

UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS LOMA BONITA

LICENCIATURA EN ZOOTECNIA

**CONSERVACIÓN DE SEMEN DE BORREGO A 5 °C
UTILIZANDO MEDIO SUPLEMENTADO CON GLUTATIÓN
REDUCIDO (GSH)**

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN ZOOTECNIA**

PRESENTA:

ISMAEL ABAD BENÍTEZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ALFREDO TREJO CÓRDOVA

LOMA BONÍTA, OAXACA, MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2013



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

LICENCIATURA EN ZOOTECNIA

LA PRESENTE TESIS TITULADA “**CONSERVACIÓN DE SEMEN DE BORREGO A 5 °C UTILIZANDO MEDIO SUPLEMENTADO CON GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH)**”, PRESENTADO POR EL PASANTE **C. ISMAEL ABAD BENÍTEZ** BAJO LA DIRECCIÓN DEL **DR. ALFREDO TREJO CÓRDOVA**, HA SIDO REVISADA Y ACEPTADA POR EL JURADO EXAMINADOR PARA SER DEFENDIDA EN EL EXAMEN PROFESIONAL Y OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN ZOOTECNIA.

JURADO EXAMINADOR

Dr. Alfredo Trejo Córdoba

Director de Tesis

M.C. Carolina Antonio Estrada

Co. Director de Tesis

Dr. Abel E. Villa Mancera

Asesor de Tesis

Dr. Sergio Ramírez Ordoñez

Revisor

M.C. Víctor Manuel Meza Villalvazo

Revisor

DEDICATORIA

A Dios: Por darme todo lo necesario en esta vida para concluir con éxito mi carrera profesional ya que sin Él no hubiera sido posible.

A mi madre: Irma Benítez Zamudio, por su amor, paciencia y por ser una madre ejemplar y sobre todo por saber impulsarnos siempre hacia adelante a pesar de las circunstancias más difíciles.

A mis hermanos: Heriberto, Eduardo, Héctor, Juan, Laura y Adilene, por su cariño, apoyo, buenos consejos y porque conocen la importancia de no dejar a medias los proyectos que se presentan en la vida.

A mis amigos: Mi ex-tutor Ubaldo Aguilar, mi cuñado Eduardo Sánchez, mis hermanos en la fe Fausto Cruz, Jorge Ramos, Pedro Chávez y toda la iglesia “Casa de Dios y puerta del cielo” por sus oraciones, por su amistad y buenos consejos, por hacer especial cada día que pasamos juntos.

AGRADECIMIENTOS

A mi Señor Jesucristo primeramente por darme la vida y por permitirme culminar este proyecto, ya que sin su ayuda y bendiciones no lo hubiera logrado.

A mi Director de tesis Dr. Alfredo Trejo Córdova por ser parte fundamental en la realización de esta tesis. Por su dedicación y confianza depositada en mí.

A los revisores de la tesis, M.C. Carolina Antonio Estrada, Dr. Abel E. Villa Mancera, Dr. Sergio Ramírez Ordoñez y M.C. Víctor Manuel Meza Villalvazo por su invaluable apoyo en cada una de las observaciones y recomendaciones para mejorar el presente trabajo.

A la Universidad del Papaloapan por el tiempo en el que me brindo las facilidades educativas fundamentales para que me superara.

A **PROMEP** por haber financiado el proyecto, con clave PROMEP/103.5/11/6720.

A todo el equipo laboral de la posta universitaria. Mi colega Eliaquím, Tomás, Jesús (el chucho) Wenceslao y Campeche, gracias por su invaluable apoyo sin hacer de lado al “palomo” el borrego semental universitario.

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ANEXOS.....	x
ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo general.....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
3. HIPÓTESIS.....	6
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
4.1. El semen ovino.....	7
4.1.1. Fisiología espermática del ovino.....	7
4.1.2. Metabolismo de los espermatozoides.....	8
4.1.3. Procesos fisiológicos espermáticos indispensables para la fecundación.....	10
4.1.3.1. Capacitación espermática.....	10
4.1.3.2. Reacción del acrosoma.....	10
4.2. Criobiología.....	10
4.2.1. Métodos de crioconservación.....	11
4.2.1.1. Refrigeración.....	11
4.2.1.2. Congelación.....	12
4.2.1.3. Vitrificación.....	13
4.3. Tipos de diluyentes.....	14

4.3.1. Diluyentes naturales.....	14
4.3.1.1. Agua de coco.....	15
4.3.1.2. Características bioquímicas del agua de coco.....	16
4.3.2. Diluyentes sintéticos.....	16
4.5. Suplementación de diluyentes.....	18
4.6. Daños en el espermatozoide producidos durante el proceso de criopreservación.....	18
4.7. Estrés oxidativo seminal.....	21
4.8. Especies reactivas de oxígeno y su mecanismo de acción.....	23
4.9. Antioxidantes.....	28
4.9.1. El glutatión reducido (GSH).....	28
4.10. Métodos de estimación de la motilidad y viabilidad espermática.....	29
4.10.1. Estimación subjetiva.....	29
4.10.2. Análisis espermático asistido por computadora (CASA).....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1. Localización del área experimental.....	32
5.2. Animales.....	32
5.3. Adiestramiento de los sementales a la vagina artificial.....	32
5.4. Obtención de los eyaculados.....	33
5.5. Diluyente.....	33
5.6. Dilución del semen.....	34
5.7. La motilidad en masa.....	35
5.8. Motilidad Individual.....	35
5.9. Viabilidad.....	36
5.10. Refrigeración.....	36
5.11. Reactivación.....	36

5.12. Diseño Experimental.....	37
5.13. Análisis estadístico.....	37
6. RESULTADOS.....	38
7. DISCUSIÓN.....	41
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
9. LITERATURA CITADA	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Valores nutritivos del agua de coco	17
Tabla 2 Relación de ingredientes utilizados para preparar el diluyente	34
Tabla 3 Escala de motilidad propuesta por Evans y Maxwell	35
Tabla 4 Valores promedio de la motilidad espermática (\pm DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH	39
Tabla 5 Valores promedio de la viabilidad espermática (\pm DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Representación esquemática de las alteraciones físicas del espermatozoide y del diluyente durante la refrigeración, congelación y descongelación	12
Figura 2. Estructura de la membrana celular del espermatozoide y de las alteraciones inducidas por el choque térmico	22
Figura 3. Representación esquemática de la cascada de la peroxidación lipídica del espermatozoide	24
Figura 4. Ciclo redox del glutatión	29
Figura 5. Componentes de los sistemas utilizados en la evaluación computarizada de la motilidad espermática (CASA)	31

ANEXOS

	Página
Anexo 1. Conservación de semen de borrego a 5°C utilizando medio suplementado con glutatión reducido (GSH).	57

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

ATP: Adenosín trifosfato.

CASA: Análisis espermático asistido por computadora.

DE: Desviación estándar.

GSH: glutatión reducido.

IA: Inseminación artificial.

mM: Milimolar.

msnm: Metros sobre el nivel del mar.

µL: Microlitro.

NADPH: Nicotín amina difosfato.

pH: Potencial de hidrogeno.

PMSG: Prostaglandina sérica de la yegua.

ROS: Especies oxigeno reactivas.

SOD: Superóxido dismutasa.

RESUMEN

Se utilizaron un total de 12 eyaculados de borrego, cada eyaculado fue dividido en 4 alícuotas correspondientes a las concentraciones de GSH evaluadas (control, 0.5, 1.0 y 5 mM). Las alícuotas fueron almacenadas en refrigeración (5 °C) durante 24 h, la evaluación de la motilidad y viabilidad se realizó a las 0, 1, 2 y 24 h de almacenamiento. A las 24 h también se evaluó la motilidad espermática a 37 °C (reactivación). A las 0, 1 y 2 h de almacenamiento no hubo diferencias significativas en cuanto a la motilidad espermática cuando se utilizaron las diferentes concentraciones de GSH. A las 24 h, la concentración de 5 mM ha mostrado mejor efectividad para mantener la motilidad espermática (29.22 %). En cuanto a la viabilidad, a las 24 h de almacenamiento las muestras que fueron diluidas en 5 mM de GSH tuvieron un 81.67 % de espermatozoides vivos. Se concluye que la actividad del GSH como antioxidante y como crioprotector durante la conservación a 5 °C es dependiente de la concentración y del tiempo de almacenamiento.

Palabras clave: ovino, antioxidante, semen.

ABSTRACT

Twelve ram ejaculate were divided into 4 aliquots for GSH concentrations tested (control, 0.5, 1.0 and 5 mM). Aliquots were stored under refrigeration (5 °C) for 24 hour, the evaluation of the motility and viability was performed to 0, 1, 2 and 24 hours of storage. A 24 h also assessed sperm motility at 37 °C (recovery). At 0, 1 and 2 hours of storage there were no significant differences in sperm mobility when used different concentrations of GSH. In 24 hour, concentration of 5 mM shown effectiveness in maintaining sperm motility (29.22 %). As for viability at 24 hrs storage samples were diluted in 5 mM GSH had at 81.67 % of live sperm. It is concluded that the activity of GSH as antioxidant and as a cryoprotectant during storage at 5 °C is concentration dependent and time of storage.

Key words: ram, antioxidant, semen

1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica que ha sido de gran importancia ya que desde 1972 se emplea semen criopreservado para inseminar hembras de diferentes especies, consiguiendo de esta manera preñar a un mayor número, generando una gran difusión de las características deseables de reproductores con alto potencial productivo asegurando así, la selección y cruzamiento de animales con mejores características reproductivas. (Salamon y Maxwell, 2000).

Para realizar la IA se puede utilizar semen fresco o conservado, dentro de las técnicas de conservación se encuentra la refrigeración o conservación a 5 °C y la congelación (Mc Donald, 1991). Generalmente, después de colectado, el semen debe enfriarse a 4-5 °C en forma gradual (1.5-2 horas mínimo) y luego equilibrarse (tiempo de espera a 4-5 °C hasta la congelación) durante 3-24 h. (Wendee, 2007).

El uso de semen refrigerado o congelado muchas veces depende de la especie en la cual se desea hacer la IA, en bovinos se ha usado ampliamente el semen congelado con resultados aceptables, mientras que en especies como son los equinos, porcinos y ovinos el semen refrigerado o líquido es el más utilizado (Curry *et al.*, 1994). Un inconveniente de la refrigeración como método para conservar células son las alteraciones que

ocurren en el acrosoma y en las membranas celulares, debido a la peroxidación de lípidos, lo que al final se traduce en un descenso de la motilidad espermática (Maxwell y Stojanov, 1996) e incluso la muerte celular (Bagchi *et al.*, 2008). Estos efectos en la calidad espermática durante la refrigeración han sido relacionados con un estrés oxidativo causado por un incremento en la producción de especies oxígeno reactivas o ROS (por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species). Los ROS causan una peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daños al ADN (Aitken y Fisher, 1994; Chatterjee y Gagnon, 2001).

Por otra parte, los espermatozoides cuentan con sistemas antioxidantes que incluyen enzimas (superóxido dismutasa o SOD, la catalasa y glutatión peroxidasa) y cofactores antioxidantes (vitamina C, E y ácido úrico) (Ochsendorf *et al.*, 1997). Una alternativa para disminuir los efectos del estrés oxidativo es la suplementación de los diluyentes con antioxidantes (Watson y Anderson, 1983).

Existen antioxidantes no enzimáticos que han sido utilizados en los diluyentes para conservación de semen como glutatión y melatonina. El glutatión reducido o (GSH) es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide de ovinos y equinos (Fouchécourt *et al.*, 1999); disminuye la tasa de capacitación espermática, mejora la motilidad de los espermatozoides *in vitro* y funciona en una variedad de importantes procesos fisiológicos y metabólicos en todas las células de

mamíferos, incluyendo la desintoxicación de los radicales libres, metales y otros compuestos electrofílicos (Wang y Ballatori, 1998), es considerado el mejor buffer redox de la célula (Masella, *et al.*, 2005).

A pesar de las excelentes características mencionadas del GSH, no existe un acuerdo entre autores respecto a la determinación de una concentración que brinde los mejores resultados en la suplementación de diluyentes para la conservación de semen.

Špaleková y Makarevich. (2012) analizaron el efecto del glutatión reducido en la motilidad de espermatozoides de borrego East-Friesian y Lacaune, almacenados a 4 °C durante 0, 24 y 48 horas en un diluyente a base de triladyl suplementado con 0.5, 1.5 y 5 mM de GSH y encontraron una mejor motilidad en el tratamiento suplementado con una concentración 5 mM a las 24 h de refrigeración.

Por otra parte Mishra *et al.* (2010) encontraron mejores resultados en parámetros de motilidad con la concentración 8 mM de GSH al realizar un estudio en el que evaluaron la motilidad espermática y otros parámetros en semen de cabra bengala negra almacenados a 5 °C por 7 días utilizando un diluyente a base de tris, ácido cítrico, glucosa y yema de huevo, suplementado con 2, 4 y 8 mM de GSH, reportaron una motilidad mayor a 50 % (útil para inseminación artificial) en el tratamiento suplementado con 8

mM de GSH hasta el día 3, mientras que los tratamientos con 2 y 4 mM de GSH solo tuvieron una motilidad mayor a 50 % hasta el día 2 y concluyeron que la suplementación con GSH en el medio de dilución ayuda a proteger la membrana celular de los espermatozoides, además que el GSH actúa como un antioxidante eficiente en el control y prevención de los ROS.

Por lo tanto el objetivo de este proyecto fue determinar el efecto del GSH en distintas concentraciones (5, 1 y 0.5 mM) en la motilidad y viabilidad espermática pos-refrigeración a 5 °C en semen de borrego.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar diferentes concentraciones de GSH en la motilidad y viabilidad espermática durante la conservación a 5 °C de semen de borrego.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la motilidad espermática en semen refrigerado a 5 °C en un medio suplementado con diferentes concentraciones de GSH.

- Evaluar la viabilidad espermática en semen refrigerado a 5 °C en un medio suplementado con diferentes concentraciones de GSH.

3. HIPÓTESIS

La adición del GSH al medio de dilución tiene un efecto benéfico en la motilidad y viabilidad espermática durante el proceso de almacenamiento a 5 °C.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 El Semen Ovino

El semen lo forman dos principales constituyentes: el plasma seminal y los espermatozoides. Las principales sustancias orgánicas presentes en el semen de ovino son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas. La fructosa es el azúcar más fácilmente metabolizable y proporciona la mayor fuente de energía a los espermatozoides del semen. (Evans y Maxwell, 1990). El semen de ovino es de color lechoso o crema pálido, la edad y estado del semental, las estaciones, la habilidad del recolector y la frecuencia de obtención de las muestras influyen en el volumen del eyaculado (Hafez, 2000).

4.1.1 Fisiología espermática del ovino

En el borrego, el ciclo espermatogénico dura aproximadamente 40 días. Sin embargo, cada ciclo ocurre a partir de las divisiones de la espermatogonia madre que suceden en diferentes momentos y a intervalos regulares de 10.5 días. De esta forma constantemente suceden nuevos ciclos a partir de las diferentes células madre, lo cual asegura el abastecimiento continuo de espermatozoides. Las últimas etapas de la maduración del espermatozoide ocurren durante su paso a través del epidídimo y dura entre 10 a 14 días (Coy, 1995a). Maduración que involucra cambios en el desarrollo del

potencial para adquirir la motilidad progresiva, en la modificación de sus patrones metabólicos, de la cromatina nuclear, y de la superficie de la membrana plasmática incluyendo la pérdida de la inclusión citoplasmática y el reordenamiento estructural del acrosoma.

Un espermatozoide viable, ya maduro, es una célula de forma alargada, recubierta en su totalidad por la membrana plasmática y conformada por una cabeza aplanada que contiene el núcleo y una cola la cual genera la actividad de la motilidad celular. El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo (Garner y Hafez, 2000).

La membrana del espermatozoide ovino se caracteriza por ser un arreglo asimétrico de moléculas dentro de una bicapa lipídica. La composición lipídica de la membrana del espermatozoide ovino es notablemente diferente de las demás células somáticas (Martínez y Morros, 1996).

4.1.2. Metabolismo de los espermatozoides

Las reservas intracelulares de Adenosín Trifosfato (ATP) proveen la energía requerida para la motilidad espermática. La concentración endógena de Adenosín Monofosfato cíclico (AMPC) no solo regula el empleo del ATP por el espermatozoide, sino que también tiene un efecto directo sobre la motilidad de los espermatozoides (Hoskins y Casillas, 1973).

Los espermatozoides aunque carecen de varios organelos presentes en otras células son metabólicamente activos. Poseen las enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas, como glucólisis (vía de Embden-Meyerhof), ciclo del ácido tricarboxílico, oxidación de ácidos grasos y el transporte de electrones (Mann, 1975).

Los espermatozoides degradan glucosa, fructosa o manosa a ácido láctico cuando se encuentran en condiciones anaerobias. Esta actividad fructolítica les permite sobrevivir en condiciones anaerobias. Esta característica es importante durante el almacenamiento de espermatozoides para su uso en inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000).

En presencia de oxígeno los espermatozoides utilizan una variedad de sustratos. Su actividad respiratoria es la que permite emplear lactato o piruvato resultantes de la fructólisis de azúcares, con la producción de dióxido de carbono y agua (Mann, 1975). Esta vía oxidativa se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis para producir energía. La mayoría del ATP se emplea en funciones básicas para mantener la motilidad y otra parte se destina a mantener la integridad de los procesos de transporte activo de las membranas del espermatozoide que impiden la pérdida de componentes iónicos vitales de la célula espermática (Garner y Hafez, 2000). En ausencia de sustratos exógenos los espermatozoides utilizan sus reservas intracelulares de plasmalógeno como fuente de energía a corto plazo (White, 1980).

4.1.3. Procesos fisiológicos del espermatozoide indispensable para la fecundación

4.1.3.1. Capacitación espermática

Es un proceso dinámico muy complejo que ocurre normalmente en el tracto reproductivo de la hembra, incluye cambios en la composición y en las propiedades de la membrana plasmática que le confieren al espermatozoide la capacidad de responder a estímulos externos que desencadenan la reacción acrosomal y la subsiguiente penetración del ovocito (Vega *et al.*, 2002).

4.1.3.2. Reacción del acrosoma

Posterior a la capacitación espermática y al encuentro del espermatozoide con el ovocito se produce la reacción del acrosoma, que libera las enzimas hidrolíticas contenidas en el acrosoma (Guyton y Hall, 2000) y consiste en la vesiculación de las membranas plasmática, acrosomal externa y su posterior desaparición (Coy, 1995b).

4.2. Criobiología

La criobiología o criopreservación es una biotecnología utilizada para la conservación de células, órganos o tejidos (Hafez, 2000). Se ha consolidado como la más importante biotecnología de los últimos años en el área de

biología de la reproducción. El proceso de criopreservación consiste en una serie de eventos, como son la dilución, adición de crioprotectores, la refrigeración o etapa de estabilización y finalmente la congelación a temperaturas de hasta -196 °C en nitrógeno líquido (Hammerstedt *et al.*, 1990).

4.2.1. Métodos de crioconservación

En la actualidad se han desarrollado tres métodos de criopreservación, la refrigeración, la congelación y la vitrificación (Figura 1).

4.2.1.1. Refrigeración

La refrigeración fue de los primeros intentos por mantener durante algunas horas la viabilidad de células y consiste en mantener a las células o tejidos a un intervalo de temperatura entre los -3 °C a los 5 °C, esta fase tiene una duración que puede variar entre 0.5 a 3 horas (Aisen *et al.*, 2000).

En esta fase se produce una disminución de la motilidad espermática (Fiser y Fairfull, 1986) a causa de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Wang *et al.*, 1997), para ello es muy importante el uso o adición de sustancias que actúen como crioprotectores que contienen fosfolípidos y proteínas de baja densidad cuya función es evitar que las células sufran del shock de frío (Foulks, 1977).

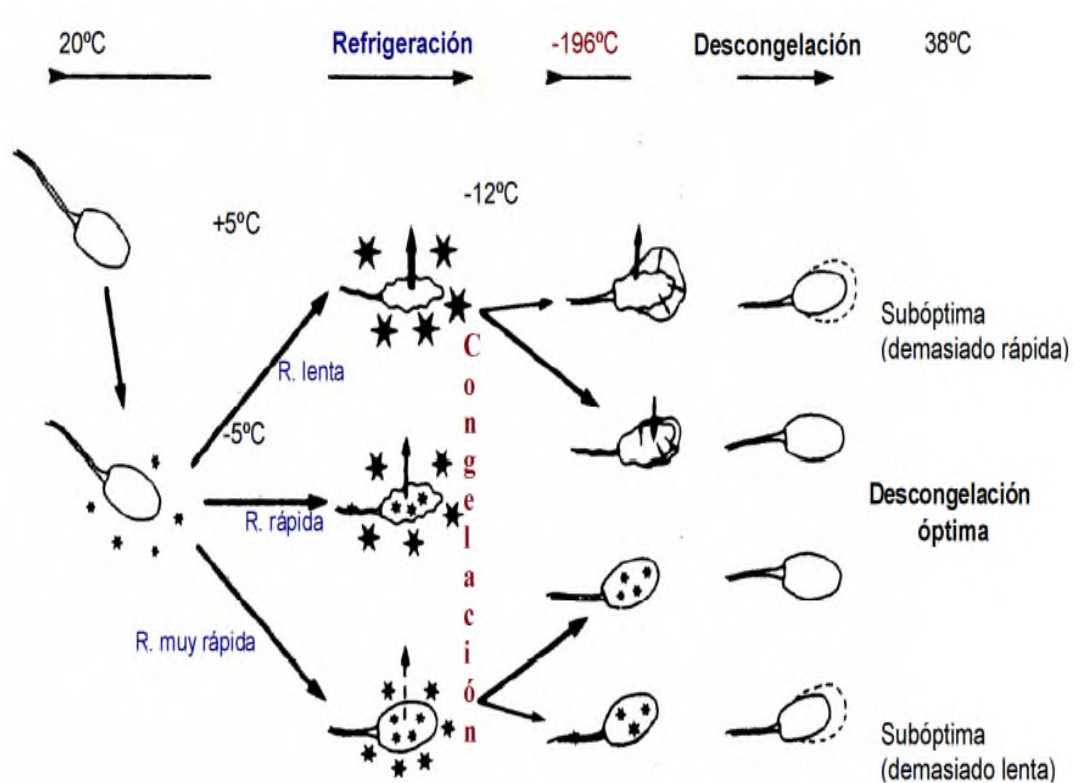


Figura 1. Representación esquemática de las alteraciones físicas del espermatozoide durante la refrigeración, congelación y descongelación (Adaptado de Amann, 1999).

4.2.1.2. Congelación

Es una técnica desarrollada con el propósito de incrementar el tiempo de conservación y mantener las funciones vitales de las células o tejidos.

La fase de congelamiento es un periodo crítico del proceso de criopreservación. Durante esta fase los espermatozoides son expuestos a un estrés de tipo osmótico y térmico (Curry y Watson, 1994). Cuando la temperatura alcanza los -10 °C se forman núcleos de hielo de agua en el

medio extracelular (Holt, 2000). Lo que provoca un incremento progresivo en la concentración de solutos.

La fracción líquida se vuelve hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, el agua intracelular sale de la célula (Medeiros *et al.*, 2002), lo que le permite mantener el equilibrio osmótico dentro del medio (Boiso, 2001).

En este periodo de cristalización ocurren los principales daños en el espermatozoide ovino (Kumar *et al.*, 2003), cuando la temperatura se encuentra entre $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Salamon y Maxwell, 2000). La formación de hielo intracelular y el consecuente daño celular se puede evitar usando una velocidad de congelamiento adecuada (Mazur, 1984), la cual debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente rápida para prevenir la deshidratación excesiva (Holt, 2000). A diferencia de la refrigeración en la congelación se utilizan temperaturas de hasta $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (temperatura del nitrógeno líquido).

4.2.1.3. Vitrificación

Se define como la transición de soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin la formación de cristales, debido al rápido descenso de temperatura la viscosidad de la muestra aumenta hasta un

punto en que las moléculas se inmovilizan (Critser *et al.*, 1987). La diferencia entre vitrificación y congelación consiste en el tiempo que requieren ambos procesos para disminuir la temperatura de un determinado tejido o concentración celular. En la congelación el descenso de la temperatura es más lento a una tasa de 28 °C/min en promedio, además, durante el tiempo que emplea la congelación estándar aun con medios controlados tiene la desventaja de provocar un mayor shock térmico y daño intracelular (Critser *et al.*, 1987). Mientras que la vitrificación procura hacer pasar la temperatura crítica lo más rápido posible para así disminuir el riesgo de daño celular y llevar a la célula hasta la temperatura de -196 °C a partir de velocidades de enfriamiento a razón de los 2500 °C/min (Critser *et al.*, 1987).

4.3. Tipos de diluyentes

Se considera diluyente a la solución acuosa cuyo objetivo es aumentar el volumen de un eyaculado obteniendo varias dosis en las que se conserven las características funcionales de las células así como el nivel de fertilidad adecuado.

4.3.1. Diluyentes naturales

Son aquellos diluyentes en los que se utiliza como ingrediente base a productos como yema de huevo y/o leche descremada. La importancia de estos diluyentes es su bajo costo y que fácilmente se pueden adquirir. Así mismo, proporcionan sustancias nutritivas para las células como glucosa,

aminoácidos, carbohidratos y lípidos, estos últimos actúan como aislantes térmicos durante el proceso de criopreservación (Foote, 2002).

4.3.1.1. Agua de coco

La planta de coco o cocotero perteneciente a la familia *Arecaceae*, y de nombre científico *Cocus nucífera* L., es una palmera, de tronco largo y elástico, con hojas pinnadas ubicadas solamente en la copa de la planta. El fruto de esta palma es el coco, una drupa de tamaño similar a la de un melón pequeño, cubierto de una capa gruesa y fibrosa. En la parte interna del fruto se encuentra un compartimiento cerrado de capa dura, llamado nuez de coco; dentro de ésta, se descubre la semilla conformada por una pulpa blanca comestible y un líquido ligeramente opaco conocido como agua de coco. El agua de coco se presenta como un diluyente alternativo en la conservación del semen caprino. Dentro de las alternativas de los diluyentes pobres en fosfolípidos, se ha demostrado que el agua de coco favorece la conservación del semen caprino (Nunes, 1993).

La motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos en semen caprino refrigerado a 4 °C con diluyente a base de agua de coco son significativamente superiores a los obtenidos con los diluyentes a base de leche. La supervivencia espermática se mantiene alrededor de las 60 horas usando un diluyente a base de agua de coco mientras que en un diluyente a base de leche dura 12 horas. Nunes (1993) observó un aumento de la fertilidad en cabras inseminadas con el semen diluido en agua de coco

respecto a las inseminadas con el semen diluido en leche. Gutiérrez *et al.* (2006) evaluaron el uso de agua de coco como diluyente base y la adición de nopal y/o leche a diferentes concentraciones para criopreservar semen de ovino, estos autores concluyen que a menor cantidad de agua de coco y mayor cantidad de nopal o leche, la motilidad progresiva es la más adecuada para la preservación de semen a largo plazo. Además compararon el uso de agua de coco y su combinación con compuestos como el suero fetal bovino y el aloe vera para la preservación en fresco y congelado de semen de ovino y concluyen que las diferentes concentraciones evaluadas fueron adecuadas para mantener la motilidad progresiva y viabilidad después del almacenamiento.

4.3.1.2. Características bioquímicas del agua de coco

El agua de coco (*Cocos nucifera*) está compuesta de soluciones ácidas naturales y estériles, conteniendo sales, proteínas, vitaminas, minerales y factores de crecimiento (Tabla1). Presenta una osmolaridad aproximada de 500 miliosmoles y un pH de 4.5 (Nunes, 1993).

4.3.2. Diluyentes sintéticos

Son diluyentes elaborados a base de compuestos químicos como son el cloruro de potasio, acetilcisteína, acetato potásico, glucosa, citrato de sodio, etc. La desventaja que tienen en comparación con los diluyentes naturales es el alto costo y la disponibilidad ya que muchos son importados o solo lo

pueden adquirir determinados laboratorios o granjas. Sin embargo, este tipo de diluyente ofrece mejores resultados en cuanto a la eficiencia para la congelación (Nunes, 1993).

Tabla 1. Valores nutritivos del agua de coco. Adaptado de Ovalles *et al.* (1995).

Componente	contenido/100 ml
Calorías	20
Humedad (g)	nd
Proteínas (g)	0.1
Grasas (g)	0.05
Carbohidratos totales (g)	5.5
Fibra dietética total (g)	nd
Cenizas (g)	nd
Calcio (mg)	nd
Fosforo (mg)	0.4
Hierro (mg)	nd
Magnesio (mg)	10
Zinc (mg)	nd
Cobre (mg)	nd
Sodio (mg)	25
Potasio (mg)	294
Cloruro (mg)	118
Vitamina A	nd
β Caroteno	nd
Tiamina (mg)	nd
Riboflavina (mg)	nd
Niacina (mg)	nd
Vitamina B6 (mg)	nd
Ácido ascórbico (mg)	nd

nd: no disponible

4.5. Suplementación de diluyentes

Diferentes tipos de sustancias como azúcares, lípidos, proteínas y antibióticos han sido incluidos en los diluyentes usados para congelación de semen. Especialmente los carbohidratos utilizados poseen diversas funciones tales como proveer un sustrato energético para las células espermáticas durante la incubación, mantener la presión osmótica del diluyente y actuar como crioprotectores. (Strom, 1999).

Se ha estudiado la influencia de los azúcares (monosacáridos, disacáridos, trisacáridos), sobre la motilidad, viabilidad y porcentaje de acrosomas intactos durante la dilución, equilibración y congelación de espermatozoides caninos. La suplementación del diluyente con azúcares mejora la calidad espermática pos-equilibración y pos-descongelación. (Strom, 1999). El tipo y localización del efecto protector del azúcar sobre la célula espermática varía de acuerdo al tipo de azúcar utilizado (Stornelli *et al.*, 2003).

4.6. Daños en el espermatozoide producidos durante el proceso de criopreservación

Durante el proceso de criopreservación se producen diversos daños en el espermatozoide por la desestabilización de las membranas y el estrés oxidativo está relacionado con la pérdida de la función espermática. (Watson, 2000). De este modo, cuando las membranas se enfrían por debajo de la temperatura de transición de los lípidos que las componen, se

produce un cambio de fase de los mismos desde un estado cristalino a una fase de gel y empiezan a agregarse formando microdominios (Holt, 2000).

Esto favorece las asociaciones al azar con otros lípidos y la formación de uniones así como de zonas muy inestables entre los dominios de lípidos en estado líquido y de gel, lo que facilita la ruptura de la membrana (Amann, 1999). Estos eventos de cambios de fase son revertidos tras la descongelación aunque muchas veces, no todos los lípidos y proteínas vuelven a su localización original (Amann, 1999). Si estas proteínas son canales iónicos y se altera la estructura de las mismas se afecta la funcionalidad de la membrana (Watson, 2000).

Por lo tanto, cuando la permeabilidad se modifica por la disminución de la temperatura puede deberse a una rotura de la membrana, aunque también es posible que se deba a los canales proteicos específicos que se encuentren modificados estructuralmente. De esta forma, se ha observado que tras el enfriamiento la regulación de los niveles intracelulares de calcio es anormal (Bailey y Buhr, 1994).

La entrada controlada de calcio al interior del espermatozoide tiene un papel fundamental en la regulación de procesos como la reacción acrosómica. De este modo, la entrada de calcio por la congelación induce cambios en el

espermatozoide similares a los que ocurren durante la capacitación (Garde, 1993).

La membrana tiene una gran cantidad de ácidos grasos insaturados que son muy susceptibles de sufrir peroxidación lipídica (Aitken *et al*, 1995). Cuando se produce este proceso los ácidos grasos, que son esenciales para dar a la membrana la fluidez que necesita, se pierden.

Los ROS, al oxidar a los ácidos grasos, hacen que las membranas espermáticas pierdan su fluidez y que los espermatozoides disminuyan su motilidad y capacidad fertilizante.

Este daño de membrana altera su permeabilidad y afecta a las bombas de Na^+ y Ca^{2+} con el consecuente ingreso de estos cationes al interior del espermatozoide, alterando la osmolaridad, permitiendo la formación de fosfatos de calcio pocos solubles, agotamiento del ATP y activación por medio del calcio de enzimas proteolíticas y fosfolipídicas, entre otros procesos de señales intracelulares que provocan daño proteico y lipídico, alteraciones en el ADN y muerte celular.

Una alta peroxidación lipídica produce la disminución de la motilidad y de la capacidad de fertilización, inhibición de la respiración, pérdida de enzimas

intracelulares y daño estructural a la membrana particularmente en la región del acrosoma (Figura 2) (Aitken *et al*, 1995). Los procesos de criopreservación aumentan la peroxidación lipídica (Chatterjee y Gagnon, 2001) y por lo tanto producen una disfunción del espermatozoide. Con respecto a la estructura responsable de la motilidad dicho parámetro puede disminuir como consecuencia de los cambios de permeabilidad en la membrana plasmática de la región de la cola, aunque también puede ser debido a la alteración de la disponibilidad de energía o el daño en la región del axonema.

Así, tras la congelación se ha observado una gran cantidad de cristales de hielo en la mitocondria y alteraciones en la membrana de la misma así como daños producidos en los brazos radiales del axonema (O'Connell *et al.*, 2002). Por último, también se han observado daños en el núcleo del espermatozoide debido a la criopreservación (Royere *et al.*, 1996). Después del proceso de criopreservación puede conseguirse un aceptable porcentaje de espermatozoides motiles, sólo una pequeña proporción de estos permanece sin cambios funcionales (Salamon y Maxwell, 2000).

4.7. Estrés oxidativo seminal

El estrés oxidativo seminal es el desequilibrio que se presenta entre la generación de especies reactivas de oxígeno y los mecanismos antioxidantes, que de persistir puede conducir a daño celular irreversible

(Fuchs *et al.*, 1997). Puede presentarse por una deficiencia en la generación de sustancias protectoras naturales o por una excesiva exposición a agentes generadores de especies reactivas de oxígeno (Chihuailaf *et al.*, 2002) (Figura 3).

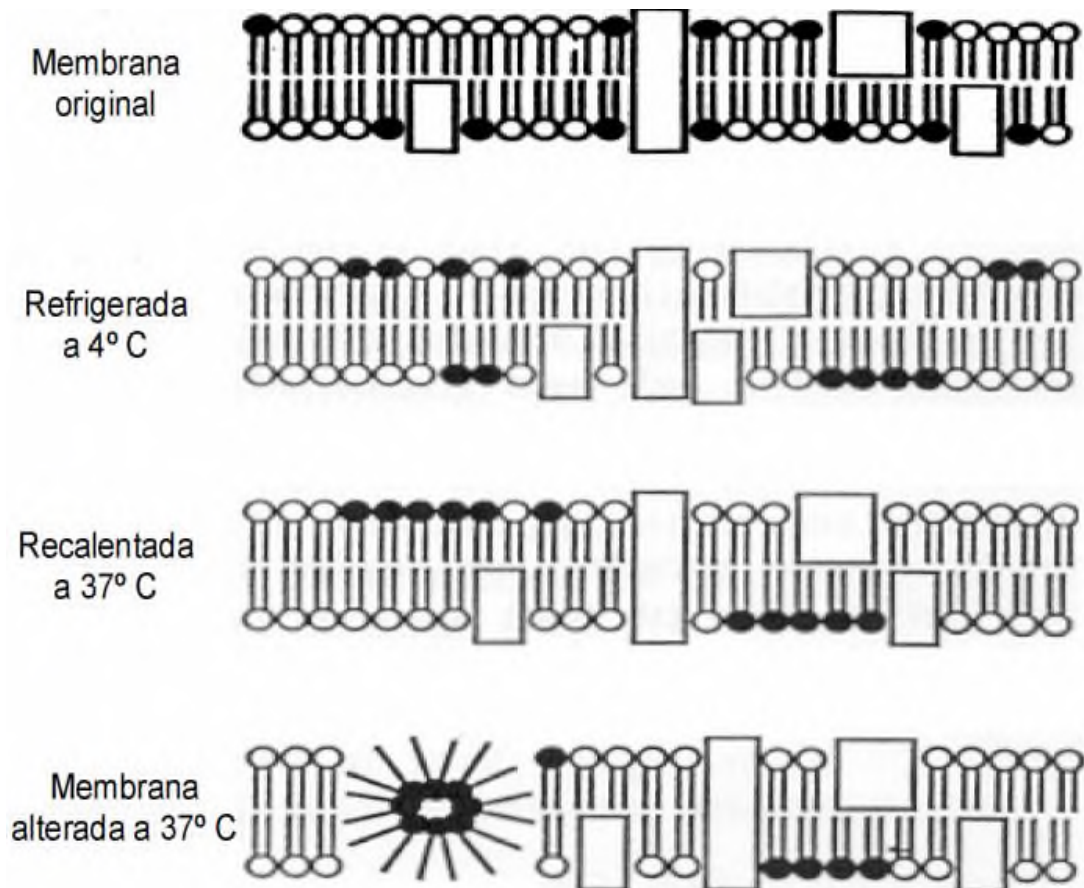


Figura 2. Estructura de la membrana celular del espermatozoide y de las alteraciones inducidas por el choque térmico. (Tomado de Serres, 2003).

Para que ocurran los procesos fisiológicos de la fertilización del ovocito son necesarias pequeñas y controladas cantidades de especies reactivas de

oxígeno (De Lamirande *et al.*, 1997). Por tanto, un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la presencia de agentes antioxidantes resulta en la peroxidación de los lípidos de las membranas espermáticas (Aitken *et al.*, 1989), alterando las funciones espermáticas (Álvarez y Storey, 1989), la integridad del ADN (Aitken *et al.*, 1998), la motilidad espermática y por consiguiente la fertilidad (Álvarez y Storey, 1989).

La producción de especies reactivas de oxígeno aumenta con el tiempo de incubación en la concentración de espermatozoides (Ball y Baumber, 2002), produciendo espermatozoides anormales (Aitken *et al.*, 1989), con poca motilidad (Aitken y Clarkson, 1988) y la presencia de leucocitos en el eyaculado (Baumber *et al.*, 2002).

4.8. Especies reactivas de oxígeno y su mecanismo de acción

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas (Hicks, *et al.*, 2006); pueden causar daño por reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad.

Los sustratos moleculares más frecuentes incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos (Machlin y Bendich, 1987).

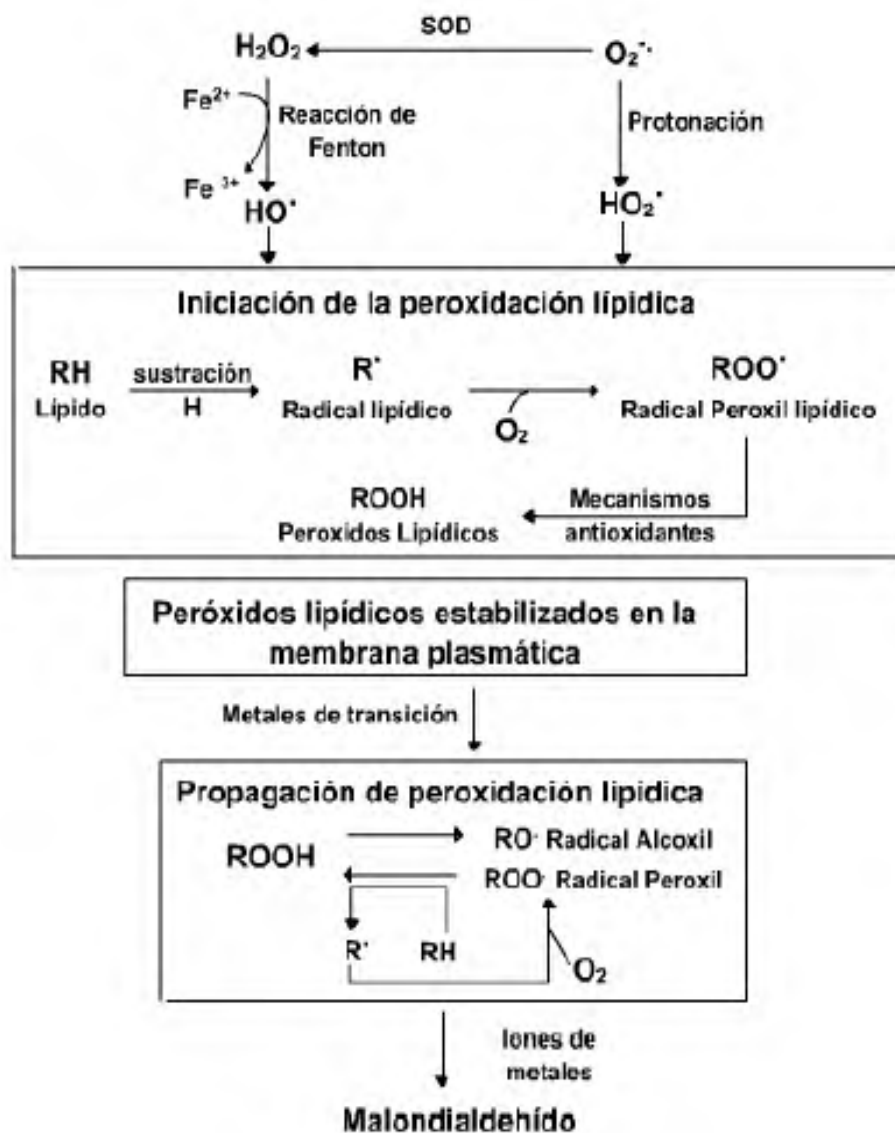


Figura 3. Representación esquemática de la cascada de la peroxidación lipídica del espermatozoide (Aitken y Fisher, 1994).

Entre las especies reactivas de oxígeno, conocidas como 'ROS' por sus siglas en inglés, destacan fundamentalmente (Beckman y Ames, 1998) el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($-OH\cdot$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) actúa solo como precursor. El peróxido de hidrógeno es la principal especie reactiva, y aunque no es un radical libre, es la molécula más involucrada en

el daño de los espermatozoides de equino (Baumber *et al.*, 2002). El H_2O_2 no posee electrones libres y por lo tanto no es un radical libre, sin embargo, es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales $-OH\cdot$ en presencia de metales de transición (Hicks *et al.*, 2006). La reacción inicial de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados se denomina lipoperoxidación y es generada por las ROS que inducen una reacción en cadena (Hicks *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha demostrado que la síntesis del óxido nítrico (NO), que es un radical libre del nitrógeno, en espermatozoides de ratón y de humano puede inducir la peroxidación de los lípidos de la membrana espermática (Herrero *et al.*, 1999), en este proceso se involucra adicionalmente el anión superóxido (O_2^-) que es una ROS que al interactuar con el óxido nítrico forma peroxinitrito, una molécula precursora de radicales $-OH\cdot$, que realmente sería la responsable de la lipoperoxidación.

La interacción del radical $-OH\cdot$ con el material genético modifica el ADN, pudiendo generar mutaciones y deleciones de la molécula. Los radicales libres han sido asociados a procesos tan diversos como son la inducción de apoptosis neuronal por daño oxidativo *in vitro* e *in vivo* (Al-Abdulla y Lee, 1998). Los ROS inducen daño a los fosfolípidos de la membrana y del ADN en espermatozoides humanos y están implicados en la infertilidad masculina. La producción de ROS y el daño del ADN son mayores en espermatozoides inmaduros con retención citoplasmática y anormalidades morfológicas de la

cabeza (Ollero *et al.*, 1996). La peroxidación lipídica asociada a ROS provoca una disminución de la motilidad y viabilidad espermática de la integridad acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial (Baumber *et al.*, 2003).

Los mecanismos celulares responsables de la generación de especies reactivas de oxígeno por los espermatozoides mamíferos aparentemente se diferencian entre especies. En bovinos y ovinos, las especies reactivas de oxígeno serían formados vía la des-aminación oxidativa de aminoácidos aromáticos, la cual es responsable de la producción de H₂O₂ (Upreti *et al.*, 1998). En conejos, las especies reactivas de oxígeno se derivarían de la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial (Aitken y Fisher, 1994).

En humanos se ha demostrado que los espermatozoides estarían generando especies reactivas de oxígeno principalmente a través de dos mecanismos: el sistema NADPH oxidasa a nivel de la membrana plasmática (Aitken *et al.*, 1997) y el NADH dependiente oxido-reductasa a nivel mitocondrial (Gavella y Lipovac, 1992).

El H₂O₂ producido en los espermatozoides ovinos, es descompuesto en el -OH·, por la acción de los metales de transición Fe⁺², Fe⁺³ y Cu⁺². Esta es una de las principales vías de producción del -OH· en el medio celular y se

conoce como reacción de Fenton. Por otra parte, la autoxidación de estos iones puede llevar a la formación de O_2^- (Chihuailaf *et al.*, 2002). Debido a su baja reactividad y vida media corta (1 ms), el O_2^- no es muy dañino, aunque la reacción con sus blancos puede producir especies más tóxicas, como los radicales de tioles (De Lamirande *et al.*, 1997).

En general, el daño causado por el O_2^- , es debido a su conversión hacia especies más reactivas. El O_2^- cambia a H_2O_2 y la subsiguiente descomposición a $-OH\cdot$ serían los responsables de su efecto biológico (Fuchs *et al.*, 1997).

El $-OH\cdot$ es de las especies reactivas más frecuentes y comunes. Las concentraciones de hierro muy bajas presentes en casi cualquier solución son suficientes para catalizar la formación del $-OH\cdot$ desde O_2^- y H_2O_2 (De Lamirande *et al.*, 1997). Su reactividad es tan grande, que cuando se forma en sistemas biológicos, los radicales reaccionan inmediatamente con cualquier molécula vecina.

Por lo tanto, el $-OH\cdot$ generalmente no sale de su sitio de generación y actúa causando daño molecular a los ácidos nucleicos o proteínas funcionales (Fuchs *et al.*, 1997). La mayoría de las macromoléculas que componen a los espermatozoides pueden ser oxidadas por las diferentes especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados (Chihuailaf *et al.*,

2002) y en especial el ácido docosahexaenoico que presenta 6 dobles enlaces, y constituye gran parte de las membranas de los espermatozoides ovinos (Jones y Mann, 1977).

4.9. Antioxidantes

Un antioxidante con función biológica se define como una sustancia que disminuye o evita la oxidación del sustrato resultando un agente reductor más potente (Hicks *et al.*, 2006). Actúa como un donador de electrones, con la finalidad de evitar una reacción en cadena de óxido-reducción (Hicks *et al.*, 2006) es decir sacrifican su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas como lípidos, proteínas, ADN, funcionalmente vitales o más importantes.

Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos y actúan como eliminadoras con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante-antioxidante a favor de estos últimos o simplemente son moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones (Chihuailaf *et al.*, 2002).

4.9.1. El glutatión reducido (GSH)

Es un agente antioxidante presente en el ambiente que rodea al espermatozoide (Fouchécourt *et al.*, 1999). Sus propiedades químicas le

permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como peróxido de hidrogeno, superóxido, hidroxilo y especie reactivas del carbono; además, reduce el radical libre tocoferoxilo y deshidroascorbato y los reconvierte a su forma original (Chihuailaf *et al.*, 2002) (Figura 4).

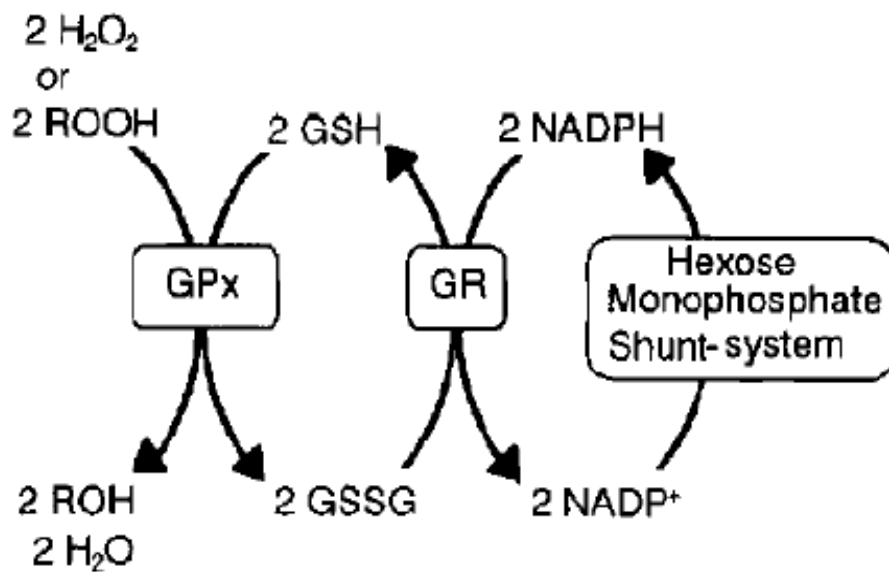


Figura 4: Ciclo redox del glutatión. (Bilodeau *et al.*, 2000).

4.10. Métodos de estimación de la motilidad y viabilidad espermática.

4.10.1 Estimación subjetiva

La estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles es el examen de laboratorio, para evaluación de la calidad espermática, más frecuentemente realizado (Budworth *et al.*, 1988); existiendo una variación, que puede ser marcada, entre los técnicos del mismo o de distintos

laboratorios en la apreciación subjetiva de la motilidad progresiva de una muestra (Amann, 1999).

Para mejorar el rigor de este examen algunos aspectos técnicos deben ser estandarizados, como es el caso de la previa dilución del semen (fresco), para evitar la aglutinación de los espermatozoides y reducir la influencia de la concentración y del pH seminal, la utilización de las mismas condiciones como la concentración apropiada y un volumen constante de muestra así como la dimensión del cubreobjetos y el control estricto de la temperatura del equipamiento y del material (Malmgren, 1997) y la misma ampliación microscópica (Concannon y Battista, 1989).

El entrenamiento y la experiencia del técnico son aspectos igualmente importantes (Linford *et al.*, 1976). Cuando se trata de comparar diferencias entre tratamientos las estimaciones de motilidad deben ser efectuadas por el mismo individuo (Concannon y Battista, 1989).

4.10.2. Análisis espermático asistido por computadora (CASA)

La determinación objetiva de la motilidad de una muestra no siempre es posible basándose en un examen visual, por la subjetividad inherente y a la reducida cantidad de la muestra. En consecuencia, evaluar una muestra o un protocolo de criopreservación de semen con base en este parámetro podrá resultar en una baja correlación con la fertilidad *in vivo*. Desde los

años ochenta, este problema está perdiendo importancia con la introducción de los sistemas de análisis de imagen computarizados (figura 5), CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que han sido desarrollados inicialmente para su uso en el análisis de la motilidad del semen humano -OH- (Jhonson *et al.*, 1996). Estos sistemas computarizados posibilitan un análisis de la motilidad automático, rápido y objetivo (Malmgren, 1997), basado en la evaluación de los espermatozoides individualmente, proporcionando un cálculo preciso de los distintos parámetros seminales (Verstegen *et al.*, 2002).

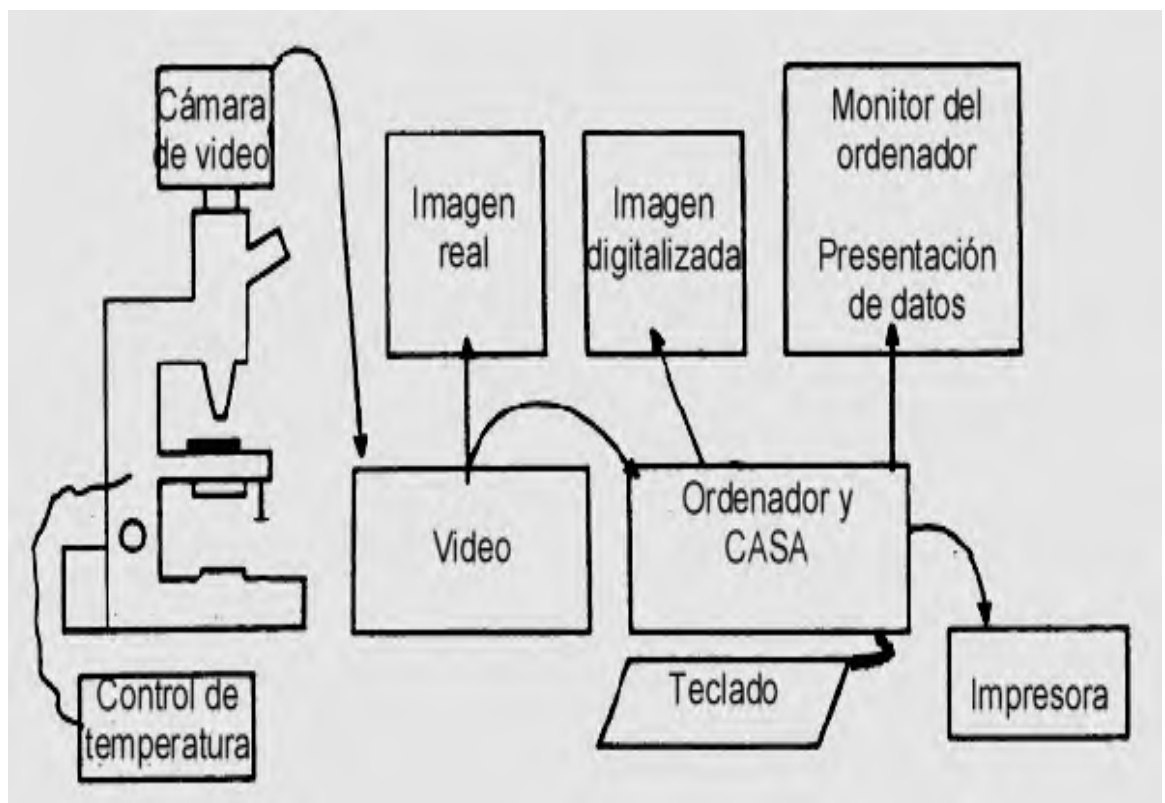


Figura 5. Componentes de los sistemas utilizados en la evaluación computarizada de la motilidad espermática (CASA). Adaptado de Budworth *et al.* (1988).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización del área experimental

Esta investigación se llevó a cabo en la posta zootécnica de la Universidad del Papaloapan campus Loma Bonita en el estado de Oaxaca, ubicada en las coordenadas 18° 06' 09" latitud norte y 95° 53' 34" longitud oeste, a una altitud de 28 msnm, con una precipitación media anual de 2500 mm y una temperatura media anual de 28 °C (INEGI, 2009).

5.2. Animales

Se utilizaron 2 sementales ovinos de la raza Pelibuey con una edad promedio de 2.5 años y una condición corporal de 3.0 – 3.5 y 10 ovejas de la raza Pelibuey sexualmente maduras con edad promedio de 2.5 años, con un peso de 30 kg y condición corporal de 3.0 – 3.5, alimentados por las mañanas con pastos nativos de la región (mulato, insurgente y llanero.), el agua fue ofrecida a libre acceso.

5.3. Adiestramiento de los sementales a la vagina artificial

Para que los sementales se acostumbraran a eyacular en la vagina artificial se utilizaron 10 ovejas de la raza Pelibuey sexualmente maduras, las hembras fueron sometidas a un proceso de inducción y sincronización de estros a través del uso de esponjas intravaginales de cronolona.

(Chrono Gest® CR, MSD Animal Health). Las esponjas permanecieron colocadas 12-14 días, al retirar la esponja se administraron 500 UI de Folligon® vía intramuscular.

5.4. Obtención de los eyaculados

La obtención de los eyaculados se realizó siguiendo la técnica descrita por Cueto *et al.* (1993). La vagina (tubo rígido de hule de 20 cm de longitud y de 6 cm de diámetro, provisto en su interior de una camisa de látex). El acondicionamiento final de la vagina se logró por el agregado de aire a la cámara de agua con el fin de estrechar la luz vaginal a 1 cm de diámetro. La obtención del semen se realizó en un lugar limpio y libre de polvo para evitar cualquier tipo de contaminación. Se lavó la pansa del macho y el prepucio. La borrega fue colocada en la manga de manejo, cuando el macho monto a la hembra el pene fue desviado lateralmente para ser introducido a la vagina artificial. El indicador de que el macho había eyaculado fue un salto del animal hacia arriba y hacia adelante, inmediatamente después del salto el tubo recolector se colocó en un termo a 37 °C.

5.5. Diluyente

El diluyente utilizado (Tabla 2), se elaboró a partir de una solución base (citrato, leche descremada de vaca y agua destilada), una vez preparada, permaneció en refrigeración (5 °C) por un tiempo máximo de 7 días. El día de la obtención del semen la solución base fue suplementada con agua de

coco, glicerol y las diferentes concentraciones de GSH (0.5, 1.0 y 5.0 mM), se determinó el pH del diluyente ajustándolo a pH de 7.3).

Tabla 2. Relación de ingredientes utilizados para preparar el diluyente.

	INGREDIENTE	CANTIDAD
SOLUCIÓN BASE	Leche de vaca en polvo	6 gr.
	Citrato de sodio	0.43 gr.
	Agua destilada	50 mL.
	Glicerina	100 µL.
SUPLEMENTOS	Agua de coco	2 mL.
	GSH	0.5, 1.0 y 5.0 mM

5.6. Dilución del semen

Una vez obtenido el eyaculado se determinó el volumen y se procedió a la dilución. De cada eyaculado se tomaron 400 µL que fueron divididos en cuatro alícuotas (100 µL por alícuota), cada alícuota fue aforada a 1 mL con el diluyente.

5.7. La motilidad en masa

Para evaluar la motilidad en masa se colocó una gota de semen fresco (aproximadamente 10 μ L) en un portaobjetos templado a 37 °C en una platina térmica, se observó al microscopio de contraste de fases con un objetivo de 40 X y se calificó con base a la escala propuesta por Evans y Maxwell (1990).

Tabla 3. Escala de motilidad propuesta por Evans y Maxwell (1990).

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Ondas muy rápidas
4	Buena	Ondas rápidas
3	Regular	Ondas lentas
2	Pobre	Sin ondas
1	Muy pobre	Sin movimiento
0	Mala	Muertos

5.8. Motilidad Individual

Fue determinada colocando una gota de semen diluido en un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos posteriormente se observó al microscopio de contraste de fases con objetivo de 40 X y se contaron 100 espermatozoides.

5.9. Viabilidad

Se colocó 10 μ L de semen en un portaobjeto, se agregó aproximadamente la misma cantidad de una solución de eosina-nigrosina al 5 % (Roberson y Watson, 1986). Después de hacer una homogenización se realizó un frotis para el conteo de 100 espermatozoides bajo el microscopio de contraste de fases a 40 X.

5.10. Refrigeración

Se realizó mediante la técnica propuesta por Cueto *et al.* (1993). una vez hecha la dilución las muestras fueron colocadas en un termo-baño a temperatura de 37 °C, posteriormente la temperatura fue disminuida progresivamente hasta 5 °C utilizando hielo (tiempo aproximado 60 min).

Una vez obtenida la temperatura de 5 °C las muestras fueron colocadas en refrigeración a 5 °C, la motilidad y viabilidad fue evaluada a la 1, 2 y 24 h de conservación.

5.11. Reactivación

Para evaluar el efecto del GSH en la motilidad espermática, las muestras fueron reactivas después del tiempo establecido de refrigeración, (24 h) para lo cual se tomó 50 μ L de muestra y fue colocada en un portaobjetos en seguida se adicionó un volumen igual de medio TCM-199 (50 μ L) a 37 °C y se evaluó la motilidad y viabilidad espermática.

5.12. Diseño Experimental

Para el efecto de la suplementación con GSH en la motilidad y viabilidad espermática se obtuvieron 12 eyaculados (6 eyaculados de cada macho). De cada eyaculado se tomaron 400 μL y fueron depositados en 4 tubos eppendorf (1.5 mL) a una razón de 100 μL por tubo. A cada tubo se le agregaron 900 μL del diluyente con las diferentes concentraciones de GSH (0, 0.5, 1.0 y 5 mM). El descenso de la temperatura se realizó según lo descrito anteriormente, las muestras permanecieron en refrigeración los tiempos establecidos (0,1, 2 y 24 h).

En cada tiempo de refrigeración se realizó la evaluación de la motilidad y viabilidad espermática. Al final de las 24 h de refrigeración se procedió a la reactivación de las muestras siguiendo la técnica descrita anteriormente.

5.13. Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos de las variables de motilidad y viabilidad pos-refrigeración a los 3 tiempos establecidos (1, 2 y 24 h) se sometieron a un análisis de varianza de una vía para probar diferencias entre tratamientos.

La comparación de medias de los tratamientos se efectuó mediante el test de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, para dicho análisis se utilizó el programa SAS, 1998.

6. RESULTADOS

La adición de GSH al medio de dilución no tiene un efecto significativo tanto en la motilidad como en la viabilidad en el tiempo 0 de almacenamiento (Tabla 4 y 5).

Durante la primera y segunda hora de almacenamiento no se observan cambios significativos en la motilidad espermática (Tabla 4). A las 24 h de almacenamiento, las muestras que fueron diluidas utilizando la concentración de 5 mM mostraron una diferencia significativa en la motilidad con respecto a las otras concentraciones ($p < 0.05$).

Después de las 24 h de refrigeración se realizó la reactivación de la motilidad espermática, los eyaculados que fueron diluidos con 5 mM de GSH mostraron mejores porcentajes de motilidad después de la activación con un 80.29 %. Durante el tiempo de evaluación (0 a 24 h) se realizaron estimaciones de la eficiencia del GSH en cada uno de las concentraciones utilizadas, cuando el diluyente fue suplementado con 5 mM, se observó una disminución del 63.56 % en la motilidad, mientras que un mayor descenso en la motilidad se observó cuando la concentración de GSH fue de 0.5 mM (78.56 %).

En cuanto a la viabilidad espermática, durante la primera y segunda hora de almacenamiento no se observan cambios significativos en el porcentaje de

espermatozoides vivos (Tabla 5). A las 24 h de almacenamiento, las muestras que fueron diluidas utilizando medio suplementado con 5 mM tuvieron 81.44 % de espermatozoides vivos siendo significativo con respecto a los demás tratamientos ($p < 0.05$).

Tabla 4. Valores promedio de la motilidad espermática (\pm DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH

Concentración de GSH (mM)	Tiempo de Refrigeración (5°C)				
	0	1	2	24	Reactivación
0.0	91.61 \pm 5.48 ^a	82.22 \pm 4.08 ^a	81.11 \pm 5.16 ^a	16.44 \pm 2.74 ^c	52.43 \pm 3.51 ^c
0.5	90.56 \pm 4.18 ^a	82.22 \pm 6.32 ^a	77.22 \pm 9.28 ^a	12.00 \pm 2.79 ^c	43.71 \pm 2.65 ^d
1.0	91.67 \pm 4.08 ^a	86.33 \pm 3.01 ^a	84.44 \pm 2.00 ^a	21.44 \pm 2.04 ^b	74.29 \pm 4.01 ^b
5.0	92.78 \pm 4.32 ^a	88.00 \pm 4.02 ^a	83.89 \pm 4.46 ^a	29.22 \pm 2.04 ^a	80.29 \pm 6.10 ^a

Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

Durante el tiempo de evaluación (0 a 24 h) se realizaron estimaciones de la eficiencia del GSH para mantener la viabilidad espermática en cada uno de las concentraciones utilizadas, cuando el diluyente fue suplementado con 5 mM, se observó una disminución del 13.67 % en la viabilidad, mientras que un mayor descenso en la viabilidad se observó cuando la concentración de GSH fue de 0 mM (21.55 %).

Tabla 5. Valores promedio de la viabilidad espermática (\pm DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH.

Concentración de GSH (mM)	Tiempo de Refrigeración (5°C)			
	0h	1h	2h	24h
0.0	88.11 \pm 5.67 ^a	77.22 \pm 4.92 ^a	73.33 \pm 8.80 ^a	66.56 \pm 7.07 ^c
0.5	88.56 \pm 3.43 ^a	77.22 \pm 8.15 ^a	77.22 \pm 4.92 ^a	67.78 \pm 8.46 ^c
1.0	91.56 \pm 6.01 ^a	79.67 \pm 4.08 ^a	78.44 \pm 5.85 ^a	74.22 \pm 4.92 ^b
5.0	95.11 \pm 3.02 ^a	85.44 \pm 3.76 ^a	81.67 \pm 4.18 ^a	81.44 \pm 2.88 ^a

Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)

7. DISCUSIÓN

Cuando se realiza la conservación de semen a través de la refrigeración (5 °C) uno de los eventos que ocurren es un incremento en la producción de especies oxígeno reactivas o ROS, el estrés oxidativo causado por el exceso de ROS está relacionado con una disminución de la motilidad y viabilidad espermática (El-Sissy *et al.*, 2007).

Hay varios mecanismos propuestos para explicar el descenso en la motilidad espermática asociado a un estrés oxidativo. La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la membrana lipídica es uno de estos mecanismos (Aitken *et al.*, 1997). Los espermatozoides son particularmente susceptibles a la lipo-peroxidación debido a la alta concentración de PUFAs en su membrana plasmática. Una consecuencia de la lipo-peroxidación es la pérdida de la fluidez en la membrana plasmática (Aitken, 1995). La pérdida de la integridad (fluidez membranar) también ayuda a incrementar la permeabilidad de la membrana y a una pérdida de la capacidad para regular las concentraciones intracelulares de iones involucrados en el control del movimiento espermático.

La actividad antioxidante del GSH ha mostrado ser dependiente de su concentración endógena, de acuerdo a Gadea *et al.* (2007). Durante la fase de enfriamiento (24 h a 15 °C) el GSH exógeno ejerce su actividad antioxidante solo cuando los niveles endógenos han disminuido, a pesar de

que en este estudio no se determinaron los niveles de GSH durante los tiempos de refrigeración se podría sugerir que al menos durante las dos primeras horas los niveles de GSH endógeno se mantienen estables y por lo tanto no se observa un efecto del GSH exógeno. Una disminución en los niveles de GSH endógenos han sido reportados solo durante la congelación-descongelación (Bilodeau *et al.*, 2000).

En este estudio la adición de glutatión reducido (GSH) en una concentración de 5 mM al medio de dilución mejora significativamente la motilidad (80.29 %) a las 24 h de conservación a 5 °C, algunos trabajos reportan efectos positivos del GSH en la calidad del semen en otras especies, Sinha *et al.*, (1996) reportaron que la adición de 5 mM de GSH en diluyentes de semen de cabra incrementan la motilidad espermática hasta en un 55.7 %.

El-kon y Darwish (2011) evaluaron el efecto del GSH en parámetros seminales del búfalo egipcio durante la congelación y almacenamiento a 5 °C, de acuerdo a estos autores la adición de 0.5 y 1.0 mM de GSH tiene un efecto sobre la calidad seminal almacenado a 5 °C hasta por 120 h. Los ROS se han propuesto como un mecanismo inductor del daño en el ADN (Sawyer *et al.*, 2003) y en la activación de la apoptosis (Duru *et al.*, 2000), los radicales de oxígeno pueden iniciar la activación de la mitocondria para liberar el citocromo C, esta molécula de señalización inicia una cascada de eventos que involucra la activación de caspasas (3 y 9) dando por resultado

la apoptosis de las células. En el presente estudio, la viabilidad mejora de manera significativa comparada con el control cuando fueron utilizadas concentraciones de 1.0 y 5.0 mM de GSH, este efecto del GSH en la viabilidad espermática durante el almacenamiento en refrigeración ha sido reportado en ovinos (Bucak y Tekin, 2007), bovinos (Munsi et al., 2007). El mecanismo a través del cual el GSH mantiene a los espermatozoides viables durante la refrigeración implica la eliminación de los ROS responsables de la lipo-peroxidación a nivel de la membrana espermática (Gadea *et al.*, 2004).

8. CONCLUSIONES

- La suplementación del diluyente con 5 mM de GSH tiene un efecto benéfico en la motilidad espermática durante la refrigeración (5 °C) de semen de borrego durante 24 h.
- La suplementación del diluyente con 5 mM de GSH tiene un efecto benéfico en la viabilidad espermática durante la refrigeración (5 °C) de semen de borrego durante 24 h.

RECOMENDACIÓN

- Se recomienda adicionar glutatión reducido a una concentración 5 mM en el medio de dilución durante la refrigeración a 5 °C de semen de borrego.

9. LITERATURA CITADA

Aisen, E; Álvarez, H; Venturino, A; Garde, J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.

Aitken, R.J; Fisher, H.M; Fulton, N. 1997. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitor diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod. Dev.*, 47: 468–482.

Aitken, R; Gordon, E; Harkiss, D; Twigg, J; Milne, P; Jennings, Z; Irvine, D. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59: 1037-1046.

Aitken, R.J; Paterson, M; Fisher, H; Buckingham, D.W; Van Duin, M. 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Cell. Science.* 108: 2017-2025.

Aitken, R. Fisher, H. 1994. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16: 259-267.

Aitken, R; Clarkson, J. Fishel, S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol. Reprod.* 40: 183-197.

Aitken, R. Clarkson, J. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Andrologia.* 9: 367-376.

Al-Abdulla, A.N. Lee, J.M. 1998. Apoptosis of retrogradely degenerating neurons occurs in association with the accumulation of perikaryal mitochondria and oxidative damage to the nucleus. *Am. J. Pathol.* 153: 447-456.

Álvarez, J. Storey, B. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23: 77-90.

Amann, R.P. 1999. Cryopreservation of sperm. In: *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 1. Academic Press, Burlington, MA, USA, 773-783.

Bagchi, A; Woods E.J; Critser, J.K. 2008. Cryopreservation and vitrification: Recent advances in fertility preservation technologies. *Expert Rev. Med. Devices*, 5: 359-370.

Bailey, J.L. Buhr, M.M. 1994. Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci* 74: 45–52.

Ball, B; Vo, A. Baumber, J. 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res.* 62: 508-515.

Baumber, J.; Vo, A.; Sabeur, K. Ball, B. 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* 57: 1025-1033.

Baumber, J.; Ball, B.; Linfor, J. Meyers, S. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Androl.* 24: 621-628.

Beckman, K.B. Ames B.N. 1998. The free radical theory of aging matures. *J. Physiol. Rev.* 78: 547-581.

Bilodeau, J.F.; Chatterjee, S.; Sirard. M.A. Gagnon, C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *J. Mol. Reprod. Dev.*, 55: 282-288.

Boiso, I. 2001. Principios básicos de criobiología. *Rev. Ibero, Fert.* 18: 127-131.

Bucak, M. N. Tekin, N. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Res.* 73: 103–108.

Budwordt, P.R.; Amann, R.P.; Chapman, P.L. 1988. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *Androl.* 9: 41-54.

Chatterjee, S. Gagnon, C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. *J. Mol. Reprod. Dev.* 59: 451–458.

Chihuailaf, R.H; Contreras, P.A. Wittwer, F.G. 2002. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. *Vet Mex.* 33, 265–283.

Concannon, P.W. Battista, M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In R. W. (Ed). *Current Veterinary Therapy.* WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 1247-1259.

Coy, F. P. 1995a. Reproducción en ovejas y cabras. En: García, S., A.; Castejón, M. F.; de la Cruz P., L.; Gonzalez G., J.; Murillo L. y M.; Salido R., G. (eds). Fisiología Veterinaria. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid. pp. 937-950.

Coy, P. 1995b. Fisiología de la gestación. En: García, A.; Castejón, M.F.; de la Cruz P. L.; Gonzalez, J.; Murillo, M. y Salido, G. (eds), Fisiología Veterinaria. Mc Graw-Hill - Interamericana, Madrid. pp. 861-874.

Critser, E.; Almeron, B.; Aaker, D.; Huse-Benda, A. Ball, G. 1987. Cryopreservation of human spermatozoa II. postthaw cronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. Rev. J. Fertil Steril. 47 (6): 980-984.

Cueto, M.; Gibbons, A.; Garcia Vinnent, J. y Arrigo, J. 1993. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación técnica de producción animal. INTA. Bariloche. 200.

Curry, M. Watson, P. 1994. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. Cryobiology. 31: 39-46.

De Lamirande, E.; Jiang, H.; Zini, A.; Kodama, H. Gagnon, C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev. Rep. 2: 48-54

Duru, N.; Morshedi, M. Oehninger, S. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Fertil. Steril. 74:1200 -7.

El-kon I.I. Darwish S.A. 2011. Effect of glutathione (GSH) on microscopic parameters and DNA integrity in egyptian buffalo semen during liquid and frozen storage. *Journal of Reproduction and Infertility* 2(3): 32-40.

El-Sissy, G.A.; El-Nattat, W.S. El-Sheshtawy, R.I. 2007. Buffalo semen quality, antioxidants and peroxidation during chilling and cryopreservation. *Vet. Res.*, 11: 55-61.

Evans, G. Maxwell, W. 1990. Conservación de semen durante corto tiempo. *Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. pp: 119-122.

Fiser, P. and Fairfull, R. 1986. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23: 518-524.

Foote, R.; Brockett, C. Kaproth, M. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Repro. Sci.* 71: 13-23.

Fouchécourt, S.; Dacheux, F. Dacheux, J.L. 1999. Glutathione-independent prostaglandin D2 synthase in ram and stallion epididymal fluids: origin and regulation. *Biol Reprod.* 60: 558-566.

Foulks, J. A. 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Rev. J. Reprod. Fertil.* 49:277-84.

Fuchs, J. Thiele, J. Ochsendorf, F. 1997. Oxidants, antioxidants and oxidative injury. En: Ochsendorf, F. and Fuchs, J (eds), *Oxidative stress in male infertility*, Michael Itschert, Gardez Verlag, Germany, pp 21-40.

Gadea, J; Gumbao, D; Novas, S.C; Zquez, F.A.Z; Grullo, L.A. Gardo, G.C. 2007. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrology*. 7, 1-10.

Gadea, J; Selles, E; Marco, M.A; Copy, P; Matas, C; Romar, R. Ruiz, S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*. 62, 690-701.

Garde, J. 1993. Congelacion de semen de la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. pp.137.

Garner, D.L. Háfiez, E.S.E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109.

Gavella, M. Lipovac, V. 1992. NADH-dependent oxido-reductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *J. Arch Andrology* 28: 135-141.

Gutierrez, A.J.; Palacios M.M.; Jimenez C.J.A. Ramirez G.J.A. 2006. Agua de coco, opuntia sp., leche y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. *J. Archivos de zootecnia*. 55, 209. Universidad de Córdoba, España 2006.

Guyton, A. y Hall, J. 2000. *Tratado de Fisiología Medica*. Mc Graw-Hill Interamericana de España, Madrid. 10 ma edición, pp 1280.

Hafez, E. y Hafez, B. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª. ed. México: Ed. Mc Graw Hill. 517pp.

Hammerstedt, R. H.; Graham, J.K. Nolan, P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *Rev. J. Androl.* 11:73-88.

Herrero, M.; De Lamirande, E. Gagnon, C. 1999. Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol. Reprod.* 61: 575-581.

Hicks, J.J.; Torres, R.Y.; Sierra, V. M. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Rev. Endocrinología y Nutrición.* 14 (4): 223-226.

Holt, W. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.

Hoskins, D. Casillas, E. 1973. Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. En: *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System.* R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington D.C., American Physiological Society, pp. 453-460.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. (INEGI), 2009, carta hidrológica y climática del estado de Oaxaca. www.inegi.org.mx.

Jhonson, L.A.; Maxwell, W.M.C.; Dobrinsky, J.R.; Welch, G.R. 1996. Staining sperm for viability assessment. *J. Reprod. Dom. Anim.* 31: 37-47.

Jones, R. Mann, T. 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J. Reprod. Fertil* 50: 261-268.

Kumar, S.; Millar, J. Watson, P. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*. 46: 246-253.

Linford, E.; Glover, F.A.; Bishop, C. Stewart, D.L. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fert.* 47: 283-291.

Machlin, L.J. Bendich, A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal* 1: 441-445.

Malmgren, L. 1997. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*. 48: 523-530.

Mann, T. 1975. Biochemistry of semen. En: *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System*. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington, DC, American Physiological Society.

Martínez, P. Morros, A. 1996. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Bios* 1: 103-117.

Masella, R.; Di Benedetto, R. Vari, R. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 16:577–86.

Maxwell, W.M. Stojanov, T. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *J. Reprod. Fertil. Dev.* 8: 1013-1020.

Maxwell, W.M. Watson P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *J. Rev. Anim. Reprod. Sci.* 42:55-65.

Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: Mechanism and implications. *Am J Physiol.* 247: 125-142.

McDonald. 1991. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. 4ª Ed. Editorial Interamericana- Mc-Graw Hill.

Medeiros, C.; Forell, F.; Oliveira, A. Rodrigues, J. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology.* 57: 327-344.

Mishra, B.; Alam, M. G.; Mazumder, S. Munsu M.N. 2010. Qualities of goat semen in Tris-Citrate-Glucose extender containing glutathione. *Bangladesh Vet.* 27(2): 46 – 55.

Munsi, M.N.; Bhuiyan, M.M.U.; Majumder, S. Alam, M.G.S. 2007. Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *J. Reprod. Domestic Anim.*, 42: 358-362.

Nunes, J.F. 1993. Agua de coco in natura, adicionada de zeatina e de JYP, como diluidores do sémen caprino. 6º congreso Internacional de Medicina Veterinaria em Língua Portuguesa. Salvador, Brasil, K6, 419-420.

Ochsendorf, F.; Thiele, J. Fuchs, J. 1997. Antioxidants in germinal epithelium, spermatozoa and seminal plasma. In: Ochsendorf FR, Fuchs J (eds). *Oxidative stress in male infertility*. Germany: Michael Itschert, Gardez Verlag. pp. 85-128.

O'Connell, M.; Mc Clure, N. Lewis, S. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *J. Hum. Reprod.* 17: 704-709.

Ollero, M.; Blanco, T.; Lopez-Pérez, M. Cevrian-Pérez, J. 1996. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications* 17: 157-164.

Ovalles, J.F; Medina, A.L; León, A; Vielma, R.A. 1995. Determinación del contenido de aminoácidos libres del agua de coco tierno por HPLC y Revisión electrónica sobre la nueva tecnología para el envasado del agua de coco. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 044: 2.

Robertson, L. Watson, P.F. 1986. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J. Reprod. Fertil.* 77: 177–185.

Royere, D.; Barthelemy, C.; Hamamah, S. Lansac, J. 1996. Cryopreservation of spermatozoa: a review. *J. Hum. Reprod. Update*, 2: 553-559.

Salamon, S. Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 62: 77–111.

SAS. 1998. *SAS User's Guide*. SAS Institute, Cary, NC.

Sawyer, D.E.; Mercer, B.G.; Wiklendt, A.M. Aitken, R.J. 2003. Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *J. Mutat, Res:* 529:21.

Serres, C. 2003. Evaluación y conservación del semen en el asno zamorano-leonés. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España.

Sinha, M. P.; Sinha, A.K.; Singh, B.K. Prasad, P.L. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Theriogenology* 41:237-243.

Špaleková, E. Makarevich, A.V. 2012. Effect of glutathione on selected motion parameters of ram cooling-stored spermatozoa. *Animal physiology*. May. 24-25.

Stornelli, M.A.; Stornelli, M.C.; Savignone, C.A.; Arauz, M.A.; Tittarelli, C. De la Sota R.L. 2003. Comparison of different concentrations of threalose on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Bras. J. Anim. Reprod.* 27, 3: 359-361.

Strom, H.B. 1999. In vitro characterization of cryopreserved canine spermatozoa with special reference to post thaw survival time and pellucida capacity. Doctoral Thesis.

Upreti, G.; Jensen, K.; Munday, R.; Duganzich, D.; Vishwanath, R. Smith, J. 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of piruvate as antioxidant. *J. Anim. Repro. Sci.* 51: 275-287.

Vega, A.; Treviño, C. y Félix, R. 2002. Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *R. Avance y Perspectiva* vol. 21: 89-95.

Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M. Onclin, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57: 149-179.

Wang, W. Ballatori, N. 1998. Endogenous glutathione conjugates: Occurrence and biological functions. *J. Pharmacol. Rev.* 50: 335-355.

Wang, A.; Zhang, H.; Ikemoto, I.; Anderson, D. Loughlin, K. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *J. Urology*. 49: 921-925.

Watson, P. Anderson W. 1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J. Reprod. Fertil.* 69: 229-235.

Watson, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *J. Anim. Repro. Sci.* 60-61: 481-492.

Wendee, C. 2007. Effect of semen parameters of bovine spermatozoa after using a contemporary collecting receptacle. Tesis de Maestria. Graduate Faculty of Texas. Tech University. University Health Sciences Center in Lubbock, Texas. Texas. USA.

White, I. 1980. Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals*. 4 th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger.

ANEXO 1.

Conservación de semen de borrego a 5 °C y glutatión reducido

CONSERVACIÓN DE SEMEN DE BORREGO A 5 °C UTILIZANDO MEDIO SUPLEMENTADO CON GLUTATION REDUCIDO (GSH)

CONSERVATION OF RAM SEMEN AT 5 °C USING MEDIUM SUPPLEMENTED WITH REDUCED GLUTATION (GSH)

Alfredo Trejo-Córdova¹, Ismael Abad-Benítez, Carolina Antonio-Estrada.

ATC¹, Laboratorio de Reproducción Animal Asistida

Universidad del Papaloapan

Loma Bonita, Oaxaca, 68400

atrejo@unpa.edu.mx

RESUMEN

Se utilizaron un total de 12 eyaculados, cada eyaculado fue dividido en 4 alícuotas correspondientes a las concentraciones de GSH evaluadas (control, 0.5, 1.0 y 5 mM). Las alícuotas fueron almacenadas en refrigeración (5 °C) durante 24 hrs, la evaluación de la motilidad y viabilidad se realizó a las 0, 1, 2 y 24 hrs de almacenamiento.

A las 24 hrs también se evaluó la motilidad espermática a 37 °C (reactivación). A las 0, 1 y 2 hrs de almacenamiento no hubo diferencias significativas en cuanto a la motilidad

espermática cuando se utilizaron las diferentes concentraciones de GSH. A las 24hrs, la concentración de 5mM ha mostrado mejor efectividad para mantener la motilidad espermática (29.22 %). En cuanto a la viabilidad, a las 24 hrs de almacenamiento las muestras que fueron diluidas en 5mM de GSH tuvieron un 81.67 % de espermatozoides vivos. Se concluye que la actividad del GSH como antioxidante y como crioprotector durante la conservación a 5 °C es dependiente de la concentración y del tiempo de almacenamiento.

Palabras clave: ovino, antioxidante, semen.

ABSTRACT

We used a total of 12 ejaculates, each ejaculate was divided into 4 aliquots for GSH concentrations tested (control, 0.5, 1.0 and 5 mM). Aliquots were stored under refrigeration (5 °C) for 24 hours, the evaluation of the motility and viability was performed at 0, 1, 2 and 24 hours of storage. A 24 hrs also assessed sperm motility at 37 °C (recovery). At 0, 1 and 2 hours of storage there were no significant differences in sperm mobility when used different concentrations of GSH. At 24 hours, the concentration of 5 mM best shown effectiveness in maintaining sperm motility (29.22 %). As for viability at 24 hrs storage samples were diluted in 5 mM GSH had a 81.67 % of live sperm. It is concluded that the activity of GSH as an antioxidant and as a cryoprotectant during storage at 5 °C is concentration dependent and time of storage.

Key words: ram, antioxidant, semen

INTRODUCCIÓN

La metodología más utilizada cuando se desea conservar semen en forma líquida por periodos no mayores de 24 hrs es mediante la refrigeración a 5°C, proceso con el cual se obtiene una reducción en la motilidad y actividad metabólica. Esta reducción en la motilidad puede restablecerse a niveles casi normales cuando los daños producidos por el choque térmico sean mínimos (Vivianco, 1998). Cuando el semen es conservado a temperaturas cercanas a los 0 °C, se debe tener en cuenta que los espermatozoides se someten a un choque térmico, lo cual puede causar cambios irreversibles en la célula espermática (Salomón y Maxwell, 2000), como son deshidratación, distorsión de la membrana, formación de cristales intracelulares y quizás el más importante un estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es causado por un incremento en la producción de radicales libres (ROS) (Villa, 2009). Sin embargo, los espermatozoides están equipados con sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS (Hicks *et al.*, 2006). Membrillo *et al.* (2003) indicaron que el glutatión reducido (GSH) es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide. Los resultados del uso de GSH como antioxidante son variados en cuanto a la cantidad utilizada, por ejemplo en el ciervo rojo se ha establecido el GSH a concentraciones de 1mM y 5mM tienen un efecto benéfico para la motilidad post-descongelación (Anel-López *et al.*, 2012), resultados similares han sido reportados por Gadea *et al.* (2011) para la criopreservación de semen humano. Por su parte Munsí *et al.* (2007) reportaron que una concentración de 0.5 mM mejora la motilidad espermática cuando los eyaculados de toro son almacenados a 5 °C. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la concentración más recomendable a ser utilizada durante la refrigeración a 5 °C del semen de ovino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron 2 sementales de la raza Pelibuey con una edad promedio de 2.5 años y una condición corporal de 3.0 – 3.5, alimentados por las mañanas con pastos nativos de la región (mulato, insurgente, llanero, etc.), el agua fue ofrecida a libre acceso.

Obtención de eyaculados. Se obtuvieron un total de 12 eyaculados (dos por semana) para lo cual se utilizó una vagina artificial. Una vez obtenidos los eyaculados fueron trasladados inmediatamente al laboratorio para ser evaluados y procesados. Se procesaron únicamente aquellas muestras con un volumen > 0.8 mL, motilidad en masa igual o mayor a 4 (Naim et al., 2009).

Preparación de diluyente. Se prepararon 50 mL de la solución base del diluyente de la siguiente manera: leche descremada (6.0 grs), glicerol (100 μ L) y citrato de sodio (0.43 grs), esta solución se mantuvo en refrigeración a 5 °C por un tiempo no mayor a dos días. Esta solución base fue mezclada en una proporción 1:1 con agua de coco para formar el diluyente.

Tratamientos. En cuatro tubos cónicos se colocaron 4 mL del diluyente (2 mL de solución base y 2 mL de agua de coco) y fueron suplementados con las siguientes concentraciones de GSH 0 mM (control), 0.5 mM, 1.0 mM y 5.0 mM.

Dilución. Cada eyaculado fue dividido en 4 alícuotas, cada alícuota fue diluida en una proporción 1:2 (semen:diluyente) utilizando cada uno diluyentes suplementados con GSH. Las muestras fueron mantenidas a 37 °C hasta su enfriamiento. Para realizar el enfriamiento de los eyaculados se siguió la técnica propuesta por Naim et al (2009), para disminuir la

temperatura de las muestras utilizo agua fría. El tiempo total del enfriamiento (de los 37 °C hasta los 5 °C) fue aproximadamente 1.5 horas. Una vez alcanzado la temperatura de 5 °C las muestras fueron almacenadas en refrigeración (5°C).

La motilidad progresiva y viabilidad espermática fueron evaluadas a los siguientes tiempos: 0 (recién diluido), 1, 2 y 24 hrs de refrigeración, a las 24 hrs también se realizó la evaluación de la motilidad progresiva pero a una temperatura de 37 °C (reactivación de la motilidad) para lo cual 5 µL de muestra fueron diluidos en 100 µL de TCM-199.

Motilidad en Masa. Se evaluó mediante la observación directa de una gota de semen fresco a 100x con la ayuda de un microscopio óptico, calculándose de forma subjetiva en una escala de 0 a 5 (Ax y col., 2000).

Motilidad Progresiva. Se tomaron 5 µL de semen y fueron colocados en un portaobjeto, la motilidad fue observada en un microscopio óptico a 40x calculando el porcentaje de espermatozoides con movimiento.

Viabilidad espermática. Para determinar la viabilidad se colocó una gota (aproximadamente 10µl) de semen en un portaobjetos, se agrego aproximadamente la misma cantidad de una solución de eosina-nigrosina al 5 % (Roberson y Watson, 1986). Después de hacer una homogenización se realizó un frotis, se realizó el conteo de 100 espermatozoides bajo el microscopio (40X)

Reactivación de la motilidad. Se tomaron 5 µL de semen y se adicionaron a 100 µL de medio TCM199 (a 37 °C), se colocó en un portaobjeto 25 uL de la dilución anterior y la

motilidad fue observada en un microscopio óptico a 400x calculando el porcentaje de espermatozoides con movimiento hacia delante

Análisis estadístico Se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de GSH sobre los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática. La prueba de Tukey fue utilizada para determinar diferencias significativas entre los grupos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de la motilidad y viabilidad fue realizada en semen almacenado a 5 °C, durante 0, 1, 2 y 24 hrs. La membrana del espermatozoide tiene altas concentraciones de ácidos grasos poli-insaturados, esta característica lo hace más propenso a sufrir el proceso de peroxidación lipídica debido al estrés oxidativo inducido por el choque térmico. Durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación los sistemas antioxidantes que presentan los espermatozoides se ven afectados disminuyendo su efectividad, por lo tanto la adición de un antioxidante exógeno podría ayudar a mejorar el sistema antioxidante del semen durante el proceso de conservación. No se encontró efecto de la adición de 0.5, 1.0 y 5 mM de GSH al medio de dilución, ya que la motilidad y viabilidad espermática fue mejor en el grupo control durante las dos primeras horas de almacenamiento a 5 °C (Tabla 1) , e incluso a las 24 horas posdilución.

Este efecto del GSH en la motilidad espermática durante las dos primeras horas del enfriamiento ha sido reportado en especies como los cerdos cuando se utilizan concentraciones de 1 y 5mM del antioxidante (Gadea et al., 2005). A las 24 hrs se observa una disminución significativa de la motilidad espermática en las tres concentraciones de GSH

(Tabla 1). Sin embargo, a una concentración de 5 mM y el control mostraron una mayor motilidad en comparación con las concentraciones de 1 mM y 0.5 mM.

Esta disminución en la motilidad en eyaculados almacenados a 5 °C durante 24 hrs ha sido reportado por Aguado et al (1998) en ovinos de la especie Manchego. Después de las 24 hrs de refrigeración se realizó la reactivación de las muestras, las muestras que conservadas con concentraciones de 5 mM y control (0 mM) de GSH mostraron mejor motilidad espermática en comparación con las concentraciones de 1 mM y 0.5 mM, lo cual nos indica que el GSH puede tener un efecto detrimental sobre la motilidad y viabilidad espermática y que puede depender de la concentración utilizada.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que el uso de glutatión reducido (GSH) a una concentración de 5mM durante la conservación de semen de ovino a 5 °C tiene un efecto sobre la motilidad y viabilidad espermática hasta por 24 hrs de almacenamiento.

LITERATURA CITADA

Anel-López L, Alvarez-Rodriguez M, García-Álvarez O, Álvarez M, Maroto-Morales A, Anel L, de Paz P, Garde JJ, Martínez-Pastor F. 2012. Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci Nov*;135(1-4):37-46.

Hicks, J.J.; Torres,R.Y.; Sierra,V. M.2006 Estrés oxidante.Concepto y clasificación *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 14, No. 4 pp 223-226

Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, García-Vazquez FA, Gardon JC. 2011. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62(1):40-6

Membrillo, O.A.,Córdova, I.A.,Hicks,G.J.J.,Olivares,C.I.M.,Martínez, T.V.M., Valencia, M.J.J.2003.Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen.*Interciencia*. 28(12):699-704.

Munsi MN, Bhuiyan MM, Majumder S, Alam MG. 2007. Effects of exogenous glutathione on the quality of chilled bull semen. *Reprod. Domest. Anim.* 42(4):358-362.

Niam, P., Cueto M., Gibbons A. 2009. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Archivos de Zootecnia* 58(223): 435-440.

Salmon, S. and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 77-111.

Vivanco, M. H. W. 1998. Inseminación artificial en ovinos. *Memorias del Seminario Internacional: Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos*. Universidad Autónoma Chapingo, México. pp: 135-194.

Evaluación de la motilidad espermática (\pm DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH

Concentración de GSH (mM)	Tiempo de Refrigeración (5°C)				
	0	1	2	24	Reactivación
0.0	91.61 \pm 5.48 ^a	82.22 \pm 4.08 ^a	81.11 \pm 5.16 ^a	16.44 \pm 2.74 ^a	52.43 \pm 3.51 ^a
0.5	90.56 \pm 4.18 ^a	82.22 \pm 6.32 ^a	77.22 \pm 9.28 ^a	12.00 \pm 2.79 ^a	43.71 \pm 2.65 ^b
1.0	91.67 \pm 4.08 ^a	86.33 \pm 3.01 ^a	84.44 \pm 2.00 ^a	21.44 \pm 2.04 ^b	74.29 \pm 4.01 ^c
5.0	92.78 \pm 4.32 ^a	88.00 \pm 4.02 ^a	83.89 \pm 4.46 ^a	29.22 \pm 2.04 ^c	80.29 \pm 6.10 ^d

Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa (p< 0.05)

Evaluación de la viabilidad espermática (\pm DE) durante la refrigeración a 5°C bajo diferentes concentraciones de GSH.

Concentración de GSH (mM)	Tiempo de Refrigeración (5°C)			
	0h	1h	2h	24h
0.0	88.11 \pm 5.67 ^a	77.22 \pm 4.92 ^a	73.33 \pm 8.80 ^a	66.56 \pm 7.07 ^a
0.5	88.56 \pm 3.43 ^a	77.22 \pm 8.15 ^a	77.22 \pm 4.92 ^a	67.78 \pm 8.46 ^a
1.0	91.56 \pm 6.01 ^a	79.67 \pm 4.08 ^a	78.44 \pm 5.85 ^a	74.22 \pm 4.92 ^b
5.0	95.11 \pm 3.02 ^a	85.44 \pm 3.76 ^a	81.67 \pm 4.18 ^a	81.44 \pm 2.88 ^c

Literal diferente en una columna indica diferencia estadística significativa ($p < 0.05$)