo control. Lo anterior puede sugerir un mayor potencial de fertilización en las dosis para inseminación con el uso del

extracto de nopal como aditivo, de manera similar a lo observado por Ferraz *et al.* (2014) en bovinos de la raza Holstein, quienes encontraron una alta correlación entre el porcentaje de motilidad progresiva y la capacidad de los espermatozoides para interactuar adecuadamente con el ovocito y sus capas extracelulares.

Los niveles de adición de extracto mayores a 0.5% tuvieron un efecto negativo sobre la viabilidad de los espermatozoides, de manera similar a lo observado por Pérez-Pe *et al.* (2001) utilizando dosis relativamente altas de vitamina E en forma de acetato y fosfato (pérdida total de la motilidad espermática) y por Membrillo-Ortega *et al.* (2011) al utilizar vitamina C a razón de 5mg/ml (disminución de 10 puntos porcentuales de la motilidad con respecto a su grupo control).

Las especies reactivas a oxígeno (ERO) pueden inhibir la formación de ATP por parte del espermatozoide y con ello el movimiento, resultando en una pérdida irreversible de motilidad y fertilidad (Perumal, 2014). De acuerdo con este efecto, es posible que la adición de 0.5% de extracto acetónico de nopal al diluyente, gracias a su buena capacidad antioxidante, haya podido bloquear una cantidad suficiente de ERO favoreciendo la producción de ATP, viéndose esto a su vez reflejado en una motilidad progresiva mayor y de mejor calidad. Sin embargo, cabe resaltar que pequeñas cantidades de especies reactivas a oxígeno son necesarias para mantener la funcionalidad de los espermatozoides (Córdova *et al.*, 2017). El superóxido es una de las especies reactivas a oxígeno de las que necesita el espermatozoide para llevar a cabo sus funciones. Esta ERO se convierte en peróxido de hidrógeno por efecto de la superóxido dismutasa. El peróxido de hidrógeno a su vez activa a la adenililciclase de membrana, promoviendo así un aumento de la producción de AMPc, mayor activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y aumento en la fosforilación de tirosinas a nivel del flagelo espermático estimulando su movimiento (Oliveira *et al.*, 2006). Debido a lo anterior, el bloqueo total de las ERO puede afectar la capacidad motil de los

espermatozoides, condición que pudiera haber ocurrido con la adición de extracto de nopal mayor al 0.5%.

Allai *et al.* (2016) analizaron la composición del extracto acetónico de nopal que utilizaron y encontraron que contenía ácidos orgánicos, flavonoides y polifenoles. De acuerdo con sus resultados al adicionar 1% de extracto de nopal al diluyente, estaban aportando ácido quínico 43.69µg/ml, ácido málico 312.39µg/ml, ácido acotínico 0.77µg/ml, rutina 1.1µg/ml, hesperidina 1.74µg/ml, hyperósido 0.62µg/ml y quercetina 0.07µg/ml. Por nuestra parte, aunque no se hizo un análisis de composición del extracto acetónico que se obtuvo, el haber utilizado nopal y el mismo método de extracción que Allai *et al.* (2016), nos permite suponer que sus composiciones eran similares. Sin embargo, en el presente estudio el nivel de adición que mejor funcionó fue el 0.5%, a diferencia del 1.0% que fue el mejor en el estudio de los autores antes mencionados. La diferencia de resultados que observamos podría estar relacionada con las condiciones de cultivo y estado fenológico de las pencas de nopal utilizadas, mismas que no se mencionan en el estudio de Allai *et al.* (2016), aunque si determinan la composición de la planta.

Los compuestos mayormente encontrados en el extracto acetónico de nopal de acuerdo con Allai *et al.* (2016), son el ácido quínico y el ácido málico. Esto se debió a que el ácido quínico en su forma libre es abundante en diversas plantas, café y ciertas frutas, además de que cuenta con actividad antioxidante (Farah & Donangelo, 2006, Deshpande *et al.*, 2016 y Pinta *et al.*, 2018). Por su parte el ácido málico (ácido 2-hidroxiutanodioico) es un compuesto fenólico ampliamente utilizado en la industria por sus propiedades antioxidantes (Dai *et al.*, 2018, Liu *et al.*, 2019). Asimismo la rutina, hesperidina, hyperósido y quercetina son compuestos fenólicos con actividad antioxidante (Allai *et al.*, 2016) que en conjunto combaten las especies reactivas a oxígeno. El hyperósido protege directamente a las células de los radicales libres de oxígeno intracelular como el peróxido de hidrógeno (Piao *et al.*, 2008), mientras que la quercetina, que es un compuesto polifenólico con actividad antioxidante, actúa indirectamente a través de regular los niveles de

glutathione; enzyme responsible for catalyzing the decomposition of hydrogen peroxide into water and oxidized glutathione. However, when quercetin is added at high doses, it can inhibit glutathione production (Xu *et al.*, 2019). In synthesis, the level of antioxidant addition to protect sperm from oxidative stress associated with cooling and freezing, must be sufficient to partially reduce the effect of ROS without completely inhibiting them and also not affect the cell's own antioxidant mechanisms or the medium conditions such as pH; it is important to emphasize that in the acetonic extract of nopal, there are important amounts of quinic and malic acids, which in excess could acidify the medium and affect sperm viability.

It is known that some components of seminal plasma are responsible for regulating the intensity of the uterine immune response at the moment of contact of the semen with the female reproductive tract; this effect is mediated in large part by the inhibition of proinflammatory cytokines and is important to allow pregnancy (Rath, Knorr, & Taylor, 2016). The dilution of seminal plasma during the processing of the semen for cooling and freezing does not seem to influence this effect and the addition of low percentages of acetonic extract as used in the present work probably does not either; however, this aspect would need to be proven.

VII. CONCLUSIONES

Con el secado por convección de las pencas, se obtiene un extracto acetónico de nopal con buena capacidad antioxidante

Se cumplió con el objetivo y se demostró la hipótesis que al adicionar extracto acetónico de nopal a un diluyente comercial en pequeñas cantidades, mejora la viabilidad espermática post-descongelado.

El uso de extracto acetónico de nopal puede ser considerado como una alternativa para mejorar la viabilidad de semen de carnero congelado/descongelado

VIII. ANEXOS

A) OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACETÓNICO DE NOPAL

Lo primero que se hizo fue lavar las pencas de nopal con agua destilada y secarlas, después se procedió a cortarlas en cuadritos para facilitar su secado, ya fuera por liofilización o por secado convectivo.

1. Obtención por secado convectivo:

Se dividió el nopal picado en charolas, mismas que fueron pesadas y se metieron en una estufa de secado convectivo a una temperatura de 55°C durante 72 horas hasta que el nopal perdió un 91.5% de peso (humedad). Posterior a esto se molió el nopal seco con una criba de 1 mm y el polvo obtenido se mezcló a razón de 5g con 100 ml de mezcla acetona/agua en una relación 70/30, se mezcló a 700 rpm durante 96 horas a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se filtró la solución con papel filtro Watman No.4, luego se rotaevaporó la solución a 38°C hasta lograr evaporar la acetona del extracto y finalmente se metió a liofilizar con la siguiente programación:

Segmento	Tiempo en horas	Temperatura °C
1	1.5	-40
2	90	-20
3	9	-10
4	3	5

Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron las charolas de la liofilizadora y el extracto se colocó en frascos color ámbar y se mantuvo en refrigeración a 5°C hasta su utilización.

2. Obtención por liofilizado:

Se dividió el nopal picado en charolas, mismas que fueron pesadas y se metieron en una liofilizadora hasta que el nopal perdió un 92.2% de su peso (humedad) con la siguiente programación:

Segmento	Tiempo en horas	Temperatura °C
1	1.5	-40
2	75	-20
3	8	-10
4	2	5

Posterior a esto se molió el nopal ya seco con una criba de 1 mm y el polvo obtenido se mezcló a razón de 5g con 100 ml de mezcla acetona/agua en una relación 70/30, se mezcló a 700 rpm durante 96 horas a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se filtró la solución con papel filtro Watman No.4, luego se rotaevaporó la solución a 38°C hasta lograr evaporar la acetona del extracto y finalmente se metió a liofilizar por segunda ocasión con la siguiente programación:

Segmento	Tiempo en horas	Temperatura °C
1	1.5	-40
2	90	-20
3	9	-10
4	3	5

Una vez transcurrido el tiempo, se sacaron las charolas de la liofilizadora y el extracto se colocó en frascos color ámbar y se mantuvo en refrigeración a 5°C hasta su utilización.

B) TÉCNICA DE DPPH

Se realizó el siguiente procedimiento establecido en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.

1. Preparación de muestra.

Se pesaron (0.10g) de muestra en la balanza analítica con las luces apagadas del laboratorio de Biología molecular. En matraces de 10 ml previamente forrados de aluminio y rotulados se agregó la muestra pesada y se disolvió con metanol con ayuda de las minipipetas de plástico. SIN LLEGAR AL AFORE. Se pasó por vortex por 30 min. Una vez pasado por vortex se aforó con metanol los matraces de 10 ml con ayuda de las minipipetas de plástico. Una vez aforado se vació el contenido de los matraces en los tubos falcón previamente rotulados y se metieron los tubos falcón a la centrifuga 3000 rpm por 10 minutos.

2. Preparación de reactivos.

DPPH:

Se pesaron (0.0039 g) del reactivo de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil en la balanza analítica con las luces apagadas del laboratorio de Biología molecular. En un matraz de 100 ml previamente forrado de aluminio y rotulado, se agregó el reactivo pesado y se disolvió con Metanol con ayuda de las minipipetas de plástico. SIN LLEGAR AL AFORE. Se utilizó un agitador magnético a 500 rpm por 30 minutos. Transcurridos los 30 min. Se aforó con Metanol con ayuda de las minipipetas de plástico.

Preparación de ácido ascórbico:

Se pesaron (0.0176 g) de ácido ascórbico en la balanza analítica con las luces apagadas del laboratorio de Biología molecular. En un matraz de 100 ml previamente forrado de aluminio y rotulado, se agregó el reactivo pesado y se disolvió con agua HPLC con ayuda de las minipipetas de plástico. SIN LLEGAR AL AFORE. Se tapó el matraz con papel parafilm, y se agitó por inversión 10 veces. Se aforó con agua HPLC con ayuda de las micropipetas de plástico.

3. Realización de curva de calibración.

En los viales forrados previamente de aluminio, se rotularon las siguientes concentraciones: C1, C2, C3, C4, C5, C6.

Se agregaron las siguientes cantidades de la preparación de Ácido Ascórbico más agua HPLC para las siguientes concentraciones:

Concentración mM	Concentración µg / ml	Cantidad Ácido Ascórbico (µl)	Cantidad de Agua HPLC (µl)
C1 50	8.8	50	950
C2 100	17.6	100	900
C3 250	44	250	750
C4 500	88	500	500
C5 750	132	750	250
C6 1000	176	1000	0

4. Preparación y llenado de placa.

Se vació en un vasito de precipitado el reactivo preparado de DPPH. Y se tenía listo:

Un vaso de precipitado con Metanol

Un vaso de precipitado con Agua HPLC

Los tubos falcon de las muestras en una gradilla.

Los viales con las concentraciones de ácido ascórbico.

En oscuridad se colocó por triplicado en la placa (Figura 7), en cada uno de los pozos las siguientes cantidades, donde:

B= Blanco (300 µl de DPPH)

C1-C6= Concentraciones de Ácido Ascórbico (20µl) + DPPH (280 µl)

M= Muestra, (20µl) de muestra + DPPH (280 µl)

Se dejó reposar la placa tapada por 30 minutos y se procedió a dar lectura en el lector ELISA a 550nm.

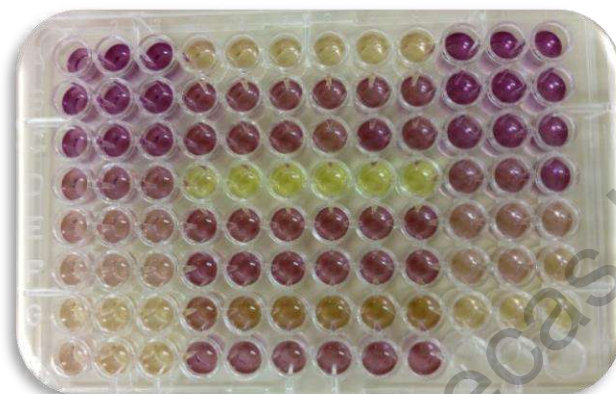


Figura 7: Placa con muestras por triplicado para prueba de DPPH.

5. Interpretación de resultados

Finalmente se realizó la interpretación de resultados pasando los datos obtenidos de la placa del lector ELISA a Excel. Se sacó el promedio de los datos triplicados y se realizó la curva de dispersión lineal donde la R cuadrada fue de 0.99

C) EVALUACIÓN HIPO-OSMÓTICA HOST

Primero se preparó la solución hipo-osmótica según Mehdipour *et al.*, (2016). Se utilizaron 9 g de Fructosa y 4.9 g de citrato de sodio en 1 l de agua bidestilada y se almacenó a temperatura ambiente y en un lugar oscuro hasta su utilización.

Se evaluaron por triplicado las dosis de semen de las 10 réplicas y los 4 diferentes tratamientos. Primero se agregaron 100µl de solución hipo-osmótica previamente preparada en cada vial, mismos que se colocaron en baño maría a 37°C, después se descongeló por 45 segundos cada pajilla en agua a 36°C y se agregaron 50µl a cada vial, para tener un volumen final de 150µl, una vez realizado esto, la mezcla permaneció por 30 min a 37°C. Finalmente se colocaron 17µl de la mezcla en un portaobjetos con un cubreobjetos y se evaluó al microscopio en un objetivo 100X con aceite de inmersión contando un total de 200 espermatozoides, separando los hinchados de los no hinchados, como se muestra en la figura 8.

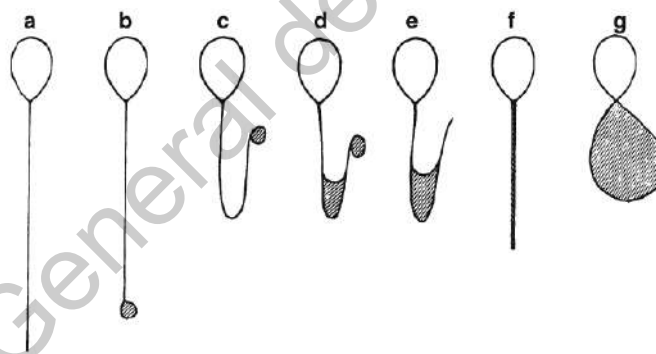


Fig. 1. Representación esquemática de diversos cambios morfológicos de los espermatozoides humanos expuestos a estrés hipo-osmótico. (una) Los espermatozoides con morfología inalterada. (segundo - set) Los espermatozoides con diferentes tipos de cola hinchada indicados por el área rayada. Figura publicado originalmente en la ref. 1 reproducido con autorización.

Figura 8. Representación esquemática de espermatozoides expuestos a estrés hipo-osmótico. Donde se muestra: a) morfología inalterada y b-g) diferentes tipos de hinchazón (Ramu & Jeyendran, 2013).

D) EVALUACIÓN HANCOCK

Primero se preparó la solución Hancock según Mehdipour *et al.*, (2016). Utilizando Formalina (62.5 ml), Solución salina (150 ml), solución Buffer (150 ml) y agua bidestilada (500 ml) y se almacenó a temperatura ambiente y en un lugar oscuro hasta su utilización.

Para preparar la solución salina se utilizaron 9.01 g de NaCl en 500 ml de agua bidestilada.

Para la solución buffer se formaron 2 soluciones:

21.7 g de Na_2HPO_4 en 500 ml de agua bidestilada.

22.54 g de KH_4PO_4 en 500 ml de agua bidestilada.

La solución buffer se conformó de 100 ml de la solución 1 y 50 ml de la solución 2.

Se evaluaron por triplicado las dosis de semen de las 10 réplicas y los 4 diferentes tratamientos. Primero se agregaron 500µl de solución Hancock previamente preparada en cada vial, después se descongeló por 45 segundos cada pajilla en agua a 36°C y se agregaron 50µl de semen a cada vial, para tener un volumen final de 550µl, una vez realizado esto, se colocaron 8µl de la mezcla en un portaobjetos con un cubreobjetos y se evaluó al microscopio en un objetivo 100X con aceite de inmersión contando un total de 200 espermatozoides, identificando espermatozoides normales y anormales.

IX. REFERENCIAS

- Allai, L., Druart, X., Öztürk, M., BenMoula, A., Nasser, B., & El Amiri, B. (2016). Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.*, 175, 1-9.
- Álvarez, J. T. (1987). Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa. Superoxide Dismutase as Major Enzyme Protectant Against Oxygen Toxicity. *J Androl*, 8, 338-348.
- Bedoya, N., Vásquez, N., & Rivera, M. (2003). Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOST). *Revista facultad nacional de agronomía Medellín*, 1983-1997.
- Boyers, S., Davis, R., & Katz, D. (1989). Automated semen analysis. *Obstet. Gynecol. Fertil*, 172-200. Citado por: Muiño, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J., López, M., Fernández, A., & Peña, A. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, 175-191.
- Bucak, M. A. (2008). Bucak MN, Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Res.*, 75, 128-134.
- Córdova, A., Espinosa-Cervantes, R., Guerra, J. E., Iglesias-Reyes, A., Huerta Rubén, Villa-Mancera, A., . . . Rodríguez, B. (2017). Importancia del estrés oxidativo en los espermatozoides. *bmeditores*, 207-214.
- Cuevas, M., Romero, F., & Parodi, J. (2013). Reactive oxygen species can alter physiological parameters of sperm; the future of macromolecules in boar semen dilutions. *International Journal of the bioflux Society*, 40-48.

- Dai, Z., Zhou, H., Zhang, S., Gu, H., Yang, Q., Zhang, W., . . . Xin, F. (2018). Current advance in biological production of malic acid using wild type and metabolic engineered strains. *Bioresour Technol.*, 345-353.
- Deshpande, S., Matej, M., Jaiwal, R., Bassil, B., Kortz, U., & Kuhnert, N. (2016). Synthesis, structure and tandem mass spectrometrical characterization of the diastereoisomers of quinic acid. *J. Agric. Food Chem*, 1-29.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. *J. Agric. Food Chem.*, 1768-1774.
- Duncan, A. W. (1992). Duncan AE, Predictive Water Loss Curves for Ram Spermatozoa during Cryopreservation: Comparison with Experimental Observations. *Cryobiology*, 29, 95-105.
- England, G., & Plummer, J. (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 261-270.
- FAOSTAT. (7 de Mayo de 2018). *Food and Agriculture Organization of United Nations*. Recuperado el 09 de Octubre de 2018, de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>
- Farah, A., & Donangelo, C. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 1-15.
- Ferraz, M., Morato, R., Yeste, M., Arcarons, N., Peña, A., Tamargo, C., . . . Mogas, T. (2014). Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. *Theriogenology*, 1067-1072.
- Flores-Álvarez, M., Vergara-Balderas, F., & Guerrero-Beltrán, J. (2011). Efecto del tiempo de almacenamiento y tipo de procesamiento en los antioxidantes de nopal. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 84-96.

- Galina, C., & Valencia, J. (2008). *Reproducción de animales domésticos*. México: LIMUSA.
- García H.A.G. (2018) Manual de prácticas, colección y procesamiento de semen de carnero. UAQ.
- Gillan, L., Evans, G. and Maxwell, W.M.C., 1995. Visualising capacitation in ram spermatozoa using chlortetracycline fluorescence (abstract). *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.*, 27: 48.
- Gordon, I. (2004). *Reproductive technologies in farm animals*. UK: CABI Publishing.
- Hancock, J. (1952). The morphology of bull spermatozoa. *The J. of Exp. Biol.*, 445-453.
- Hancock, J. (1955). The morphology of boar spermatozoa. *Journ. R. Micr. Soc.*, 84-97.
- Ivanoff, E. (1922). On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia. *12*, 244-256.
- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Pérez-Pelaez, M., Crabo, B., & Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 219-228.
- Larsen, L., Scheike, T., Jensen, T., Bonde, J., Ernst, E., Hjollund, N., . . . Giwercman, A. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Human Reprod*, 1562-1567.
- Liu, Q., Tang, G., Zhao, C., Gan, R., & Li, H. (2019). Antioxidant activities, phenolic profiles, and organic acid contents of fruit vinegars. *Antioxidants*, 1-12.
- Lopyrin, A., & Rabocev, B. (1968). The optimum time to use preserved semen. *Ovtsevodstvo*, 20-22. Citado por: Salamon, S., & Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 77-111.

- Marti, E., Mara, L., Marti, J., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. (2007). Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, 67, 1446-1454.
- Maxwell, W., & Watson, P. (1996). Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 55-65.
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57, 327-344.
- Mehdipour M, Kia HD, Najafi A, Dodaran (2016). Effect of Green tea (*Camelia sinensis*) extract and prefreezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 73, 297-303.
- Membrillo-Ortega, A., Córdova-Izquierdo, A., Hicks-Gómez, J., Valencia-Méndez, J., & Castillo-Juárez, H. (2011). Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de congelar. *Rev. Vet.*, 85-90.
- Molyneux, P. (2004). Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *J. Sci. Technol.*, 212-219.
- Moore, S. H. (2017). Review: Reproductive technologies in dairy science. *J. Dairy Sci.*, 10314-10331.
- Mortimer, S. (2000). CASA Practical Aspects. *Journal of andrology*, 515-524.
- Muiño, R., Fenández, M., Areán, H., Viana, J., López, M., Fernández, A., & Peña, A. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, 175-191.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 426-436.

- Parks, J., & Graham, J. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38, 209-222.
- Pérez-Pe, R., Cebrián-Pérez, J., & Muiño-Blanco, T. (2001). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56, 425-434.
- Perry, E. (1945). *The Artificial Insemination of Farm Animals*. Rutgers University Press. Citado por: Moore, S. H. (2017). Review: Reproductive technologies in dairy science. *J. Dairy. Sci.*, 10314-10331.
- Perumal, P. (2014). Effect of superoxide dismutase on semen parameters and antioxidant enzyme activities of liquid stored (5°C) mithun (*Bos frontalis*) semen. *Journal of animals*, 1-9.
- Piao, M., Kang, K., Zhang, R., Ko, D., Wang, Z., You, H., . . . Hyun, J. (2008). Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in luon fibroblast cells via antioxidant effect. *ELSEVIER*, 1448-1457.
- Pinta, M., Montoliu, I., Aura, A., Seppänen-Laakso, T., Barron, D., & Moco, S. (2018). In Vitro Gut Metabolism of [U- 13 C]-Quinic Acid, The Other Hydrolysis Product of Chlorogenic Acid . *Mol Nutr Food Res*, 1-24.
- Ramu, S., & Jeyendran, R. (2013). The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity. En D. T. I., *Spermatogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*.
- Rath, D., Knorr, C., & Taylor, U. (2016). Communication requested: Boar semen transport through the uterus and possible consequences for insemination. *Theriogenology*, 94-104.
- Rodríguez-Félix, A., & Cantwell, M. (1988). Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos). *Plant Foods for Human Nutrition*, 38, 83-93.

- Rózek, A., Achaerandio, I., Güell, C., López, F., & Ferrando, M. (2008). Efecto del secado convectivo en la estabilidad de compuestos fenólicos añadidos a alimentos sólidos mediante deshidratación osmótica. *CIMNE, España*, 1-6.
- Ruiz, M. E., Rivera, B., & Ruiz, A. (1998). *Reproducción animal: métodos de estudio en sistemas*. San José, Costa Rica: RISPAL.
- Sáenz, C., Berger, H., Corrales, J., Galletti, L., García, V., Higuera, I., . . . Varnero, M. (2006). *Utilización agroindustrial del nopal*. FAO.
- SAGARPA. (22 de Mayo de 2015). Recuperado el 09 de Octubre de 2018, de <https://www.gob.mx/sagarpa/en/prensa/impulsan-mejora-genetica-en-ovinocultura-nacional>
- SAGARPA. (29 de Noviembre de 2017). Recuperado el 09 de Octubre de 2018, de <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/la-ovinocultura-una-actividad-muy-arropadora?idiom=es>
- Salamon, S., & Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 77-111.
- Saling, P.M. and Storey, B.T., 1979. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracyclme as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell. Biol.*, 83: 544-555.
- Sánchez, A., Rubilar, J., & Gatica, R. (2002). Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. *Archivos de medicina veterinaria*.
- SIAP. (9 de Octubre de 2018). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Obtenido de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/276009/Ovino_1_.pdf
- 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*, 1722-1726.

- Smith, M. F. (2018). Reproduction in domestic ruminants during the past 50 yr: discovery to application. *J. Anim. Sci.*, 96(7), 2952-2970.
- Soto-Herrera Z. (2018) Cuantificación de fenoles totales, flavonoides, taninos y capacidad antioxidante de un pasto fresco, seco y liofilizado de cebada de la variedad esmeralda (*Hordeum vulgare*). Tesis individual
- Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C., & Stornelli, M. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Anal. Vet.*, 25, 28-35.
- Tortolero, I., Arata-Bellabarba, G., Osuna, J. A., Gómez, R., & Regadera, J. (2005). Estrés oxidativo y función espermática. *Revista Venez Endocrinol Metab*, 11-19.
- Valencia, J., Gonzáles, G., González, M., & Trejo, A. (1994). Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25ml y 0.5ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Vet. Méx.*, 127-131.
- Vishwanath, R. (2003). Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, 59, 571-584.
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 23-53.
- Watson, P. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 871-891.
- Watson, P., & Morris, G. (1987). Cold shock injury in animal cells. *Symposium of the Society for Experimental Biology*, 41, 311-340.
- Xu, D., Hu, M.-J., Wang, I.-Q., & Cui, Y.-L. (2019). Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medical application. *Molecules*, 1-15.