

Efecto de la adición de antioxidantes en los diluyentes para la preservación de semen ovino

Felipe Torres-Ruda¹ / Cindy Iveth Manjarrez² / Melissa Carvajal-Serna³ /
Henry Alberto Grajales-Lombana⁴

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto sobre la calidad espermática de tres sustancias antioxidantes (50 μM de trolox/ 10^8 espermatozoides, 50 μg de catalasa/ml de eyaculado y cisteamina 5mM) en una base de diluyente comercial Triladyl™, bajo condiciones de refrigeración y congelación/descongelación en semen ovino. Se congeló semen de seis machos adultos en una base del diluyente comercial Triladyl™. El eyaculado de cada macho fue puesto en cuatro diferentes alícuotas: una para control, y a las demás se les adicionó con la base del diluyente 50 μM de trolox/ 10^8 espermatozoides, 50 μg de catalasa/ml de eyaculado y cisteamina 5 mM. La calidad espermática precongelación (5 °C) y poscongelación se evaluó con la ayuda de un sistema de análisis computarizado (IVOS II®), con lo cual se eliminó la subjetividad a la prueba. Se observó que 50 μM de trolox/ 10^8 SPZ y 50 μg de catalasa/ml tienen la capacidad de mantener valores ($p < 0,05$) superiores de motilidad total ($64,26 \pm 0,82$ y $55,54 \pm 0,85$) y motilidad progresiva ($47,26 \pm 0,75$ y $44,32 \pm 1,13$) en condiciones de precongelación, y para motilidad total ($67,60 \pm 1,91$ y $63,47 \pm 3,40$), motilidad progresiva ($50,87 \pm 2,58$ y $38,88 \pm 2,31$) y viabilidad ($66,97 \pm 2,25$ y $61,16 \pm 4,31$) en poscongelación, comparados con los tratamientos control o la adición de 5 mM de cisteamina. La adición de 50 μM de trolox/ 10^8 espermatozoides y de 50 μg de catalasa/ml de semen mejora la motilidad total y progresiva del semen ovino refrigerado a 5 °C y la viabilidad en semen congelado/descongelado.

Palabras clave: antioxidante, calidad espermática, congelación, oxidación lipídica.

- 1 Zootecnista, MSc. Departamento de Ciencias para la Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá
✉ daftorres@unal.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0403-9781>
- 2 Zootecnista. Departamento de Ciencias para la Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá
✉ cimanjarrez@unal.edu
- 3 Zootecnista, MSc. Departamento de Ciencias para la Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá
✉ mcarvajals@unal.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3929-5064>
- 4 Zootecnista, MSc, Ph.D. Profesor asociado, Departamento de Ciencias para la Producción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá
✉ hagrajalesl@unal.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0827-6899>

Cómo citar este artículo: Torres-Ruda F, Manjarrez CI, Carvajal-Serna M, Grajales-Lombana HA. Efecto de la adición de antioxidantes en los diluyentes para la preservación de semen ovino. Rev Med Vet. 2019;(38):101-109. <https://doi.org/10.19052/mv.voll.iss38.9>

Effect of adding antioxidants in diluents for the preservation of sheep semen

Abstract

The present study aimed to evaluate the effect on sperm quality of three antioxidant substances (50 μM of trolox/ 10^8 spermatozoa, 50 μg of catalase/ml of ejaculate, and 5mM cysteamine) in a Triladyl™ commercial diluent base, under conditions of refrigeration and freezing/thawing in sheep semen. Semen from six adult males was frozen in a commercial Triladyl™ diluent base. The ejaculate of each male was placed in four different aliquots: one for control, and the other three with additional 50 μM of trolox/ 10^8 spermatozoa, 50 μg of catalase/ml of ejaculate, and 5 mM cysteamine, respectively, in the diluent base. Pre-freezing (5 °C) and post-freezing sperm quality was evaluated using a computerized analysis system (IVOS II®), which eliminated subjectivity during the test. It was observed that 50 μM of trolox/ 10^8 SPZ and 50 μg of catalase/ml are able to maintain higher values ($p < 0.05$) of total motility (64.26 ± 0.82 and 55.54 ± 0.85) and progressive motility (47.26 ± 0.75 and 44.32 ± 1.13) under pre-freezing conditions, and of total motility (67.60 ± 1.91 and 63.47 ± 3.40), progressive motility (50.87 ± 2.58

and 38.88 ± 2.31), and viability (66.97 ± 2.25 and 61.16 ± 4.31) in the post-freezing period, compared to control treatments or the addition of 5 mM of cysteamine. The addition of 50 μM of trolox/ 10^8 spermatozoa and 50 μg of catalase/ml of semen improves the total and progressive motility in ovine semen refrigerated at 5 °C, as well as viability in frozen/thawed semen.

Keywords: antioxidant, sperm quality, freezing, lipid oxidation.

Efeito da adiç o de antioxidantes nos diluentes para preservação de s men ovino

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito sobre a qualidade espermática de tr s substancias antioxidantes (50 μM de trolox/ 10^8 espermatozoides, 50 μg de catalasa/ml de ejaculado e cisteamina 5mM) numa base de diluente comercial Triladyl™, sob condições de refrigeração e congelamento/descongelamento em s men ovino. S men de seis machos adultos foi congelado numa base do diluente comercial Triladyl™. O ejaculado de cada macho foi posto em quatro diferentes alíquotas: uma para controle e nas outras foi adicionada a base do diluente 50 μM de trolox/ 10^8 espermatozoides, 50 μg de catalasa/ml de ejaculado e cisteamina 5mM. A qualidade espermática precongelaç o (5 °C) e p s-congelação avaliou-se com ajuda de um sistema de análise computadorizado (IVOS II®), eliminando assim a subjetividade ao teste. Observou-se que 50 μM de trolox/ 10^8 SPZ e 50 μg de catalasa/ml têm a capacidade de manter valores ($p < 0,05$) superiores de motilidade total ($64,26 \pm 0,82$ e $55,54 \pm 0,85$) e motilidade progressiva ($47,26 \pm 0,75$ e $44,32 \pm 1,13$) em condições de pre-congelação, e para motilidade total ($67,60 \pm 1,91$ e $63,47 \pm 3,40$), motilidade progressiva ($50,87 \pm 2,58$ e $38,88 \pm 2,31$) e viabilidade ($66,97 \pm 2,25$ e $61,16 \pm 4,31$) em p s-congelação, comparados com os tratamentos controle ou a adição de 5 mM de cisteamina. A adição de 50 μM de trolox/ 10^8 espermatozoides e 50 μg de catalasa/ml de s men melhora a motilidade total e progressiva do s men ovino refrigerado a 5 °C e a viabilidade em s men congelado/descongelado.

Palavras-chave: antioxidante, qualidade espermática, congelação, oxidação lipídica

INTRODUCCIÓN

El uso de semen ovino criopreservado para la inseminación artificial cervical (IAC) convencional enfrenta algunos obstáculos técnicos y biológicos, lo que muestra desventajas ante el desempeño logrado con la inseminación artificial (IA) con semen fresco o la monta natural (1-3). En consecuencia, mejorar la calidad espermática del semen después de la criopreservación es un reto actual para la disseminación de material con alto valor genético.

El espermatozoide ovino es más sensible al estrés térmico por frío que el de otras especies como el bovino, el conejo o el hombre (4-6), y en lo que se refiere al almacenamiento en n tr geno líquido a -196 °C la reducción de viabilidad del semen producida por el proceso de congelación y descongelación impide obtener tasas de preñez semejantes a las de otras especies. Los cambios de temperatura que se producen a partir de 37 °C a -196 °C y viceversa en cuestión de segundos desencadenan una transición rápida de fases (líquida-sólida) sobre la membrana espermática, de manera que el estrés por

frío y una serie de mecanismos apoptóticos llevan a la muerte temprana de la célula espermática (7).

La lesión criogénica a causa del ataque de radicales libres reducen la viabilidad y la habilidad fertilizante del espermatozoide. En la especie ovina son especialmente vulnerables a la propagación de la peroxidación lipídica (LPO) por la gran proporción de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana, pero los espermatozoides son protegidos por un sistema antioxidante que existe en el plasma seminal y en la membrana plasmática (8-10). Por otro lado, estos sistemas de protección se ven alterados durante la criopreservación (11). Por eso es fundamental el uso de estrategias de suplementación de compuestos antioxidantes a los diluyentes antes de la congelación.

El uso de antioxidantes para prevenir los efectos de las especies oxígeno-reactivas (ROS, por sus siglas en inglés) en procesos de criopreservación de semen de diferentes especies ha incrementado en los últimos años, especialmente en la especie ovina, la cual tiene una membrana lipídica muy sensible comparada con otras especies (1). Componentes sintéticos como el trolox, que es un análogo de la vitamina E, se encuentra disponible en el comercio, y sus efectos han sido probados en ovinos a diferentes grados de temperatura. La razón por la cual se prueban los antioxidantes sintéticos es por su variabilidad en los resultados, en los que se ha observado desde poca mejora de la calidad hasta efectos negativos en el semen (12,13). También se ha hallado que si existe un alto nivel de adición de antioxidantes, estos pueden presentar toxicidad en las muestras y, por el contrario, manifestar efectos negativos sobre la calidad espermática (13).

La adición de varios antioxidantes en el semen ovino extiende el periodo de almacenamiento, mejora la motilidad, reduce la degradación celular, mejora la integridad acrosomal e incrementa la viabilidad y la habilidad fertilizante *in vitro* (14). En otros estudios se ha probado la eficacia de la adición de antioxidantes según su estructura y su actividad biológica (10,14-16). El trolox es un análogo de la vitamina E soluble en agua, que mejora

la calidad del semen ovino posdescongelación (14). La cisteamina es un compuesto tiol que se conoce por ser un eficiente limpiador de radicales libres, y puede contribuir al mantenimiento de estado redox en las células (17), y en una concentración de 6 mM ayuda a incrementar la motilidad, la viabilidad y la funcionalidad de la membrana, además de que contribuye a disminuir la peroxidación lipídica en los espermatozoides ovinos (15), al igual que otro compuesto enzimático como la catalasa (14).

La suplementación con diluyentes que contienen como base yema de huevo es necesaria para preservar las características de calidad de las células espermáticas durante el almacenamiento, porque la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) interactúa con las proteínas de unión a la membrana espermática (BSP), con lo que se enmascaran los efectos negativos de la congelación (18). El uso de diluyentes base como el Triladyl™ + yema de huevo en la especie ovina ha sido reconocido desde hace dos décadas (19). Sin embargo, en estudios más recientes se ha eliminado el uso exclusivo de la yema de huevo, y además se ha demostrado el potencial uso del Triladyl™ combinado con antioxidantes para mejorar la calidad seminal posdescongelación (20), mientras que se pueden evitar los riesgos sanitarios relacionados con el uso de productos biológicos, como la yema de huevo (21,22). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto sobre la calidad espermática de tres sustancias antioxidantes (50 µM de trolox/10⁸ espermatozoides, 50 µg de catalasa/ml de eyaculado y cisteamina 5 mM) en una base de diluyente comercial Triladyl™, en condiciones de refrigeración y congelación/descongelación en semen ovino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Agentes químicos y medios

Los componentes químicos usados en este estudio, como catalasa (C9322), trolox (238813), cisteamina (C9322) y otros medios de evaluación, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Chemicals (Sigma-Aldrich, Inc.).

Animales y colecta seminal

El estudio se realizó con machos ovinos de 3-4 años de edad de tres diferentes razas (hampshire, romney marsh y criollo), que se encontraban con una condición corporal de 3 a 3,5, salud adecuada y en las mismas condiciones nutricionales (pastoreo en *Pennisetum clandestinum* y *L. multiflorum*, suplemento concentrado 400 g, silo de maíz 300 g y sal mineralizada 100 g). Fueron alojados en el Centro de Investigación, Desarrollo y Extensión Ovino del Centro Agropecuario Marengo, ubicado en Mosquera, Cundinamarca, que pertenece a la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Se obtuvo semen de 6 machos por el método de vagina artificial, basado en el protocolo de colecta aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, de la Universidad Nacional de Colombia (CB-074-2014). Dos colectas consecutivas por machos fueron utilizadas (23,24), e inmediatamente después de la colecta el semen se conservó en baño de María a 35 °C aproximadamente, por un tiempo alrededor de 15 min mientras se realizaba la evaluación del semen fresco.

Evaluación del semen

Inmediatamente después de la colecta, se evaluó el volumen del eyaculado en tubos cónicos graduados con aforo cada 0,1 ml. Las características espermáticas microscópicas se evaluaron mediante el uso de un sistema computarizado de análisis seminal (IVOS II[®]; Hamilton Thorne Research, Beverly, MA), bajo la configuración Ovino Viadent 10X NH CM040GE, que captura 31 fotogramas por segundo y evalúa la motilidad progresiva, la motilidad total, la concentración espermática, los parámetros de cinemática, la normalidad morfológica y la viabilidad, con base en los parámetros de configuración para ovino (tabla 1). Una muestra del semen fue diluida hasta garantizar una concentración final de 40X10⁶ spz/ml, en un medio de mantenimiento espermático llamado medio fosfato-HEPES-sucrosa, que fue compuesto por sacarosa 10 %, HEPES 1 %, sodio-fosfato monobásico 0,5 M y EGTA 100 mm (25), a una temperatura de 37 °C.

Tabla 1. Parámetros de configuración del sistema computarizado para Ovino Viadent 10X NH CM040GE

Parámetros	Valor
Recuento de fotogramas	31
Velocidad de captura del fotograma (Hz)	0,6
STR progresivo (%)	80
VAP progresivo (um/s)	50
Tipo de Iluminación	Fluorescente
Recuento total mínimo	200
Espermatozoide fluorescente al Viadent	No viable

Fuente: elaboración propia

Se implementó una tinción (Viadent) de biz-benzimida trihidrocloruro (Hoeschst 33259, µg/ml), para determinar la vitalidad de la muestra, ya que este compuesto penetra únicamente las membranas dañadas y se adhiere al ADN, emitiendo fluorescencia. Un total de 50 µl de la dilución previamente realizada (1:75) fueron mezclados con 50 µl de la solución Viadent, y se dejó en incubación en condiciones de oscuridad durante 2 min a 37 °C. Inmediatamente después, una muestra de 3 µl fue cargada en una de las láminas Leja[®] de 4 cámaras, con una profundidad de 20 µm. Para cada muestra se evaluaron en promedio 5 campos ubicados en el retículo central de la cámara, y se contaron en promedio 340 células por muestra. La opción Viadent en el sistema IVOS II usa luz visible (luz azul de emisión de diodo) para determinar el número de células no-viables en cada campo evaluado.

Dilución de semen y enfriamiento

Únicamente los eyaculados que cumplieron con el criterio de satisfactorio en fresco basados en la tabla de evaluación de la sociedad americana de teriogenología fueron considerados en el experimento, además de tener un volumen superior a 1 ml (tabla 2). Solo uno de los machos colectados no cumplió con el volumen suficiente, ya que su eyaculado fue solo de 1 ml. Para la base del diluyente se utilizó Triladyl[™] en su forma comercial.

Tabla 2. Parámetros de clasificación adaptados de Kasimanickam et al. (2006)

Parámetro	Satisfactorio (%)	Cuestionable (%)	Insatisfactorio (%)
Motilidad*	> 30	10-30	< 10
Normalidad morfológica*	> 70	30-70	< 30

Fuente: elaboración propia

El eyaculado de cada macho fue puesto en cuatro diferentes alícuotas a las que se les adicionó con la base del diluyente 50 μ M de trolox/10⁸ espermatozoides, 50 μ g de catalasa/ml de eyaculado y cisteamina 5 mM. La dilución se realizó a 37 °C y se inició con una curva de disminución de la temperatura y equilibrio de 3 °C cada 15 min hasta los 5 °C, que fue cuando se realizó la primera evaluación seminal del semen frío. Para continuar con la congelación, las alícuotas de cada tratamiento se dejaron en vapores de nitrógeno a una altura de 5 cm durante 10 min, y posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido y se conservaron hasta su evaluación. Para descongelar las alícuotas se mantuvo cada una de estas en baño de María a 37 °C durante 30 s, y se evaluó inmediatamente.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de ANOVA a un factor, en el que el factor de clasificación es el tratamiento con cuatro ni-

veles (control, trolox, catalasa, cisteamina). Para la comparación de medias se realizó una prueba de Bonferroni con un alfa de 0,001. Los análisis se realizaron con el programa de análisis estadístico SPSS versión 24.

RESULTADOS

Se colectó eyaculado de 6 animales que cumplían con los requerimientos satisfactorios basados en los parámetros de la Sociedad Americana de Teriogenología. En la tabla 3 se resumen los parámetros de calidad en fresco obtenidos para cada uno de los animales. Se seleccionó el eyaculado de 5 de los machos que cumplieron con los criterios de motilidad, normalidad morfológica (tabla 2) y volumen superior a 1 ml.

Tabla 3. Evaluación de calidad espermática para los 6 machos ovinos implementados

Número de animal	Volumen (ml)	Concentración X10 ⁶ SPZ/ml	Motilidad (%)	Progresiva (%)	Vitalidad (%)	Normalidad morfológica
1104	1,5	2473,31	61,6	46,9	88,9	92,5
2101	2,3	2996,02	85,3	55,5	95,7	81,1
2109	1,3	2717,14	88,3	71,6	96,5	92,7
2210	1	1614,88	74,7	46,1	95,7	75,3
3104	1,2	3403,99	86,3	60,9	96,4	97,2
3107	1,1	3200,01	83,5	63,3	92,4	95,4

Fuente: elaboración propia

En la evaluación de la calidad espermática para los tratamientos en condiciones de pre congelación (5 °C), se evidenciaron diferencias ($p < 0,001$) para motilidad total y progresiva y para viabilidad entre tratamientos.

Se observó que 50 μM de trolox/ 10^8 SPZ y 50 μg de catalasa/ml tienen la capacidad de mantener valores significativamente superiores ($p < 0,05$) de motilidad total y motilidad progresiva, comparados con los tratamientos control o la adición de 5 mM de cisteamina. En relación con la evaluación de la viabilidad, el control y la adición de 50 μg de catalasas, se presentó un porcentaje de células viables superior al 75 %, lo que indica que, a pesar de observar disminución en la motilidad celular, la curva de enfriamiento afectó aproximadamente el 18 % de las células, que es un valor de viabilidad aceptable. Respecto al tratamiento con adición de cisteamina, la viabilidad

disminuyó significativamente comparada con los otros tratamientos (tabla 4).

Después de la congelación se realizó la evaluación de calidad espermática para los mismos parámetros y se observaron diferencias ($p < 0,001$) entre tratamientos para todas las variables de calidad posdescongelación.

El uso de 5 mM de cisteamina tuvo efectos negativos sobre la calidad espermática de semen ovino criopreservado, y mostró incluso valores menores comparados con los del tratamiento control. Con respecto a la adición de trolox y catalasa, se observó que tienen un efecto positivo en el mantenimiento de la calidad espermática posdescongelación, pero la adición de 50 μM de trolox/ 10^8 SPZ presenta mejor progresividad comparada con la adición de catalasa.

Tabla 4. Evaluación de la calidad espermática para los tratamientos a 5 °C (n = 5)

Tratamiento	Motilidad total	Progresividad	Viabilidad
Control	51,4 \pm 2,38579a	24,8 \pm 1,66343a	75,2 \pm 1,44914 ^a
Trolox [50 μM]	64,26 \pm 0,82801b	47,26 \pm 0,75007b	72,7 \pm 8,23025a b
Catalasa [50 μg]	55,54 \pm 0,85942ab	44,32 \pm 1,13287b	75,42 \pm 4,19886 ^a
Cisteamina [5 μM]	33,98 \pm 1,33918c	24,78 \pm 0,90686a	50,74 \pm b5,18542

Los datos se presentan como medias \pm error estándar; a, b, c = diferentes entre fila representan diferencias entre tratamientos.

Fuente: elaboración propia

Tabla 5. Evaluación de la calidad espermática para los tratamientos posdescongelación (n = 5)

Tratamiento	Motilidad total	Progresividad	Viabilidad
Control	48,91 \pm 1,36915 ^a	27,95 \pm 0,93439 ^a	47,71 \pm 0,80146 ^a
Trolox (50 μM)	67,60 \pm 1,91812 ^b	50,87 \pm 2,58457 ^b	66,97 \pm 2,25732 ^b
Catalasa (50 μg)	63,47 \pm 3,40791 ^b	38,88 \pm 2,31831 ^c	61,16 \pm 4,31969 ^b
Cisteamina (5 μM)	26,44 \pm 1,13016 ^c	16,43 \pm 1,49741 ^d	25,75 \pm 1,51136 ^c

Los datos se presentan como medias \pm error estándar; a, b, c = diferentes entre fila representan diferencias entre tratamientos.

Fuente: elaboración propia

DISCUSIÓN

El uso de compuestos como el trolox y la catalasa tuvo un efecto positivo para mantener las características de motilidad y viabilidad en la célula espermática del presente estudio, tanto en los procesos de precongelación como en los de poscongelación. Resultados similares obtuvo Maia et al. (14) al demostrar que la adición de antioxidantes como la catalasa durante procesos de congelación evita la peroxidación lipídica, pero el uso de diluyentes con trolox y trolox + catalasa reduce la producción de ROS, y en consecuencia tiene un mayor efecto sobre la motilidad total y progresiva y la vitalidad (14). Contradictoriamente, estos resultados difieren en ovinos cuando a una temperatura de 15 °C se adicionan antioxidantes como el trolox (en tres niveles de adición 0,2; 1 y 5 mM) y que al ser comparados con glutathione (GSH) afectan negativamente la calidad espermática del semen ovino (26). Con el uso de otro diluyente de congelación, que contenía glicerol al 4%, los resultados fueron completamente diferentes, y una adición de 1 mM trolox presenta mejoras en la calidad espermática mientras la adición de 1 mM cisteamina no tiene mejoras y, por el contrario, empobreció el resultado de calidad (27). La interacción entre los antioxidantes adicionados y la base del diluyente es un factor que se debe tener en cuenta al momento de evaluar el efecto de la suplementación con antioxidantes.

El papel de la cisteamina no tuvo resultados positivos frente a las variables de calidad espermática; por el contrario, en el tratamiento control se observó mejores resultados. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de seguir utilizando esta sustancia antioxidante, siempre y cuando se utilicen otras concentraciones como lo sugieren Mata-Campuzano et al. (27), que demostraron que los tratamientos con este antioxidante disminuyen la motilidad de la célula, pero pueden aumentar la vitalidad cuando se usan con diferentes tipos de diluyentes a base de lecitina de soya. Otros estudios han utilizado cisteamina durante procesos de congelación, teniendo en cuenta la concentración y el paso de la congelación en el que se debe agregar la enzima al diluyente. Sepúlveda et al. (28) demostraron que durante la curva de enfria-

miento se presentan mejores resultados para motilidad y viabilidad si se agregan los antioxidantes cuando el semen está a 10 °C, frente a si se agregan desde el inicio de la curva.

Los antioxidantes trolox y catalasa y las concentraciones utilizadas como aditivo en el diluyente comercial Tryladil™ para procesos de refrigeración y congelación de semen son opciones para mejorar y mantener las variables de calidad espermática, teniendo en cuenta la producción de ROS y la peroxidación lipídica que se producen en estos procesos y sus efectos sobre la funcionalidad de la célula. Se recomienda evaluar nuevas concentraciones de cisteamina como uso alternativo de otras sustancias antioxidantes dentro de la preparación de diluyentes para la congelación, y así determinar si tiene o no un efecto positivo durante los procesos de congelación. Se debe evaluar la interacción entre el diluyente, la concentración de antioxidantes y la concentración celular para la congelación de semen ovino.

CONCLUSIONES

Los efectos perjudiciales del proceso de refrigeración y congelación sobre las variables de motilidad y viabilidad espermática del semen ovino pueden ser contrarrestados con la adición de componentes antioxidantes en una base de diluyente como el Triladyl™. Los resultados de este estudio demuestran que la adición de 50 µM de trolox/10⁸ espermatozoides y de 50 µg de catalasa/ml de semen mejora la motilidad total y progresiva del semen ovino refrigerado a 5 °C y la viabilidad en semen congelado/descongelado. Estos resultados deben confirmarse con ensayos de fertilidad *in vitro* e *in vivo*, y son líneas importantes de investigación para impulsar el desarrollo de la industria reproductiva en la raza ovina en Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la subvención de la Universidad Nacional de Colombia, mediante el proyecto “Programa estratégico para el mejoramiento genético

y reproductivo y determinación de las características y calidad de la canal y la carne en sistemas de producción ovina en 5 regiones de Colombia” (Ref. Proyecto: 110157635854, financiado por Colciencias en la convocatoria Col576 de 2012).

REFERENCIAS

1. Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci.* 1995;37(3-4):185-249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-1](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-1)
2. Paulenz H, Söderquist L, Pérez-Pé R, Andersen Berg K. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology.* 2002;57(2):823-36. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00683-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00683-5)
3. Sánchez-Partida LG, Windsor DP, Eppleston J, Setchell BP, Maxwell WMC. Fertility and its relationship spermatozoa intrauterine in ewes insemination after to motility characteristics of cervical, transcervical, with frozen-thawed and ram semen. *J Androl.* 1999;20(2):280-8.
4. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:481-92. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
5. Cardozo J, Grasa P, Cebrián J. Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Rev Corpoica.* 2009;10(1):51-9.
6. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.* 1990;11(1):73-88.
7. Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci.* 2000;62(4):265-75. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00121-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00121-4)
8. Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology.* 1992;29(2):255-66. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-V](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-V)
9. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil Dev.* 2004;16(5):581-8.
10. Bucak MN, Ateşşahin A, Varişli Ö, Yüce A, Tekin N, Akçay A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology.* 2007;67(5):1060-7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.004>
11. Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Domest Anim.* 2008;43(supl. 4):18-31. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x>
12. Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, de Paz P, Garde JJ, Martínez-Pastor F. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted to 37°C up to four hours. *Reprod Domest Anim.* 2012;47(6):907-14. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01990.x>
13. Câmara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MMP. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology.* 2011;76(2):342-50. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.013>
14. Maia MDS, Bicudo SD, Sicherle CC, Rodello L, Gallego ICS. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim Reprod Sci.* 2010;122(1-2):118-23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.004>
15. Najafi A, Kia HD, Mohammadi H, Najafi MH, Zanganeh Z, Sharafi M, et al. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology.* 2014;69(1):68-73. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.05.004>
16. Mata-Campuzano M, Soleilhavoup C, Tsikis G, Martínez-Pastor F, de Graaf SP, Druart X. Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. *Anim Reprod Sci.* 2015;162:31-6. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.004>
17. Guérin P, El Moutassim S, Ménéz Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings.

- Hum Reprod Update. 2001;7(2):175-89. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>
18. Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.* 2002;53(1-2):109-19. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(01\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(01)00098-5)
 19. Ollero M, Perez-Pe R, Muiño-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology.* 1998;37(1):1-12. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2092>
 20. Ali Al Ahmad MZ, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, Fieni F. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod Domest Anim.* 2008;43(4):429-36. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00930.x>
 21. Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology.* 2007;68(1):1-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.03.025>
 22. Wrathall AE, Holyoak GR, Parsonson IM, Simmons HA. Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenology.* 2008;70(5):725-45. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.049>
 23. Carvajal-Serna M, Cortés-lópez HA, Manrique-Perdomo C, Grajales-Lombana H. Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano. *Rev Med Vet.* 2018;(36):49-61. <https://doi.org/10.19052/mv.5171>
 24. Carvajal-Serna M, Cardozo JA, Grajales-Lombana H, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Sperm quality and seminal plasma proteins in three sheep breeds under high altitude and tropical conditions. *Spanish J Agric Res.* 2018;16(2):e0403. <https://doi.org/10.5424/sjar/2018162-12882>
 25. Mendoza N, Casao A, Del Valle I, Serrano E, Nicolau S, Asumpção ME, et al. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012;880(1):74-81. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.11.019>
 26. Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Tamayo-Canul J, López-Urueña E, de Paz P, Anel L, et al. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: effect of temperature, extender and storage time. *Anim Reprod Sci.* 2014;151(3-4):137-47. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.10.006>
 27. Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Tamayo-Canul J, Anel L, de Paz P, Martínez-Pastor F. Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. *Theriogenology.* 2015;83(4):520-8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.018>
 28. Sepúlveda N, Santiani A, Risopatrón J, Rodero E. Criopreservación de semen ovino con adición de antioxidantes. *Sitio Argentino de Producción Animal.* 2006;404-6.