

# CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO CON ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES

## ANTIOXIDANTS ADDITION TO RAM SEMEN CRYOPRESERVATION

SEPÚLVEDA, N. <sup>(1)</sup>; SANTIANI, A. <sup>(1)</sup>; RISOPATRÓN, J. <sup>(1)</sup> y RODERO, E. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de La Frontera. Temuco (Chile)

<sup>(2)</sup> Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba (España)

### RESUMEN

*El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de los antioxidantes Tempo y Tempol en la calidad de espermatozoides ovinos durante la criopreservación. Se evaluó el momento de adición de cada antioxidante durante el enfriamiento observándose una mejor motilidad y viabilidad espermática con la adición del antioxidante a 10 °C. También se evaluaron concentraciones de los antioxidantes Tempo y Tempol. Los mejores resultados en motilidad y reacción de acrosoma fueron obtenidos con Tempo 1mM. Los niveles de ROS y peroxidación lipídica en el grupo Tempo 1mM también fueron menores. Estos resultados sugieren que la peroxidación lipídica reduce la motilidad espermática y desestabiliza la membrana plasmática, mientras que la adición de Tempo 1mM protege a los espermatozoides ovinos de este estrés oxidativo durante el proceso de criopreservación.*

**Palabras clave:** Semen ovino, inseminación artificial, antioxidantes.

### SUMMARY

*The aim of the present work was to study the effect of the antioxidant Tempo and Tempol in the quality of sheep sperms during the criopreservación. There was evaluated the moment of addition of antioxidant during the cooling being observed a better motility and spermatic viability with the addition of the antioxidant was to 10 °C. Also there were evaluated concentrations of the antioxidant Tempo and Tempol. The best results in motility and acrosoma reaction they were obtained with Tempo 1mM. ROS's levels and lipidic peroxidation in the group Tempo 1mM also they were minor. These results suggest that the lipidic peroxidation decrease the spermatic motility and destabilizes the plasmatic membrane, whereas Tempo's addition 1mM protects to the sheep sperms of this oxidative stress during the process of criopreservation.*

**Words key.** Ram semen, artificial insemination, antioxidant.

### Introducción

Las tasas de fertilidad en ovejas inseminadas con semen congelado son reducidas debido a que la proporción de espermatozoides viables es afectada por procesos como el enfriamiento, congelamiento y des-

congelamiento. Durante el proceso de criopreservación existe un incremento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (WANG y col., 1997). En ese sentido, el potencial daño celular y disminución de la motilidad espermática podrían aumentar debido a la ges-

neración de ROS. Es por ello que los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la producción de ROS y peroxidación lipídica durante el proceso de criopreservación de semen ovino y evaluar el efecto de la adición de los antioxidantes.

## Material y métodos

El estudio se realizó en los laboratorios del CEBIOR de la Universidad de La Frontera. El semen fue colectado de 6 carneros Romney March utilizando una vagina artificial. El diluyente fue preparado en base a leche descremada y 5% de yema de huevo (v/v). La segunda fracción del diluyente fue preparada en base a la primera fracción suplementada con fructosa, penicilina, estreptomicina y glicerol 1M. Método de congelamiento. El semen diluido fue enfriado a una velocidad de 1 °C/3 minutos, desde los 35 °C hasta los 5 °C. Luego, fueron expuestas durante 15 minutos a vapores de nitrógeno líquido, antes de ser sumergidas en el tanque de nitrógeno líquido.

**Procedimiento metodológico.** Experimento 1: Se formaron los siguientes grupos: (T1) sin antioxidante; y adición del antioxidante a los (T2) 35 °C; (T3) 35 y 5 °C y (T4) 10 °C, tanto para Tempo como para Tempol. Experimento 2: Se evaluaron diferentes concentraciones de cada antioxidante (control, 0,5, 1,0 y 2,5 mM). La evaluación de la producción de ROS, peroxidación y capacitación espermática fue realizada en los grupos control, Tempo 1 mM y Tempol 1 mM. En los grupos con antioxidantes, éstos fueron adicionados durante la curva de enfriamiento, a los 10 °C.

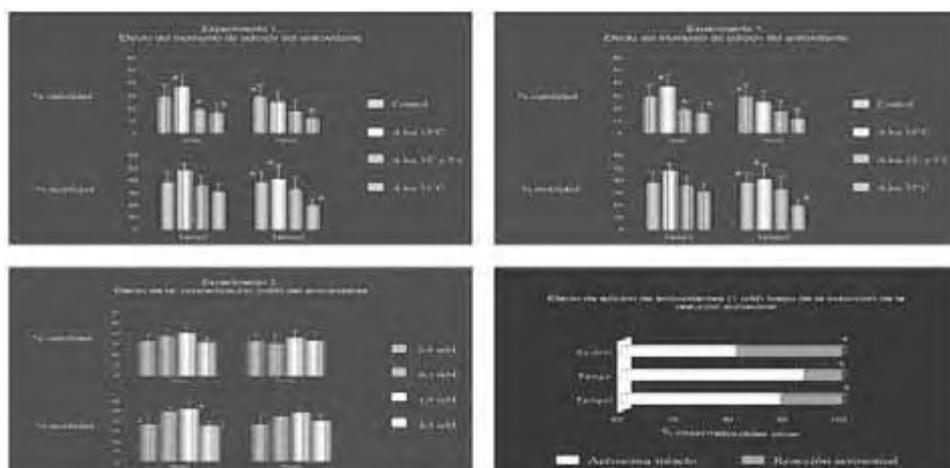
**Evaluación de semen.** Se evaluó motilidad progresiva y la viabilidad e integridad acrosomal fue realizada mediante la técnica de doble tinción descrita por DIDION y col. (1989). La evaluación de la capacitación fue realizada mediante la

inducción de la reacción del acrosoma con 5 mM de calcio ionóforo A23187. Los niveles de ROS fueron medidos mediante el método de quimioluminiscencia. Los niveles de ROS fueron expresados en unidades relativas de quimioluminiscencia (RLU). La peroxidación lipídica fue evaluada a través de la medición del malondialdehído por el método del Ácido Tiobarbitúrico (TBA).

## Resultados y discusión

Los resultados de los experimentos se observan en la figura 1. Los mejores porcentajes de motilidad y viabilidad se obtuvieron cuando el antioxidante se adicionó a los 10 °C. La mejor concentración para Tempo y Tempol fue 1 mM. Los mayores niveles de ROS fueron observados a 5 °C, en forma similar a lo reportado en humanos por WANG y col. (1997). La adición de antioxidantes disminuyó ligeramente la producción de ROS. La mayor producción de ROS y peroxidación lipídica en el presente trabajo se observó en el grupo control, el cual tuvo los menores porcentajes de motilidad y viabilidad espermática. En consecuencia, la pérdida de motilidad y viabilidad espermática producida durante el proceso de criopreservación podría ser consecuencia de la producción de ROS durante el periodo de enfriamiento celular. De esta manera, la pérdida de motilidad espermática ha sido revertida por la adición de Tempol a los diluyentes durante la refrigeración de espermatozoides de ovino (MARA y col., 2002). Los grupos Tempo y Tempol tuvieron un menor porcentaje de espermatozoides que respondieron a la inducción de la reacción acrosomal. Existen evidencias que ROS inducen la capacitación en espermatozoides humanos y que la adición de antioxidantes bloquea este proceso en espermatozoides de hámster (BIZE y col., 1993) a través de la inhibición de la fosforilación de proteínas en residuo tirosina (AITKEN y col., 1995).

**Figura 1. Efecto de la adición de antioxidantes en la calidad de semen ovino criopreservado.**



### Conclusiones

Los antioxidantes Tempo y Tempol reducen la producción de ROS y peroxidación li-

pídica durante la criopreservación de semen ovino, evitando la pérdida de motilidad, viabilidad y reduciendo la capacitación prematura.

### Referencias bibliográficas

- AITKEN, R.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D. y VAN DUIN, M., 1995. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J. Cell. Sci.*, 108, 2017-2025.
- BIZE, I.; SANTANDER, G.; CABELLO, P. y DRISCOLL, D., 1991. Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol Reprod*, 44, 398-403.
- DIDION, B.A.; DABRINSKY, J.; GILES, J. y GRAVES, C., 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*, 22, 51-57.
- MARA, L.; ACCARDO, C.; DATTENA, M.; BRANCA, A.; CASU, S. y CAPPAL, P., 2002. Efecto de un antioxidante en la conservación de semen ovino. *Producción Ovina y Caprina*, núm. XXVII, SEOC, 1059-1065. España.
- WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I.; ANDERSON, D.J. y LOUGHLIN, K.R., 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 49, 921-925.