



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS  
EN LA DIETA SOBRE LA CONGELACIÓN DEL SEMEN  
OVINO**

**TESIS**

Que presenta:

**Maximiliano Tun Moo**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical**

Director de tesis:

**Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde**

Conkal, Yucatán, México

Enero, 2019



TecNM



Conkal, Yucatán, México a 10 de Enero del 2019

El comité de tesis del candidato a grado: Maximiliano Tun Moo, constituido por los CC. Julio Porfirio Ramón Ugalde, Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo, Luis Leonardo Pinzón López y Benjamín Ortiz de la Rosa, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN LA DIETA SOBRE LA CONGELACIÓN DEL SEMEN OVINO**, que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde  
Director de Tesis

Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo  
Co-director de Tesis

Dr. Luis Leonardo Pinzón López  
Asesor de Tesis

Ph. D. Benjamín Ortiz de la Rosa  
Asesor de Tesis

Conkal, Yucatán, 07 de Diciembre de 2018

### **DECLARATORIA DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en las secciones de materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.



---

Maximiliano Tun Moo

## AGRADECIMIENTOS

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de los estudios de posgrado y por el financiamiento del proyecto Ciencia Básica 164592.*

*Al Instituto Tecnológico de Conkal y a los profesores de la Maestría en Ciencias de Producción Pecuaria Tropical por sus enseñanzas, por la oportunidad y apoyo brindado en su programa de posgrado*

*A mi comité de tesis: Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde, Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo, Dr. Luis Leonardo Pinzón López, PhD. Benjamín Ortiz de la Rosa*

*Al INIFAP en especial al Dr. Álvaro Domínguez Rebolledo por su apoyo incondicional quien estoy agradecido por compartirme su tiempo, sus conocimientos, su paciencia, ya que fue mi guía en este camino, por su dedicación, ayuda y apoyo incondicional.*

*Al Dr. Julio Ramón Porfirio Ugalde, por la orientación y ayuda que me brindo para la elaboración de este proyecto de tesis.*

*Al Dr. Luis Leonardo Pinzón López por su apoyo y asesoramiento para la realización de este proyecto.*

*A mis compañeros y equipo de trabajo del laboratorio Guadalupe Itzel Rodríguez Gutiérrez, Isaid Basilio Hernández y Ángel Díaz Cen por el apoyo otorgado durante el experimento.*

*A mi madre por siempre ser paciente conmigo, ser una excelente amiga y brindarme todas las comodidades posibles. .*

## DEDICATORIAS

*Al creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo de tesis a Dios.*

*Tú, quien ha sido mi mano derecha durante todo este tiempo; te agradezco por tu desinteresada ayuda, por echarme una mano cuando siempre la necesité, por aportar considerablemente en mi proyecto, Te agradezco no solo por la ayuda brinda, sino por los buenos momentos en los que convivimos Dallely Yazmin Piste Koyoc.*

*De igual forma, dedico esta tesis a mi madre Maria Elena Moo Polanco que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.*

*En especial a mi padre Andres Tun Poot por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia todo se consigue.*

*A mis hermanos que siempre han estado junto a mí y brindarme su apoyo, muchas veces poniéndose en el papel de padre.*

*A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pag.</b>
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	viii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 ANTECEDENTES .....	2
1.2.1 Clasificación de los ácidos grasos.....	2
1.2.2 Fuente de los ácidos grasos .....	3
1.2.3 Funciones generales de los ácidos grasos .....	3
1.2.4 Funciones específicas de los ácidos grasos en la fertilidad del macho .....	5
1.2.5 Criopreservación .....	7
1.2.5.1 Criopreservación de semen .....	7
1.2.6 Métodos de congelación-descongelación.....	9
1.2.7 Alteraciones del espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación .....	13
1.3 HIPOTESIS .....	15
1.4 OBJETIVOS.....	16
1.4.1 Objetivo General .....	16
1.4.2 Objetivo Específicos .....	16
1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	17
1.5.1 Diagrama del procedimiento.....	17
1.6 LITERATURA CITADA.....	18
CAPITULO II. EFECTO DEL ACEITE DE SOYA EN LA DIETA SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE OVINO PELIBUEY.....	27
2.1 RESUMEN Y ABSTRACT .....	27
2.1.1. ABSTRACT.....	28
2.2. Introducción.....	29
2.3. Materiales y métodos.....	30
2.4. Resultados y discusión .....	32
2.5. Conclusión.....	35
2.6. Agradecimiento .....	35
2.7. Referencias .....	35

## ÍNDICE DE CUADROS

### CUADROS

#### CAPÍTULO II

Cuadro 1. Efecto del aceite de soya sobre los parámetros de motilidad espermática a la descongelación (media $\pm$ error estándar).....	33
Cuadro 2. Efecto del aceite de soya en la dieta sobre la viabilidad, Actividad mitocondrial, acrosomas intactos y Host de muestras espermáticas de ovino Pelibuey post-descongelación (media $\pm$ error estándar).....	35

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del aceite de soya (AS) en la dieta, sobre la congelación del semen ovino. Durante un período experimental de 60 días, 27 ovinos de la raza Pelibuey fueron divididos en tres grupos con cada uno de los siguientes tratamientos: T1 (3% AS) alimento comercial + pasto Taiwán, T2 (6% AS) alimento comercial + pasto Taiwán y TT (Testigo) alimento comercial + pasto Taiwán. Se congelaron-descongelaron 135 eyaculados a los que se les evaluó los parámetros de motilidad (MT, MP, VAP, VCL, VSL, LIN, STR, WOB, ALH, CBF) con el sistema CASA, la integridad de la membrana plasmática (Ioduro de propidio), la actividad mitocondrial (J-C1), la integridad de los acrosomas (FICT-PSA) y la integridad de la membrana de la cola con el Host. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y con la prueba de Tukey. Se observó en el TT vs T1 y T2 una mayor ( $P < 0.05$ ) motilidad total ( $38.0 \pm 4.0$  vs  $21.7 \pm 3.3$  y  $12.5 \pm 4.0\%$ ) y motilidad progresiva ( $18.3 \pm 1.9$  vs  $10.3 \pm 1.5$  y  $6.7 \pm 1.9\%$ ), respectivamente. Por otra parte, la velocidad media registrada en los tratamientos T1 y TT ( $60.6 \pm 2.2 \mu\text{m/s}$ ;  $64.4 \pm 2.7 \mu\text{m/s}$ ;  $P > 0.05$ ) fue superior ( $P < 0.05$ ) al T2 ( $53.6 \pm 2.7$ ). Mientras la viabilidad espermática de los tratamientos T2 ( $53.00 \pm 3.4\%$ ) y TT ( $49.29 \pm 2.8\%$ ) fueron similares, resultaron distintos ( $P < 0.05$ ) al T1 ( $37.38 \pm 2.9\%$ ). Los acrosomas intactos ( $48.14 \pm 4.0\%$ ;  $46.15 \pm 4.1\%$ ;  $P > 0.05$ ) en el TT y T1, fueron mayores ( $P < 0.05$ ) al T2 ( $31.30 \pm 4.7\%$ ). La endosmosis positiva en los tratamientos TT, T1 y T2 ( $43.71 \pm 3.2$  vs  $22.54 \pm 3.3$  y  $25.10 \pm 3.8\%$ ), respectivamente, fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el TT. En los demás parámetros no se encontraron diferencias. La inclusión del aceite de soya en la dieta en concentraciones del 3 y 6 %, no mejoró la criopreservación del semen ovino.

**Palabras clave:** Aceite de soya, ovinos, semen, criopreservación.



## ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of soybean oil (AS) supplemented diet, on the criopreservation of ram semen. Twenty seven Pelibuey ram were divided into three treatments: T1 (3% AS) commercial feed + Taiwan pasture, T2 (6% AS) commercial feed + Taiwan pasture and TT (soybean oil free) control) commercial feed + Taiwan, during an experimental period of 60 days. One hundred and thirty five ejaculates were frozen-thawed and evaluated for motility parameters (MT, MP, VAP, VCL, VSL, LIN, STR, WOB, ALH, CBF) with the CASA system, the integrity of the plasma membrane (Iodide propidium), mitochondrial activity (J-C1), integrity of acrosomes (FICT-PSA) and the integrity of the tail membrane (Host). The results were analyzed by ANOVA and the means were compared with the Tukey test. Total motility ( $38.0 \pm 4.0$  vs  $21.7 \pm 3.3$  and  $12.5 \pm 4.0\%$ ) and progressive motility ( $18.3 \pm 1.9$  vs  $10.3 \pm 1.5$  and  $6.7 \pm 1.9\%$ ) were higher ( $P < 0.05$ ) in the TT than T1 and T2, respectively. On the other hand, the average speed recorded in the T1 and TT treatments ( $60.6 \pm 2.2 \mu\text{m} / \text{s}$ ,  $64.4 \pm 2.7 \mu\text{m} / \text{s}$ ,  $P > 0.05$ ) were higher ( $P < 0.05$ ) than T2 ( $53.6 \pm 2.7$ ). While the sperm viability of the treatments T2 ( $53.00 \pm 3.4\%$ ) and TT ( $49.29 \pm 2.8\%$ ) were similar, they were different ( $P < 0.05$ ) from T1 ( $37.38 \pm 2.9\%$ ). The intact acrosomes ( $48.14 \pm 4.0\%$ ;  $46.15 \pm 4.1\%$ ;  $P > 0.05$ ) in the TT and T1 were higher ( $P < 0.05$ ) than T2 ( $31.30 \pm 4.7\%$ ). The positive endosmosis in the treatments TT, T1 and T2 ( $43.71 \pm 3.2$  vs  $22.54 \pm 3.3$  and  $25.10 \pm 3.8\%$ ), respectively, was higher ( $P < 0.05$ ) in the TT. In the other parameters, no differences were found. Cryopreservation of ram semen doesn't improve with a dietary supplementation with soybean oil at 3 and 6%.

**Key words:** Soybean oil, ram, semen, criopreservation.

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1.1 INTRODUCCIÓN

La nutrición y la reproducción generalmente se encuentran vinculadas, debido a que el éxito reproductivo de un animal depende de su estado nutricional. A lo largo de los años se ha estudiado el efecto de esta asociación, a menudo mediante la alteración de las dietas de diversas maneras con el fin de observar los cambios resultantes en los parámetros reproductivos de los animales (Surai *et al.*, 2000; Yeste *et al.*, 2011). Uno de los cambios más significativos, es la adición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) a la dieta. Estudios recientes indican que diferentes fuentes de PUFAs en la dieta de rumiantes, como las grasas de origen animal y vegetal (oleico, linoleico y linolenico), influye en algunas funciones reproductivas de la hembra, como un aumento en el diámetro y el número de folículos presentes en el ovario, así como un período más corto para la primera ovulación (Nottle *et al.*, 1986; Stewart and Oldman, 1986; Letelier *et al.*, 2008) y un efecto positivo sobre la fertilidad (Mattos *et al.*, 2000; Encinias *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2009). Asimismo, el efecto de los ácidos grasos se ha descrito sobre los parámetros reproductivos en los machos, observado un aumento del libido (Kelso *et al.*, 1997; Castellano *et al.*, 2010), la calidad espermática (Yeom *et al.*, 2003; Mitre *et al.*, 2004; Samadian *et al.*, 2010), la concentración (Alizadhe *et al.*, 2014; Fair *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017), la motilidad (Harris *et al.*, 2005; Estiene *et al.*, 2008; Gliozzi *et al.*, 2009; Yeste *et al.*, 2011; Samadian *et al.*, 2012; Alizadhe *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2017), la viabilidad espermática (Alizadhe *et al.*, 2014; Esmaili *et al.*, 2014; Fair *et al.*, 2014), en la fertilidad y reducción en el número de morfoanomalías (Estienne *et al.*, 2008). Estas mejoras en la calidad seminal, pueden deberse a las modificaciones que se presentan en la composición de las membranas de los espermatozoides y del plasma seminal de aquellos animales que son suplementados con PUFAs (Paulenz *et al.*, 1995; Blesbois *et al.*, 1997; Samadia *et al.*, 2010; Yeste *et al.*, 2011; da Rocha *et al.*, 2009). Los PUFAs, principalmente los de 20 y 22 carbonos, como los ácidos omegas 3 y omega 6, se encuentran en abundancia en la membrana espermática de los espermatozoides, proporcionando fluidez y permeabilidad a las membranas para llevar a cabo la fertilización (Esmaili *et al.*, 2015; Wathes *et al.*, 2007). Asimismo, los ácidos grasos también se encuentran en el plasma seminal de varias especies, incluyendo al ser humano

(Wathes *et al.*, 2007), los cuales son importantes para el desarrollo y protección de las células espermáticas (Leahy y de Graaf, 2012). Estudios recientes han demostrado que la ingesta de los PUFAs produce modificaciones en la membrana plasmática de los espermatozoides, así como también en el plasma seminal. Estas modificaciones representan un aumento de PUFAs en las membranas de los espermatozoides, así como en el plasma seminal, lo cual podría ser perjudicial para los espermatozoides. Esto es debido a que, los PUFAs son muy susceptibles a la lipoperoxidación causada por los radicales libres que se producen durante los procesos de congelación (Wathes *et al.*, 2007).

En la especie ovina, la fertilidad del semen congelado es baja y se sabe que el espermatozoide ovino es más sensible a la temperatura que en otras especies (Cardozo *et al.*, 2009). Sin embargo, aún se desconoce el papel que puedan jugar las variaciones de estos ácidos grasos en la mantención de la integridad plasmática y acrosomal del espermatozoide debido a que los ácidos grasos son susceptibles a la peroxidación y con ello la ocurrencia de radicales libres (Safarinejad *et al.*, 2010). Por lo tanto, el presente estudio fue evaluar el efecto del aceite de soya (3 y 6%) en la dieta, sobre la congelación del semen ovino.

## **1.2 ANTECEDENTES**

### **1.2.1 Clasificación de los ácidos grasos**

Los ácidos grasos son compuestos ácidos carboxílicos saturados o insaturados, con cadenas carbonadas que varían entre 2 y 36 átomos de carbono. Estas últimas contienen un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el extremo opuesto (n u omega) (Castellano *et al.*, 2010). Los ácidos grasos insaturados se dividen en monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados (PUFA). Los PUFA tienen más de un doble enlace en su molécula y sobre la base de su estructura química se diferencian tres grupos, los omega 3 (n-3), los omega 6 (n-6) y los omega 9 (n-9), en los que el primer doble enlace se encuentra a 3, 6 ó 9 carbonos del extremo metilo de la molécula, respectivamente (Catalá, 2013). El ácido oleico (C18:1 n-9) es MUFA por contener solamente una doble ligadura en el carbono 9 a partir del extremo metilo terminal de la molécula. Los tejidos animales pueden sintetizar el ácido oleico (C18:1 n-9). Sin embargo, tanto los animales como el hombre no pueden realizar la síntesis de novo de los ácidos grasos n-3 o n-6 ya que carecen de las enzimas desaturadas apropiadas

para cada uno de ellos (Catalá, 2013; Murray *et al.*, 2006). Estos ácidos grasos se denominan esenciales (AGE) y se deben obtener a partir de una fuente dietética (Samadian *et al.*, 2012; Morimoto *et al.*, 2005). El ácido linoleico (LA C18:2 n-6), y los ácidos  $\alpha$ -linolénico (ALA C18:3 n-3), docosahexaenoico (DHA C22:6 n-3) y eicosapentaenoico (EPA C20:5 n-3), son los representantes principales en las dietas de las familias 6 y 3 respectivamente (Beare-Rogers *et al.*, 2001).

### **1.2.2 Fuente de los ácidos grasos**

El ácido linoleico (LA), es abundante en aceites vegetales como aceite de maíz, girasol, cártamo y canola (Rooke *et al.*, 2001), es el precursor del ácido araquidónico (AA C20:4 n-6). Asimismo, el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA), se encuentra en los cloroplastos principalmente en los vegetales verdes y hierbas. El aceite de linaza y el de chía son aceites vegetales que contienen altos niveles de ALA, así como también cantidades significativas de LA (Gurr *et al.*, 2002). De tal manera, el EPA y el DHA son adicionados directamente de la dieta o producidos en el organismo a partir del ALA (Sargent, 1997). Las algas son los productores primarios de EPA y DHA en la naturaleza. Los peces consumen las algas convirtiéndose de esta manera en ricas fuentes de n-3. Por consiguiente, los aceites de pescado ofrecen un suplemento dietético de fácil disponibilidad de EPA y DHA (Yeste *et al.*, 2011; Rooke *et al.*, 2001; Sargent *et al.*, 1997).

### **1.2.3 Funciones generales de los ácidos grasos**

La composición de ácidos grasos en los animales es especie y tejido específico. Los ácidos grasos se encuentran en el organismo formando cadenas largas de 12 a 24 átomos de carbono. Aproximadamente, la mitad son insaturados y contienen de 1 a 6 dobles enlaces. En humanos, el tejido adiposo es el reservorio principal de ácidos grasos, considerado el patrón estándar para representar los ácidos grasos de la dieta. Los triacilgliceroles en el tejido adiposo contienen como ácido graso predominante al ácido oleico (C18:1 n-9), seguido por el ácido palmítico (C16:0) y el LA (Venegas-Calderón *et al.*, 2010).

El LA es el PUFA más abundante, representando entre el 12 al 16 % del total (Hodson *et al.*, 2008). Dentro de los n-3, el ALA es el predominante, constituyendo alrededor del 1 %. Sólo pequeñas cantidades de EPA y DHA están presentes en el tejido adiposo, lo que sugiere una capacidad de almacenamiento limitada de estos ácidos grasos n-3 de cadena larga e implica la necesidad de una continua suplementación a través de la dieta (Arterburn *et al.*, 2006; Clifton *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 1999).

Los ácidos grasos en forma de fosfolípidos son componentes estructurales de las membranas celulares. Su perfil influye en la fluidez y espesor de las mismas, y por lo tanto, en la actividad de las proteínas asociadas a la membrana (enzimas, canales iónicos, transportadores, receptores) (Geerling *et al.*, 1999). Las moléculas fosfolípídicas están compuestas por una molécula de glicerol unida a una parte hidrofóbica (dos moléculas de ácido graso) y conectada a través del ácido fosfórico a una cabeza hidrofílica (colina, etanolamina, serina, inositol). Esto permite la disposición especial de la bicapa lipídica que incorpora moléculas hidrofóbicas en su parte interna e hidrofílicas en la externa. La estabilidad de la membrana se incrementa por la presencia de moléculas como el colesterol y proteínas específicas. Mientras mayor contenido haya de dichas moléculas, menor será la fluidez de la membrana. Por lo tanto, el grado de insaturación del ácido graso también actúa en la fluidez. La membrana tiene mayor fluidez por un aumento en la poliinsaturación de los lípidos (mayor número de dobles enlaces), que puede promover un incremento en la actividad metabólica de las células, tejidos y animales como consecuencia de una mayor actividad de las proteínas de membrana (Nelson *et al.*, 2013). Además, los ácidos grasos que tienen doble unión en configuración *cis*, llevan al plegamiento de la cadena hidrocarbonada en aproximadamente 60° por cada doble enlace. En consecuencia, las cadenas ocupan un lugar mayor en la membrana que produce el incremento de la fluidez. Contrariamente, los ácidos grasos saturados o insaturados, pero en configuración *trans*, cuyas cadenas son rectas y ocupan menos espacio, disminuyen la fluidez de la membrana (Almaida-Pagán *et al.*, 2014).

Los ácidos grasos esenciales (AGE) intervienen en diversos procesos fisiológicos como el crecimiento, la reproducción (Rooke *et al.*, 2001). Dentro de las funciones más importantes para destacar tenemos que los PUFA de 20 y 22 átomos de carbono (que incluyen el AA, EPA y DHA) son precursores de moléculas con actividad biológica tales como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, lipoxinas, resolvinas y neuroprotectinas.

Asimismo, son elementos fundamentales para la formación de hormonas esteroideas y para el transporte de las vitaminas liposolubles A, D, E y K (Rooke *et al.*, 2001; Kremmyda *et al.*, 2011).

#### **1.2.4 Funciones específicas de los ácidos grasos en la fertilidad del macho**

Los ácidos grasos n-3, particularmente los de cadena larga, son nutrientes esenciales a lo largo de toda la vida. En machos como hembras la deficiencia de AGE causa infertilidad y, entre otras consecuencias, resulta en bajo contenido de AA, es fundamental para la formación de eicosanoides (Hodson *et al.*, 2008; Almaida-Pagán *et al.*, 2014). En todas las especies, los fosfolípidos son el mayor componente lipídico de las membranas espermáticas, y contienen grandes cantidades de PUFA (Sampath *et al.*, 2005; Scott, 1973; Darin-Bennet *et al.*, 1974). En la mayoría de los mamíferos los predominantes son los de la serie n-3 (más del 60 % del total de ácidos grasos) (Kelso *et al.*, 1997; Castellini *et al.*, 2006). Así, el DHA se encuentra en altas cantidades en el espermatozoide de primates, toros y carneros. (Gadella *et al.*, 2008). La composición de lípidos en la membrana del espermatozoide juega un papel muy importante en las modificaciones fisicoquímicas que ocurren durante la fertilización (Lin *et al.*, 1993). En humanos, el DHA se considera esencial para la fertilidad, ya que reducciones en la cantidad de este ácido graso en los espermatozoides se han asociado con alteraciones en la motilidad, capacidad fertilizante y número total de espermatozoides (Parks *et al.*, 1992). Se requieren altos contenidos de PUFA en la membrana espermática con el fin de brindarle al espermatozoide la fluidez necesaria para fertilizar (Nissen *et al.*, 1983). Por lo tanto, los PUFA son vulnerables al ataque de las especies reactivas del oxígeno (ROS), iniciando una cascada de peroxidación de lípidos con formación de radicales libres, que se conoce como estrés oxidativo. Los ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados como el EPA, DHA, y AA poseen alto riesgo de ser oxidados. La peroxidación lipídica puede comprometer seriamente la integridad funcional de las células, en los espermatozoides este daño se asocia con reducción de la fertilidad (Aitken *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1989; Aitken *et al.*, 1993). Los fluidos acompañan al espermatozoide en su paso por el tracto reproductivo masculino están formados por una gran cantidad de enzimas antioxidantes altamente especializadas (Alvares *et al.*, 1995), brindándole protección a los espermatozoides de mamíferos contra el estrés oxidativo. A pesar de la correlación existente entre el daño

oxidativo y los PUFA, se ha mencionado que la incorporación de estos últimos en los fosfolípidos conduce a cambios conformacionales y reduce la disponibilidad de dobles enlaces para la lipoperoxidación (Almaida-Pagán *et al.*, 2014). Sin embargo, faltan aún más estudios que soporten esta función de los ácidos grasos insaturados. Finalmente, el aumento en la ingesta de n-3 produce una mayor transcripción de enzimas antioxidantes tales como proteína de desacoplamiento, glutatión transferasa y superóxido dismutasa, e inhibe la transcripción de enzimas que participan en la producción de ROS y especies reactivas de oxígeno (Almaida-Pagán *et al.*, 2014).

Por lo anterior, la suplementación dietaria con PUFA puede influenciar la función reproductiva a través de una variedad de mecanismos. Por ejemplo, proveen los precursores para la biosíntesis de prostaglandinas o esteroides que participan en la regulación de dicha función (Rhemrev *et al.*, 2000).

Los ácidos grasos n-6 estimulan a las células de Leydig a través de efectos directos sobre la producción esteroideogénica o indirectos por medio de las prostaglandinas (Castellano *et al.*, 2011), a su vez provocando un aumento en la síntesis de testosterona (Lin, 1985). Sin embargo, se han descrito efectos opuestos de los PUFA con respecto a la esteroideogénesis y aún es incierto el mecanismo de acción específico de los n-3 sobre las hormonas reproductivas en las distintas especies domésticas.

En rumiantes, la biohidrogenación de PUFA es parte de la digestión de lípidos en el rumen. Así, los lípidos son ampliamente alterados, lo que resulta en marcadas diferencias entre el perfil de ácidos grasos de los lípidos de la dieta (en su mayoría PUFA) y los lípidos que salen del rumen (principalmente ácidos grasos saturados) (Stocco *et al.*, 2005). No obstante, Childs (2008), demostraron que la suplementación con n-3 en vaquillonas en el rumen en condiciones semi protegido aumentó significativamente la concentración de n-3 en diferentes tejidos del tracto reproductivo comparado con animales sin la adición de n-3, sugiriendo de esta manera una transferencia exitosa de ácidos grasos desde la dieta (Esmaeili *et al.*, 2012).

La suplementación de AGE en la dieta para mejorar las características reproductivas en los machos, obteniendo resultados favorables tales como: aumento en la proporción de espermatozoides con motilidad progresiva y acrosomas normales, reducción de la cantidad de morfoanomalías espermáticas, aumento de la fertilidad (Estienne *et al.*, 2008; Fair *et al.*, 2014; Beare-Rogers *et al.*, 2001).

Esto sugiere que la transferencia de AGE desde la dieta hacia los espermatozoides es efectiva. Altos niveles de n-3 en la dieta produjeron un incremento de los mismos en las membranas espermáticas, lo que se relacionó con un mejoramiento de las cualidades seminales y una mayor habilidad para fertilizar (Marinero *et al.*, 1996; Childs *et al.*, 2008).

Al respecto, se ha sugerido que los n-3, especialmente el DHA, desarrollan un papel importante en la formación de espermatozoides funcionales (Samadian *et al.*, 2012).

## **1.2.5 Criopreservación**

### **1.2.5.1 Criopreservación de semen**

La criopreservación de semen de animales domésticos ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, particularmente en los programas de mejoramiento genético. El proceso de criopreservación causa daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables (Quinn *et al.*, 1969).

Por lo tanto, es de esperar que al utilizarse la inseminación artificial con semen congelado la fertilidad obtenida es menor en comparación al utilizar semen fresco (Watson, 2000).

El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a  $-130^{\circ}\text{C}$  para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros *et al.*, 2002). La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí (Boiso, 2001).



La criopreservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades físico- químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Vila, 1984). Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula (Vila y García, 1983; Holt, 2000).

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de crioconcentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso, 2001). El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente (Grossmann y Santaló, 1991). Cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican (Vila y Carretero, 1985). Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución. Este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células (Boiso, 2001).

La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente (Boiso, 2001). Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1984). Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso, 2001). La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur, 1984). Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular. La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es

específica para cada tipo celular. (Holt, 2000). La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar *et al.*, 2003).

Mazur (1984) postula que la lesión celular crioinducida podría explicarse también por la acción combinada de factores físicos. Los factores físicos a los que se refiere son el estrés osmótico y la presión que sufren las células en sus membranas por la expansión del hielo. Esta presión produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal. Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16°C alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991).

### **1.2.6 Métodos de congelación-descongelación**

Desde los primeros intentos para congelar el espermatozoide de macho cabrío realizados por Smith y Polge (1950) y Baker (1957), en los que los índices de fertilidad eran muy bajos y por tanto poco prácticos, se ha desarrollado diversos estudios para mejorar los métodos de congelación con el fin de aumentar la viabilidad del espermatozoide.

En los mamíferos, la criopreservación del semen se caracteriza por una fertilidad reducida en comparación con el semen fresco (Watson, 2000). Factores como cambios en la temperatura del medio de congelación, así como la osmolaridad y toxicidad de los crioprotectores empleados y la formación de cristales de hielo intra y extra celulares, son sólo algunos de los principales factores responsables de la alteración de la estructura y funcionalidad de la membrana espermática observada en los espermatozoides criopreservados (Watson, 2000).

En el ovino, a pesar de un porcentaje relativamente alto (40-60 %) de espermatozoides que conservan su motilidad tras la descongelación, sólo alrededor del 20-30 % permanecen biológicamente intactos (Salamon y Maxwell, 2000).

Dentro de la misma especie animal, existe una amplia variabilidad interindividual respecto a la tolerancia de los gametos a los procesos de criopreservación. En este contexto, numerosos autores distinguen entre “buenos y malos congeladores”, refiriéndose a la congelabilidad de los espermatozoides, es decir, cómo van los gametos a soportar el proceso de criopreservación. Thurston et al. (2002) han demostrado que estas diferencias interindividuales al proceso de criopreservación están genéticamente determinadas. Además, se ha observado que la variabilidad entre individuos podría estar relacionada con una distinta composición lipídica y proteica de la membrana espermática (White et al., 1993; Waterhouse et al., 2006).

(Marco-Jiménez et al., 2006), debido probablemente a que han perdido parte del contenido intracelular. En un primer momento, durante la fase de equilibración, la célula se comprime como consecuencia de la salida de agua al medio extracelular y posteriormente se hincha como respuesta al paso del agua y de los crioprotectores al interior (Agca et al., 2002). Sin embargo, en la congelación la célula vuelve a reducirse, debido a la salida de agua al exterior. Estas observaciones sugieren que las dimensiones de la cabeza espermática de muestras individuales de semen pueden ser un indicador de la criosupervivencia espermática.

### **Proceso de congelación**

Durante el proceso de congelación existe una serie de cambios físicos y químicos en el espermatozoide, los cuales afectan su integridad y función y por ende la capacidad para fertilizar el ovocito (Samper, 2009).

De acuerdo a la velocidad de enfriamiento y descongelación los métodos de congelación pueden clasificarse en protocolos de congelación lenta con descongelación rápida,

congelación lenta con descongelación lenta, congelación ultrarápida y vitrificación (Boiso, 2001).

En los dos primeros, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos, y el descenso de la temperatura se realiza lentamente, en un congelador programable. La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace rápidamente a temperatura ambiente o en un baño maría a 30°C, para evitar la recristalización (Boiso, 2001).

La congelación ultrarápida fue originalmente descrita para la congelación de embriones, por Trounson (1986). Implica la rápida deshidratación celular, utilizando altas concentraciones de crioprotector, seguida de la inmersión en nitrógeno líquido. La vitrificación (Rall y Fahy, 1985) se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados en muy altas concentraciones, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo.

La congelación de semen ovino emplea el protocolo de congelación lenta con descongelación rápida. Este protocolo está conformado por el proceso de enfriamiento, el proceso de congelamiento y el proceso de descongelamiento (Santiani, 2004).

El enfriamiento se da en dos fases, en la primera el semen diluido es enfriado hasta temperaturas de 5°C, para luego, en una segunda fase que permite la estabilización del semen diluido con la adición de sustancias crioprotectoras (Salamon y Maxwell, 2000).

El período de disminución de temperatura entre 35 a 5°C se da entre a 0.5 a 3 horas (Aisen *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2003a) y tiene por finalidad el reducir la motilidad espermática (Fiser y Fairfull, 1986). Para permitir la estabilización celular, se mantiene el semen a 5°C por un período de 0.5 a 1.5 horas a antes de iniciar el congelamiento (Aisen *et al.*, 2000). El proceso de congelamiento empieza cuando la temperatura llega a 5°C y se realiza exponiendo las pajuelas a los vapores de nitrógeno líquido (Salamon y Maxwell, 2000).

Maxwell *et al.* (1995), obtienen un mayor porcentaje de movimiento y viabilidad espermática a la descongelación, cuando las pajuelas de 0.25 y 0.5 ml son colocadas a 6 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido.

### **Proceso de descongelación**

La descongelación del semen es tan importante como el congelamiento, porque los espermatozoides tienen que atravesar nuevamente el “rango crítico de temperatura” (Salamon y Maxwell, 2000). Por consiguiente, el descongelamiento rápido es necesario para prevenir la recristalización de cualquier cristal de hielo intracelular presente en el espermatozoide. En algunos trabajos, la descongelación de pajuelas de semen ovino se ha realizado en baño maría a temperaturas de 37- 50°C durante segundos hasta 5 minutos (Fiser *et al.*, 1981; Molinia *et al.*, 1994a, 1994b; Aisen *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2000; El-Alamy y Foote, 2001; Gil *et al.*, 2003b; Kumar *et al.*, 2003). Por ello, el descongelamiento a una temperatura menor a 37°C previene el estrés osmótico y mantiene la integridad de membrana en espermatozoides bovinos (Correa *et al.*, 1996).

De acuerdo con Mazur (1985). El proceso de descongelación, es tan importante como la fase de refrigeración y congelación, en cuanto al impacto que tiene sobre la viabilidad del espermatozoide. Las variaciones en la temperatura de congelación y descongelación influyen inevitablemente en la proporción de espermatozoides móviles, provocando además cambios estructurales, bioquímicos y funcionales en la célula espermática.

Según Salamon y Maxwell (1995a) la mayoría de los investigadores utilizan temperaturas entre los 38-42°C para descongelar esperma envasado en minipajuelas. Sin embargo, otros autores realizan la descongelación a temperaturas de 70-75°C (Aamdal y Andersen, 1968; Grotte *et al.*, 1992).

Todo esto indica, que una descongelación rápida a temperaturas elevadas provocará una mejor recuperación espermática con un menor daño celular, por pasar más rápidamente la temperatura crítica (-60°C a -15°C) donde se producirá el mayor daño sobre el espermatozoide.

### **1.2.7 Alteraciones del espermatozoide durante los procesos de congelación y descongelación**

La reducción de la capacidad fecundante está relacionada a dos razones puntuales, una baja viabilidad post-descongelamiento y un trastorno subletal en una proporción de espermatozoides sobrevivientes (Watson, 2000).

La baja viabilidad se debe a factores como: cambio de temperatura, estrés osmótico, la formación de hielo intracelular y la toxicidad. El cambio de temperatura produce un estrés en la membrana, posiblemente relacionado con un cambio de fase en los lípidos (Watson, 2000). Las lesiones producidas por el congelamiento de las membranas antes y durante este proceso sólo se invierten parcialmente después del descongelamiento. Las proteínas integrales de la membrana son agrupadas por la separación de la fase lipídica, y esto puede alterar su función, especialmente la función de las proteínas de canales iónicos. Es por eso que la permeabilidad de la membrana aumenta después del congelamiento (Watson, 2000). La regulación de calcio es claramente afectada y altera la función celular. En casos severos, es incompatible con la viabilidad celular (Bailey y Buhr, 1994). Como ya se mencionado anteriormente el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular producen una disminución de la viabilidad espermática. Finalmente, la toxicidad de algunas sustancias como el glicerol también producen la muerte de los espermatozoides (Watson, 2000).

Un porcentaje de los espermatozoides sobrevivientes presenta un daño funcional que está relacionado con la calidad de la membrana, daños oxidativos, integridad de los receptores de membrana e integridad de la estructura nuclear, (Watson, 2000). Esto se ve reflejado en la motilidad, capacitación espermática e integridad acrosomal.

Una de las principales características de los espermatozoides criopreservados es la disminución de la proporción de células móviles (Watson, 2000). La motilidad post descongelamiento se reduce a valores entre 40 a 50% (Molinia y col., 1994a; 1994b; Hellemann y Jara, 1997; El-Alamy y Foote, 2001; Salamon y Maxwell, 2000).

El proceso de criopreservación está relacionado a la capacitación espermática. Los espermatozoides ovinos luego del proceso de congelamiento-descongelamiento muestran un

alto porcentaje de capacitación en comparación con espermatozoides de semen fresco (Pérez *et al.*, 1996; Maxwell y Watson, 1996). En ese sentido, el porcentaje de espermatozoides capacitados en semen fresco varía entre 5 a 20%, mientras que en espermatozoides descongelados el porcentaje de capacitación puede llegar hasta 90% (Pérez *et al.*, 1996), aunque varía entre 40 a 60% (Gil *et al.*, 2000) In vitro, la capacidad fecundante de espermatozoides ovinos descongelados es superior en comparación con espermatozoides de semen fresco (Gillan y Maxwell, 1999). Esto estaría confirmando que un alto porcentaje de espermatozoides ovinos luego del proceso de congelamiento-descongelamiento ya estarían capacitados.

En relación a la integridad acrosomal, la criopreservación aumenta ligeramente la reacción acrosomal en espermatozoides viables de ovinos. Alrededor del 10% (De las Heras *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1996; D'Alessandro *et al.*, 2001; Gil *et al.*, 2000, 2003a, 2003b) de espermatozoides vivos luego del descongelamiento experimentan reacción acrosomal, en comparación con la reacción acrosomal menor a 4% en semen fresco de ovino (Pérez *et al.*, 1996; Valcárcel *et al.*, 1997; Paulenz *et al.*, 2002)

Por añadidura a los efectos directos letales sobre la célula espermática sometida a congelación-descongelación, los métodos convencionales de valoración pueden informar acerca de la criosupervivencia espermática cuando sus resultados se comparan con los eyaculados en fresco. Por ejemplo, el movimiento espermático es menor, de peor calidad y se mantiene durante menos tiempo en el esperma congelado-descongelado que en el fresco, indicando una alteración de las membranas durante el proceso (Dorado, 2003).

### **1.3 HIPÓTESIS**

La inclusión del aceite de soya en la dieta podría mejorar la criopreservación del semen de ovino.



## **1.4 OBJETIVOS**

### **1.4.1 Objetivo General**

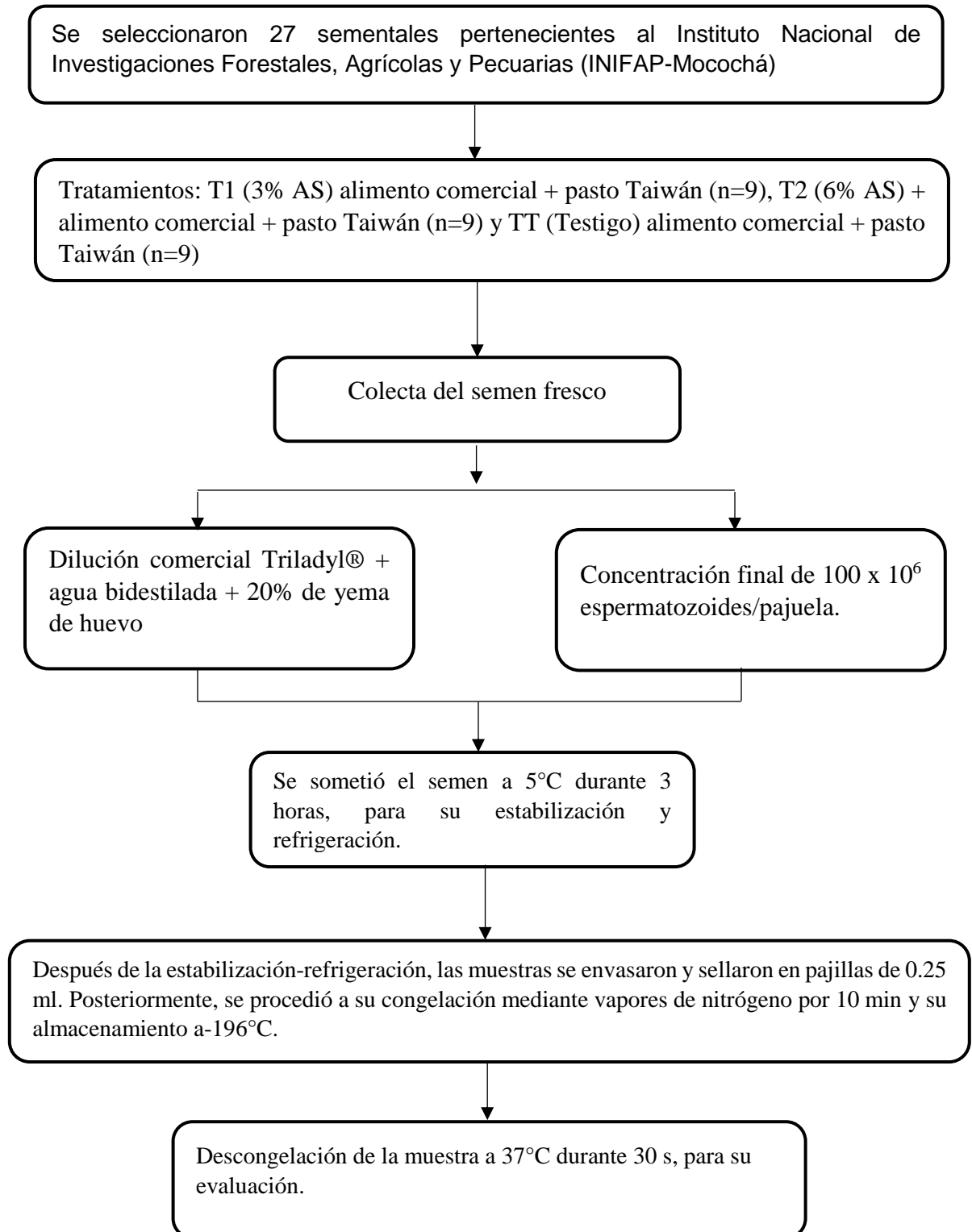
Evaluar el efecto del aceite de soya en la dieta, sobre la criopreservación del semen ovino Pelibuey.

### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Evaluar los parámetros de motilidad espermática y la concentración espermática, mediante el sistema computarizado CASA.
- Analizar la viabilidad, actividad mitocondrial, integridad de los acrosomas y la integridad de la membrana plasmática de la cola (Host).

## 1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1.5.1 Diagrama del procedimiento



## 1.6 LITERATURA CITADA

- Agca Y, Gilmore J, Byers M, Woods EJ, Liu J, Critser JK. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biol Reprod.* 2002;67: 1493–1501.
- Aisen, E.G., Álvarez, H.L., Venturino, A. y Garde, J.J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology.* 53, 1053-1061.
- Aitken RJ, Baker HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans. *Human Reprod.* 1995; 10:1736-9.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989; 40: 183-7.
- Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Molec Reprod Develop.* 1993; 35: 302-15.
- Almaida-Pagán PF, De Santis C, Rubio-Mejía OL, Tocher DR. Dietary fatty acids affect mitochondrial phospholipid compositions and mitochondrial gene expression of rainbow trout liver at different ages. *J Comp Physiol B.* 2014.
- Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molec Reprod Develop.* 1995; 42: 334-6.
- Andersen LF, Solvoll K, Johansson LR, Salminen I, Aro A, Drevon CA. Evaluation of a food frequency questionnaire with weighed records, fatty acids, and alpha-tocopherol in adipose tissue and serum. *Am J Epidemiol.* 1999; 150: 75-87.
- Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n3 fatty acids in humans. *American J Clin Nutr.* 2006; 83(suppl): 1467S-76S.

- Beare-Rogers J, Dieffenbacher A, Holm JV. Lexicon of lipid nutrition (IUPAC Technical Report). *Pure App Chem.* 2001; 73: 685-744.
- Blesbois E, Lessire M, Grasseau I, Hallouis JM, Hermier D. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biol Reprod.* 1997; 56: 1216-20.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 18, 127-131.
- Cardozo JA, Grasa P, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Revista Corpoica–Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 2009; 10:51-9.
- Castellano CA, Audet I, Bailey JL, Chouinard PY, Laforest JP, Matte JJ. Effect of dietary n-3 fatty acids (fish oils) on boar reproduction and semen quality. *J Anim Sci.* 2010; 88(7): 2346-55.
- Castellano CA, Audet I, Bailey JL, Laforest JP, Matte JJ. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. *Theriogenology* 2010; 74(8):1482-90.
- Castellano CA, Audet I, Laforestc JP, Matteb J, Suhd M. Fish oil diets alter the phospholipid balance, fatty acid composition, and steroid hormone concentrations in testes of adult pigs. *Theriogenology* 2011; 76(6): 1134-45.
- Castellini C, Cardinali R, Dal Bosco A, Minelli A, Camici O. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. *Theriogenology* 2006; 65(4): 703-12.
- Catalá A. Five Decades with Polyunsaturated Fatty Acids: Chemical Synthesis, Enzymatic Formation, Lipid Peroxidation and Its Biological Effects. *J Lipids.* 2013.

- Childs S, Hennessy AA, Sreenan JM, Wathes DC, Cheng Z, Stanton C, Diskin MG, Kenny DA. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. *Theriogenology* 2008; 70: 595-611.
- Clifton PM, Keogh JB, Noakes M. Trans fatty acids in adipose tissue and the food supply are associated with myocardial infarction. *J Nutr.* 2004; 134: 874-9.
- da Rocha AA, da Cunha ICN, Ederli B, Albernaz AP, Quirino CR. Effect of daily food supplementation with essential fatty acids on canine semen quality. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44(2): 313-5.
- Darin-Bennet A, Poulos A, White IG. The phospholipids and phospholipid bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1974; 41: 471-4.
- Esmaeili V, Shahverdi AH, Alizadeh AR, Alipour H, Chehrazai M. Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. *Andrologia* 2012.
- Estienne MJ, Harper AF, Crawford RJ. Dietary supplementation with a source of omega-3 fatty acids increases sperm number and the duration of ejaculation in boars. *Theriogenology.* 2008; 70: 70-6.
- Fair S, Doyle DN, Diskin MG, Hennessy AA, Kenny DA. The effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation of rams on semen quality and subsequent quality of liquid stored semen. *Theriogenology* 2014; 81(2): 210-219.
- Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, Brewis IA. Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *International J Develop Biol.* 2008; 52(5-6): 473-80.

- Geerling BJ, van Houwelingen AC, Badart-Smook A, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Fat intake and fatty acid profile in plasma phospholipids and adipose tissue in patients with Crohn's disease, compared with control. *Am J Gastroen.* 1999; 94: 410-7.
- Gil, J., Rodríguez-Ieazoqui, M., Lundeheim, N., Söderquist, L. y Rodríguez- Martínez, H. (2003a). Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology.* 59, 1157-1170.
- Gliozzi TM, Zaniboni L, Maldjian A, Luzi F, Maertens L, Cerolini S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology.* 2009; 71(6): 910-9.
- Grossmann, M., Santaló, J. (1991). Aspectes teòrics de la congelació de gámets i d'embrions. *Treb Soc Cat Biol.* 42, 87-108.
- Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN. Lipid Biochemistry: An Introduction. 5th ed. Oxford, UK: *Blackwell Science Ltd*, 2002.
- Harris MA, Baumgard LH, Arns MJ, Webel SK. Stallion spermatozoa membrane phospholipid dynamics following dietary n-3 supplementation. *Anim Reprod Sci.* 2005; 89(1-4): 234-7.
- Hodson L, Murray Skeaff C, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lip Res.* 2008; 47: 348-380.
- Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- Kelso KA, Cerolini S, Speake BK, Cavalchini LG, Noble RC. Effects of dietary supplementation with  $\alpha$ -linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks on age. *J Reprod Fertil.* 1997; 110: 53-9.

- Kelso KA, Redpath A, Noble RC, Speake BK. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *Reprod Fertility*. 1997; 109: 1-6.
- Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011; 155 (3): 195-218.
- Kumar, S., Millar, J.D. y Watson, P.F. (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.
- Leahy T, de Graaf S. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reproduction in domestic animals*. 2012; 47(s4):207-13.
- Lin DS, Connor WE, Wolf DP, Neuringer M, Hachey DL. Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. *J Lipid Res*. 1993; 34(3): 491-9.
- Lin T. Mechanism of action of gonadotropin-releasing hormone stimulated Leydig cell steroidogenesis III. The role of arachidonic acid and calcium/phospholipid dependent protein kinase. *Life Sci*. 1985; 36(13): 1255-64.
- Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gómez EA, Vicente JS. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52:295-304.
- Marinero MJ, Colas B, Prieto JC, Lopez Ruiz MP. Different sites of action of arachidonic acid on steroidogenesis in rats Leydig cells. *Molec Cel Endocrin*. 1996; 1: 193-200.

- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanism and implications. *The American Journal of Physiology*. 247, 125-142.
- Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T. y Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. *Theriogenology*. 57, 327-344.
- Morimoto KC, Van Eenennaam AL, DePeters EJ, Medrano JF. Hot topic: endogenous production of n-3 and n-6 fatty acids in mammalian cells. *Am Dairy Sci Ass*. 2005; 88: 1142-6.
- Morte M, Rodríguez A, Soares D, Rodrigues A, Gamboa S, Ramalho-Santos J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. *Anim Reprod Sci* 2008; 106(1-2):36-47
- Murray RK, Granner DK, Rodwell VW, Botham KM, Mayes PA. Biosynthesis of fatty acids and eicosanoids. En Harper's Illustrated Biochemistry, 27th ed. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. (Eds). pp. 196-208. McGraw Hill, New York, 2006.
- Neild D, Gadella B, Colendrander B, Agüero A, Brouwers J. lipid peroxidation in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2002; 58:295-298.
- Nelson DL, Cox MM. Lipids. En: Lehninger Principles of Biochemistry. 6th ed, W.H. Freeman Publishers, New York, 2013; pp 357-380.
- Nissen HP, Kreysel HW. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. *Andrologia* 1983; 15 (3): 264-9.
- Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behaviour of boar, bull stallion and rooster sperm membrane. *Cryobiology* 1992; 29: 255-66.



- Paulenz, H., Söderquist, L., Pérez-Pé, R. y Berg, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57, 823-836.
- Quinn, P.J., White, I.G. y Cleland, R.W. (1969). Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fertil*. 18, 209-220.
- Rhemrev JP, van Overveld FW, Haenen GR, Teerlink T, Bast A, Vermeiden, JP. Quantification of the nonenzymatic fast and slow TRAP in a post-addition assay in human seminal plasma and the antioxidant contributions of various seminal compounds. *J Androl*. 2000; 21: 913-20.
- Rooke JA, Shao CC, Speake BK. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 2001; 121: 315-22.
- Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men. *Clinical Nutrition*. 2010; 29(1):100-5.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, et al. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;65:245 – 59
- Samadian F, Towhidi A, Rezayazdi K, Bahreini M. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. *Animal* 2012; 4 (12): 2017-22.
- Sampath H, Ntambi JM. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Ann Rev Nutrit*. 2005; 25: 317-40.
- Samper JC. 2009. Artificial insemination with fresh and cooled semen. In: Samper JC (ed).
- Santiani, A., Sandoval, R., Ruiz, L., Coronado, L. (2004). Estudio de la integridad en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hipoosmótico. XXVII Reunión

Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Piura, Perú, 20 al 24 de setiembre.

Sargent JR. Fish oils and human diet. *Br J Nutrit.* 1997; 7(1): 5-13.

Scott JW. Lipid metabolism of spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1973; 18(Suppl): 65-76.

Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Molec Endocrin.* 2005; 19: 2647-59

Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod* 2002; 66:545-554.

Venegas-Calación M, Sayanova O, Napier JA. An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Prog Lip Res.* 2010; 49: 108-19.

Vila, L. (1984). Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clin Hematol.* 6, 227-236.

Vila, L. y Carretero, F. (1985). Manejo de congeladores programables. *Biol Clin Hematol.* 7, 61-67.

Waterhouse, K. E., Hofmo, P.O., Tverdal, A., Miller, R.R. Jr. (2006) Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction.* 131, 887-94.

Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of reproduction.* 2007; 77(2):190-201.








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

White, I.G. (1993) Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev.* 5, 639-58. Review.

Yeste M, Barrera X, Coll D, Bonet S. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. *Theriogenology.* 2011; 76(1): 184-96.

## **CAPITULO II. EFECTO DEL ACEITE DE SOYA EN LA DIETA SOBRE LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE OVINO PELIBUEY.**

### **EFFECT OF SOYBEAN SOIL IN DIET ON CRIOPRESERVATION OF PELIBUEY RAM SEMEN.**

Tun-Moo Maximiliano<sup>2</sup> , Domínguez-Rebolledo Álvaro<sup>1</sup> \*, Rodríguez-Gutiérrez Itzel<sup>2</sup> , Pinzón-López Luis<sup>2</sup> , Ortiz-de la Rosa Benjamín<sup>2</sup> , Loeza-Concha Henry<sup>3</sup> , Ramón-Ugalde Julio<sup>2</sup> .

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochoá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mocochoá, Yucatán.

<sup>2</sup>Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO)-Instituto Tecnológico de Conkal. Antigua Carretera Mérida-Motul km 16.3, C.P. 97345, Conkal, Yucatán. México.

\*Autor de correspondencia: Álvaro Domínguez Rebolledo, C.P. 97454, e-mail:

[dominguez.alvaro@inifap.gob.mx](mailto:dominguez.alvaro@inifap.gob.mx), <http://www.inifap.gob.mx>

#### **2.1 RESUMEN Y ABSTRACT**

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del aceite de soya (AS) en la dieta, sobre la congelación del semen ovino. Durante un período experimental de 60 días, 27 ovinos de la raza Pelibuey fueron divididos en tres grupos con cada uno de los siguientes tratamientos: T1 (3% AS) alimento comercial + pasto Taiwán, T2 (6% AS) alimento comercial + pasto Taiwán y TT (Testigo) alimento comercial + pasto Taiwán. Se congelaron-descongelaron 135 eyaculados a los que se les evaluó los parámetros de motilidad (MT, MP, VAP, VCL, VSL, LIN, STR, WOB, ALH, CBF) con el sistema CASA, la integridad de la membrana plasmática (Ioduro de propidio), la actividad mitocondrial (J-C1), la integridad de los acrosomas (FICT-PSA) y la integridad de la membrana de la cola con el Host. Los resultados se analizaron mediante un ANOVA y con la prueba de Tukey. Se observó en el TT vs T1 y T2 una mayor ( $P < 0.05$ ) motilidad total ( $38.0 \pm 4.0$  vs  $21.7 \pm 3.3$  y  $12.5 \pm 4.0\%$ ) y motilidad progresiva ( $18.3 \pm 1.9$  vs  $10.3 \pm 1.5$  y  $6.7 \pm 1.9\%$ ), respectivamente. Por otra parte, la velocidad media registrada en los tratamientos T1 y TT ( $60.6 \pm 2.2 \mu\text{m/s}$ ;  $64.4 \pm 2.7 \mu\text{m/s}$ ;  $P > 0.05$ ) fue superior ( $P < 0.05$ ) al T2 ( $53.6 \pm 2.7$ ). Mientras la viabilidad espermática

de los tratamientos T2 ( $53.00 \pm 3.4\%$ ) y TT ( $49.29 \pm 2.8\%$ ) fueron similares, resultaron distintos ( $P < 0.05$ ) al T1 ( $37.38 \pm 2.9\%$ ). Los acrosomas intactos ( $48.14 \pm 4.0\%$ ;  $46.15 \pm 4.1\%$ ;  $P > 0.05$ ) en el TT y T1, fueron mayores ( $P < 0.05$ ) al T2 ( $31.30 \pm 4.7\%$ ). La endosmosis positiva en los tratamientos TT, T1 y T2 ( $43.71 \pm 3.2$  vs  $22.54 \pm 3.3$  y  $25.10 \pm 3.8\%$ ), respectivamente, fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el TT. En los demás parámetros no se encontraron diferencias. La inclusión del aceite de soya en la dieta en concentraciones del 3 y 6 %, no mejoró la criopreservación del semen ovino.

**Palabras clave:** Aceite de soya, ovinos, semen, criopreservación.

### 2.1.1. ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of soybean oil (AS) supplemented diet, on the cryopreservation of ram semen. Twenty seven Pelibuey ram were divided into three treatments: T1 (3% AS) commercial feed + Taiwan pasture, T2 (6% AS) commercial feed + Taiwan pasture and TT (soybean oil free) control) commercial feed + Taiwan, during an experimental period of 60 days. One hundred and thirty five ejaculates were frozen-thawed and evaluated for motility parameters (MT, MP, VAP, VCL, VSL, LIN, STR, WOB, ALH, CBF) with the CASA system, the integrity of the plasma membrane (Iodide propidium), mitochondrial activity (J-C1), integrity of acrosomes (FICT-PSA) and the integrity of the tail membrane (Host). The results were analyzed by ANOVA and the means were compared with the Tukey test. Total motility ( $38.0 \pm 4.0$  vs  $21.7 \pm 3.3$  and  $12.5 \pm 4.0\%$ ) and progressive motility ( $18.3 \pm 1.9$  vs  $10.3 \pm 1.5$  and  $6.7 \pm 1.9\%$ ) were higher ( $P < 0.05$ ) in the TT than T1 and T2, respectively. On the other hand, the average speed recorded in the T1 and TT treatments ( $60.6 \pm 2.2 \mu\text{m} / \text{s}$ ,  $64.4 \pm 2.7 \mu\text{m} / \text{s}$ ,  $P > 0.05$ ) were higher ( $P < 0.05$ ) than T2 ( $53.6 \pm 2.7$ ). While the sperm viability of the treatments T2 ( $53.00 \pm 3.4\%$ ) and TT ( $49.29 \pm 2.8\%$ ) were similar, they were different ( $P < 0.05$ ) from T1 ( $37.38 \pm 2.9\%$ ). The intact acrosomes ( $48.14 \pm 4.0\%$ ;  $46.15 \pm 4.1\%$ ;  $P > 0.05$ ) in the TT and T1 were higher ( $P < 0.05$ ) than T2 ( $31.30 \pm 4.7\%$ ). The positive endosmosis in the treatments TT, T1 and T2 ( $43.71 \pm 3.2$  vs  $22.54 \pm 3.3$  and  $25.10 \pm 3.8\%$ ), respectively, was higher ( $P < 0.05$ ) in the TT. In the other parameters, no differences were found. Cryopreservation of ram semen doesn't improve with a dietary supplementation with soybean oil at 3 and 6%.

**Key words:** Soybean oil, ram, semen, criopreservation.

## **2.2. Introducción**

La nutrición y la reproducción generalmente se encuentran vinculadas, debido a que el éxito reproductivo de un animal depende de su estado nutricional. A lo largo de los años se ha estudiado el efecto de esta asociación, a menudo mediante la alteración de las dietas de diversas maneras con el fin de observar los cambios resultantes en los parámetros reproductivos de los animales (Surai *et al.*, 2000; Yeste *et al.*, 2011). Uno de los cambios más significativos, es la adición de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) a su dieta. Se han estudiado diferentes fuentes de PUFAs en la dieta de rumiantes, como las grasas de origen animal y vegetal, observándose que su consumo influye en algunas funciones reproductivas de la hembra, como un aumento en el diámetro y el número de folículos presentes en el ovario, así como un período más corto para la primera ovulación (Nottle *et al.*, 1986; Stewart and Oldman, 1986; Letelier *et al.*, 2008) y un efecto positivo sobre la fertilidad (Mattos *et al.*, 2000; Encinias *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2009). Asimismo, en los machos se ha observado un aumento del libido (Kelso *et al.*, 1997; Castellano *et al.*, 2010), la concentración (Alizadhe *et al.*, 2014; Fair *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017), la motilidad (Alizadhe *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2017) y la viabilidad espermática (Alizadhe *et al.*, 2014; Esmaeili *et al.*, 2014). Estas mejoras en la calidad seminal pueden deberse a las modificaciones que se presentan en la composición de las membranas de los espermatozoides y del plasma seminal de aquellos animales que son suplementados con PUFAs (Paulenz *et al.*, 1995; Blesbois *et al.*, 1997; Samadia *et al.*, 2010). Los PUFAs, principalmente los de 20 y 22 carbonos, como los ácidos omegas 3 y omega 6, se encuentran en abundancia en la membrana espermática de los espermatozoides, proporcionando fluidez y permeabilidad a las membranas para llevar a cabo la fertilización (Esmaeili *et al.*, 2015; Wathes *et al.*, 2007;). Sin embargo, altos niveles de PUFAs en la dieta podría promover la peroxidación lipídica en los espermatozoides (Surai *et al.*, 2000), causando la pérdida de su motilidad y su viabilidad (Cerolini *et al.*, 2000). Esto es debido a que, los PUFAs son muy susceptibles a la lipoperoxidación causada por los radicales libres que se producen durante la manipulación de la muestra o durante los procesos de congelación (Wathes *et al.*, 2007). Por lo tanto, el

presente estudio fue evaluar el efecto del aceite de soya (3 y 6%) en la dieta, sobre la congelación del semen ovino.

### **2.3. Materiales y métodos**

**Ubicación.** El presente trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Mochá. La evaluación seminal se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Reproductiva del Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO).

**Selección de animales.** Se utilizaron 27 machos ovinos Pelibuey de 40 a 45 kg de peso vivo, con una condición corporal de 3 a 3.5 y con una edad de 2.5 años. Los animales estuvieron en un período de adaptación de 15 días, donde se les suministró gradualmente la dieta hasta alcanzar lo establecido en el experimento. Posteriormente, los animales continuaron con la dieta hasta los 60 días.

**Alimentación.** Los sementales fueron distribuidos al azar en tres tratamientos: T1 (3% AS) alimento comercial + pasto Taiwán (n=9); T2 (6% AS) alimento comercial + pasto Taiwán. (n=9); TT (Testigo) alimento comercial + pasto Taiwán, (n=9)

**Obtención de muestras seminales.** Se obtuvieron 135 eyaculados en total de los 27 animales, mediante una vagina artificial y con la ayuda de una oveja que sirvió como maniquí.

**Dilución espermática.** Los eyaculados seleccionados fueron diluidos con el diluyente comercial Triladyl® + agua bidestilada + 20% de yema de huevo a una concentración final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/pajuela.

**Congelación de semen.** Después de la dilución, el semen fue empacado en pajillas de 0.25 µL de PVC-francés (pajuelas Minitüb, Tiefenbach®, Alemania). Al finalizar el llenado de las pajillas, se procedió a almacenarlas a 5°C durante 180 min. Finalmente, las pajillas se

colocaron a una distancia de 4 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos, para su congelación y almacenamiento en los tanques de nitrógeno líquido

**Descongelación de semen.** El procedimiento de descongelación se realizó mediante la inmersión de las pajillas en agua a 37°C durante 30 segundos.

### **Evaluación seminal**

**Concentración espermática.** Se diluyó una pequeña fracción de la muestra de semen (5 µL) en 995 µL agua destilada. Después, se tomó 8 µL de la muestra diluida agua y se colocó en cada uno de los dos lados de la cámara bücker para estimar su concentración. Finalmente, con el módulo de concentración del sistema CASA, se capturaron 4 campos de cada lado de la cámara y se sacó la concentración.

**Motilidad espermática.** La motilidad se analizó con el sistema CASA (ISAS®v1 (Proiser R + D, Valencia, España). Se colocaron 5 µL del semen descongelado en 45 µL de diluyente, se dejó incubar durante 10 min., después se colocaron 5 µL de la muestra sobre una cámara de recuento Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) precalentada a 37°C, y se procedió a la captura de al menos cinco campos con un mínimo de 300 espermatozoides/muestra. Los parámetros de motilidad evaluados fueron: Motilidad Total (MT%), Motilidad Progresiva (MP%), Velocidad Curvilínea (VCL µm/s), Velocidad Rectilínea (VSL µm/s), Velocidad Media (VAP µm/s), Índice de linealidad (LIN (VSL/VCL) X 100, Índice de rectitud (STR (VSL/VAP) X 100, Índice de Oscilación (WOB (VAP/VCL) X 100, Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH µm) y Frecuencia de batido de la cabeza espermática (FBC Hz).

**Viabilidad espermática.** Se evaluó mediante la tinción de SYBR14-PI, añadiendo 1µL de PI stock en 100 µL de muestra espermática diluida en solución salina (PBS) y se dejó incubar durante 10 minutos a 37°C. Después, se colocó 5µL de la muestra sobre un cubre y portaobjeto precalentado a 37°C, y se procedió a su evaluación por medio de un microscopio de epifluorescencia (LWScientific i40-ADN), contabilizando 100 espermatozoides entre los cuales presentaban fluorescencia roja (muertos) y verde los vivos.



**Integridad del acrosoma.** Se evaluó mediante la tinción de FITC-PSA, añadiendo 5µL de la solución stock en 100 µL de muestra espermática diluida en PBS y se dejó incubar en la oscuridad durante 30 minutos a 37°C. Después, se colocó 5µL de la muestra sobre un cubre y portaobjetos. Finalmente, se contabilizaron 100 espermatozoides mediante un microscopio de epifluorescencia, contabilizando 100 espermatozoides entre los cuales presentaban fluorescencia de color verde (acrosomas dañados) y no fluorescencia los acrosomas intactos.

**Actividad mitocondrial.** Se analizó con la tinción JC-1, añadiendo 1µL de la solución stock en 100 µL de muestra espermática diluida en PBS y se dejó incubar en la oscuridad durante 10 minutos a 37°C. Después, se colocó 5µL de la muestra sobre un cubre y portaobjetos y se contabilizaron 100 espermatozoides mediante un microscopio de epifluorescencia, contabilizando 100 espermatozoides entre los cuales presentaban fluorescencia de color naranja (mitocondrias activas) y de verde las mitocondrias inactivas.

**Integridad de la membrana plasmática de la cola (HOST):** Se realizó diluyendo 5µL la muestra espermática en 50µL de solución de endósmosis y se dejó incubar a 37 °C. Después, se colocó 5µL de la muestra sobre un cubre y portaobjetos y se contabilizaron 100 espermatozoides mediante un microscopio de contraste de fases, contabilizando 100 espermatozoides entre los que presentaban colas enrolladas (endósmosis positiva) y no enrolladas (endósmosis negativa).

**Análisis estadístico.** Los datos se analizaron con un ANOVA y posteriormente una prueba de Tukey para determinar las diferencias de medias. Para ello, se utilizó el Software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20. 0 (IBM, 2011).

## **2.4. Resultados y discusión**

En el cuadro 1, se puede observar en el tratamiento TT vs T1 y T2 una mayor ( $P < 0.05$ ) motilidad total ( $38.0 \pm 4.0$  vs  $21.7 \pm 3.3$  y  $12.5 \pm 4.0\%$ ) y motilidad progresiva ( $18.3 \pm 1.9$  vs  $10.3 \pm 1.5$  y  $6.7 \pm 1.9\%$ ), respectivamente. Por otra parte, la velocidad media (VAP) registrada en los tratamientos T1 y TT ( $60.6 \pm 2.2 \mu\text{m/s}$ ;  $64.4 \pm 2.7 \mu\text{m/s}$ ;  $P > 0.05$ ) fue superior ( $P < 0.05$ ) al T2 ( $53.6 \pm 2.7$ ). Para los demás parámetros de motilidad, no se observaron

diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). Estos resultados son similares a los obtenidos con semen descongelado de toro de la raza Holstein (Khoshvagt *et al.*, 2015) y carnero (Esmaeili *et al.*, 2014), presentado un aumento de la motilidad progresiva para ambos y, de la motilidad total en éste último. Sin embargo, difieren en los resultados reportados por Rodrigues *et al.* (2017) sobre la motilidad total en muestras descongeladas de perro, Díaz *et al.* (2017) en los parámetros de motilidad total, progresiva y velocidad media en muestras descongeladas de carnero, y por Losano *et al.* (2017) en los parámetros de la velocidad media, velocidad rectilínea y curvilínea en muestras de toro de la raza Holstein. Estas diferencias, pueden estar asociadas a la raza, concentración y tipo de los PUFAs añadidos a la dieta, tiempo de alimentación, entre otros.

**Cuadro 1.** Efecto del aceite de soya sobre los parámetros de motilidad espermática a la descongelación (media  $\pm$  error estándar).

Parámetros	Tratamiento (Aceite)		
	T1 (3 %)	T2 (6 %)	TT (0 %)
MT (%)	21.7 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	12.5 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	38 $\pm$ 4.0 <sup>b</sup>
MP (%)	10.3 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	6.7 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>	18.3 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	60.6 $\pm$ 2.2 <sup>ab</sup>	53.6 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	64.4 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	101.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	88.7 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	102.0 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	45.8 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	41.1 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	49.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>
LIN (%)	43.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	44.7 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	43.4 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
STR (%)	70.6 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	71.7 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	67.4 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
WOB (%)	59.0 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	60.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	60.6 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>
ALH ( $\mu\text{m}$ )	3.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
BCF (Hz)	11.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	10.9 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	10.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>

(<sup>ab</sup>) Literales diferentes dentro de la misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

(MT) Motilidad Total (%), (MP) Motilidad Progresiva (%), (VAP) Velocidad Media ( $\mu\text{m/s}$ ), (VCL) Velocidad Curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), (VSL) Velocidad Rectilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), (LIN) Índice de linealidad (VSL/VCL) X 100, (STR) Índice de rectitud (VSL/VAP) X 100, (WOB) Índice de Oscilación (VAP/VCL) X 100, (ALH) Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza espermática ( $\mu\text{m}$ ), (BCF) Frecuencia de batido de la cabeza espermática (Hz).

En el cuadro 2, se observó que los porcentajes de la viabilidad espermática de los tratamientos T2 (53.00  $\pm$  3.4%) y TT (49.29  $\pm$  2.8%) fueron similares, resultaron distintos

( $P < 0.05$ ) al T1 ( $37.38 \pm 2.9\%$ ). Los acrosomas intactos ( $48.14 \pm 4.0\%$ ;  $46.15 \pm 4.1\%$ ;  $P > 0.05$ ) en el TT y T1, fueron mayores ( $P < 0.05$ ) al T2 ( $31.30 \pm 4.7\%$ ). La endosmosis positiva en los tratamientos TT, T1 y T2 ( $43.71 \pm 3.2$  vs  $22.54 \pm 3.3$  y  $25.10 \pm 3.8\%$ ), respectivamente, fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el TT. No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en los demás parámetros evaluados.

En el presente estudio, la viabilidad espermática fue similar usando de un 6% de PUFAs en la dieta, respecto al Testigo (Sin aceite). Esto concuerda a lo reportado por Losano *et al.* (2017) y Karimi *et al.* (2016), en muestras espermáticas descongeladas de toro y por Díaz *et al.* (2017), en carnero. Sin embargo, difiere a lo encontrado por Esmaeili *et al.* (2014) en semen de carnero y Khoshvagt *et al.* (2015) en muestras descongeladas de toro.

Algunos estudios han demostrado que la inclusión de los PUFAs en la dieta mejora la calidad del semen tanto en fresco como en el descongelado, sin embargo, hay otros estudios que han reportado lo contrario en el semen congelado. Estos resultados contradictorios, pueden estar asociadas a la especie y raza del animal, así como en la concentración y tipo de los PUFAs añadidos a la dieta, tiempo de la alimentación y a la cantidad de PUFAs presentes en la membrana de los espermatozoides.

Se conoce muy bien, que los espermatozoides de la mayoría de las especies son ricos en PUFAs, lo cual incrementa la susceptibilidad de las células a la lipoperoxidación inducida por los radicales libres que se producen durante el manejo y procesos de congelación-descongelación de las muestras (Wathes *et al.*, 2007). Asimismo, una elevada dieta de PUFAs puede provocar un aumento de las concentraciones de PUFAs en la membrana de los espermatozoides, ocasionando la muerte celular (Surai *et al.*, 2000). Por lo tanto, con el fin de aprovechar la disponibilidad del aceite de soya y su contenido de PUFAs, es importante realizar más estudios para aclarar su efecto sobre la congelación del semen ovino.

**Cuadro 2.** Efecto del aceite de soya en la dieta sobre la viabilidad, actividad mitocondrial, acrosomas intactos y Host de muestras espermáticas de ovino Pelibuey post-descongelación (media  $\pm$  error estándar)

Tratamiento	Aceite	Viabilidad (%)	Mitocondrias Activas (%)	Acrosomas Intactas (%)	Endosmosis Positiva (%)
T1	3 %	37.38 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	38.00 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	46.15 $\pm$ 4.1 <sup>a</sup>	22.54 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>
T2	6%	53.00 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	47.30 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup>	31.30 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>	25.10 $\pm$ 3.8 <sup>b</sup>
TT	0 %	49.29 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>	45.29 $\pm$ 3.1 <sup>a</sup>	48.14 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	43.71 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>

(<sup>ab</sup>) Literales diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos.

## 2.5. Conclusión

La inclusión del aceite de soya en la dieta en concentraciones del 3 y 6 %, no mejora la criopreservación del semen ovino.

## 2.6. Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el proyecto Fiscal No. 1513272874 del INIFAP y por el proyecto de CONACyT - Ciencia Básica 164592.

## 2.7. Referencias

Alizadeh, A., Esmaili, V. Shahverdi, A. & Rashidi, L. (2014). Dietary fish oil can change sperm parameters and fatty acid profiles of ram sperm during oil consumption period and after removal of oil source. *Cell J* 16, 289.

Blesbois, E., Lessire, M. Grasseau, I. Hallouis, J.M. Hermier, D. (1997). Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. *Biol Reprod.* 56: 1216-20.

Byrne, H., Rylands, A.B. Carneiro, J.C. Lynch-Alfaro, J.W. Bertuol, F. da Silva, M.N.F. Messias, M. Groves, C.P. Mittermeier, R.A. Farias, I. Hrbek, T. Schneider, H. Sampaio, I. Boubli, JP. (2016). Phylogenetic relationships of the New World titi monkeys (*Callicebus*): first appraisal of taxonomy based on molecular evidence. *Frontiers in Zoology* 13:10.

Castellano, C.A., Audet, I. Bailey, J.L. Laforest, J.P. Matte, J.J. (2010). Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. *Theriogenology*. 74:1482–1490.

Cerolini, S., Maldjian, A. Surai, P. Noble, R. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.*, 58: 99-111.

Diaz- Jimenez, M., Pereira, B. Ortiz, I. Consuegra, C. Partyka, A. Dorado, J. & Hidalgo, M. (2017). Effect of different extenders for donkey sperm vitrification in straws. *Reproduction in Domestic Animals* 52 55–57.

Encinias, H. B., G. P. Lardy. A. M. Encinias, and M. L. Bauer. (2004). High linoleic acid safflower seed supplementation for gestating ewes: effect on ewe performance. Lamb survival. And Brown fat stores. *J. Anim. Sci.* 82:3654-3661.

Esmaili, V., Shahverdi, A.H. Alizadeh, A.R. Alipour, H. Chehrazi, M. (2014). Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. *Andrology* 46:42-49.

Fair, S., Doyle, D.N. Diskin, M.G. Hennessy, A.A. & Kenny, D.A. (2014). The effect of dietary n- 3 polyunsaturated fatty acids supplementation of rams on semen quality and subsequent quality of liquid stored semen. *Theriogenology* 81, 210–219.

Karimi, M.P., Staiger, N. Buunk, A. Fessard, N. (2016). Tucker, Uniaxially aligned electrospun fibers for advanced nanocomposites based on a model PVOH-epoxy system, *Compos. Part A: Appl. Sci. Manuf.* 81; 214–221.

Kelso, K. A., Cerolini, S. Speake, B. K. Cavalchini, L.G. & Noble, R.C. (1997). Effects of dietary supplementation with alpha- linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition

and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility* 110, 53–59.

Khoshvaght-Aliabadi, M., A. Jafari, O. Sartipzadeh, and M. Salami, (2016). Thermal-hydraulic performance of wavy plate-fin heat exchanger using passive techniques: Perforations, winglets and nanofluids. *Int. Commun. Heat Mass*, 78: 231-240.

Letelier, C., Mallo, F. Encinas, T. Ros, J.M. & Gonzalez-Bulnes, A. (2008). Glucogenic supply increases ovulation rate by modifying follicle recruitment and subsequent development of preovulatory without effects on ghrelin secretion. *Reprod.* 136, 65-72.

Liu M, Jin., X, He, X. (2015). Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. *PLoS One*.30;10(3):e01219 21.1-16.

Lopes, R.P. Buchmann, F.S.C. Caron, F. & Itusarry, M.E.G. (2009). Barrancas fossilíferas do arroio Chuí, RS - importante megafauna pleistocênica no extremo sul do Brasil. In: M. Winge; C. Schobbenhaus; M. Berbert-Born; E.T. Queiroz; D.A. Campos; C.R.G. Souza, & A.C.S. Fernandes (eds.) *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*, Serviço Geológico do Brasil/Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos, p. 355-362.

Losano, J., Angrimani, D. Dalmazzo, A. Rui, B. R. Brito, M. M. Mendes, C. M. Nichi, M. (2017). Effect of mitochondrial uncoupling and gly- colysis inhibition on ram sperm functionality. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene* 52, 289–297.

Mattos, R., C. R. Staples, and W. W. Thatcher. (2000). Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev. Reprod.* 5:38–45.

Paulenz, H. Söderquist, L. Pérez-Pé, R. y Berg, K.A. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57, 823-836.

Rodrigues, T. S., Bossini, D. Miglio, A. Girardi, L. Montalbán, J. Noels, A. Marigo, P. (2017). Determining stellar parameters of asteroseismic targets: going beyond the use of scaling relations. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, stx120.

Wathes, D.C., Abayasekara, D.R. Aitken, R.J. (2007). Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod.* 77 (2): 190-201.

Yeste, M., Barrera, X. Coll, D. Bonet, S. (2011). The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. *Theriogenology*. 76(1): 184-96.