



Efecto de aditivos antioxidantes en semen ovino post-congelación

Iván Gómez^a, Y.M Domínguez^b, G. De La Isla^a, D. Velazquez^b

^aFacultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., ^bCEIEPAA-FMVZ-UNAM, Tequisquiapan, Qro. (yesdomin@hotmail.com)

RESUMEN

El proceso de criopreservación de semen de carneros da como resultado un aumento en el número de células apoptóticas en comparación con el semen fresco. Este estrés provoca daños en la integridad de la membrana con la consecuente pérdida de la motilidad y viabilidad. Los factores perjudiciales durante la criopreservación figuran los ocasionados por los radicales libres que se forman en este proceso siendo los responsables del daño oxidativo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de adicionar antioxidantes (las vitaminas C y E) en el semen de carnero para su criopreservación y evaluar su efecto en la motilidad al descongelarlo. Se utilizaron nueve carneros y se analizaron tres eyaculados de cada semental. Cada eyaculado fue dividido en cuatro tratamientos: control, con vitamina C, con vitamina E y combinación de vitaminas C+E. La determinación de la motilidad espermática al descongelar se realizó por medio del Test de Endosmosis (HOST). Los datos fueron analizados por medio del Análisis de Varianza (ANOVA) mediante un modelo simple, comparando el porcentaje de motilidad individual de las medias de los tratamientos post-congelación. Los resultados mostraron que todos los sementales previo al proceso de congelación tuvieron buenos resultados de las características seminales en promedio obtuvieron 0.75 ml de volumen, 3.6×10^9 espermatozoides/ml, 86% de motilidad individual y 73% Host. Posterior a la descongelación se registró aumento de la mortalidad en los espermatozoides con los tratamientos con vitamina C y la combinación de vitamina C+E, se estimó que la combinación de antioxidantes con vitamina E no redujo estadísticamente la mortalidad espermática (43.8% de motilidad individual, 56.2% mortalidad) en comparación el grupo control ($p > 0.05$). Se concluye que la adición de antioxidantes al diluyente, puede reducir el estrés oxidativo causado por la congelación y descongelación de los espermatozoides; sin embargo, no es de manera significativa.

INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática de los espermatozoides de mamíferos es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas. Antes y después de la eyaculación, la membrana espermática sufre cambios que están asociados a la capacidad fecundante de los espermatozoides. Diversos eventos ocurren durante el proceso de fertilización: capacitación, reacción acrosomal y fusión del espermatozoide a la superficie del oocito. Todos ellos requieren de la actividad bioquímica de la membrana, y, por lo tanto, es muy importante evaluar la estructura e integridad funcional de la misma (Córdova *et al.*, 2003).

Consecuentemente, los espermatozoides sólo son viables un corto periodo de tiempo en el tracto reproductivo de la hembra y, por lo tanto, tendrían una menor oportunidad de poder fecundar los ovocitos (Gillan y Maxwell, 1999).

El proceso de congelación de semen da como resultado un aumento en el número de células apoptóticas en comparación con el semen fresco. Durante la criopreservación del semen, el estrés provoca daños en la integridad de la membrana con la consecuente pérdida de la motilidad y



viabilidad. Dentro de los principales factores perjudiciales durante la criopreservación figuran los ocasionados por los radicales libres que se forman en este proceso siendo los responsables del daño oxidativo (Watson, 2000). El daño a bajas temperaturas ocurre en la membrana plasmática, en la membrana acrosomal, en la mitocondria y en la vaina del axonema y aunque fisiológicamente se forman radicales libres durante la respiración mitocondrial, es importante tener en cuenta que las anomalías en la mitocondria pueden contribuir a la producción excesiva de los radicales libres (Castillo *et al.*, 2011).

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por espermatozoides dañados tiene un impacto negativo sobre las células viables restantes, ya que representa un daño acumulativo para los espermatozoides que son almacenados. Las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, ya que pueden activar al espermatozoide en la fecundación; un desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide, provocando un estrés oxidativo que se ha definido como un desequilibrio entre los agentes oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Estos últimos involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas diversas entre las que se incluyen las vitaminas E y C, que cumplen su función antioxidante al disminuir el porcentaje de peroxidación lipídica (Castillo *et al.*, 2011).

TEORIA

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por espermatozoides dañados tiene un impacto negativo sobre las células viables restantes, ya que representa un daño acumulativo para los espermatozoides que son almacenados.

Entre las ROS destacan fundamentalmente el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La reacción inicial de la oxidación de los ácidos grasos consiste en una lipoperoxidación y es generada por las ROS que inducen una reacción en cadena, provocando un rompimiento de dobles enlaces en los lípidos de las membranas (Córdova *et al.*, 2003).

Para el control o disminución de la peroxidación lipídica del espermatozoide se ocupan los antioxidantes con función biológica que se definen como aquellas sustancias que presentes en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del sustrato toda vez que resulta un agente reductor más potente. En bioquímica inorgánica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de oxidorreducción. Existen los antioxidantes preventivos que actúan al inicio de una cadena de oxidación para reducir o impedir el comienzo de una cadena de oxidorreducción. Como ejemplos se pueden considerar los reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos (enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y peroxidasa). Mientras que los antioxidantes secundarios son interruptores que actúan al bloquear en alguna etapa la cadena de oxidación ya iniciada al captar radicales libres y al acortar la longitud de la cadena de oxidación y sus consecuencias (vitaminas E y C y la enzima superóxidodismutasa) (Hicks, 2002). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de los espermatozoides de ovino post-congelación a través de la adición de antioxidantes en el diluyente.

PARTE EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en el CEIEPAA-FMVZ-UNAM, ubicado Tequisquiapan, Querétaro. Se utilizaron 9 machos ovinos de las razas Suffolk (3), Katahdin (3) y Dorset (3) con una edad promedio de 3 años reproductivamente activos, durante la época de primavera (marzo- abril) los cuales fueron alojados en sementaleras individuales y alimentados con avena (administrando el 4% de su peso corporal en Materia Seca) y agua *ad libitum*. Se obtuvieron 3 tomas de semen de cada animal en el transcurso de 5 semanas (2 tomas cada semana y 1 la última semana), obteniéndose un total de 27



eyaculados totales. Se administró 3 tratamientos diferentes en cada eyaculado y un control, los cuales fueron; Grupo Control :Triladyl (25%), Agua bidestilada (70%) y yema de huevo (5%), Tratamiento 1: Triladyl (25%), Agua bidestilada (70%), yema de huevo (5%) y vitamina C (.05mg/ml), Tratamiento 2: Triladyl (25%), Agua bidestilada (70%), yema de huevo (5%) y vitamina E (.05mg/ml), y Tratamiento 3: Triladyl (25%), Agua bidestilada (70%), yema de huevo (5%), vitamina E (.05mg/ml) y vitamina C (.05mg/ml). Previo a la dilución se realizó el examen macroscópico del semen donde se examinó volumen, color, consistencia y motilidad en masa macroscópica y el examen microscópico donde se determinó la concentración espermática por medio de la cámara de Neubauer, se evaluó la motilidad en masa microscópica y motilidad individual, posteriormente se realizó la dilución con los diferentes tratamientos y control a cada eyaculado y se volvió a evaluar la motilidad individual y la permeabilidad de la membrana (HOST) con una solución hipotónica de citrato de sodio y fructosa manteniendo la temperatura a 37°C, al termino se procedió a la refrigeración (descendiendo la temperatura hasta 4°C durante 2 horas), consecutivamente al empajillado (pajillas de .25ml) y la congelación primero con vapores de nitrógeno liquido (durante 7 minutos) después en nitrógeno liquido directamente para almacén en el termo. La descongelación se hizo 24 horas después introduciendo las pajillas por 1 minuto en un baño maría a 37 °C. Al sacar las pajillas del agua eran secadas y evaluadas de cada pajilla se utilizó una gota para evaluación microscópica y una gota para realizar el HOST.

Los datos fueron analizados por medio del Análisis de Varianza (ANOVA) mediante un modelo simple, de un factor comparando el porcentaje de motilidad individual de las medias de los tratamientos (control, Vitamina C, Vitamina E y un combinado de vitamina C con Vitamina E) post-congelación y comparando las medias aritméticas de todos los tratamientos. También se evaluó el coeficiente de correlación entre las muestras con tratamientos y el Host.

Al evaluar el semen, se obtuvieron resultados satisfactorios en la evaluación macroscópica y microscópica (Tabla 1). El promedio del semen de los carneros evaluados cumplió con las características de motilidad individual y motilidad masal de los espermatozoides requeridos para criopreservación de las muestras, siendo 86.83 % de motilidad individual (con un rango entre el 80 % - 90%), concentración, 3523X10⁶ por mililitro (con un rango entre 2000 y 4500x10⁶ por mililitro) y motilidad masal de 5 puntos (movimiento progresivo, rápido y enérgico del espermatozoide, valor 4 o 5) (Aisen, 2004).

Tabla 1. Promedio evaluación de semen pre-congelación todos los machos.

Raza	Volumen (ml)	Concentración espermática (x 10 ⁶)/ml	Motilidad Masal	Motilidad Individual (%)	Host Control
Machos Katahdin	0.71	3773	+++++	88.88	75.22
Machos Suffolk	0.87	4115	+++++	87.22	72.77
Machos Dorset	0.91	2683	+++++	84.44	72.55
General	0.83	3523	+++++	86.83	73.34

Los resultados demostraron diferencias estadísticas significativas (Tabla 2 y 3) entre los tratamientos analizados después de descongelar repercutiendo negativamente la motilidad individual y el HOST a la adición de vitamina C para la disminución del grado oxidativo con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Se observó que el tratamiento con Vitamina E fue el que mejor respuesta tuvo al descongelar disminuyendo la motilidad un 49.53% sobre el 86.83 general. Sin embargo la vitamina E ($p > 0,05$) no tuvo diferencias significativas con el grupo control y por ende



no se puede decir que tuvo un efecto protector oxidativo en los espermatozoides. El grupo control disminuyó un 50.37%; esto muestra el buen comportamiento de estos dos tratamientos a lo largo del proceso de descongelación, lo que se encuentra dentro del rango de motilidad individual deseada, pues según Gillian y Maxwell (1999), al congelar el semen sólo alrededor del 50% de los espermatozoides mantienen su viabilidad.

Tabla 2. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen post-congelación todos los machos.

	Control	Tratamiento Vitamina C	Tratamiento Vitamina E	Tratamiento Vitamina C + Vitamina E
Machos Katahdin	27.39	12.96*	30.73	22.58*
Machos Suffolk	49.99	25.17*	49.99	32.58*
Machos Dorset	51.84	20.36*	50.73	34.42*
Promedio	43.07	19.49 *	43.81	29.86 *

*tratamientos con diferencia estadística $p < 0.05$

Se evaluó el coeficiente de correlación entre las muestras con cada uno de los tratamientos y la prueba HOST, resultado que todas las muestras tuvieron una correlación positiva (Tablas 3).

Tabla 3. Porcentaje promedio de la evaluación HOST de las pajillas descongeladas de los tratamientos de todos los machos.

HOST	Control	Tratamiento Vitamina C	Tratamiento Vitamina E	Tratamiento Vitamina C + Vitamina E
%	45.74	15.36 *	40.74	25.51 *
Correlación/ motilidad individual	0.695	0.675	0.487	0.269

Los resultados de la combinación de antioxidantes C+E no tuvo un efecto significativo en el mantenimiento de la motilidad individual refiriéndonos como viabilidad del espermatozoide, esto contrasta con lo reportado por Castillo *et al* (2011) que determinaron que la combinación de antioxidantes disminuye significativamente el efecto de oxidación celular durante la congelación de semen. Mientras que Mathews (2001) reportó que no se encuentran diferencias estadísticas entre diluyentes adicionados con vitamina E o sin esta, y reporta que la vitamina E necesita necesariamente la adición de vitamina C para poder ser aprovechada por las células y evitar la peroxidación lipídica. En el caso de la vitamina C, está se caracteriza por expresar uno de los mecanismos de defensa contra las ROS; pero no influencia el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides en almacenamiento, ya que provoca una reducción del pH, efecto que se observó en este estudio, ya que fue el tratamiento con el porcentaje menor en cuanto a motilidad individual al descongelar, este efecto contraproducente en los espermatozoides lo reportó también Castillo *et al* (2011).



CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que no existe diferencia estadística entre los tratamientos, mas sin embargo se recomienda seguir con la investigación en el porcentaje de la adición de antioxidantes para evaluar su efecto durante el proceso de congelación de semen de carnero.

BIBLIOGRAFIA

1. E. Aisen, "Reproducción ovina y caprina". Primera edición. Editorial Intermédica. 2004. Buenos Aires, Argentina.
2. H. Castillo, A.Córdova, J.Hicks, A.Membrillo y J.Valencia, "Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar", 2011, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. México.
3. A.Córdova, J. Hicks, V.Martínez , A.Membrillo, M. Olivares y J. Valencia, "Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen", 2003, Asociación Interciencia. Venezuela.
4. L. Gillan, W. Maxwell, "The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract". 1999, Journal of Reproduction and Fertility, Volume 54, pp:271-283.
5. J.Hicks, "Bioquímica", 2002, 1° Edición, Editorial McGraw Hill. México.
6. C.Mathews, K.Van Holde "Bioquímica" 2001, 2° Edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. España.
7. P. Watson, "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen" 2000, Animal Reproduction Science ,Volume60-61, pp: 481-492.