



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Efectos de la administración de vitaminas antioxidantes en las  
características seminales y estado oxidativo del carnero**

**Constanza Francisca Cabello Araya**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas

PROFESOR GUÍA: Dr. Víctor Hugo Parraguez  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

FONDECYT N° 1130181

SANTIAGO, CHILE  
AÑO 2015



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**Efectos de la administración de vitaminas antioxidantes en las  
características seminales y estado oxidativo del carnero**

**Constanza Francisca Cabello Araya**

Proyecto de Memoria para optar al  
Título Profesional de Médico  
Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Biológicas

**NOTA FINAL:** \_\_\_\_\_

	<b>FIRMA</b>
<b>PROFESORA GUÍA: DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ G.</b>	_____
<b>PROFESORA CONSEJERA: DRA. BESSIE URQUIERTA.</b>	_____
<b>PROFESOR CONSEJERO: DR. LUIS ALBERTO RAGGI S.</b>	_____

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

FONDECYT N° 1130181

SANTIAGO, CHILE  
AÑO 2015

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. Parraguez por darme la oportunidad de realizar esta tesis, pero principalmente por darme la oportunidad de terminarla. Agradecer su apoyo, su paciencia, su cariño y comprensión. Profe, le agradezco profundamente todas las conversaciones, críticas y consejos, pero sin duda siempre le estaré agradecida de su alta exigencia y su constante enseñanza, pese a todas las circunstancias que rodearon el desarrollo de la tesis. Muchas gracias, gracias por ser un admirable veterinario, docente y persona. Siempre estará en mi corazón, el profe más hípster y estiloso de FAVET, ese que me incentivo siempre a ser mejor alumna y no rendirme.

Al mismo tiempo quisiera agradecer a los profesores del departamento de fisiología, la Dra. Bessie Urquieta y el Dr. Luis Raggi, por permitirme crecer en los pasillos del departamento, participando activamente de ayudantías y de electivos. Si veo, mis años de formación, Físio y sus anécdotas, son parte esencial de esta. Gracias, por su paciencia, por el cariño y por siempre mostrar esa disposición a enseñar.

Quisiera también agradecer el apoyo eterno y el inmenso cariño de la Dra. Eileen Cofré. Estricta, altos niveles de cortisol, y sencillamente una amiga maravillosa. De esas personas que pocas veces se encuentran en la vida. Le agradezco, la oportunidad que me dio, esa de poder terminar mi tesis. Infinitas gracias, por ser usted, por ayudarme, enseñarme, guiarme, retarme y apoyarme en todo. No dudo, que será de esas investigadoras que cambian el mundo, esas que con la inteligencia, trabajo y esfuerzo, logran aportar al mundo. Usted y Ceppi, son los mejores compañeros de tesis y amigos hípster que me podría haber dado el egreso... pues gracias a ustedes, hoy escribo estos agradecimientos. Quereros!

Les agradezco profundamente a mis padres, por su amor y apoyo infinito, por estar en cada sonrisa y caída. Por enseñarme desde pequeña, a respetar la naturaleza y los animales. Gracias mis viejos queridos, por bancarme, por su esfuerzo y convicción, ya que sin ustedes mis estudios, su redirección y mis sueños no hubiesen sido posibles. Gracias por ser mis padres, por estar ahí. Mis viejos, gracias por las oportunidades, por dejarme crecer, estudiar y siempre incentivarme a soñar.

A mi amado hermano, eternas gracias por tu complicidad, por tu compañía y ayuda. Por amarme y bancarme, pero por sobre todo por te agradezco por conversar, por incentivarme a

ser mejor, a cuestionar y a luchar. Sin ti, sin las peleas, sin las risas, sin las conversas y sin nuestro eterno debate sobre el hombre y la naturaleza...No miraría el alcance e impacto de esta hermosa profesión, como hoy la veo. ¡Gracias, psicólogo loco!

A mis amigos y compañeros, les agradezco ser ustedes... Me regalaron la dicha y el recuerdo de vivir un pregrado feliz. De amar ir a clases, porque aprender con ustedes era una locura y una aventura repleta de risas y alegría. Aprobé y reprobé, me eximieron y me echaron...egrese y fue con ustedes, con los de siempre, con esos eternos amigos que apañan en las buenas y en las malas. Gracias por la paciencia, por todas las conversaciones, los consejos, los carretes, los recuerdos inolvidables, por las leyendas, por esos viernes de cuchi o de pérgola, por ese miércoles de cerveza y por esas eternas noches de estudio...Gracias por crecer juntos, por formarnos juntos y por cada día incentivarnos a ser mejores profesionales. Ustedes hicieron que mi recuerdo de FAVET fuera de leyenda. Los amo!

Y finalmente quisiera agradecer a mi facultad, por entregarme unos años maravillosos... por permitirme crecer, formarme y enseñarme que los sueños se construyen con esfuerzo. Gracias por las oportunidades, por los conocimientos, por los amigos, por los recuerdos, por los altos niveles de cortisol, por los inolvidables pergolazos, por las ayudantías, por dejarme debiendo puntos, por tus docentes, por tus pastos, por tu microclima, por tu mística, por tus alianzas y por enseñarme que todos, incluyéndote puedes mejorar. Gracias, por darme la oportunidad y la libertad de aprender, construir y luchar por esos sueños de justicia y equidad. ¡Infinitas gracias FAVET, por ser mi hogar por tantos años!

Gracias mi amada Medicina Veterinaria por permitir formarme en tu arte, por permitir aprender de tus diferentes oportunidades. Gracias por entregarme tantos años de felicidad, en su grado máximo, tan solo con estudiarte. Que este nuevo camino, que por circunstancias de la vida han evolucionado, sea plagado de amor y pasión. Gracias, por permitirme, seguir aprendiendo de ti.

“Gracias a la vida y sus circunstancias por enseñarme a disfrutar, luchar, amar y sonreír. Después de todo... Mañana es un nuevo día. ¿Qué te puedo decir?”

(...) Je veux d'amour, d'lajoie, d'labonnehumeur (...)

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
<b>4.1. Características seminales del carnero</b>	<b>4</b>
<b>4.2. Estrés Oxidativo: Alteraciones de la Calidad Seminal</b>	<b>5</b>
<b>4.2.1. Estrés Oxidativo</b>	<b>5</b>
<b>4.2.2. Estrés oxidativo seminal</b>	<b>6</b>
<b>4.3. Sistema Antioxidante</b>	<b>7</b>
<b>4.3.1. Capacidad Antioxidante Total (TAC)</b>	<b>7</b>
<b>4.3.2. Sistema antioxidante seminal</b>	<b>9</b>
<b>4.4. Terapia Antioxidante</b>	<b>10</b>
<b>4.4.1. Vitaminas Antioxidantes</b>	<b>10</b>
<b>4.4.2. Suplementación de vitaminas AO en la calidad seminal</b>	<b>10</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b>	<b>12</b>
<b>6. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>6.1. Objetivo general</b>	<b>12</b>
<b>6.2. Objetivos específicos</b>	<b>12</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>7.1. Ubicación</b>	<b>13</b>
<b>7.2. Animales</b>	<b>13</b>
<b>7.3. Diseño experimental</b>	<b>13</b>
<b>7.4. Muestras sanguíneas</b>	<b>14</b>
<b>7.5. Recolección y evaluación del semen</b>	<b>14</b>
<b>7.6 Análisis estadístico</b>	<b>15</b>

<b>8. RESULTADOS</b>	<b>16</b>
<b>8.1. Características Seminales:</b>	<b>16</b>
a. Volumen del eyaculado	16
b. Concentración espermática	16
c. Motilidad progresiva	17
d. Vitalidad espermática	18
e. pH	19
f. Color	20
<b>8.2. Capacidad Antioxidante Total (TAC) del plasma sanguíneo</b>	<b>20</b>
<b>8.3. Concentración de Malondialdehído(MDA) en el plasma sanguíneo</b>	<b>21</b>
<b>8.4. Concentraciones plasmáticas de vitamina C y E</b>	<b>22</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
<b>9.1. Efecto Fotoperiodo/Estacionalidad</b>	<b>23</b>
<b>9.2. Concentración plasmática de vitamina E y C</b>	<b>24</b>
<b>9.3. Concentración plasmática de MDA y TAC</b>	<b>26</b>
<b>9.4. Características Seminales</b>	<b>28</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>32</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>33</b>

## **INDICE**

### **TABLAS**

<b>1. Tabla N° 1: Características reproductivas del carnero</b>	<b>5</b>
---	----------

### **FIGURAS**

<b>1. Figura Nro. 1: Volumen del Eyaculado</b>	<b>16</b>
<b>2. Figura Nro. 2: Concentración espermática</b>	<b>17</b>
<b>3. Figura Nro. 3: Motilidad progresiva</b>	<b>18</b>
<b>4. Figura Nro. 4: Vitalidad espermática</b>	<b>19</b>
<b>5. Figura Nro. 5: pH espermático</b>	<b>20</b>
<b>6. Figura Nro. 6: Capacidad Antioxidante Total (TAC) del plasma sanguíneo</b>	<b>21</b>
<b>7. Figura Nro. 7: Concentración de MDA en el plasma sanguíneo</b>	<b>21</b>
<b>8. Figura Nro. 8: Concentraciones plasmáticas sanguíneas de vitamina C</b>	<b>22</b>
<b>9. Figura Nro. 9: Concentraciones plasmáticas sanguíneas de vitamina E</b>	<b>23</b>

## 1. RESUMEN

El estrés oxidativo se describe como una de las principales causas la alteración de la calidad seminal del carnero, afectando a la concentración, motilidad, vitalidad y morfología espermática. Estudios muestran que la terapia antioxidante es capaz de mejorar la capacidad antioxidante, atenuar los daños por estrés oxidativo y mejorar la calidad seminal. En éste estudio se evaluó el efecto de la suplementación oral de vitaminas antioxidantes sobre las características seminales y en el estado oxidativo del carnero. Para esto se administraron 650 mg de vitamina C y 450 UI de vitamina E durante 60 días a la mitad de los animales (n=5) y la otra mitad se usó como grupo control (n=5). Se tomaron muestras de semen y sangre a los 0, 30 y 60 días, mediante electroeyaculación y venipunción, respectivamente. La evaluación de las características seminales de concentración, vitalidad espermática y motilidad progresiva se realizó con el sistema CASA. El volumen del eyaculado se evaluó con la copa de extracción y el pH mediante tiras reactivas. La evaluación del estado antioxidante se realizó mediante la medición del la capacidad antioxidante total (TAC) y la concentración de malondialdehido (MDA) en el plasma sanguíneo, mediante la técnica de ELISA. Las concentraciones plasmáticas de vitamina C y E se evaluaron mediante HPLC.

Se encontró que la administración oral de vitaminas C y E aumenta significativamente las concentraciones plasmáticas de las vitaminas, tras 30 y 60 días de administración ( $p < 0,05$ ). Asimismo, la suplementación de vitaminas antioxidantes aumentó significativamente la concentración espermática a los 30 días de tratamiento, además de aumentar la vitalidad y concentración espermática tras 60 días de tratamiento ( $p < 0,05$ ). Se concluye que la suplementación oral con vitaminas E y C a partir de 30 días mejora la calidad seminal en carneros.

**Palabras clave:** Vitamina C, Vitamina E, Estrés oxidativo, Calidad seminal



## **2. ABSTRACT**

Oxidative stress is described as a major cause of impaired ram semen quality, affecting concentration, motility, vitality and sperm morphology. Studies show that antioxidant therapy is able to improve antioxidant status, mitigating the oxidative damage, and improving semen quality. In this study, the effect of oral antioxidant vitamins supplementation on the seminal characteristics and oxidative status were evaluated in rams. Half the animals (n = 5) were supplemented with 650 mg of vitamin C and 450 IU of vitamin E for 60 days, and the other half was the control group (n = 5). Semen and blood samples were taken at 0, 30 and 60 days of treatment by electroejaculation and venipuncture, respectively. Evaluation of seminal characteristics of like sperm concentration, sperm vitality and motility were performed by means CASA system. Volume of the ejaculate was assessed directly in the extraction cup and pH using test strips. Antioxidant status was assessed by analyzing total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA) in blood plasma by ELISA. Plasma vitamins concentrations were evaluated with HPLC.

It was found that oral administration of vitamin C and E significantly increased vitamins plasma concentrations at 30 and 60 days of supplementation ( $p < 0.05$ ). In addition, vitamins supplementation significantly increased sperm concentration by 30 days of treatment, and increase vitality and sperm concentration at 60 days of treatment ( $p < 0.05$ ). It is concluded that 30 days of oral vitamins C and E supplementation or more, improves semen quality in rams.

**Key Words:** Vitamin C, Vitamin E, Oxidative stress, Seminal quality

### 3. INTRODUCCIÓN

Considerando que el objetivo principal de la producción ovina es la obtención del mayor número de corderos por oveja al año, la implementación e inserción de nuevos conocimientos y tecnologías reproductivas adquiere relevancia. Gran parte de los estudios están centrados en potenciar el manejo reproductivo asociado a la hembra, sin embargo, los carneros conforman normalmente del 2 a 5% de los rebaños ovinos, lo que significa que hay a lo menos 1 carnero por cada 50 hembras. Es por esta razón que la reproducción del carnero y sus manejos adquieren un rol trascendental tanto en la fertilidad como en la prolificidad del rebaño, debido a que la mala calidad seminal de un ejemplar afectará al éxito reproductivo de un gran número de hembras.

El manejo reproductivo asociado al carnero se enfoca principalmente en el examen andrológico y al manejo nutricional otorgado con el fin de obtener una calidad seminal óptima, que logre la mayor tasa de preñez. Sin embargo, se señalan diversos factores ambientales, genéticos y de manejo que alteran la calidad seminal.

Usualmente, se realiza una evaluación clínica del tracto reproductivo de los carneros seleccionados como reproductores antes del inicio de la temporada reproductiva, ya que la alteración de los órganos reproductivos disminuye la calidad seminal. Además, se busca otorgar una condición nutricional óptima, lo que muchas veces no puede asegurarse, debido a que en su mayoría depende de la pradera natural, pudiendo afectarse la calidad seminal.

En general, diversas alteraciones funcionales del tracto reproductivo en los machos se asocian a la presencia de estrés oxidativo, ya sea por modificaciones de la perfusión gonadal o por déficit del sistema antioxidante endógeno. Así mismo, el daño oxidativo es la causa principal de disminución de la fertilidad del semen ovino refrigerado o crioconservado utilizado en inseminación artificial, por lo que actualmente se adicionan vitaminas antioxidantes a los medios de conservación seminal. Los beneficios que ha traído la administración de vitaminas antioxidantes en evitar efectos del estrés oxidativo en el semen del hombre, hacen pensar que, en carneros, al suplementarlos previo a la época reproductiva, podría resultar beneficioso para mejorar la calidad seminal, ya que permitiría mantener un estado antioxidante óptimo y atenuaría el impacto ejercido por factores de manejo. Este estudio pretende evaluar el efecto de la suplementación de carneros con vitamina C y E sobre la calidad y estado antioxidante del semen

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Características Seminales del Carnero**

La American Sheep Industry Association (2002) señala que el potencial reproductivo del carnero está determinado por la capacidad de producir espermatozoides (ESP), en cantidad y calidad, así como la capacidad de producir hormonas sexuales induciendo la madurez sexual, presentación de libido y una serie de efectos en el macho. Sathe y Shipley (2014) indican que tanto el proceso de espermatogénesis como la actividad sexual, está mediado por la acción hormonal del eje hipotálamo-hipofisis-gonadal, sumada a la acción de la estacionalidad mediada por la glándula pineal (Garner y Hafez, 2000).

El semen se define como la suspensión celular líquida que contiene los ESP y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor del macho (Setchell, 2014). El plasma seminal constituye la porción fluida de la suspensión liberada en la eyaculación, procedente principalmente de la próstata, glándulas vesiculares y bulbouretrales (ASI, 2002). Barrios *et al.* (2000), señalan que dichas secreciones contienen componentes bioquímicos específicos que regulan las diferentes funciones espermáticas; particularmente el plasma seminal ovino contiene altas concentraciones de ácido cítrico, fructosa, glicerilfosforilcolina y sorbitol, entre otras (Garner y Hafez, 2000).

Por su parte, los ESP eyaculados derivan de las células germinales contenidas en los túbulos seminíferos localizados en el interior de los testículos (Setchell, 2014). Particularmente en el ovino, el proceso espermatogénico se inicia aproximadamente a los 5 meses de edad, pero los ESP producidos adquieren su total viabilidad poco tiempo después (Garner y Hafez, 2000). Cada ciclo espermatogénico dura aproximadamente 47 días y contempla 4 ciclos del epitelio seminífero, lo que se da a partir de las divisiones de la espermatogonia madre que suceden en diferentes momentos y a intervalos regulares de 10,5 días, asegurando una producción continua de ESP (ASI, 2002 ; Sathe y Shipley, 2014). Así mismo, el ESP alcanza sus últimas etapas de maduración en el epidídimo, generando como producto final una célula de forma alargada conformada por una cabeza aplanada y una cola, recubierta en su totalidad por la membrana plasmática y poseedora en el extremo anterior de una estructura de doble membrana denominada acrosoma (Sathe y Shipley, 2014). La membrana del ESP ovino se caracteriza por poseer una composición lipídica que difiere de las otras especies. Así, Jones

y Mann (1977) señalan que el ESP ovino posee altos niveles de fosfolípidos y de ácidos grasos poliinsaturados, además de bajos niveles de colesterol (Avdi *et al.*, 2004). Por otro lado, Avdi *et al.* (2004), plantean que existe una estrecha relación entre el tamaño testicular, la producción de semen y la variación estacional, indicándose que el tamaño testicular se asocia positivamente con el volumen del eyaculado, movilidad espermática, la calidad seminal y la producción de ESP y negativamente con los defectos espermáticos primarios, principalmente en etapa reproductiva (Garner y Hafez, 2000; Sathe y Shipley, 2014). Las características generales del eyaculado normal de un ovino varían entre autores, considerándose como parámetros de evaluación seminal principalmente al color, pH, volumen, concentración, morfología y motilidad espermática, los que presentan una variabilidad dependiendo del estado sanitario, nutricional o influencia medioambiental (Garner y Hafez, 2000).

Tabla N°1: Características seminales del carnero

<b>Autor (año)</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Concentración (Millones/mL)</b>	<b>Motiles (%)</b>	<b>Vitalidad (%)</b>
Garner y Hafez (2000)	0,8-1,2	2000-3000	60-80	83-95
Asienet <i>al</i> (2000)			79-88	71-84
Paulenzet <i>al</i> (2002)	0,75-2	>3500	>70	
Sathe y Shipley (2014)	0.8-1.5	1500-3000	70-90	85-90

## 4.2 Estrés Oxidativo: Alteraciones en Calidad Seminal

### 4.2.1 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EO) representa un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante (AO) (Agarwal *et al.*, 2014), que de persistir puede conducir a un daño celular irreversible. Las ROS son radicales libres (RL) con capacidad de causar daño oxidativo. Esto se debe a que poseen un electrón no apareado que les permite reaccionar con diversas biomoléculas, sustrayendo electrones para lograr su estabilidad, conllevando a la oxidación, desequilibrio y alteración estructural de moléculas circundantes, siendo sus sustratos más frecuentes los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, proteínas, carbohidratos y DNA (Agarwal *et al.*, 2014; Aitken *et al.*, 2014). No obstante, las ROS en bajas cantidades son necesarias para el desarrollo de las

funciones celulares normales implicadas en la proliferación, diferenciación y migración (Aitken *et al.*, 2014). Dado que las ROS se producen constantemente durante los procesos metabólicos, las células han desarrollado un complejo sistema de defensa AO, actuando como donador de electrones, evitando las reacciones de óxido-reducción (Agarwal *et al.*, 2014).

#### 4.2.2 *Estrés oxidativo seminal*

En el caso de los ESP, se señala que el EO induce importantes alteraciones en su supervivencia, calidad y fertilidad (Aitken *et al.*, 2014; Agarwal *et al.*, 2014). Los mecanismos celulares responsables de la generación de ROS en los espermatozoides varían entre especies, no obstante exhiben al igual que otras células, la capacidad constante de producir ROS durante el metabolismo aeróbico de procesos fisiológicos normales (Bansal y Bilaspuri, 2010). Las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, asociándose a eventos bioquímicos relacionados con la capacitación espermática, reacción acrosómica, capacidad fertilizadora, entre otras (Aitken *et al.*, 2014). Sin embargo, un desequilibrio entre su producción y degradación, independiente de su causa, desencadena efectos adversos a nivel estructural y funcional del ESP, o bien puede conducir a la activación de la apoptosis (Agarwal *et al.*, 2014). Kao *et al.* (2008) señalan que el aumento de ROS en el eyaculado deriva en una menor calidad seminal, disminuyendo la motilidad, concentración y alteración de la morfología espermática (Aitken *et al.*, 2014).

El proceso de peroxidación lipídica de la membrana espermática induce la pérdida de fluidez, estabilidad y permeabilidad, lo que se traduce en alteraciones en la motilidad, inhibición de la respiración, pérdida de enzimas intracelulares, vitalidad y morfología del ESP, especialmente en la zona del acrosoma (Kao *et al.*, 2008; Agarwal *et al.*, 2014). Otra acción deletérea de las ROS es la que se produce sobre el DNA, en donde se afecta directamente la integridad del DNA, induciendo modificación de las bases y entrecruzamiento de bases nitrogenadas, recolocación cromosómica, etc, lo que altera la función celular, por ende la fertilidad (Bansal y Bilaspuri, 2011). Agarwal *et al.* (2014), señalan la relación entre la presencia de alteraciones en el DNA producto de ROS y la baja concentración espermática, acentuándose ante aumento de temperatura testicular (Sanocka y Kurpisz, 2004), ya que disminuye la capacidad de replicación del DNA y la mitosis celular (González-Marin *et al.*,

2012). No obstante, Agarwal *et al.* (2014) plantean a la apoptosis celular como causa principal de la presentación de una baja concentración espermática, lo que se respalda con lo expuesto por numerosos estudios que señalan la presencia de un mayor porcentaje de ESP en apoptosis en pacientes con oligozoospermia que en pacientes con una concentración normal (Kefer *et al.*, 2009). Por otro lado, Sathe y Shipley (2014) relacionan la presentación de baja concentración espermática con alteraciones en el color del eyaculado, describiendo un color más opaco para aquéllos que tenían una concentración menor. Para otros parámetros de calidad seminal como son el pH y el volumen espermático, no se han obtenido datos certeros y directamente asociados al EO, no obstante, el pH se utiliza principalmente para evaluar calidad seminal, debido a que variaciones en su rango pueden afectar la motilidad y vitalidad espermática (Sathe y Shipley, 2014).

Para la evaluación del daño seminal por EO, se considera la medición de moléculas provenientes de la oxidación de proteínas y ácidos grasos, como son las proteínas carboniladas (PC) y malondialdehído (MDA) respectivamente, además de otros factores como la capacidad antioxidante total (TAC) o enzimas antioxidantes endógenas como glutatión peroxidasa (GPx) y superóxidodismutasa (SOD) (Agarwal *et al.*, 2014).

### **4.3 Sistema antioxidante**

#### *4.3.1 Capacidad Antioxidante Total (TAC)*

Un antioxidantes (AO) se define como cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos (Kusano *et al.*, 2008). En otras palabras, la función de un AO es la de actuar como donador de electrones, evitando el desarrollo de una reacción de óxido-reducción en cadena, sacrificando su integridad molecular para suprimir un daño en sustratos biológicos (Kefer *et al.*, 2009). Los AO se clasifican dependiendo de su mecanismo de acción y de su solubilidad en el agua, denominándose AO enzimáticos o AO no enzimáticos y AO liposolubles o AO hidrosolubles, respectivamente (Bansal y Bilaspuri, 2011).

Las células y tejidos corporales están equipados con sistemas de defensa que ayudan a contrarrestar y a evitar el daño oxidativo (Kefer *et al.*, 2009). Para mantener un estado de equilibrio funcional en el ambiente aeróbico, el sistema de defensa AO se organiza en 3

niveles principales de protección: prevención, intercepción y reparación (Kusano *et al.*, 2008). Como primera línea de defensa AO se encuentran los AO preventivos (SOD, GPx y proteínas secuestradoras de metales) los que suprimen la formación de RL. A continuación, intervienen los AO eliminadores de RL, los que son capaces de suprimir la iniciación de la reacción en cadena (vitamina C o ácido ascórbico, urato, albúmina), así como de evitar la propagación e inducir la finalización de la reacción en cadena (vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, ubiquinol, carotenos, polifenoles). Finalmente, actúan las enzimas sintetizadas de novo o de reparación, los que reparan daño y reconstituyen tejidos (fosfolipasas, proteasas, enzimas reparadoras de DNA, transferasas) (Wilcox *et al.*, 2004 ;Kusano *et al.*, 2008, Agarwal *et al.*, 2014 ).

Durante décadas, los investigadores han estudiado muchos biomarcadores de EO buscando cuantificar tanto el daño oxidativo como el sistema de defensa antioxidante, incluyendo la medición de enzimas AO y de productos generados por el daño oxidativo (Kusano *et al.*, 2008 ; Aitken *et al.*, 2014). Sin embargo, a principios de 1990 se describe una nueva prueba para medir el estado antioxidante total de un organismo, denominándola como capacidad antioxidante total (TAC) (Kusano *et al.*, 2008). Este ensayo se caracteriza por evaluar el sistema AO general del organismo, sin presentar distinción ni especificidad entre los diferentes AO, sino que evalúa los efectos de cooperación existentes entre los distintos AO del organismo (sinergismo), proporcionando una indicación de la capacidad global que presenta un individuo para contrarrestar las ROS, resistir el daño oxidativo y estudiar enfermedades asociadas con el EO (Ghiselli *et al.*, 2000 ; Kusano *et al.*, 2008).

Mayoritariamente los métodos para determinar la TAC se basan en la inhibición de ciertas reacciones por la presencia de AO, siendo los más utilizados aquellos que generan RL en medios específicos y son fácilmente detectados por técnicas fotométricas (Ghiselli *et al.*, 2000 ; Kusano *et al.*, 2008 ; Escorza *et al.*, 2009).

Tanto Kusano *et al.* (2008) como Escorza *et al.* (2009) indican que la medida de la capacidad antioxidante depende de la heterogeneidad y la naturaleza del sistema, así como del tipo de sustrato, su estado de saturación y estado fisicoquímico, además del tipo de iniciadores, la presencia de metales de transición y su interacción con el sistema. Ghiselli *et al.* (2000) señalan que para obtener una información más amplia y completa es más apropiado utilizar

distintos métodos con diferentes condiciones de oxidación. Además, debido a la heterogeneidad de condiciones analíticas utilizadas, los valores de la TAC sólo deberían ser comparados cuando se aplica el mismo método y el mismo disolvente (Escorza *et al.*, 2009).

#### 4.3.2 Sistema antioxidante seminal

Al igual que otras células, los ESP y el plasma seminal están equipados con sistemas AO para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS. Este sistema AO se compone por AO enzimáticos (superóxidodismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y no enzimáticos (ascorbato, urato, vitamina E, vitamina C, etc.), proporcionando a los ESP un entorno de protección contra el EO, no obstante ésta se ve influenciada por diversos factores (Garner y Hafez, 2000).

Diversas investigaciones señalan que un bajo nivel de la TAC tiene un papel clave en la infertilidad masculina, se ha visto que individuos infértiles poseen menor cantidad de AO en comparación con sus pares fértiles (Yeni *et al.*, 2010 ; Agarwal *et al.*, 2014). Así mismo, el EO seminal presenta una correlación positiva con una baja TAC, por lo que se indica que la suplementación de AO en la dieta mejora la TAC, mejorando la calidad seminal y atenuando el desarrollo de daño celular por EO, recomendando principalmente el uso de vitaminas (Kefer *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2014). Agarwal *et al.* (2014) indica que existe una correlación positiva entre la presentación de bajos niveles de AO enzimáticos o no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, SOD, etc) específicos con una baja TAC, predisponiendo al desarrollo de estrés oxidativo. Tanto Kefer *et al.* (2009) como Agarwal *et al.* (2014) señalan la relación entre la presentación de mayores alteraciones morfológicas a nivel espermático con la presentación de una baja TAC, atribuyendo principalmente al déficit de AO no enzimáticos en la dieta, no obstante en ciertas condiciones se puede atribuir a la baja concentración de AO enzimáticos (Kusano *et al.*, 2008). Agarwal *et al.* (2014) relacionan directamente la baja motilidad y vitalidad espermática con altos niveles de ROS y baja TAC.



## **4.4 Terapia Antioxidante**

### *4.4.1 Vitaminas Antioxidantes*

Como se señaló anteriormente, tanto los AO enzimáticos como los no enzimáticos (vitaminas) juegan un rol importante en la protección celular ante daño oxidativo, ya que su concentración va a repercutir directamente en la TAC del animal (Bansal y Bilaspuri, 2011). Aitken *et al.*, (2014) indican la importancia de los AO no enzimáticos y su efecto en la reducción y prevención de la infertilidad. Los AO no enzimáticos son también llamados antioxidantes eliminadores de RL y se clasifican en AO hidrófilos y AO lipófilos. Entre ellos se incluye a la vitamina A y vitamina E como AO liposolubles, así como a la vitamina C y al ácido úrico como AO hidrosolubles (Escorza *et al.*, 2009 ;Agarwal *et al.*, 2014). Particularmente, Kefer *et al.* (2009) señalan que el uso de vitamina C y E en la dieta aumenta la TAC mejorando la calidad seminal.

Tanto la vitamina C como la vitamina E son AO no enzimáticos de elección para suplementar a pacientes susceptibles al EO, administrados fundamentalmente en la dieta (Dragsted, 2008). La vitamina C es un AO hidrosoluble capaz de reaccionar con los RL presentes en el medio acuoso, romper la cadena de oxidación y, además, tiene el potencial de proteger componentes citosólicos y de membrana del EO (Dragsted, 2008 ; Ross *et al.*, 2010). Cabe señalar que los niveles de vitamina C en el plasma seminal humano es aproximadamente 10 veces más que la del plasma sanguíneo por lo que su rol en la protección del espermatozoide es fundamental (Agarwalet *al.*, 2014).

Así mismo, la vitamina E es un AO liposoluble que tiene la capacidad de eliminar los radicales hidroperoxilos lipídicos, romper la cadena de oxidación, lo que previene la propagación de los RL en las lipoproteínas plasmáticas y de membrana (Ross *et al.*, 2010; Agarwalet *al.*, 2014). Así mismo, es fundamental señalar que la vitamina E, al reaccionar con los radicales peroxilos, forma el radical tocoferilo (Vit. E-O<sup>-</sup>), el cual es reducido por la vitamina C, reciclando la vitamina E (Traber y Stevens, 2011).

### *4.4.2 Suplementación de vitaminas AO en la calidad seminal*

Tras diversas investigaciones, la suplementación con AO en la dieta ha adquirido un rol relevante al momento de la elección terapéutica contra la infertilidad masculina en patologías

asociadas a EO (Dragsted, 2008 ; Ross *et al.*, 2010 ; Agarwal *et al.*, 2014). Particularmente, Agarwal *et al.* (2014) señalan que el aumento de la TAC en un individuo producto de la suplementación con vitaminas AO se traduce en una mayor concentración, motilidad y vitalidad espermática, así como en una menor presentación de ESP defectuosos. Así mismo, Ross *et al.* (2010) mediante el análisis de un número de investigaciones en las que se utilizaron distintos AO como terapia de la infertilidad masculina, señalan que el uso de AO mejora la calidad seminal, mejorando principalmente la motilidad espermática y disminuyendo el estrés oxidativo. Por otro lado, Chew (1995) señalan que el uso de AO es fundamental en animales, ya que aumenta la TAC y disminuye la predisposición al desarrollo de EO, además Bansal y Bilaspuri (2010) recomiendan mantener una óptima TAC en los animales para disminuir entre otras cosas, alteraciones reproductivas producto de EO.

Tras analizar distintos estudios, Agarwal *et al.* (2014) señalan que el uso de vitaminas AO y su efecto es dosis dependiente. En el caso del uso de vitamina E, en dosis adecuadas, se establece que disminuye los niveles de MDA, aumenta la concentración espermática y mejora tanto la vitalidad como la motilidad espermática, además de mejorar la tasa de fertilidad y disminuir la tasa de abortos (Bansal y Bilaspuri, 2011 ; Agarwal *et al.*, 2014). Por otro lado, Aitken *et al.* (2014) y Agarwal *et al.* (2014) señalan que el uso indicado de vitamina C impacta y mejora sustancialmente la motilidad y vitalidad espermática, sin embargo sobredosificación va a significar una disminución de la motilidad espermática. Por otro lado, Fraga *et al.* (2010) señalan que el uso de vitamina C previene del daño del DNA por EO conllevando a una disminución de la mortalidad espermática y de la presentación de ESP defectuosos, además de un aumento de la tasa de fertilidad.

La información previamente presentada hace suponer que la suplementación de carneros con vitamina C y vitamina E, puede contribuir a mejorar la capacidad antioxidante total de los ejemplares, favoreciendo la calidad seminal.

## **5. HIPÓTESIS**

Durante la gametogénesis, los espermatozoides están virtualmente expuestos al estrés oxidativo que afecta negativamente la función reproductiva de los carneros, lo que se previene con el uso de antioxidantes.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

Establecer el efecto de la administración de vitaminas antioxidantes en las características seminales y estado oxidativo de los carneros.

### **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.** Evaluar las características seminales: volumen, color, pH, concentración, motilidad progresiva y vitalidad espermáticas; a los 0, 30 y 60 días en carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes.
- 2.** Evaluar la capacidad antioxidante plasmática, mediante el análisis de MDA y TAC a los 0, 30 y 60 días en carneros con y sin tratamiento.
- 3.** Evaluar las concentraciones plasmáticas de vitamina C y E a los 0, 30 y 60 días en carneros con y sin tratamiento

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio contó con la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y del Comité Asesor de Bioética de la Comisión Nacional Científica y Tecnológica (Conicyt).

### **7.1 Ubicación**

El estudio se realizó en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET), ubicada en Santiago, RM, a 540 m.s.n.m.

### **7.2 Animales**

Los animales considerados en este estudio corresponden a carneros mestizos (1 a 2 años de edad), fenotípicamente semejantes y de similar peso corporal.

Los animales fueron alimentados con 2,5 kg de alfalfa por día, administrados en 2 raciones diarias, para cubrir sus requerimientos (NRC, 2007) y dispusieron de agua *ad libitum*. La mitad de los animales fue suplementado diariamente con vitaminas antioxidantes, en dosis de 650 mg de Vitamina C y 450 U.I. de Vitamina E (grupo LLV) a partir de la realización del primer muestreo hasta la finalización del experimento a los 60 días de iniciada la suplementación. Las dosis fueron ajustadas según el peso corporal de los animales, basándose en lo descrito por Parraguez *et al.* (2011), para lograr aumento en la concentración plasmática de las vitaminas C y E. Las vitaminas fueron administradas directamente en el hocico de cada animal a primera hora en la mañana y su absorción fue evaluada mediante la medición de su concentración en plasma sanguíneo. La otra mitad de los animales que no recibió vitaminas constituyó el grupo control (LL).

### **7.3 Diseño experimental**

Las muestras para la evaluación de la calidad seminal fueron tomadas a los días 0, 30 y 60 de iniciado el tratamiento con vitaminas, buscando evaluar el efecto de la suplementación en un ciclo espermático ovino que dura aproximadamente 47 días (Sathe y Shipley, 2014). Así mismo, las muestras de cada animal y tiempo de muestreo fueron analizadas en duplicado.

Los grupos muestrales estuvieron constituidos por 5 animales para cada periodo muestral. El tamaño de cada grupo fue estadísticamente calculado considerando las diferencias y la variabilidad estadística en la concentración plasmática de testosterona entre carneros con fertilidad normal y baja (Moore *et al.*, 1978) y las diferencias y variabilidad estadísticas entre el diámetro testicular y su relación con la calidad seminal (Islam y Land, 1977), considerando  $\alpha=0,05$ . Los experimentos fueron realizados durante la temporada reproductiva (Marzo, Abril y Mayo).

#### **7.4 Muestras sanguíneas**

Se tomaron muestras de sangre (10 mL) con jeringas heparinizadas desde la vena yugular para la medición de la concentración de biomarcadores de estrés oxidativo y de vitamina C y E. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g por 10 minutos a 4° C (MIKRO 200 R, HettichZentrifugen, Alemania) para la obtención de plasma sanguíneo, el que se almacenó a – 80° C hasta su posterior medición.

La evaluación del daño oxidativo en lípidos (malondialdehído) y la capacidad antioxidante total se realizó en plasma sanguíneo en triplicado mediante un test colorimétrico, siguiendo las especificaciones técnicas del fabricante (Cayman Chemicals Company, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.), utilizando el kit comercial TBARS y el Antioxidant Assay Kit, respectivamente. La medición de absorbancia de las microplacas se realizó con el lector Microplate Reader DNM-9602 (Beijing, Perlong New Technology Co. Ltd., Beijing, China).

La concentración plasmática de las vitaminas C y E se midió mediante cromatografía de alto rendimiento (HPLC) con detección amperométrica y de fluorescencia respectivamente, siguiendo los procedimientos usados previamente en ovejas (Parraguez *et al.*, 2011).

#### **7.5 Recolección y evaluación del semen**

Las muestras de semen fueron extraídas mediante electroestimulación y recogidas en una copa graduada. Previo a la electroestimulación (15 minutos antes), los carneros recibieron 0,2 mg/Kg de Xilacina intramuscular (Centrovét, Chile). Se limpió el recto de heces y el área del prepucio se lavó con suero salino. La electroeyaculación se realizó utilizando una sonda de 3 electrodos (150 mm x 25 mm) conectada a una fuente de poder que permite el control

del voltaje y amperaje recomendado para carneros (Minitub GmbH, Moledo Ejakulator, Alemania).

El volumen del eyaculado fue medido utilizando la graduación de la copa de recolección. El eyaculado fue analizado para concentración espermática y motilidad progresiva, utilizando un Sistema Computarizado de Análisis del Semen, CASA (ISAS-MCMfFdVit, Valencia, España), siguiendo los protocolos establecidos por el fabricante. Además, se analizó la vitalidad espermática mediante citometría de flujo (Gallios, Beckman Coulter, Inc. Miami, FL USA.), utilizando yoduro de propidio como fluoróforo y las muestras fueron guardadas en oscuridad a 4°C hasta su posterior análisis. Así mismo, el pH fue determinado mediante el uso de tiras reactivas (Merck, Alemania).

## **7.6 Análisis estadístico**

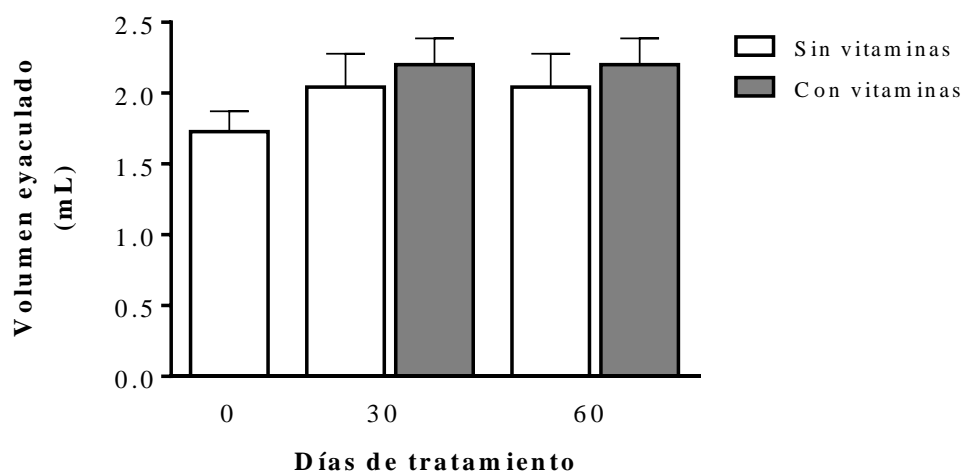
Los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad. Posteriormente fueron sometidos a comparación mediante un análisis de varianza (ANDEVA), siguiendo un modelo factorial, donde los factores fueron la administración de vitaminas y el tiempo de suplementación. Cuando el ANDEVA resultó significativo se realizó la prueba de Duncan para establecer cuáles fueron los grupos distintos. Se consideraron diferencias significativas cuando  $P \leq 0,05$ . Los resultados son expresados en promedio  $\pm$  error estándar de la media.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Características Seminales

#### a. Volumen del eyaculado:

En la figura 1 se muestran los promedios del volumen del eyaculado a los 0, 30 y 60 días en carneros LL y LLV. Al comparar los promedios del volumen del eyaculado a lo largo del tratamiento, no se apreciaron variaciones significativas que dependan de la suplementación con vitaminas ( $p=0,69$ ), de los días de tratamiento ( $p=0,253$ ), ni de la interacción de las variables ( $p=0,87$ ).

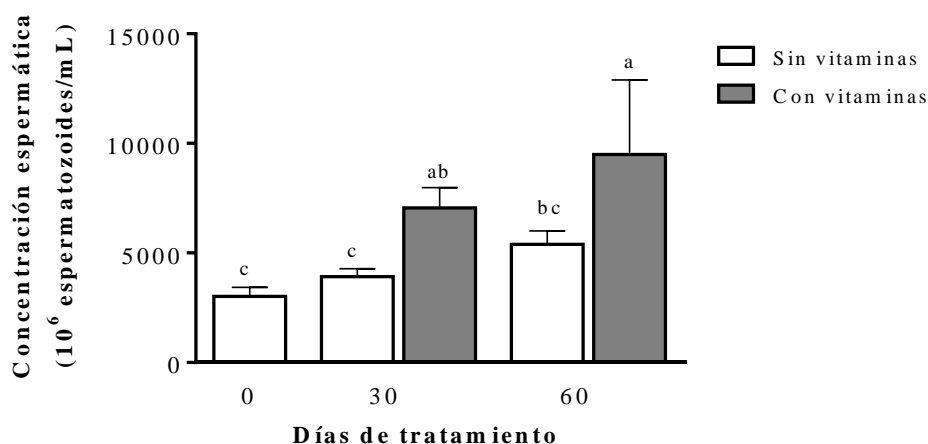


**Figura Nro. 1:** *Volumen del eyaculado de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 0, 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm EE$ ).*

#### b. Concentración espermática

En la figura 2 se muestran los promedios de la concentración espermática a los 0, 30 y 60 días en carneros LL y LLV. Se observa que los grupos LLV, tanto al día 30 y 60 de tratamiento, registran valores más altos que los animales control a los mismos días de tratamiento, asociado principalmente al factor suplementación de vitaminas ( $p=0,01$ ). En contraste, la concentración espermática no presenta variaciones significativas que dependan del tiempo de tratamiento ( $p=0,08$ ), ni de la interacción de las variables ( $p=0,64$ ).

Adicionalmente se estableció que el grupo LLV60 fue significativamente mayor con respecto a los grupos no tratados al tiempo 0,30 y 60, así mismo el grupo LLV30 fue significativamente mayor que los grupos no tratados al tiempo 0 y 30 ( $p < 0,05$ ).

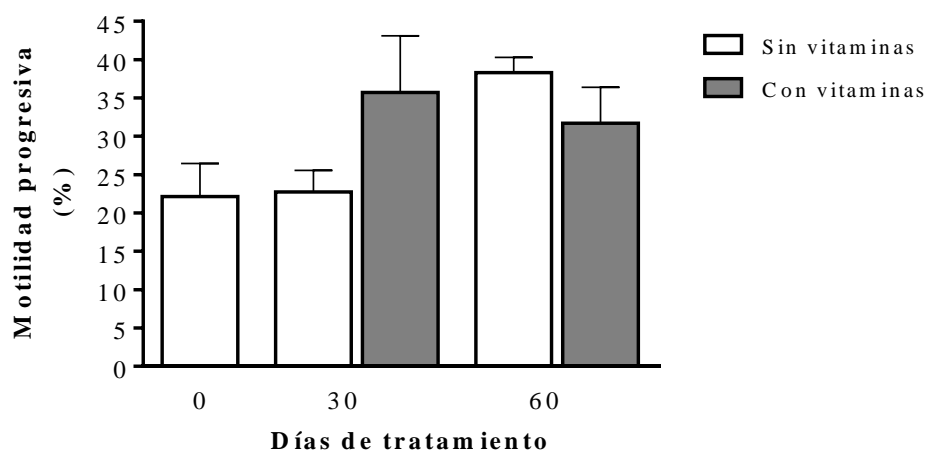


**Figura Nro. 2:** Concentración espermática de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 0, 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm EE$ ). (a,b,c): Las letras distintas, indican diferencias estadísticamente significativas entre los respectivos grupos ( $p < 0,05$ ).

### c. Motilidad progresiva

En la figura 3 se muestran los promedios de la motilidad progresiva a los 0, 30 y 60 días en carneros con y sin tratamiento de vitaminas, LL y LLV, respectivamente. Aunque se observa que los valores promedios de la motilidad progresiva son más altos en los grupos tratados y control a los 60 días, el análisis estadístico mostro que no hay variaciones significativas que dependan del factor días de tratamiento ( $p=0,3$ ), de la administración de vitaminas ( $p=0,62$ ) ni de la interacción entre ambas variables ( $p=0,14$ ).

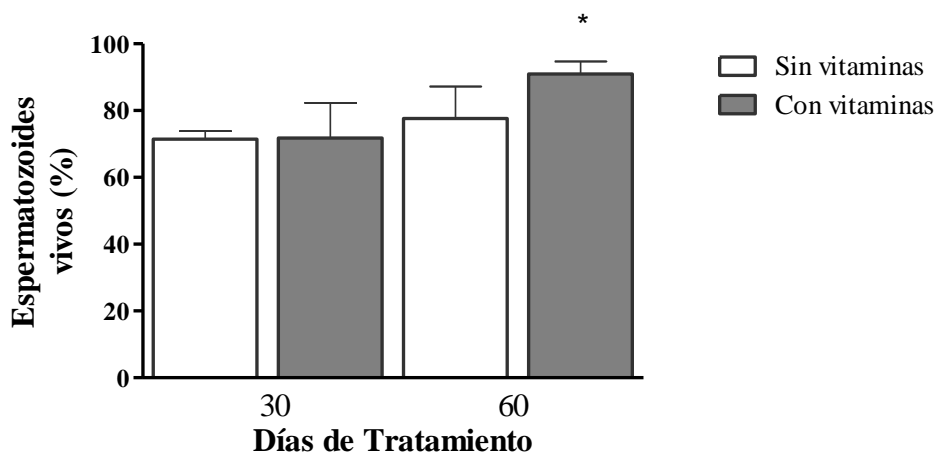




**Figura Nro. 3:** Motilidad progresiva de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 0, 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm EE$ ).

**d. Vitalidad espermática:**

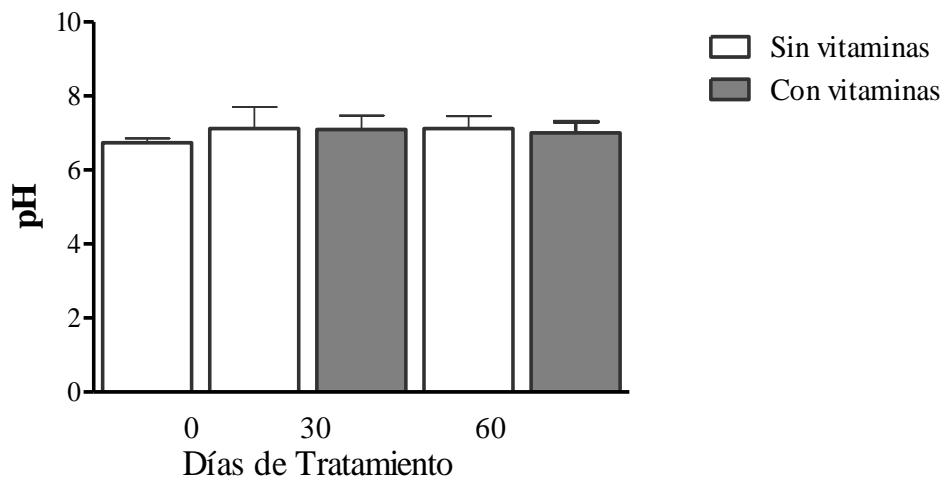
En la figura 4 se muestran los promedios de la vitalidad espermática a los 30 y 60 días en carneros LL y LLV. Para esta variable no fue posible obtener la medición al tiempo 0. Los promedios de la vitalidad espermática, en términos absolutos, a los 30 días de tratamiento registraron valores más bajos que los animales evaluados al día 60. Además, se estableció que el grupo LLV60 fue significativamente mayor con respecto los grupos LL30, LLV30 y LL60 ( $p < 0,05$ ), lo que se asocia principalmente al efecto de la variable días de tratamiento ( $p = 0,02$ ) y a la interacción de las variables suplementación y días de tratamiento ( $P = 0,05$ ). En cambio no se observa influencia significativa del factor suplementación de vitaminas en la variación de los grupos ( $p = 0,07$ ).



**Figura Nro. 4:** Vitalidad espermática de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm EE$ ). \* Indica diferencia estadísticamente significativa con los grupos LL30, LLV30 y LL60.

#### e. pH:

En la figura 5 se muestran los promedios del pH del eyaculado a los 0, 30 y 60 días en carneros LL y LLV. Al comparar los promedios del pH del eyaculado a lo largo del tratamiento, no se observa variación entre los grupos LL y LLV. Los promedios del pH al día 30 y 60, independiente del grupo, oscilan entre  $7,0 \pm 0,3$ - $7,1 \pm 0,5$ , no obstante al día 0 se obtuvo un promedio de  $6,7 \pm 0,1$ . El pH del eyaculado presentó poca variabilidad entre animales, además; no se apreciaron variaciones significativas que dependan de la suplementación con vitaminas ( $p=0,680$ ), de los días de tratamiento ( $p=0,196$ ), ni de la interacción de las variables ( $p=0,768$ ).



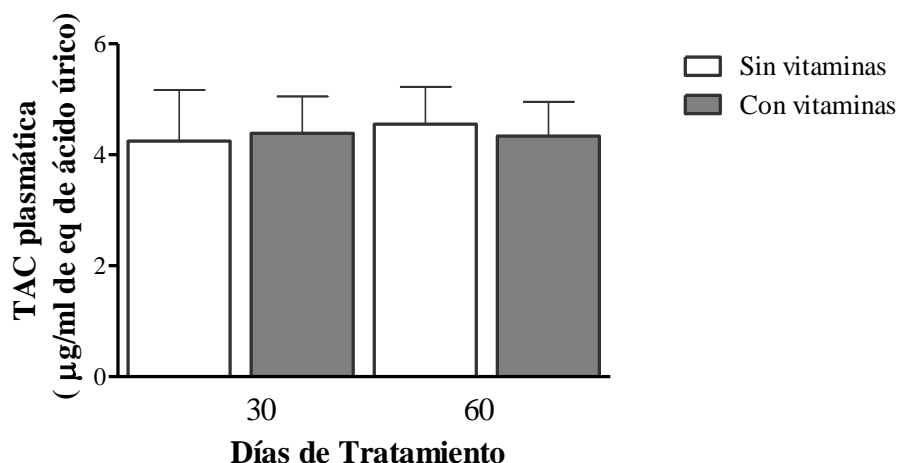
**Figura Nro. 5:** *pH del eyaculado de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 0, 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm EE$ ).*

**f. Color:**

Durante el tratamiento se evaluó el color del eyaculado a los 0, 30 y 60 días en carneros LL y LLV. Al comparar el color entre los distintos grupos y tiempos de suplementación no se apreciaron variaciones, describiéndose como blanquecino en todos los animales estudiados.

**8.2 Capacidad Antioxidante Total (TAC) del plasma sanguíneo**

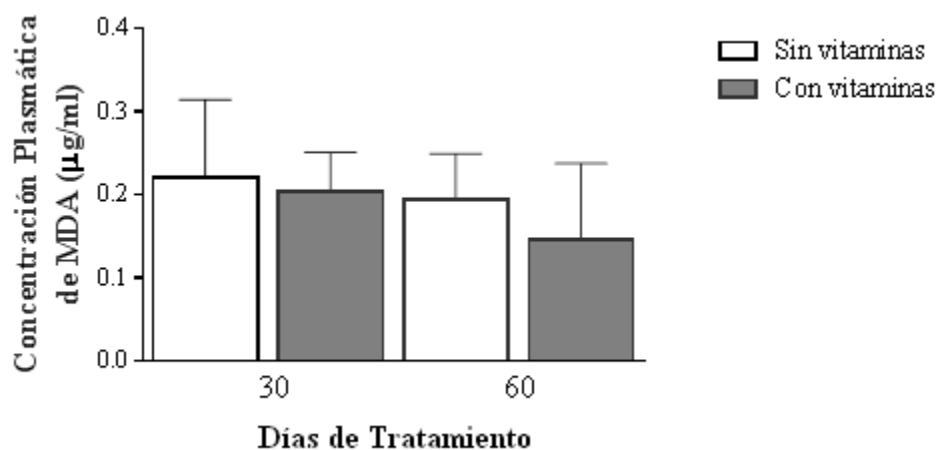
En la figura 6 se muestran los promedios de la TAC del plasma sanguíneo a los 30 y 60 días en carneros LL y LLV. Es importante señalar que para esta variable no fue posible obtener la medición al tiempo 0. Al comparar la promedios de la TAC del plasma sanguíneo no se observan diferencias significativas que dependan de la suplementación con vitaminas ( $p=0,9$ ), de los días de tratamiento ( $p=0,7$ ), ni de la interacción de las variables ( $p=0,5$ ).



**Figura Nro. 6:** Capacidad Antioxidante Total plasmática de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm DS$ ).

### 8.3 Concentraciones de malondialdehído (MDA) en el plasma sanguíneo

En la figura 7 se muestran los promedios de las concentraciones plasmáticas de MDA a los 30 y 60 días en carneros LL y LLV. Para esta variable tampoco fue posible obtener la medición al tiempo 0. Se observa que los grupos presentaron gran variabilidad, sin mostrar diferencias significativas entre los grupos que dependan de la suplementación con vitaminas ( $p=0,2$ ), de los días de tratamiento ( $p=0,19$ ), ni de la interacción de las variables ( $p=0,62$ )

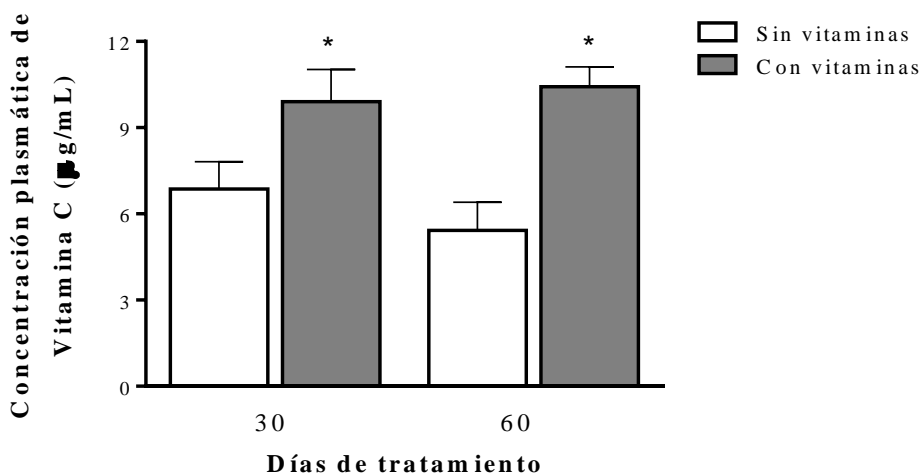


**Figura Nro. 7:** Concentraciones plasmáticas de MDA de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm EE$ ).

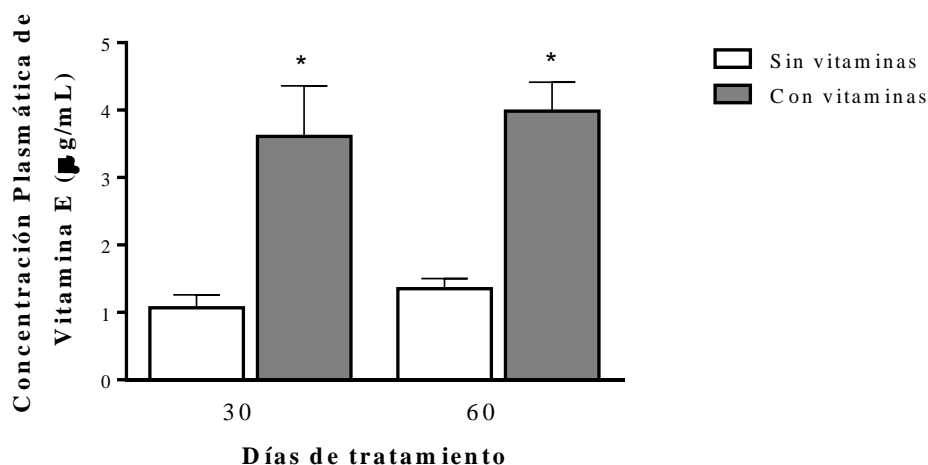
#### 8.4 Concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E

En la figura 8 y 9 se muestran los promedios de las concentraciones plasmáticas de vitamina C y vitamina E en los grupos LL y LLV, respectivamente. Para esta variable, no fue posible obtener la medición de las concentraciones plasmáticas de vitamina C y vitamina E al tiempo 0. Al comparar los promedios de las concentraciones plasmáticas de vitamina C a lo largo del tratamiento, se observa que las concentraciones obtenidas por el grupo LLV al día 30 y 60 fueron significativamente más altas con respecto a sus controles, asociado principalmente al factor vitaminas ( $p=0,05$ ). No se apreciaron variaciones significativas que dependan del factor días de tratamiento ( $p=0,3$ ) ni de la interacción entre suplementación de vitaminas y tiempo de tratamiento ( $p=0,6$ ).

Así mismo, al comparar los promedios de las concentraciones plasmáticas de vitamina E, se observa un aumento significativo en el grupo LLV al día 30 y 60 con respecto a sus grupos no suplementados, asociado principalmente al factor suplementación de vitaminas ( $p=0,01$ ). No se apreciaron variaciones significativas que dependan del factor días de tratamiento ( $p=0,4$ ) ni de la interacción entre suplementación de vitaminas y tiempo de tratamiento ( $p=0,9$ ).



**Figura Nro. 8:** Concentraciones plasmáticas sanguíneas de vitamina C de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm EE$ ). \* Indica diferencia estadísticamente significativa con los grupos no tratados.



**Figura Nro. 9:** Concentraciones plasmáticas sanguíneas de vitamina E de carneros con y sin tratamiento de vitaminas antioxidantes a los 30 y 60 días de suplementación ( $X \pm EE$ ). \* Indica diferencia estadísticamente significativa con los grupos no tratados

## 9. DISCUSIÓN

Tanto Aitken *et al.* (2014) como Agarwal *et al.* (2014) señalan que los espermatozoides potencialmente están expuestos al daño por EO, induciendo importantes alteraciones en su supervivencia, calidad y fertilidad. Así mismo, Kefer *et al.* (2009), Yeni *et al.* (2010) y Agarwal *et al.* (2014) relacionan la presentación de un mayor daño por EO en los espermatozoides con la presencia de una baja TAC, recomendando la suplementación con vitaminas AO para aumentar la TAC, atenuar daños por estrés oxidativo y mejorar las características seminales. Considerando lo anterior, en el presente estudio se analizó el efecto de la suplementación de vitamina C y E tanto en la concentración plasmática de MDA y TAC de carneros suplementados y no suplementados durante 60 días, así como su impacto en las características seminales: volumen del eyaculado, color, pH, motilidad progresiva, concentración y vitalidad espermática.

### 9.1 Efecto Fotoperiodo/Estacionalidad

En primer lugar, tras comparar los resultados obtenidos de animales no suplementados durante los meses de muestreo para distintas características seminales (volumen del eyaculado, motilidad progresiva, concentración y vitalidad espermática) se observó, pese a

no evidenciar variaciones estadísticamente significativas, una tendencia al aumento desde el mes de marzo a mayo, obteniendo resultados superiores con el transcurso del tiempo. Las variaciones observadas, según Sathe y Shipley (2014) pueden ser atribuidas al efecto de la estacionalidad, ya que los carneros, al igual que las hembras, son afectados por el efecto fotoperiodo (ASI, 2002). Así mismo, Garner y Hafez (2000) indican que los ovinos son estacionales de días cortos, entrando en etapa reproductiva a medida que los días presentan menos horas de luz, situación que coincide durante los meses de muestreo.

Por otro lado, Avdi *et al.* (2004) señalan que existe una relación positiva entre la producción de semen y la estacionalidad reproductiva, respaldando las diferencias obtenidas durante los meses de muestreo en los animales sin suplementación. Garner y Hafez (2000), Sathe y Shipley (2014), Ross *et al.* (2010) indican que la variación estacional, en etapa reproductiva, se asocia positivamente con la motilidad espermática y la vitalidad espermática, así como negativamente con los defectos espermáticos primarios. Además, señalan que el factor estacionalidad aumenta la concentración y vitalidad espermática, la motilidad progresiva y el volumen del eyaculado, no obstante, señalan que su nivel de repercusión depende de la raza ovina.

Lo anterior, permite establecer que el factor estacional estuvo presente en los resultados obtenidos en la presente memoria. Sin embargo, por tratarse de un efecto fijo inevitable, se asume que afecta de igual forma a todos los animales, lo que permite evaluar sin inconvenientes efecto de la suplementación de vitaminas antioxidantes en las características seminales.

## 9.2 Concentración plasmática de vitamina C y E

En primer lugar, tras el análisis de las concentraciones plasmáticas de vitamina C y vitamina E obtenidas por los grupos suplementados al día 30 y 60 de tratamiento y su significativo aumento con respecto a los animales no suplementados, se puede establecer que la administración oral y diaria de vitaminas AO impacta positivamente en las concentraciones plasmáticas de los animales tratados, siendo un método efectivo de suplementación. Esto coincide con las recomendaciones expuestas por Bansal y Bilaspuri (2011), Aitken *et al.* (2014) y Agarwal *et al.* (2014), quienes sugieren a la administración oral como método de elección para suplementar vitaminas AO con un fin preventivo y atenuante para elevar la

TAC y mejorar las características seminales, sin embargo, estos autores señalan que aún no existe una estandarización de la forma de administración oral ni de la dosis adecuada para lograr el efecto esperado en humanos.

En el caso de los ovinos, se describen diversas formas de administración de vitamina C y E para cubrir los requerimientos básicos (NRC, 2007) tales como: presentación en polvo feed-grade, polvo como agente dispersable en agua, líquidas hidromiscibles, formas recubiertas, formas estabilizadoras e inyectables (connotación terapéutica). Sin embargo, Clifford (2001) señala que la suplementación oral diaria de vitaminas en rumiantes es una buena forma de prevenir potenciales deficiencias y sus repercusiones, ya que la mayoría de las vitaminas suplementadas posee buena absorción digestiva, además de que no poseen gran capacidad de almacenamiento en el organismo por lo que se necesita constante suplementación. Así mismo, señala que la suplementación oral de vitaminas en rumiantes han reportado efectos positivos al disminuir la incidencia de enfermedades, mejorar la respuesta productiva y la respuesta del sistema inmunológico.

Trabajos de Daniels (2000) o Parraguez *et al.* (2011) demuestran que la administración oral y diaria de vitaminas es capaz de atenuar el daño por estrés oxidativo en ovejas gestantes. Así mismo, las investigaciones de Yan *et al.* (2010), Lou *et al.* (2011) y Jafaroghli *et al.* (2010) en carneros y de Hong *et al.* (2010) en chivos, sugieren que la suplementación oral de vitaminas AO repercute positivamente en el desarrollo testicular, en la calidad seminal y su actividad enzimática, demostrando que la suplementación oral permite obtener resultados significativos y consistentes en las características reproductivas de los ovinos.

Por otro lado, Agarwal *et al.* (2014) señalan que aún no existe una estandarización en el tiempo recomendado de suplementación de vitaminas AO en humanos, pero indica que los efectos sobre la calidad seminal, estado AO y biomarcadores de EO, se observan en un mínimo de 90 días, debido al aumento significativo de los niveles plasmáticos de las vitaminas suplementadas (Farrel, 1993; Halliwell y Whiteman, 1997; Horwitt, 2001). Así mismo, las investigaciones tanto para vitamina C de Padilla *et al.* (2007) en vacas y de Hidiroglouet *al.* (1997) en ovejas, para vitamina E de Rekkas *et al.* (2000) en carneros, como para ambas de Parraguez *et al.* (2011) en oveja, señalan que las concentraciones



plasmáticas de las vitaminas suplementadas aumentan significativamente tras 30 días de tratamiento, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

### 9.3 Concentración plasmática de MDA y TAC

Con respecto a la TAC y el MDA, los resultados obtenidos no evidencian diferencias estadísticamente significativas entre los grupos suplementados y los no suplementados. Sin embargo, es importante señalar que al comparar los promedios de MDA se observa que los grupos tratados presentan tendencia a menor concentración que los no tratados, coincidiendo con señalado por Agarwal (2014) quien indica que la suplementación de vitaminas AO disminuye los niveles de MDA. En el caso de animales, estudios de Parraguez *et al.* (2011) en ovejas, Yusef *et al.* (2004) en conejos, Hatamoto *et al.* (2006) en perros y Hong *et al.* (2010) en chivos, señalan que la suplementación de vitaminas AO disminuyen significativamente el MDA a nivel plasmático en el caso ovejas como también a nivel seminal en los perros, chivos y conejos. Así mismo, Imamovic y Pinter (2014) tras analizar diversos estudios en humanos encuentran que los niveles plasmáticos de MDA tienden a disminuir con terapias antioxidantes. No obstante, señalan que las variaciones significativas dependen del antioxidante utilizado, su dosis y si existe una predisposición a la presentación de EO, lo que coincide con lo expuesto por Agarwal *et al.* (2014) y Parraguez *et al.* (2011). Además, Izquierdo *et al.* (2009) tras analizar diversos estudios, describe los beneficios del uso de vitaminas antioxidantes en los diluyentes de criopreservación del semen, disminuyendo la presentación de biomarcadores de EO y mejorando la calidad seminal. Por lo tanto, considerando lo anterior y pese a los resultados obtenidos no se puede desestimar que la suplementación oral de vitamina C y E en carneros pueda atenuar los daños por EO e inducir cambios en los niveles de MDA de animales tratados, no obstante se sugieren nuevas investigaciones.

Por otro lado, la literatura abordada no expresa un consenso exacto respecto al efecto de la suplementación de vitaminas AO en la TAC. Por un lado, estudios como los de Imamovic y Pinter (2014) en humanos y Parraguez *et al.* (2011) señalan que hay efectos positivos en la TAC plasmática al suplementar con vitaminas AO a individuos sometidos a condiciones predisponente de EO, en cambio, estudios como el de Chao *et al.* (1999) indican que no siempre existen alzas significativas de la TAC en animales suplementados y

sometidos a condiciones de EO. Así mismo, pese a que tanto Agarwal *et al.* (2014) como Chew (1995) indican que la suplementación de vitaminas AO debería elevar la TAC en los pacientes suplementados, son estos mismo autores quienes señalan que el factor suplementación no implica que siempre se presentarán diferencias significativas entre tratados y no tratados, sino que su administración puede o no repercutir en las concentraciones plasmáticas de la TAC, lo que se reafirma por lo expresado por Imamovic y Pinter (2014) en humanos y por los resultados encontrados en este estudio, que pese a la suplementación durante 60 días, en carneros no se encontraron variaciones significativas de la TAC.

Es importante señalar además, que la TAC se caracteriza por evaluar el sistema AO general del organismo, sin presentar distinción ni especificidad entre los diferentes AO y su capacidad (Ghiselli *et al.*, 2000 ; Kusano *et al.*, 2008). Tanto Agarwal *et al.* (2014) como Aitken *et al.* (2014) sugieren que para obtener resultados concluyentes respecto al efecto de la suplementación de antioxidantes se recomienda la medición de otros marcadores como proteínas carboniladas y enzimas antioxidantes a nivel plasmático y local. Así mismo, Escorza y Salinas (2009) recomiendan la evaluación de la TAC como indicador de estado global y dinámico del estado antioxidante, sin embargo, destacan la importancia de evaluar el estado de los antioxidantes específicos. Además Ghiselli *et al.* (2000), señalan que la evaluación de la TAC no refleja el comportamiento y estado de los sistemas antioxidantes específicos, así mismo, junto a Escorza y Salinas (2009) sugieren, dependiendo del propósito, evaluar el estado antioxidante local, ya que esto otorgará resultados más concluyentes y significativos a la hora del análisis. En el caso del efecto de la suplementación con antioxidantes en el estado antioxidante seminal y general, estudios como Imamovic y Pinter (2014), Agarwal *et al.* (2014), Hatamoto *et al.* (2006) y Aitken *et al.* (2014), coinciden con lo expuesto por Escorza y Salinas (2009), ya que respaldan sus conclusiones de la efectividad de la suplementación en el estado antioxidante con la evaluación de parámetros antioxidantes seminales y plasmáticos, encontrando principalmente resultados positivos en los parámetros antioxidantes locales.

Nuestro estudio no mostró cambios significativos de la TAC y del MDA plasmático por efecto del tratamiento con vitaminas antioxidantes. Esto, sin embargo, no descarta la

posibilidad de un incremento del estatus antioxidante a nivel seminal o testicular, situación que permitiría explicar los resultados encontrados en la calidad seminal.

#### 9.4 Características seminales

Dentro de las características seminales analizadas, se aprecia que la suplementación de vitaminas antioxidantes no repercute significativamente sobre el volumen del eyaculado de los animales tratados, no obstante los grupos suplementados con vitaminas AO presentan una tendencia a tener volúmenes del eyaculado promedio más alto con respecto a los grupos no suplementados, coincidiendo así con lo expuesto por Aitken *et al.* (2014) y Eskenazi *et al.* (2005) quienes señalan que la terapia AO impacta positivamente en el volumen del eyaculado.

Al analizar el impacto de la suplementación de vitaminas AO en otras características seminales como el pH o el color, no se aprecian variaciones significativas atribuibles a la administración, situación que coincide con la literatura abordada en donde no se hace referencia respecto al efecto significativo de la suplementación de antioxidantes en estas variables. Sin embargo, tanto Sathe y Shipley (2014) y Garner y Hafez (2000) señalan que tanto la presentación de variaciones significativas en el rango del pH seminal como cambios de color en el semen pueden indicar el desarrollo de patologías, presencia de orina o contaminantes que alteren la calidad seminal, por lo que se puede establecer que los eyaculados analizados provienen de animales sanos, que están libres de contaminación y que presentan condiciones que permitieron un análisis de otras características seminales sin interferencias.

Con respecto a la motilidad progresiva, no se observan diferencias significativas entre las motilidades presentadas por animales tratados y no tratados. Ni siquiera se aprecia una leve tendencia a un aumento por parte de los animales suplementados por sobre los no tratados, como manifestó el volumen del eyaculado. Situación que contrasta con lo señalado por Bansal y Bilaspuri (2011), Aitken *et al.* (2014) y Agarwal *et al.* (2014), quienes indican que la suplementación de vitaminas AO aumenta significativamente la motilidad progresiva en los individuos tratados. Así mismo, investigaciones de Eskenazi *et al.* (2005) en humanos, Yusef *et al.* (2004) en conejos, Hatamoto *et al.* (2006) en perros y Audet *et al.* (2004) en jabalís, respaldan el impacto positivo y significativo que tiene la administración de vitaminas AO en la variable estudiada. Pese a que Avdi *et al.* (2004), Garner y Hafez (2000) y Sathe y

Shiple (2014) describen que tanto la motilidad progresiva como otras características seminales son afectadas por diversos factores, no se logra explicar el descenso de la motilidad progresiva por parte de los animales tratados al día 60 con respecto a los del día 30. Considerando lo señalado por Agarwal *et al.* (2014) respecto a los beneficios de la suplementación de vitaminas AO en motilidad progresiva, independiente de los resultados obtenidos no se descarta la potencialidad descrita de la suplementación de vitaminas AO sobre la motilidad progresiva de los carneros, debido a que en la literatura abordada no se describen efectos nocivos asociados a la dosis ni al tiempo determinado en este estudio.

Por otro lado, al analizar el impacto de la suplementación de vitaminas AO en la vitalidad espermática se aprecia que los animales suplementados al día 60 obtienen una vitalidad promedio significativamente mayor con respecto a los grupos no suplementados y al grupo suplementado a los 30 días. Los animales suplementados durante 60 continuos alcanzan un promedio de 90,9 % de espermatozoides vivos, evidenciando una diferencia de casi un 12% con respecto a los otros grupos y alcanzando estándares recomendados por Garner y Hafez (2000). La significancia de los resultados obtenidos se asocian principalmente al tiempo de suplementación, coincidiendo con lo expuesto por Ross *et al.* (2010) e Imamovic y Pinter (2014) quienes señalan que la terapia AO repercute significativamente sobre la vitalidad espermática si es suministrada durante un periodo mínimo. Así mismo, las variaciones significativas según Agarwal *et al.* (2014) e Imamovic y Pinter (2014) también dependen de la administración de una dosis constante durante un tiempo determinado, hecho que se evidencia al observar diferencias significativas luego de 60 días de tratamiento a los carneros con una dosis fija de vitamina E y C. En el caso de los humanos, Imamovic y Pinter (2014) señalan que para obtener resultados significativos en la vitalidad espermática se recomienda una suplementación diaria por al menos 90 días, coincidiendo con los resultados encontrados por Akmal *et al.* (2006) y Kobori *et al.* (2014). En cambio en el caso de jabalís, Audet *et al.* (2004) señalan que una terapia de 2 meses a dosis recomendada manifiesta variaciones significativas en la vitalidad espermática, coincidiendo con los resultados del presente estudio.

Tras analizar la repercusión de la suplementación de vitaminas AO en la concentración espermática, se aprecia que los grupos suplementados obtienen una concentración promedio significativamente más alta con respecto a los grupos no

suplementados, coincidiendo con lo expuesto por Agarwal *et al.* (2014) y Ross *et al.* (2010) quienes señalan que la terapia con vitaminas AO aumenta la concentración espermática significativamente.

En un principio, los resultados permiten establecer que la suplementación durante 30 días con vitaminas AO induce cambios positivos y significativos en la concentración espermática de los animales tratados con respecto a las presentadas por aquellos no tratados al mismo tiempo, permitiendo establecer que la suplementación de vitaminas AO durante 30 días es efectiva como método para mejorar las concentraciones espermáticas de los carneros. Como se señalaba anteriormente, los efectos de la suplementación de vitaminas sobre la concentración espermática y características seminales dependen del tiempo de suplementación, de la dosis y de la presentación (Agarwal *et al.*, 2014). Por ejemplo, en humanos Imamovic y Pinter (2014), tras analizar diversos estudios sobre los efectos de distintas terapias AO y sus efectos en las características seminales entre el año 2000-2013, concluyen que el aumento de la concentración espermática al administrar vitamina E o vitamina C de forma oral, se hace evidente a partir de 60 ó 90 días de iniciado el tratamiento, estableciendo como terapia mínima de 3 meses de suplementación, lo que se respalda con las investigaciones de Akmal *et al.* (2006), Ghanem *et al.* (2010) y Kobori *et al.* (2014). En otras especies, se aprecian aumentos significativos de la concentración espermática a los 2 meses de tratamiento según Yusef *et al.* (2004) en conejos, Hatamoto *et al.* (2006) en perros, Jafaroghli *et al.* (2010) en carneros y Audet *et al.* (2004) en jabalís, por lo que se podría estimar que una suplementación de 30 días de vitaminas AO en carneros induciría cambios significativos en la concentración espermática.

Independientemente de lo anterior, los animales no suplementados aumentan su concentración espermática a los 60 días a un nivel que comparativamente no presenta diferencias significativas con los tratados durante 30 días. Situación diferente al analizar los datos obtenidos de los animales suplementados con vitaminas AO durante 60 días, quienes manifiestan un aumento significativo de la concentración espermática con respecto a los no tratados tanto a los 0, 30 y 60 días, además de presentar una concentración promedio mucho mayor que la de los animales al día 30.

Por lo tanto, se puede establecer que la suplementación de vitaminas AO impacta significativamente la concentración espermática tanto a los 30 como a los 60 días de

tratamiento y no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos tratados, pudiendo recomendarse terapias de uno o dos meses de duración. A su vez, Agarwal *et al.* (2014) y Aitken *et al.* (2014) tras el análisis de diversos estudios, concluyen que terapias muy prologadas pueden inducir alteraciones en la calidad seminal, por lo que se recomendaría que en estudios posteriores de carneros se considerara el factor tiempo de suplementación con el fin de estimar un tiempo óptimo de suministro de vitaminas AO.

Tras las evidencias encontradas en el presente estudio respecto a las características seminales y su comparación con la literatura abordada, se establece que la suplementación de vitaminas C y E en carneros repercute significativamente sobre la concentración y vitalidad espermática al ser tratados durante 60 días. Por lo tanto, se puede recomendar como método para mejorar la calidad seminal de los carneros la suplementación oral con vitaminas C y E durante 30 ó 60 días previo a su uso reproductivo, ya que se evidencian efectos beneficiosos en la concentración espermática desde los 30 días de suplementación y en la vitalidad desde los 60 días. Es importante señalar, que pese a que no se evidenciaron resultados significativos para la motilidad progresiva, gran porcentaje de la literatura abordada y en diferentes especies señalan que el tratamiento y/o suplementación con vitaminas AO impacta positivamente sobre esta variable, por lo que no se descarta que dicha dosis y durante el tiempo sugerido puedan inducir variaciones significativas sobre la motilidad espermática de animales tratados

## **10. CONCLUSIONES**

- 1) La suplementación de forma oral y diaria de 650 mg de vitamina C y 450 IU de vitamina E aumenta significativamente las concentraciones plasmáticas de las mismas en animales tratados con respecto a no tratados a los 30 y 60 días, por lo que se establece como una forma eficiente de suplementación.
- 2) La suplementación con vitaminas C y E durante 30 días aumenta significativamente la concentración espermática. Así mismo, la suplementación durante 60 días aumenta significativamente tanto la vitalidad como la concentración espermática de los animales tratados, por lo que se puede recomendar la suplementación diaria y oral de vitaminas C y E como mínimo durante 30 días para obtener mejoras significativas en la calidad seminal.
- 3) La suplementación con vitaminas C y E no afectó las concentraciones de MDA ni la TAC en el plasma sanguíneo, lo que no se contrapone con un eventual incremento del estatus antioxidante del plasma seminal o a nivel testicular. No obstante, se sugiere que en próximos estudios se evalúe el estado antioxidante a nivel local.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S.S. 2014.** Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health* 32: 1-17.

**AITKEN, R.J.; SMITH, T.B.; JOBLING, M.S.; BAKER, M.A.; DE IULIIS, G.N. 2014.** Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology* 16: 31-38.

**AKMAL, M.; QADRI, J.; AL-WAILI, N.; THANGAL, S.; HAQ, A.; SALOOM K. 2006.** Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. *Journal of Medicinal Food* 9: 440-442.

**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.

**AUDET, I.; LAFOREST, J.; MARTINEAU, G.; MATTE, J. 2004.** Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *Journal of Animal Science* 82: 626-633.

**ASI. AMERICAN SHEEP INDUSTRY ASSOCIATION. 2002.** Sid Sheep Production Handbook. Ed, vol 7. American Sheep Industry, Inc. 919-936.

**AVDI, M.; BANOS, G.; STEFOS, K.; CHEMINEAU, P. 2004.** Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of chios and serres rams. *Theriogenology* 62: 275-282.

**BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. 2010.** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*. 1-7. doi: 10.4061/2011/686137.

**BARRIOS, B.; PÉREZ-PÉ, R., GALLEGO, M.; TATO, A.; OSADA, J.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. 2000.** Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction* 63:1531-1537.

**CHEW, P. 1995.** Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *The Journal of Nutrition* 125:1804S-1808S.



**CHAO, W.; ASKEW, E.; ROBERTS, D.; WOOD, S.; PERKINS, J. 1999.** Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. *Journal of Nutrition* 129, 2009–2012.

**CLIFFORD A. 2001.** Total nutrition: Feeding animals for health and growth. Nottingham University Press. Nottingham, Uk. 237.

**DANIELS J. 2000.** Evaluation of ewe and lamb immune response when ewes were supplemented with vitamin E. *Journal of Animal Science* 78: 2731-2736.

**DRAGSTED, L. O. 2008.** Biomarkers of exposure to vitamins A, C, and E and their relation to lipid and protein oxidation markers. *European Journal of Nutrition* 47: 3-18.

**ESCORZA, M.; SALINAS, J. 2009.** La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica* 28: 89-101.

**ESKENAZI, B.; KIDD, S.; MARKS, A.; SLOTER, E.; BLOCK, G.; WYROBEK, A. 2005.** Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Human Reproduction* 20: 1006-1012.

**FARRELL P. 1993.** Vitamin E. **In:** Shils M.; Olson J.; Shike M Eds. Modern Nutrition in Health and Disease, 8th ed. Lea y Febiger. Philadelphia, USA. 396-410.

**FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K.; HELBOCK, H.J.; JACOB, R.A.; AMES, B.N. 1991.** Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 11003-11006.

**GHANEM, H.; SHAEER O.; EL-SEGINI, A. 2010.** Combination clomiphene citrate and antioxidant therapy for idiopathic male infertility: a randomized controlled trial. *Fertility and Sterility* 93: 2232–2235.

**GARNER, D.; HAFEZ, E. 2000.** Spermatozoa and seminal plasma. **In:** Hafez E.S.E and Hafez. B (eds), Reproduction in Farm Animals. 7<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams y Wilkins Company, Philadelphia, USA. 96-109.

**GHISELLI, A., SERAFINI, M., NATELLA, F., y SCACCINI, C. 2000.** Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine* 29: 1106-1114.

**GONZÁLEZ-MARÍN C., GOSÁLVEZ J., ROY R. 2012.** Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cell. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 14026-14052.

**HALLIWELL, B.; WHITHEMAN M. 1997.** Antioxidant and prooxidant properties of vitamin C In: Marcel Dekker. Vitamin C in Health And disease. Packer L.; Fuchs J Eds. New York, Usa. 59-73

**HATAMOTO, L.; SOBRINHO, C.; NICHI, M.; BARNABE, V.; BARNABE, R.; CORTADA, C. 2006.** Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology* 66: 1610-1614.

**HIDIROGLOU, M.; BATRA, T.; ZHAO, X. 1997.** Comparison of vitamin C bioavailability after multiple or single oral dosing of different formulations in sheep. *Reproduction Nutrition Development* 37: 443-448.

**HONG, Z.; HAILING, L.; HUI, M.; GUIJIE, Z.; LEYAN, Y.; DUBING, Y. 2010.** Effect of Vitamin E supplement in diet on antioxidant ability of testis in Boer goat. *Animal Reproduction Science* 117: 90-94.

**HORWITT M. 2001.** Critique of the requirement for vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 1003-1005.

**IMAMOVIC K.; PINTER B. 2014.** Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *BioMed Research International*. 1-11. doi:10.1155/2014/426951.

**ISLAM, A.B.M.M.; LAND, R.B. 1977.** Seasonal variation in testis diameter and sperm output of rams of breeds of different prolificacy. *Journal of Animal Science* 25: 311-317.

**IZQUIERDO, A.; JIMÉNEZ, M.; LANG, C.; JIMÉNEZ, C.; LIERA, J.; DENIS, B.; SALINAS, K. 2009.** Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*3: 1-38.

**JAFAROGHLI, M.; ABDI-BENEMAR, H.; ZAMIRI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; SHADPARVAR, A. 2014.**Effects of dietary n- 3 fatty acids and vitamin C on semen characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. *Animal Reproduction Science* 147: 17-24.

**JONES, R.; MANN, T. 1977.** Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *Journal of Reproduction and Fertility* 50: 261-268.

**KAO S., CHAO H., CHEN H., HWANG T., LIAO T., WEI Y. 2008.** Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility* 89: 1183-1190.

**KEFER, J.C.; AGARWAL, A.; SABANEHGH, E. 2009.** Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*.16: 449-457.

**KOBORI, Y.; OTA, S.; SATO, R.; YAGI, H.; SOH, S.; ARAI, G.; OKADA, H. 2014.**Antioxidant cosupplementation therapy with vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 in patients with oligoasthenozoospermia. *Archivio Italiano di Urología e Andrología* 86: 1-4.

**KUSANO, C., FERRARI, B. 2008.**Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 7 : 1-15.

**LUO, H.; YUE, D.; YUAN, F.; LIU, K.; YAN, L.; GE, S.; XU, X. 2011.** Chapter 8: Effect of Vitamin E on the development of testis in sheep. **In:** MANAFI, M. 2011. Artificial Insemination in Farm Animals. INTECH. Rijeka, Croacia. 123-135.

**MOORE, R.W.; WHYMAN, D.; WILSON, P.R. 1978.** Effects of sexual stimulation on plasma levels of LH and testosterone in rams from high- and low-fertility flocks. *Journal of Reproduction and Fertility* 53: 67-70.

**NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2007.** Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. 7th Ed. Washington, DC. National Academy Press. 362.

**PADILLA, L.; MATSUI, T.; IKEDA, S.; KITAGAWA, M.; YANO, H. 2007.** The effect of vitamin C supplementation on plasma concentration and urinary excretion of vitamin C in cattle. *Journal of Animal Science* 85: 3367-3370.

**PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; ARANEDA, O.; GARCIA, C.; MUNOZ, A.; DE LOS REYES, M.; URQUIETA, B. 2011.** Effects of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: Comparative study in high and low altitude native sheep. *Reproduction, Fertility, and Development* 23[2]: 285-296.

**PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PÉREZ-PÉ, R; BERG, K. 2002 .** Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57: 823-836

**REKKAS, C.; KOKOLIS, N.; BELIBASAKI, S.; TSANTARLIOTOU, M.; SMOKOVITIS, A. 2000.** Effect of  $\alpha$ -tocopherol on plasma testosterone and plasminogen activator activity or inhibition in ram spermatozoa. *Theriogenology* 53:751-760.

**ROSS, C.; MORRIS, A.; KHAIRY, M.; KHALAF, Y.; BRAUDE, P.; COOMARASAMY, A.; EL-TOUKHY, T. 2010.** A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive Biomedicine Online* 20: 711-723.

**SANOCKA D., KURPISZ M. 2004.** Reactive oxygen species and sperm cell. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2:12.

**SATHE, S.; SHIPLEY. 2014.** Chapter 10: Applied andrology in sheep, goats and selected cervids. **In:** Chenoweth, P. y Lorton S. *Animal Andrology: Theories and Applications*. CAB International, CABI. London, UK. 226-254.

**SETCHELL B. 2014.** Chapter 1: Semen and its Constituents. **In:** Chenoweth, P. y Lorton S. *Animal Andrology: Theories and applications*. CAB International, CABI. London, UK. 1-13.

**TRABER, M.G.; STEVENS, J.F. 2011.** Vitamins c and e: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine* 51: 1000-1013.

**YAN, L.; YUE, D.; LUO, H.; JIN, X.; XU, X. 2010.** Effect of Vitamin E supplementation on the enzymatic activity of selected markers in Aohan fine-wool sheep testis. *Animal Reproduction Science*. 122: 264-269.

**YENI, D.; GUNDOGAN, M.; CIGERCI, I.; AVDATEK, F.; FIDAN, A. 2010.** Seasonal variation of oxidative stress parameters in ram seminal plasma. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9: 49-54.

**YOUSEF, M.; ABDALLAH, G.; KAMEL, K. 2003.** Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science* 76: 99-111.

**WILLCOX, J. ; ASH, S.; CATIGNANI, G. 2004.** Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 275-295.