



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON VITAMINAS C Y E SOBRE LA  
CALIDAD DEL SEMEN DE CARNERILLOS CONSERVADO A TEMPERATURA  
AMBIENTE Y REFRIGERACIÓN**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de  
Magister en Ciencias Agropecuarias

Lic. Cs. Agropecuarias Massiel Alejandra Arancibia Cádiz

Director de Tesis  
Dr. Víctor H. Parraguez G.

Profesores consejeros  
MSc. Giorgio L. Castellaro G.  
MSc. Héctor Manterola B.

SANTIAGO – CHILE  
2016

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON VITAMINAS C Y E SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNERILLOS CONSERVADO A TEMPERATURA AMBIENTE Y REFRIGERACIÓN**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Ciencias Agropecuarias.

Lic. Cs. Agropecuarias Massiel Alejandra Arancibia Cádiz

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
<b>DIRECTOR DE TESIS</b>		
Víctor Hugo Parraguez Gamboa Médico Veterinario, MSc, PhD	6,3	Aprobada
<b>PROFESORES CONSEJEROS</b>		
Giorgio Luis Sebastián Castellaro Galdames Ingeniero Agrónomo, MSc.	6,2	Aprobada
Héctor Manterola Badilla Ingeniero Agrónomo, MSc.	7,0	Aprobada

Santiago, Chile  
2016

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis padres, Patricia Cádiz y Arnaldo Arancibia, por su amor y apoyo incondicional, por todo el esfuerzo que realizaron para entregarme educación, como también por los valores y principios que me entregaron y me siguen entregando.*

*A mi novio Esaú Serrano por su apoyo, consejos, amor, su compañía y en especial comprensión, durante todo el periodo de universidad, el cual fue importante en los momentos difíciles de la carrera.*

*A mis amigas por su apoyo y cariño en los momentos difíciles durante el periodo de universidad.*

*Al profesor Víctor Hugo Parraguez por su buena voluntad, paciencia, sabiduría y tiempo gastado en mí, para solucionar problemas y complicaciones que surgieron.*

*Y finalmente agradezco a la fuente de financiamiento beca FONDECYT 1130181 de CONYCIT Chile, que sin ellas no hubiera sido posible desarrollar esta investigación.*

## **DEDICATORIA**

*Quisiera dedicar esta investigación a mi familia y novio quienes me apoyaron durante todos estos años de estudio.*

## ÍNDICE

### CAPÍTULO I: MONOGRAFÍA

1. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON VITAMINAS C Y E SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNERILLOS CONSERVADO A TEMPERATURA AMBIENTE Y REFRIGERACIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN BILIOGRÁFICA .....	2
2.1. Calidad del semen y factores que la afectan .....	2
2.2. Efectos de la temperatura .....	3
2.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	4
2.4. Modo de acción de las ROS, estrés oxidativo y daño espermático.....	5
2.5. Sistema antioxidante de los espermatozoides .....	5
2.6. Consecuencias de la generación excesiva de ROS en la mitocondria.....	6
2.7. Efectos de las ROS en la capacitación espermática y reacción acrosómica .....	7
2.8. Efecto de las vitaminas antioxidantes .....	8
2.9. Vitamina C .....	8
2.10. Vitamina E.....	8
2.11. Interacción entre vitamina C y E.....	9
3. LITERATURA CITADA.....	10
1. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON VITAMINA C Y E SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNERILLOS CONSERVADO A TEMPERATURA AMBIENTE Y REFRIGERACIÓN .....	13
2. RESUMEN .....	14
3. ABSTRACT .....	15
4. INTRODUCCIÓN .....	16
5. HIPÓTESIS .....	18
6. OBJETIVOS.....	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
7.1. Ubicación del estudio .....	19
7.2. Animales y manejo general.....	19
7.3. Tratamiento y toma de muestras .....	20
7.4. Diseño experimental y análisis estadístico .....	22
8. RESULTADOS.....	24
8.1. Efecto de la suplementación oral con vitaminas C y E sobre la concentración plasmática en carnerillos. ....	24
8.2. Efecto de la suplementación vitamínica sobre las características del eyaculado al tiempo 0. ....	24
8.3. Efectos de suplementación y temperatura de almacenamiento sobre las principales características seminales (espermatozoides móviles totales, movilidad espermática progresiva, movilidad espermática no progresiva, velocidad espermática rectilínea, velocidad espermática curvilínea y velocidad espermática promedio).....	25
9. DISCUSIÓN.....	34
10. CONCLUSIONES .....	39
11. LITERATURA CITADA.....	40

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Parámetros de calidad en semen fresco de carnerillo.....	2
<b>Cuadro 2.</b> Requerimientos nutricionales de los carnerillos.....	20
<b>Cuadro 3.</b> Valor nutritivo del heno de alfalfa y suplemento vaca 14®.....	21
<b>Cuadro 4.</b> Efecto de la suplementación oral de las vitaminas C y E en las distintas variables de la calidad seminal de los carnerillos, al tiempo 0.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Concentración plasmática de vitaminas C y E, en carnerillos suplementados oralmente con estas vitaminas, (A) concentración antes de la suplementación y (B) concentración posterior a los 30 días de suplementación.....	25
<b>Figura 2.</b> Efecto de la suplementación oral de las vitaminas C y E en las distintas variables de la calidad seminal de los carnerillos, durante todo el período de conservación.....	27
<b>Figura 3.</b> Efecto de la refrigeración de los eyaculados en las distintas variables de la calidad seminal de los carnerillos, durante todo el período de conservación.....	28
<b>Figura 4.</b> Efectos de la suplementación con vitaminas C y E y de la temperatura de conservación, sobre algunas variables de calidad seminal en carnerillos, a través del tiempo de conservación.....	30
<b>Figura 5.</b> Efectos de la suplementación con vitamina C y E y de la temperatura de conservación, sobre algunas variables de calidad seminal en carnerillos, a través del tiempo de conservación.....	31
<b>Figura 6.</b> Efectos de la suplementación con vitamina C y E y de la temperatura de conservación, sobre algunas variables de calidad seminal en carnerillos y sus respectivas líneas de tendencias, a través del tiempo de conservación.....	34
<b>Figura 7.</b> Efectos de la suplementación con vitamina C y E y de la temperatura de conservación, sobre algunas variables de calidad seminal en carnerillos y sus respectivas líneas de tendencias, a través del tiempo de conservación.....	35

**1. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON VITAMINAS C Y E SOBRE  
LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNERILLOS CONSERVADO A  
TEMPERATURA AMBIENTE Y REFRIGERACIÓN**

## 2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Calidad del semen y factores que la afectan

La calidad del semen está definida por los parámetros de volumen del eyaculado, concentración espermática, movilidad masal, vitalidad espermática, motilidad espermática, velocidad espermática y color del eyaculado (Cabrera *et al.*, 2011). Para que el semen se considere de alta calidad, debe encontrarse dentro de rangos descritos para su especie, que se presentan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Parámetros de calidad en semen fresco de carnerillo (Fuente: Mansano *et al.*, 2014 y Cox *et al.*, 2015).

Carnerillo	
Parámetros	Valores
Volumen del eyaculado (mL)	0,8- 1,2
Concentración espermática ( $\times 10^9$ mL <sup>-1</sup> )	1,5
Motilidad de masa (escala valórica 1-5)	>3
Vitalidad espermática (%)	70-80
Espermatozoides móviles totales (%)	70-80
Movilidad espermática progresiva (%)	70-80
Movilidad espermática no progresiva (%)	25-15
Velocidad espermática curvilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	>140
Velocidad espermática rectilínea ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	>50
Velocidad espermática promedio ( $\mu\text{m s}^{-1}$ )	>90
Color del eyaculado	Blanco cremoso-blanco lechoso

Uno de los principales factores que afecta la calidad del semen es el almacenamiento o preservación, debido a la sobre-producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los espermatozoides. Las ROS producen cambios, tanto estructurales como funcionales, que conducen a una reducción de la movilidad y la viabilidad de los espermatozoides y por lo mismo, perjuicios durante el transporte en el tracto reproductivo de las hembras, lo que finalmente redundaría en un deterioro de la fertilidad del semen (Hernández *et al.*, 2010). La preservación a temperatura ambiente facilita la producción de ROS, en cambio las temperaturas de refrigeración desfavorecen la formación de ROS y prolongan la viabilidad del semen (Leboeuf *et al.*, 2000).

Otros factores que afectan la motilidad y velocidad del semen son: la edad del reproductor, su estado nutricional, la presencia de enfermedades subyacentes, la temperatura ambiental, la frecuencia con la que se llevan las extracciones seminales y una mala manipulación del eyaculado (Fischman *et al.*, 2007).

Además, toda alteración que esté cercana a los testículos y produzca una reacción inflamatoria puede inhibir o alterar la producción de espermatozoides; por ejemplo, situaciones que cursen con fiebre, infecciones urinarias o de tejidos u órganos adyacentes a los testículos, pueden afectar directamente la producción de espermatozoides (Rocha *et al.*, 2005).

## 2.2. Efectos de la temperatura

Las altas temperaturas corporales o ambientales pueden provocar un deterioro del semen, que puede poner en riesgo la fertilidad, produciendo alteraciones como astenoszoospermia (alteración en la movilidad de los espermatozoides) u oligospermia (disminución de la cantidad de espermatozoides en la eyaculación), a consecuencia del incremento térmico en el escroto. A partir de los 35 °C en el escroto la calidad del semen desciende y el número de espermatozoides disminuye significativamente, incrementándose la fragmentación del ADN de los espermatozoides (roturas o lesiones en el material genético del espermatozoide), parámetro relacionado con la capacidad fecundante de los espermatozoides (Morales *et al.*, 2007). Al reducir la temperatura escrotal por debajo de los 20°C el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, pero cuando se somete a temperaturas entre los 0°C y los -20°C, o hasta los -60°C el espermatozoide sufre efectos de descompensación iónica y de líquidos, suficientemente graves para causar un shock térmico (Hernández *et al.*, 2015). A causa de esto se presentarán espermatozoides con la cola doblada, con pérdida de motilidad o realizando movimientos en círculo, lo cual se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones y moléculas (Morales *et al.*, 2007).

Los daños que sufre el espermatozoide durante los procesos de criopreservación son principalmente físico-químicos, debido al estrés osmótico que sufre la célula al deshidratarse, la deformación de la membrana y a la formación de cristales de hielo (Membrillo *et al.*, 2011). En un espermatozoide sometido a temperaturas bajo cero se formará hielo intra y extracelular. Este hielo crece sin control formando grandes cristales que dañan la célula. El daño se produce por dos mecanismos: por la acción que ejerce el hielo en crecimiento y por el daño osmótico que causa la acumulación de sales y otros solutos que se originan, al irse fijando las moléculas de agua a los núcleos de hielo (Ortega, 2008). Estos cristales de agua pura se comienzan a formar después de los -5°C y, por el mismo fenómeno de cristalización, todos los solutos quedan separados del cristal, aumentando así la concentración de sales en la porción de agua que aún no se congela. Este fenómeno lleva a un aumento en la presión osmótica, el agua dentro del espermatozoide es más lenta en formar cristales que el agua fuera de este, por lo que ocurre una salida de agua al medio extracelular por gradiente osmótica, a través de la membrana plasmática. Como resultado de esto, el espermatozoide se deshidrata (Membrillo *et al.*, 2011).

Por otro lado, el proceso de congelación da lugar también a cambios de fase en la membrana celular que pueden alterar receptores de membrana y otras proteínas, interfiriendo en su capacidad de reconocimiento y de transporte de iones y agua a través de los canales o poros de membrana, etc. (Ortega, 2008). A una temperatura de 5°C la permeabilidad al  $\text{Ca}^{++}$  crece significativamente, superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de  $\text{Ca}^{++}$ . Así, el  $\text{Ca}^{++}$  se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos (Membrillo *et al.*, 2011). Este daño se manifiesta en una disminución de la motilidad espermática y posiblemente afectando la morfología del acrosoma. Se postula que el acrosoma con estas alteraciones sufre una pérdida mayor de capacidad fecundante de la que sería esperada de la reducción de la motilidad, siendo también una de las causas el incremento en la producción de ROS (Watson, 1995).

La susceptibilidad de los espermatozoides al choque térmico depende de la especie animal de la cual provengan los gametos. Los principales cambios que se generan son en el metabolismo espermático de los hidratos de carbono, pérdida de enzimas, alteración de algunos lípidos de membrana y desequilibrios en la distribución de cationes (Watson, 1995). Ortega *et al.* (2008) indican que el choque térmico induce a una alteración irreversible en las membranas celulares producto de la generación de ROS, cuyo efecto se ve acentuado por la incubación de las muestras a temperaturas de 37°C, pero no a temperaturas de 21°C, en semen de caballo (*Equus caballus*). Esta susceptibilidad al choque térmico está determinada por el contenido de colesterol en la membrana y por la proporción de ácidos grasos poliinsaturados que éstas presenten en los fosfolípidos, ya que ambos fenómenos influyen en la fluidez de las membranas celulares (Ortega *et al.*, 2008). La relación colesterol/fosfolípidos es determinante de la fluidez de las membranas. Las especies que tienen elevadas relaciones colesterol/fosfolípidos son las que mejor resisten los cambios de temperatura. Así, Cabrera *et al.* (2011), observaron que las especies más resistentes al choque térmico son el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y hombre, ya que la relación molar colesterol/fosfolípidos en sus membranas espermáticas era de 0,88 y 0,99 respectivamente, mientras que en las especies catalogadas como sensibles esta relación es inferior a 0,46, como el toro (*Bos Taurus*) 0,45 y carnero 0,3. Si las concentraciones son similares en ambos grupos de lípidos, se mantiene la fluidez de la membrana y no se produce la separación lateral de las cadenas lipídicas, por lo que las proteínas intrínsecas no son desplazadas, conservándose así la integridad del plasmalema. Otro factor que influye en la sensibilidad al choque térmico, además de la especie de la cual procedan los espermatozoides es el grado de maduración celular. Estos factores van a incidir en la composición de las membranas celulares, originando variaciones en la estructura lipídica de las mismas, siendo estos hechos determinantes en la fluidez de la membrana plasmática (Ortega *et al.*, 2008).

El tiempo máximo de refrigeración sin alteración en la fertilidad en carneros ha sido referido entre 6 y 12 horas por Kasimanickam *et al.* (2007). La refrigeración es una alternativa al semen congelado, cuando la inseminación es hecha dentro de un corto periodo después de la colecta. Una refrigeración adecuada, posee ventajas sobre la congelación por mantener buena calidad seminal para periodos de almacenamiento cortos (Giménez *et al.*, 2011). Esto es independiente del diluyente, tasa de dilución, temperatura o condiciones de refrigeración, cuanto mayor el tiempo de refrigeración, mayor tasa de deterioro de la célula espermática, disminuyendo la movilidad y sobrevivencia del espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra y consecuentemente, reducción de la fertilidad. Se ha informado que, la fertilidad presenta una disminución de un 20% por día de refrigeración (Salamón and Maxwell, 2000).

### **2.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las ROS son un conjunto de moléculas producidas en algunos procesos metabólicos en los que participa el oxígeno. Las ROS son moléculas muy reactivas entre las que se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción (Salomon and Maxwell, 2000).

## 2.4. Modo de acción de las ROS, estrés oxidativo y daño espermático

Las ROS se generan principalmente en el semen por dos fuentes, los espermatozoides anormales y los leucocitos. La población fundamental de leucocitos en el semen son los neutrófilos, estos juegan un papel fundamental al destruir a los patógenos a través de mecanismos de producción ROS, pero también pueden eliminar patógenos mediante fagocitosis (Hernandez *et al.*, 2010). Las ROS pueden dañar proteínas, ácidos nucleicos y causar la pérdida de la movilidad espermática y con ello afectar la fertilidad. Los espermatozoides son vulnerables al poseer en su membrana un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que la tornan vulnerable al ataque de las ROS, generando lipoperoxidación. Este fenómeno se lleva a cabo debido a que los ácidos grasos poliinsaturados poseen en su estructura dobles enlaces que son susceptibles a la sustracción de un electrón por parte de las ROS (Hernández *et al.*, 2010). Esto genera daños irreversibles a la movilidad del espermatozoide, la fluidez de membrana (necesaria para la fecundación), daños a las propiedades funcionales de la célula que pueden conducir a lisis total. También las ROS pueden causar hipercondensación del núcleo espermático como resultado de una excesiva oxidación de los grupos sulfhidrilo proteicos y activación de la apoptosis, a través de la degradación enzimática del ADN por acción de las caspasas (Kasimanickam *et al.*, 2007).

Se debe considerar que el metabolismo normal del oxígeno de cualquier célula, incluyendo los espermatozoides, produce ROS, tales como anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), pero en cantidades capaces de ser neutralizadas por el sistema antioxidante endógeno (Hicks, 2001). La pérdida del balance entre producción de ROS y la actividad neutralizante de los antioxidantes endógenos, en favor de los agentes pro-oxidantes, conducen al estado de estrés oxidativo. Por esto, una alteración entre la generación de ROS y los mecanismos antioxidantes pueden resultar en daño celular (Sheweita *et al.*, 2005). En el caso de los espermatozoides humanos, los niveles adecuados de ROS son importantes para su funcionamiento normal. Estos sufren procesos controlados de óxido-reducción durante la hiperactivación, capacitación y la reacción acrosómica (Fraczek and kurpisz, 2005).

## 2.5. Sistema antioxidante de los espermatozoides

Un antioxidante puede ser definido como cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Illera *et al.*, 2000).

Se conocen tres grupos de antioxidantes: antioxidantes primarios que previenen la formación de nuevos radicales libres, transformándolos en moléculas menos perjudiciales, antes que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas. Entre estos antioxidantes tenemos a la enzima superóxido dismutasa (SOD), enzima glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa. Antioxidantes secundarios: capturan los radicales libres, evitando las reacciones en cadena, entre estos tenemos: la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), betacaroteno, ácido úrico, bilirrubina y albúmina. Antioxidantes Terciarios: que reparan las biomoléculas dañadas por los radicales

libres, entre ellos tenemos las enzimas reparadoras de ADN y la metionina sulfóxido reductasa (Sheweita *et al.*, 2005).

Para evitar el proceso de oxidación y daño celular existe el sistema antioxidante endógeno, constituido por compuestos enzimáticos como: SOD, catalasa, GPX, glutatión y la coenzima Q<sup>•</sup>. Éstos mantienen a las ROS en concentraciones fisiológicas y protegen a las células de su exceso (Illera *et al.*, 2000). El sistema antioxidante endógeno es reforzado por los antioxidantes exógenos presentes en la dieta. Dentro de éstos podemos mencionar algunas vitaminas como la vitamina C, vitamina E y pro vitamina A (beta-caroteno). Además, algunas enzimas necesitan cofactores metálicos que también son suministrados en la dieta, como: selenio, cobre, zinc y magnesio, para poder realizar el mecanismo de protección celular (Illera *et al.*, 2000). Cabe destacar que los espermatozoides son muy susceptibles a la acción de las ROS, ya que su reducido citoplasma es escaso en estos mecanismos endógenos para reparar los daños asociados al estrés oxidativo (Salamon and Maxwell, 2000). El peróxido de hidrógeno es la principal ROS tóxica para los espermatozoides. Las concentraciones moderadamente altas de ROS no afectan la viabilidad de los espermatozoides pero sí la motilidad, generalmente por agotamiento del ATP (Salomon and Maxwell, 2000).

El plasma seminal contiene enzimas antioxidantes pertenecientes al sistema antioxidante exógeno como melatonina, vitamina C, vitamina E, piruvato y carnitina (Salamon and Maxwell, 2000). Fraczek and Kurpisz (2005), encontraron concentraciones significativamente menores de antioxidantes en el semen de hombres estériles en relación con los controles. No obstante, las concentraciones patológicas de ROS detectadas en el semen de hombres estériles se deben más probablemente al aumento de la producción de ROS que a la disminución de la capacidad antioxidante del líquido seminal. Ortega *et al.* (2008), señalaron que los niveles de producción de ROS por las poblaciones espermáticas se correlacionaron negativamente con la calidad del semen. Funciones dependientes de la fluidez de la membrana como son la fusión al ovocito y la reacción acrosómica también se ven alteradas. Asimismo, el material genético es susceptible al daño oxidativo, siendo el peróxido de hidrógeno el agente inductor principal (Salamon and Maxwell, 2000). El ADN nuclear está bien protegido por las protaminas, proteínas que sustituyen a las histonas nucleares presentes en otros tipos celulares y que ofrecen mayor estabilidad a la cadena de ADN (Baumber *et al.*, 2002). El genoma del núcleo es particularmente resistente al exceso de ROS pero no ocurre lo mismo con el material genético de las mitocondrias. Por esto mismo la integridad del ADN mitocondrial es un marcador de estrés oxidativo (Baumber *et al.*, 2002).

## **2.6. Consecuencias de la generación excesiva de ROS en la mitocondria**

Durante procesos dependientes del estado redox como la capacitación espermática, se han observado transformaciones morfológicas en las mitocondrias (Garrido *et al.*, 2004). Se ha demostrado que estos organelos, tan abundantes en la cola y la pieza intermedia, son los principales generadores de ROS en los espermatozoides y que cualquier factor capaz de interferir en la cadena transportadora de electrones es un potencial inductor de ROS (Yanagimachi, 1988). La enzima mitocondrial implicada es la oxidoreductasa dependiente de Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Durante la respiración celular los

electrones se transfieren del NADH al oxígeno a través de la cadena de tres complejos proteicos llamados NADH-Q reductasa, citocromo reductasa y citocromo oxidasa (Garrido *et al.*, 2004). Existen dos fuentes de generación de  $O_2^-$  en la cadena transportadora de electrones: a través de la reducción de la ubiquinona se forma un radical libre parcialmente reducido a ubisemiquinona (QH), la cual interactúa con el  $O_2$  para producir  $O_2^-$  (Walczak–Jedrzejowska *et al.*, 2012). Este mecanismo es el principal responsable de la producción de ROS en la mitocondria. El otro mecanismo de producción de  $O_2^-$  en la mitocondria es el que involucra la flavoproteína NADH deshidrogenada. El grupo flavina de esta enzima es reducido durante el transporte electrónico al radical flavina semiquinona que al reaccionar con el  $O_2$  produce  $O_2^-$  en una reacción similar a la de la ubiquinona (Walczak–Jedrzejowska *et al.*, 2012).

Prácticamente el semen de cada eyaculación presenta posibles fuentes de ROS. Se deduce que en cada eyaculación algunos espermatozoides sufrirán daño oxidativo y pérdida de su función. De esta manera, el impacto de las ROS sobre la fertilidad es un problema de grado, más que de presencia o ausencia. En las mitocondrias disfuncionales la producción de ROS aumenta significativamente y estas moléculas a su vez afectan la función mitocondrial de los espermatozoides (May, 1999). Esta relación se puede deber a dos fenómenos interconectados mutuamente: las ROS lesionan la membrana mitocondrial y la membrana mitocondrial lesionada aumenta la producción de ROS. Por otro lado, las mitocondrias tienen una función clave en el mecanismo de la apoptosis. Su integridad está determinada por la presencia de citocromo C en el espacio de la membrana interna. Los niveles altos de ROS desorganizan las membranas interna y externa de las mitocondrias. Esto produce la liberación de la proteína citocromo C de la mitocondria, que activa las caspasas e induce apoptosis. Se ha demostrado en varios tipos celulares que el estrés oxidativo puede ser inductor de la apoptosis (Yanagimachi, 1988).

## **2.7. Efectos de las ROS en la capacitación espermática y reacción acrosómica**

La capacitación espermática es un proceso de desestabilización de sustancias adsorbidas o integradas en la membrana plasmática, que ocasiona un influjo de  $Ca^{++}$  al interior de la célula espermática (Hernández *et al.*, 2010). Esta capacitación va a desencadenar dos hechos imprescindibles para la fecundación: un incremento en la actividad de movimiento del flagelo espermático y la liberación del contenido del acrosoma mediante un proceso exocitótico denominado “reacción acrosómica” (Barros *et al.*, 1967). Éste implica la formación de múltiples puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, originándose la formación de pequeñas vesículas, la eliminación de la matriz acrosomal y la exposición de la membrana acrosomal interna (Barros *et al.*, 1967; Yanagimachi, 1988). Algunos autores consideran que la capacitación es el inicio de la reacción acrosómica (Chang, 1984), mientras que otros opinan que son dos fenómenos independientes, aunque la reacción acrosómica depende de la capacitación para poder producirse (Hernández *et al.*, 2010). La muerte celular se podría producir rápidamente tras sufrir la reacción acrosómica, debido a la acción de las ROS (Didion y Graves, 1986).

Por ello, es muy importante que los procesos de ovulación y capacitación espermática estén bien sincronizados, para que el encuentro de los gametos tenga lugar en el momento exacto en que ambos estén preparados para la fecundación (Illera *et al.*, 2000).

## 2.8. Efecto de las vitaminas antioxidantes

Las vitaminas son moléculas orgánicas, que se sintetizan por plantas y microorganismos. Estas están presentes en los alimentos naturales y son requeridas por el organismo, ya que no se pueden sintetizar o se sintetizan en insuficientes cantidades (Illera *et al.*, 2000), estas son requeridas para el mantenimiento de las funciones metabólicas de la mayoría de las células animales. Las vitaminas se clasifican según el criterio de solubilidad, en vitaminas hidrosolubles y vitaminas liposolubles. Las vitaminas hidrosolubles, se excretan en la orina, de modo que rara vez se acumulan en concentraciones tóxicas. Por la misma razón su almacenamiento es limitado y como consecuencia se deben consumir con regularidad. Mientras que las vitaminas liposolubles son solubles en los lípidos y solventes orgánicos, y para una eficiente absorción de estas se requieren ácidos grasos, de la bilis y enzimas lipolíticas del páncreas y mucosa intestinal. Estos son compuestos esenciales, ya que el organismo no puede sintetizarlos (May, 1999).

## 2.9. Vitamina C

La vitamina C (ácido L-ascórbico) es la forma enol de la 2-ceto-1-gulofurano lactona. Ésta es sintetizada por los rumiantes en el hígado, pese a esto la suplementación vía oral de estas vitaminas aumentan la concentración plasmática en la sangre de vacas y ovejas (Matsui, 2012 y Parraguez *et al.*, 2011). En el hombre, el ácido ascórbico se encuentra en el plasma seminal 10 veces más concentrado que en el suero sanguíneo y en las células (Matsui, 2012). La corteza suprarrenal y el cuerpo lúteo mantienen concentraciones elevadas de la vitamina, aparentemente destinada a la síntesis de esteroides. Esta vitamina tiene un efecto antioxidante capturando los radicales libres y evitando su posterior reacción en cadena (Matsui, 2012).

Thiele *et al.* (1995) demostraron que las concentraciones de ácido ascórbico en plasma seminal de humanos, se relacionan positivamente con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y también cumple una función protectora en el epidídimo. Además, ha sido demostrado que el ácido ascórbico protege espermatozoides humanos contra daño oxidativo del ADN (Fraga and Motchnik, 1999).

## 2.10. Vitamina E

La vitamina E está compuesta por un grupo de 8 vitameros que a su vez se dividen en dos grupos fundamentales: 4 tocoferoles (TF) y 4 tocotrienoles (TT) (May, 1999). Estos se diferencian en la saturación de la cadena lateral. Los tocoferoles tienen una cadena saturada y los tocotrienoles una insaturada con 3 dobles enlaces. Estos enlaces en ambos grupos actúan como protector de las membranas celulares, retrasando su envejecimiento y evitando el deterioro causado por los radicales libres, protegiendo a los lípidos de la peroxidación. Dentro de cada grupo los vitameros difieren en el número y posición de los grupos metilo en el anillo cromano, designándose como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\tau$  y  $\delta$  (May, 1999). Los TT son productos menos distribuidos en la naturaleza y tienen menor actividad biológica que los TF, por lo que son de menor importancia nutricional. Además la TF tiene una gran retención en la membrana plasmática (Bjornebue *et al.*, 1990).

## 2.11. Interacción entre vitamina C y E

Las vitaminas C y E pueden ser utilizadas de forma complementaria, ya que la vitamina C es el principal antioxidante en el plasma y dentro de la célula, al donar electrones al radical tocoperóxido de la vitamina E oxidada (Hernández *et al.*, 2010). De esta manera recicla la función antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol, ayudando a proteger las membranas lipídicas de la peroxidación (Hernández *et al.*, 2010). Además, el  $\alpha$ -tocoferol puede actuar como un antioxidante o pro-oxidante, ya que inhibe o facilita la peroxidación lipídica de las lipoproteínas de baja densidad (Carr *et al.*, 2000). La actividad pro-oxidante del  $\alpha$ -tocoferol es prevenida por el ascorbato, por lo que la vitamina E es más efectiva en combinación con la vitamina C (Carr *et al.*, 2000). Esta interacción entre moléculas solubles en agua y solubles en lípidos de las membranas, ocurre en la interfase membrana-citosol, siendo todo esto lo que hace que ambas vitaminas tengan un efecto más significativo en el organismo (Chan, 1993).

En estudios realizados en ovinos donde se administraron vía oral Se y vitamina E se pudo demostrar que la fertilidad de estos ovinos aumentó y obtuvieron un mayor porcentaje de parición (Fraire, 2013). En otro estudio, realizado en cabras (*Capra aegagrus hircus*), se suplementó vitamina C y vitamina E por separado y en combinación, demostrando que la suplementación en conjunto de vitamina C y E redujo significativamente el grado de estrés oxidativo en el semen postdescongelado, en relación al semen del grupo testigo, en cambio, la suplementación de vitamina C no tiene resultados significativos por sí sola (Carr *et al.*, 2000). Esto concuerda con lo ocurrido en estudios hechos en semen de pavo (*Meleagris gallopavo*), donde la vitamina C sola no mejoró la motilidad (Castellini *et al.*, 2000). Asimismo Yousef *et al.* (2003) suplementó vitamina C y E en conejos, demostrando una mejora en la calidad de semen al reducir la producción de ROS, ya que hay una estabilidad oxidativa del semen, relacionada con el consumo de  $\alpha$ -tocoferol y de vitamina C.

Therond *et al.* (1996) en un estudio en humanos demostraron que el porcentaje de espermatozoides móviles está significativamente relacionado con el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en el fluido seminal, es decir, existe una relación donde a mayor concentración de vitaminas C y E en el plasma seminal, mayor porcentaje de fertilidad. Cabe destacar que la vitamina C y E se encuentran tanto en el medio intra como extra celular (Membrillo *et al.*, 2011).

Estudios realizados por Jafaroghli *et al.* (2014), en carneros suplementados con vitamina C y ácidos grasos mejoraron la motilidad total y progresiva, además el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal aumentó, demostrando que la suplementación con vitamina C mejora considerablemente la calidad seminal. Además la administración oral de vitamina C y E en forma oral redujo significativamente los indicadores de estrés oxidativo (Parraguez *et al.*, 2011), lo que sugiere la participación de agentes prooxidantes en el deterioro de la calidad seminal en carneros.

### 3. LITERATURA CITADA

Barros, C.; J. Bedford; L. Franklin and C. Austín. 1967, june. Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *Journal of Andrology*, 34: 12-14.

Baumber, J.; B. Ball; J. Linfor and S. Meyers. 2002, april. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology*, 58: 301-302.

Bjornebue, A.; E. Gunn and C. Devron. 1990, march. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *Journal of Nutrition*, 120: 233-242.

Cabrera, P.; A. Ayulo y C. Pantoja. 2011, july. Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Journal of Veterinary Research*, 22: 13.

Carr, A.; B. Zhu; and B. Frei. 2000, september. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research*, 87: 349-354.

Castellini, C.; P. Lattaioli; M. Bernardini; and A. Bosco. 2000, september. Effect of dietary alpha-tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen stored at 5°C. *Theriogenology*, 54: 523-533.

Chan, A. 1993, september. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Can J Physiology Pharmacology*, 71: 725-731.

Chang, M. 1984, february. The meaning of sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 5: 45-50.

Cox, J.; E. Jeria; A. Bocic; N. Vera; R. Soto and J. Dorado. 2015, july. Characterization of the productive performance of Highlander sheep in Southern Chile. II. Male reproductive traits. *Small Ruminant Research*, 130:189-192

Didion, B. and C. Graves. 1986, april. In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrus cows. *Journal of Animal Science*, 62: 1029-1033.

Fischman, M.; S. Campi; L. González; C. Blasi; M. Ghirardi; J. Veksler y H. Cisale. 2007. Valoración de la calidad seminal en semen ovino congelado de entre 9 y 15 años de antigüedad. 5° Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, 25 de Septiembre de 2007, Mendoza, Argentina: UBA. 13p. [En línea]. Recuperado en: <[http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_ovina/inseminacion\\_ovinos/10-fischman\\_semen.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/10-fischman_semen.pdf)>. Consultado el: 10 Junio 2015.

Fraczek, M. and Kurpisz, M. 2005, april. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 59:523-34.

Fraga, C. and G. Motchnik, 1999. july. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high doses of vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind. *Institute of Reproductive Medicine of the University*, 103-106.

Garrido, N.; M. Meseguer and C. Simon.2004, july. Proxodatove and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male infertility. *Journal of Andrology*, 6: 59-65.

Hernández, J.; R. Suástegui; C. Sánchez y R. Ramírez. 2015, abril. Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos. *Revista de Salud Animal*, 37: 15-20.

Hernández, Y.; L. Delgado; R. López; Martínez G. y Mallok A. 2010, septiembre. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 18: 153-158.

Hicks, J. 2001. Bioquímica. Cuarta edición. México: McGraw-Hill. 900p.

Illera, M.; J. Illera y J. Illera. 2000. Vitaminas y minerales. 1a. ed. Madrid, España: Editorial Complutense Antártica. 69p.

Jafaroghli, M.; H. Abdi-Benemar, M. Zamiri, B. Khalili, A. Farshad and A. Shadparvar. 2014, april. 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.

Kasimanickam, R.; V. Kasimanickam; K. Pelzer and J. Descanio. 2007, july. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram lamb spermatozoa during storage at 4°C. *Animal Reproduction Science*, 101: 60-73.

Leboeuf, B.; B. Restall and S. Salamon. 2000, August. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Sciences*, 62: 113-141.

Mansano, M.; C. Scott; D. Souza; T. Torre; V. Vallejo y F. Ferreira de Souza. 2014, junio. Viabilidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5° y 15°C en diferentes sistemas de refrigeración. *Revista brasileña de ciência veterinarias*, 21: 122-126.

Matsui, T. 2012, may. Vitamin C nutrition in cattle. *Journal of Animal Science*, 25: 597-605.

May, J. 1999, juny. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?. Federation of American Societies for Experimental Biology Journal, 13: 995-1006.

Membrillo, A.; A. Córdova; J. Hicks; J. Valencia y H. Castillo. 2011, agosto. Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. Revista Veterinaria, 22:5-90.

Morales, R.; B. Lledó; J. Ortiz José; D. Rodríguez; A. Fabregat; y R. Bernabeu. 2007, octubre. Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. Revista iberoamericana de fertilidad, 300-350.

Ortega, C.; Y. Sotillo; E. Varela; M. Gallardo; A. Muriel and L. González. 2008, march. Detection of “Apoptosis-Like” Changes During the Cryopreservation Process in Equine Sperm. Journal of Andrology, 29:213–221.

Parraguez, V.; Atlagich M.; Araneda O.; García C.; Muñoz A.; De los Reyes M. and Urquieta B. 2011, September. 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: 285–296.

Rocha, G.; J. Castañeda y J. Valencia. 2005, septiembre. Factores que afectan la producción de dosis de semen en centros de inseminación artificial porcina. Avances en Investigación Agropecuaria, 9: 33-43.

Salamon, S. and W. Maxwell. 2000, september. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-111.

Sheweita, S.; Tilmisany A. and Sawaf H. 2005, july. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. Curent Drug Metabolism, 6: 495-501.

Thiele, J.; H. Friesleben; J. Fuchs and F. Ochsendorf. 1995, march. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. Human Reproduction, 10: 110–115.

Walczak, R.; J. Karol and J. Slowikowska. 2012, november. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. Central European Journal of Urology, 120: 60-68.

Watson, P. 1995, september. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reproduction, Fertility and Development, 7: 871 – 891.

Yanagimachi, R. 1988, september. Mammalian fertilization. The Physiology of Reproduction, 10: 135-185.

Yousef, M.; G. Abdallah; and K. Kamel. 2003, april. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. Animal Reproduction Science, 76: 99-111.

**1. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ORAL CON VITAMINA C Y E SOBRE  
LA CALIDAD DEL SEMEN DE CARNERILLOS CONSERVADO A  
TEMPERATURA AMBIENTE Y REFRIGERACIÓN**

## 2. RESUMEN

Uno de los principales factores que afectan la calidad del semen es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno cuando el semen es almacenado. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la suplementación oral con vitaminas C y E en carnerillos, previene el deterioro de la calidad del semen conservado a temperatura ambiente (22-23°C) y refrigeración (4-6°C), ambas situaciones factibles de obtener para cualquier productor. Para ello, se llevó a cabo el experimento en 10 carnerillos, donde a 5 de ellos se les administró diariamente en forma oral una dosis de 600 mg de vitamina C y de 450 UI de vitamina E, durante 30 días. Los otros 5 carnerillos, fueron el grupo sin suplementación de vitaminas. Se obtuvieron muestras de sangre y se analizaron para medir las concentraciones de vitaminas C y E. Además se extrajeron eyaculados donde fueron analizados los parámetros de calidad seminal. Las concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E fueron significativamente mayores en los carnerillos suplementados. El volumen del eyaculado, motilidad de masa, espermatozoides móviles totales y las velocidades no mostraron diferencias entre grupos sin vitaminas y con vitaminas, mientras que la concentración espermática, vitalidad espermática, movilidad espermática progresiva fueron significativamente mayores en los carnerillos suplementados y la movilidad espermática no progresiva fue significativamente mayor para el grupo sin vitaminas (en el eyaculado al tiempo 0). Para los resultados a través del tiempo. La temperatura de almacenamiento no tuvo resultados significativos en la variable motilidad espermática no progresiva, mientras que la motilidad espermática total y progresiva fue mayor en los eyaculados a temperatura ambiente. Por el contrario, la velocidad espermática fue mayor en los eyaculados a temperatura de refrigeración. Los eyaculados de carneros suplementados y sometidos a refrigeración presentaron una calidad seminal superior que los grupos no suplementados. Se concluye que la suplementación oral diaria de vitaminas C y E durante un periodo de 30 días y la refrigeración como método de almacenamiento, permite mantener por más tiempo la calidad del semen de carnerillos, luego de la extracción del eyaculado.

**Palabras claves:** Antioxidantes, especies reactivas de oxígeno, estrés oxidativo y eyaculado.

### 3. ABSTRACT

One of the main factors affecting semen quality is the reactive oxygen species overproduction when the semen is stored. The objective of the present study was to determine whether oral supplementation with vitamins C and E in ram lambs prevents the deterioration of semen quality preserved at room temperature (22-23 ° C) and cooling (4-6 ° C), both situations feasible to obtain for any producer. For this, the experiment was carried out in 10 ram lambs, where 5 of them were daily supplemented orally with vitamin C 600 mg and vitamin E 450 IU, for 30 days. The other 5 animals, were the group control without vitamin supplementation. Blood samples were collected and analyzed to measure vitamin C and E concentrations, in addition to ejaculate extraction where the seminal quality parameters were analyzed. Plasma concentrations of vitamins C and E were significantly higher in supplemented ram lambs. The volume of the ejaculate, mass motility, total motile spermatozoa and velocities showed no differences between groups without vitamins and vitamins, whereas sperm concentration, sperm vitality, and sperm motility were significantly higher in supplemented sperm and sperm motility. Progressive was significantly higher for the group without vitamins (in the ejaculate at time 0). For results over time. The storage temperature did not have significant effects in non-progressive sperm motility, while total and progressive sperm motility was higher in ejaculates stored at room temperature. In contrast, sperm velocity was higher in ejaculates at refrigeration temperature. Ejaculates from supplemented group and stored under refrigeration had higher seminal quality than the non-supplemented groups. It is concluded that the daily oral supplementation of vitamins C and E during a period of 30 days and refrigeration as a storage method, allows to maintain longer the quality of the semen of sheep, after the extraction of the ejaculate.

**Keywords:** Antioxidants, reactive oxygen species, oxidative stress and ejaculating.

## 4. INTRODUCCIÓN

Una de las limitantes para la inseminación artificial es el almacenamiento o preservación del semen, ya sea esté a temperatura ambiente (22-23°C), refrigerado (4-6°C) o congelado (-196°C), debido a la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los espermatozoides, conduciendo a cambios bioquímicos tanto estructurales como moleculares, y por ende, también funcionales (Mansano *et al.*, 2014). Esto se ve acentuado cuando se recurre a inseminar en terreno, ya que usualmente no se cuenta con métodos de refrigeración, conllevando a una disminución de la calidad seminal y sus posteriores perjuicios económicos.

Por lo tanto, uno de los principales factores que afecta la calidad del semen es la preservación o almacenamiento de éste, debido a la generación de estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre ROS y los mecanismos antioxidantes, produciendo cambios en los espermatozoides que conducen a una reducción de la movilidad y la viabilidad de estos y, por lo mismo, una disminución en la capacidad fecundante en el tracto reproductivo de la hembra, lo que finalmente redundaría en un deterioro de la fertilidad del semen (Hernández *et al.*, 2010).

Las ROS son moléculas que poseen una gran reactividad debido a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción (Hernández *et al.*, 2015). Se debe considerar que el metabolismo normal del oxígeno produce ROS, tales como anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo (OH $\cdot$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que se encuentran en cantidades capaces de ser neutralizadas por el sistema antioxidante endógeno (Khan, 2010). El peróxido de hidrógeno es la principal ROS tóxica para los espermatozoides. En la cadena transportadora de electrones existen dos fuentes que generan  $O_2^-$ : a través de la reducción de la ubiquinona y el otro involucra la reducción del grupo flavina de la flavoproteína NADH deshidrogenada (Khan, 2011).

Los espermatozoides son vulnerable al daño peroxidativo de las ROS porque poseen en su membrana plasmática un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados, los cuales son necesarios para mantener la fluidez en la fusión de membrana durante la fertilización (Hernández *et al.*, 2010). Niveles altos de ROS causan diversas anomalías en la morfología espermática como disminución de la movilidad y viabilidad espermática, problemas de migración, capacitación, unión y fusión de los gametos, pérdidas de la integridad acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial afectando el proceso normal del envejecimiento y posterior muerte celular, también pueden inhibir la acción de reacciones enzimáticas alterando así la fertilidad del macho (Walczak *et al.*, 2012).

Las ROS que afectan al espermatozoide provienen principalmente de dos fuentes: de los espermatozoides defectuosos y de los leucocitos seminales (Khan, 2011). Otros factores son la baja protección del sistema antioxidante, ya que contribuiría a hacer las células más vulnerables a niveles normales de ROS, infecciones del tracto reproductor masculino, la hipoxia, etc. (O'Hara *et al.*, 2010). Sin embargo, cabe resaltar que las ROS en concentraciones fisiológicas adecuadas cumplen un papel importante en los procesos de maduración, capacitación, hiperactivación y fecundación. Bajo circunstancias fisiológicas,

la actividad redox de los espermatozoides, es mediada por el AMPc y la fosforilación de la tirosina, estos eventos bioquímicos están asociados con la capacitación espermática (Khan, 2011).

Para evitar el proceso de oxidación y daño celular existe el sistema antioxidante endógeno, constituido por compuestos enzimáticos como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPX), glutatión y la coenzima Q<sup>•</sup>. Éstos mantienen la concentración de ROS en concentraciones fisiológicas estables y protegen a las células de su exceso (Hernández *et al.*, 2010). El sistema antioxidante endógeno es reforzado por los antioxidantes exógenos presentes en la dieta. Dentro de éstos podemos mencionar algunas vitaminas como la vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), pro vitamina A (beta-caroteno). Cabe destacar que los espermatozoides son muy susceptibles a la acción de las ROS, ya que su reducido citoplasma es escaso en estos mecanismos endógenos para reparar los daños asociados al estrés oxidativo (Khan, 2011).

La vitamina C (ácido ascórbico) es un antioxidante hidrosoluble e importante agente antioxidante. La base de su acción está relacionada con la formación de una especie de radical (radical ascorbilo) que es menos inestable que el radical captado (Combs, 2008).

La vitamina E (alfa-tocoferol) es un antioxidante liposoluble, el más activo y abundante de los tocoferoles, su estructura le permite reaccionar con las ROS e impedir las reacciones de propagación. La actividad del alfa-tocoferol se basa en sus propiedades antioxidantes, por lo que esta es importante ya que mantiene la integridad y estabilidad de las membranas biológicas protegiendo los ácidos grasos polinsaturados de la peroxidación (Combs, 2008).

La vitamina C y E pueden ser utilizadas de forma complementaria, ya que la vitamina C es el principal antioxidante en el plasma seminal y dentro de la célula, al donar electrones al radical tocoperoxil de la vitamina E oxidada. De esta manera recicla la función antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol, ayudando a proteger la membrana lipídica de la peroxidación (May, 1999). Además, el  $\alpha$ -tocoferol puede actuar como un antioxidante o pro-oxidante, ya que inhibe o facilita la peroxidación lipídica de las lipoproteínas de baja densidad. La actividad pro-oxidante del  $\alpha$ -tocoferol es prevenida por el ascorbato, por lo que la vitamina E es más efectiva en combinación con la vitamina C (Carr *et al.*, 2000). Esta interacción entre moléculas solubles en agua y solubles en lípidos de las membranas, ocurre en la interface membrana-citosol, siendo todo esto lo que hace que ambas vitaminas tengan un efecto más significativo en el organismo (Chan, 1993).

Además la vitamina C y E son las principales antioxidantes presentes en el semen de manera natural en los mamíferos que regulan la producción de ROS (Silva *et al.*, 2013).

El presente estudio fue diseñado para evaluar la viabilidad del semen de carneros pos eyaculación, cuando este se mantiene bajo condiciones que normalmente puede acceder un productor, temperatura ambiental y refrigeración, así como también establecer los efectos de la administración oral de vitaminas C y E. Estas vitaminas son de bajo costo, por lo que incluirlas en mayor cantidad en la dieta del animal, sería fácilmente aplicable por el productor y podría facilitar el manejo del semen y mejorar la fertilidad de su rebaño luego de la inseminación artificial.

## **5. HIPÓTESIS**

La suplementación oral con vitamina C y E mejoran la calidad y retrasa el deterioro de semen de carnerillos conservado a temperatura ambiente (22-23°C) y de refrigeración (4-6°C).

## **6. OBJETIVOS**

- 1) Evaluar, en carnerillos, el efecto de la suplementación oral con vitamina C y E por 30 días sobre la concentración plasmática de estas vitaminas.
- 2) Evaluar el efecto del tratamiento oral con vitaminas C y E durante 30 días, sobre la calidad del semen de carnerillos.
- 3) Evaluar el efecto del tratamiento oral con vitaminas C y E durante 30 días sobre, el deterioro de la calidad del semen conservado a temperatura ambiente y refrigerado.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó de acuerdo a las directrices de los Principios Internacionales para la Investigación Biomédica en Animales y fue aprobado por el Comité de Revisión de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile y Comité Asesor de Bioética de la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnológica (CONICYT, Chile).

### 7.1. Ubicación del estudio

El estudio se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (33° 34'31" S 70° 37' 52" O), en la mitad de la estación reproductiva (marzo a mayo).

### 7.2. Animales y manejo general

Fueron utilizados 10 carnerillos (*Ovis orientalis aries*) mestizos, de 9-11 meses de edad con pesos entre los 40 y 55 Kg y una condición corporal de 2,5 a 3,5 (en escala 1-5). Cinco de ellos fueron suplementados diariamente con 600 mg de vitamina C y 450 UI de vitamina E, en formato granulado, dosificadas en tubos Eppendorf y suministrados vía oral. Aunque tradicionalmente se ha considerado que la administración oral de vitamina C es incapaz de aumentar las concentraciones plasmáticas de la vitamina debido a su degradación ruminal (Knight, 1941), estudios recientes en ovejas (*Ovis aries*) y vacas (*Bos taurus*) han demostrado que suplementar vía oral vitamina C, aumenta significativamente la concentración plasmática de esta vitamina (Parraguez *et al.*, 2011; Matsui, 2012). Además estudios realizados por Parraguez *et al.* (2011) demostraron que la suplementación vía oral de la vitamina E también aumenta la concentración plasmática en ovinos. También se consideró que la suplementación vía oral es práctica, económica y asegura el consumo de las vitaminas. Los otros 5 carnerillos conformaron el grupo control, sin suplementación. La suplementación vitamínica se realizó por 30 días consecutivos.

Los animales fueron alimentados diariamente con 2,5 kg de heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y 0,5 kg de suplemento balanceado (vaca 14®, alimentos Cisterna) y agua *ad libitum* para satisfacer las necesidades. Los requerimientos nutricionales para carnerillos se presentan en el Cuadro 2 y el valor nutricional del heno de alfalfa y el suplemento en el Cuadro 3.

**Cuadro 2.** Requerimientos nutricionales de los carnerillos (Fuente: NRC, 2007).

Requerimientos del animal				
Peso vivo kg	Unidad	40	50	60
Concentración energética en la dieta	Kcal kg <sup>-1</sup>	2,87	2,87	2,87
MS consumida	kg d <sup>-1</sup>	1,68	2,03	2,13
EM	Mcal d <sup>-1</sup>	4,81	5,83	6,10
PB (60%)	UIP g d <sup>-1</sup>	262	315	323
Ca	g d <sup>-1</sup>	8,3	9,9	10,0
P	g d <sup>-1</sup>	6,5	7,8	7,9
Vitamina E	UI d <sup>-1</sup>	400	500	600
Vitamina C	mg d <sup>-1</sup>	-	-	-

**Cuadro 3.** Valor nutritivo del heno de alfalfa y suplemento vaca 14®. (Fuente: NRC, 2007 y Alimentos cisterna, 2014).

<b>Valor nutritivo de heno de Alfalfa</b>	<b>Unidad</b>	
EM	Mcal kg <sup>-1</sup>	2,1
PB	%	18,0
Vitamina E	UI kg <sup>-1</sup>	60
Vitamina C	mg kg <sup>-1</sup>	66
<b>Vaca 14®</b>	<b>Unidad</b>	
Proteína bruta, mínimo	%	14,0
Energía metabolizable	Kcal kg <sup>-1</sup>	2600
Fibra cruda máximo	%	15,0
Calcio, mínimo	%	1,0
Fosforo, mínimo	%	0,80

### 7.3. Tratamiento y toma de muestras

Antes de comenzar con la suplementación se tomaron muestra de sangre y a los 30 días después de la administración de las vitaminas se tomaron muestras de semen y sangre. Para la obtención del semen, se vació el recto y la zona del prepucio fue lavada con solución salina y secada cuidadosamente con una toalla de papel, para evitar contaminaciones. Se procedió a la extracción con electroeyaculador (Minitube e320, Tiefenbach, Germany). Este método es ampliamente utilizado por ser rápido y además no necesita de entrenamiento del macho para las colectas de semen (Arieta *et al.*, 2014). Aunque se ha indicado que la electroeyaculación podría disminuir la calidad seminal (Salomon y Morrart, 1963), trabajos recientes indican que la adecuada utilización de protocolos de extracción seminal y equipos de electroeyaculación de buena calidad, mantendrían los rangos de calidad seminal dentro de los parámetros adecuados (Ledesma *et al.*, 2015 y Jiménez *et al.*, 2015). La sonda (diámetro: 2,5 cm, longitud: 16 cm) fue lubricada con gel de contacto y fue introducida en el recto con los tres electrodos longitudinales orientados ventralmente, posteriormente se aplicaron los pulsos eléctricos. Los pulsos eléctricos consistieron en aumentos consecutivos de 0,5 V, partiendo de 0 hasta un máximo de 8 V, cada pulso se aplicó durante 3 segundos, seguido de un descanso de 3 segundos. Todos los animales eyacularon entre 4 y 8 V. Para la colección del semen se utilizaron copas de vidrio graduadas para medir el volumen del eyaculado. Una vez obtenido cada eyaculado y verificado el volumen, la copa fue cubierta con papel aluminio, para evitar posibles efectos adversos de la exposición del semen a la luz (Membrillo *et al.*, 2011). Posteriormente se llevó al laboratorio, para proceder inmediatamente a su análisis.

El laboratorio se mantuvo a una temperatura ambiente de 22-23°C. Esta temperatura fue chequeada continuamente con un termómetro ubicado sobre las gradillas donde se mantuvo el semen expuesto a temperatura ambiente. Para el caso del semen conservado a temperatura de refrigeración, las muestras se pusieron en un refrigerador mantenido a 4-6°C (Chang, 1948).

Se debe destacar que las variables que mejor representan la calidad seminal son volumen del eyaculado, motilidad de masa, concentración espermática, vitalidad espermática,

motilidad espermática y velocidad espermática, por lo que en el presente estudio fueron las variables a analizar (Cabrera *et al.*, 2011).

En el análisis a tiempo 0 (muestras recién extraídas), el volumen del eyaculado fue determinado a través de la graduación de la copa recolectora, la motilidad de masa fue medida mediante observación de una gota del semen puesta sobre un portaobjetos y observado en microscopio con magnificación de 10x, utilizando la escala de 1 a 5, siendo 1 no móvil, 2 muy poco móvil, 3 poco móvil, 4 medianamente móvil y 5 altamente móvil. Luego se procedió a diluir la muestra (1:1000) en medio Tris/ácido cítrico/fructosa (Emmanverdi *et al.*, 2013), para obtener una concentración final de aproximadamente  $50 \times 10^6$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ , debido a que el semen puro es extremadamente denso, lo que impide una buena evaluación de las variables (Emmanverdi *et al.*, 2013). Las variables analizadas en las muestras diluidas fueron: vitalidad espermática, concentración espermática, espermatozoides móviles totales, movilidad espermática progresiva, movilidad espermática no progresiva, velocidad espermática rectilínea, velocidad espermática curvilínea y velocidad espermática promedio, evaluadas con el sistema CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*), mediante el equipo ISASv1 (Proiser, Valencia, España). Luego los eyaculados diluidos de cada carnerillo fueron distribuidos en dos gradillas con 10 tubos Eppendorf cada una y con la respectiva numeración de los carnerillos sin vitaminas y con vitaminas. Una gradilla fue dejada a temperatura ambiente ( $22-23^\circ\text{C}$ ) y la otra gradilla fue llevada a temperatura de refrigeración ( $4-6^\circ\text{C}$ ), para los análisis de las características anteriormente descritas a través del tiempo de conservación (1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas).

Para el estudio de la vitalidad espermática se utilizó el Kit Halotech® (Proiser, Valencia, España), el cual posee colorantes fluorescentes naranja de acridina y yoduro de propidio, que permiten diferenciar espermatozoides vivos de los muertos, en base a la integridad de la membrana plasmática. La membrana plasmática está intacta cuando la célula está viva y actúa como barrera de entrada a las tinciones celulares de microscopía de campo claro o fluorescencia (Rojas, 2012). El naranja de acridina atraviesa la membrana celular y se une a los ácidos nucleicos, generando fluorescencia de color verde. El yoduro de propidio, en cambio no atraviesa la membrana intacta de células vivas, pero si las dañadas. Se une a los ácidos nucleicos, desplazando al naranja de acridina, dando una fluorescencia de color rojo.

Se obtuvieron muestras de sangre (5 mL) desde la vena yugular de los carnerillos, las que fueron centrifugadas a  $1200 \times g$ , durante 5 min., para aislar el plasma, donde se midieron las concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E, en el grupo control y el grupo tratado, antes y posterior al tratamiento, como se mencionó anteriormente. Las vitaminas se midieron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), utilizando detección amperométrica en el caso de la vitamina C y detección espectrofluométrica en el caso de la vitamina E, tal como se describe en el estudio realizado por Parraguez *et al.* (2011). Debido a la complejidad de la técnica y a la carencia del equipo estas mediciones se solicitaron como servicio a un laboratorio especializado.

#### 7.4. Diseño experimental y análisis estadístico

La comparación de resultados en el tiempo 0 solo incluyó el factor suplementación, con dos niveles (sin vitaminas y con vitaminas), donde las variables analizadas fueron: volumen del eyaculado, motilidad de masa, concentración espermática, vitalidad espermática, espermatozoides móviles totales, movilidad espermática progresiva, movilidad no progresiva, velocidad espermática rectilínea, velocidad espermática curvilínea y velocidad espermática promedio y su diseño experimental fue completamente aleatorio (DCA). La concentración plasmática de vitaminas C y E fue también comparada entre grupos con vitaminas y sin vitaminas, considerando muestras de sangre obtenidas antes de iniciarse la suplementación y las obtenidas al final de ella. Para analizar las muestras de semen durante su conservación en el tiempo (1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas), se consideraron cuatro tratamientos que correspondieron a la interacción de los factores suplementación mencionados anteriormente y temperatura de almacenamiento con dos niveles (4-6°C refrigerada y 22-23°C ambiente). En este caso, se analizaron las mismas variables, con excepción del volumen del eyaculado, motilidad de masa, concentración espermática y vitalidad espermática y su diseño experimental fue completamente aleatorio (DCA) con estructura factorial. Para ambos casos la unidad experimental fue el carnero y la unidad de observación fue el eyaculado. Por lo tanto los modelos utilizados fueron:

Primer análisis (tiempo 0):  $Y_{ij} = \mu + V_i + \varepsilon_{ij}$

$Y_{ij}$ : la respuesta de j-enésima observación (j: 1, 2, 3... y 5) del efecto de la suplementación de las vitaminas o sin suplementación de las vitaminas (i: 1 y 2 respectivamente).

$\mu$ : la media general de las observaciones.

$V_i$ : el efecto de la suplementación de vitaminas o sin suplementación de vitaminas.

$\varepsilon_{ij}$ : error experimental.

Segundo análisis (a través del tiempo):  $Y_{ijkl} = \mu + V_i + t_j + T_l + (V_i t_j) + (V_i T_l) + (t_j T_l) + (V_i t_j T_l) + \varepsilon_{ijkl}$

$Y_{ijkl}$ : la respuesta de k-enésima observación (k: 1, 2, 3... y 5) del efecto de la suplementación de las vitaminas o sin suplementación de las vitaminas (i: 1 y 2 respectivamente).

$\mu$ : la media general de las observaciones.

$V_i$ : el efecto de la suplementación de vitaminas o sin suplementación de vitaminas.

$t_j$ : efecto de las temperaturas de almacenamiento (j: 1 y 2 (23°C y 4-6°C respectivamente)).

$T_l$ : efecto del tiempo de conservación (l: 1, 2, 3... y 7 (1, 3, 6, 12, 24, 36 y 48 horas respectivamente)).

$\varepsilon_{ijkl}$ : error experimental.

Los datos obtenidos en el tiempo 0 se compararon mediante test de  $t$  de Student y para el segundo análisis estadístico, en donde se incluyeron los factores temperatura de almacenamiento y tiempo de conservación, se realizó un análisis de varianza. Previo a realizar el análisis de varianza se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad por medio de las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Para las diferencias significativas se realizaron pruebas de comparaciones múltiples

mediante LSD de Fisher. El software estadístico utilizado para los análisis fue InfoStat/Estudiantil versión 2008® (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2008).

Los datos expresados en forma de porcentaje (motilidad y vitalidad), fueron sometidos a la transformación propuesta por Waddel and Gemmel, (1991):

$$\text{Variable numérica} = ((\arccos(\sqrt{\text{Variable \%}/100})) * (360 / (2 * 3.14159265)))$$

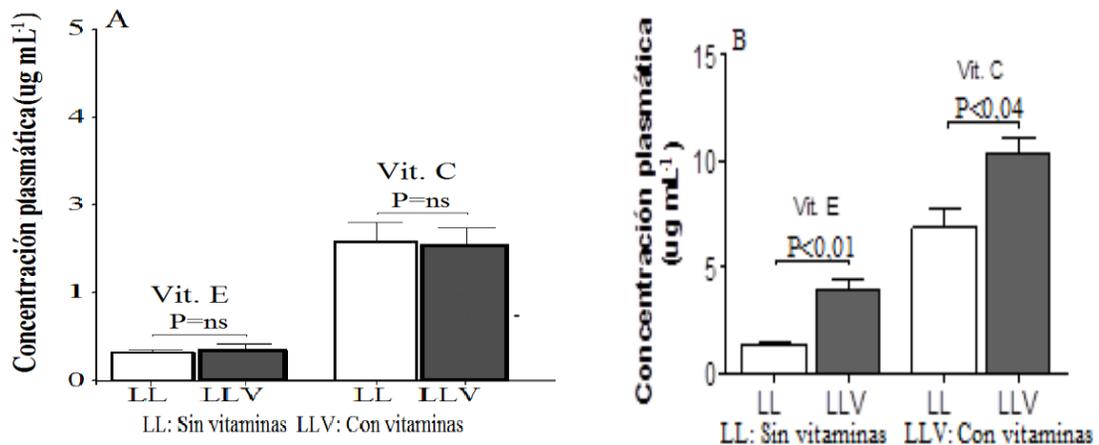
Además para contrastar el segundo modelo, se realizó un análisis de regresión lineal, en el cual se evaluaron los resultados mediante la comparación de las pendientes entre los grupos experimentales.

Los análisis consideraron un nivel de significancia  $\alpha$ : 0,05. Los resultados se presentan como promedio y con su respectivo error estándar (SEM).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Efecto de la suplementación oral con vitaminas C y E sobre la concentración plasmática en carnerillos.

La Figura 1 presenta las concentraciones plasmáticas de las vitaminas C y E. La Figura 1A muestra las concentraciones plasmáticas antes de la suplementación, en donde no se presentaron diferencias significativas entre los grupos sin vitaminas y con vitaminas. Sus medias y sus respectivos SEM fueron: para el caso de la vitamina C  $2,0 \pm 0,24 \mu\text{g mL}^{-1}$  en el grupo sin vitaminas en comparación con  $1,89 \pm 0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$  del grupo con vitaminas y para el caso de la vitamina E  $0,40 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$  en el grupo sin vitaminas en comparación con  $0,41 \pm 0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$  del grupo con vitaminas. La Figura 1B muestra las concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E, luego de la suplementación durante 30 días, donde se pueden observar diferencias significativas entre los grupos sin vitaminas y con vitaminas. Sus medias y sus respectivos SEM fueron: para el caso de la vitamina C  $5,4 \pm 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  en el grupo sin vitaminas en comparación con  $9,9 \pm 1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  del grupo con vitaminas y para el caso de la vitamina E  $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$  en el grupo sin vitaminas en comparación con  $3,6 \pm 0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  del grupo con vitaminas. La validación de estos datos fue realizada a través de un análisis de varianza con un  $p < 0,05$  y a un nivel de confianza 95%.



**Figura 1.** Concentración plasmática de vitaminas C y E, en carnerillos suplementados oralmente con estas vitaminas, (A) concentración antes de la suplementación y (B) concentración posterior a los 30 días de suplementación. Las barras representan las medias con su SEM.

### 8.2. Efecto de la suplementación vitamínica sobre las características del eyaculado al tiempo 0.

Los resultados obtenidos en el grupo sin vitaminas y el grupo con vitaminas al tiempo 0 (eyaculado recién extraído), luego de 30 días de suplementación con vitaminas C y E, se presentan en el Cuadro 4, donde se puede observar que las vitaminas tuvieron efectos significativos sobre los parámetros de calidad seminal. Además, se observan que los parámetros para ambos grupos presentaron valores dentro de los rangos de una adecuada

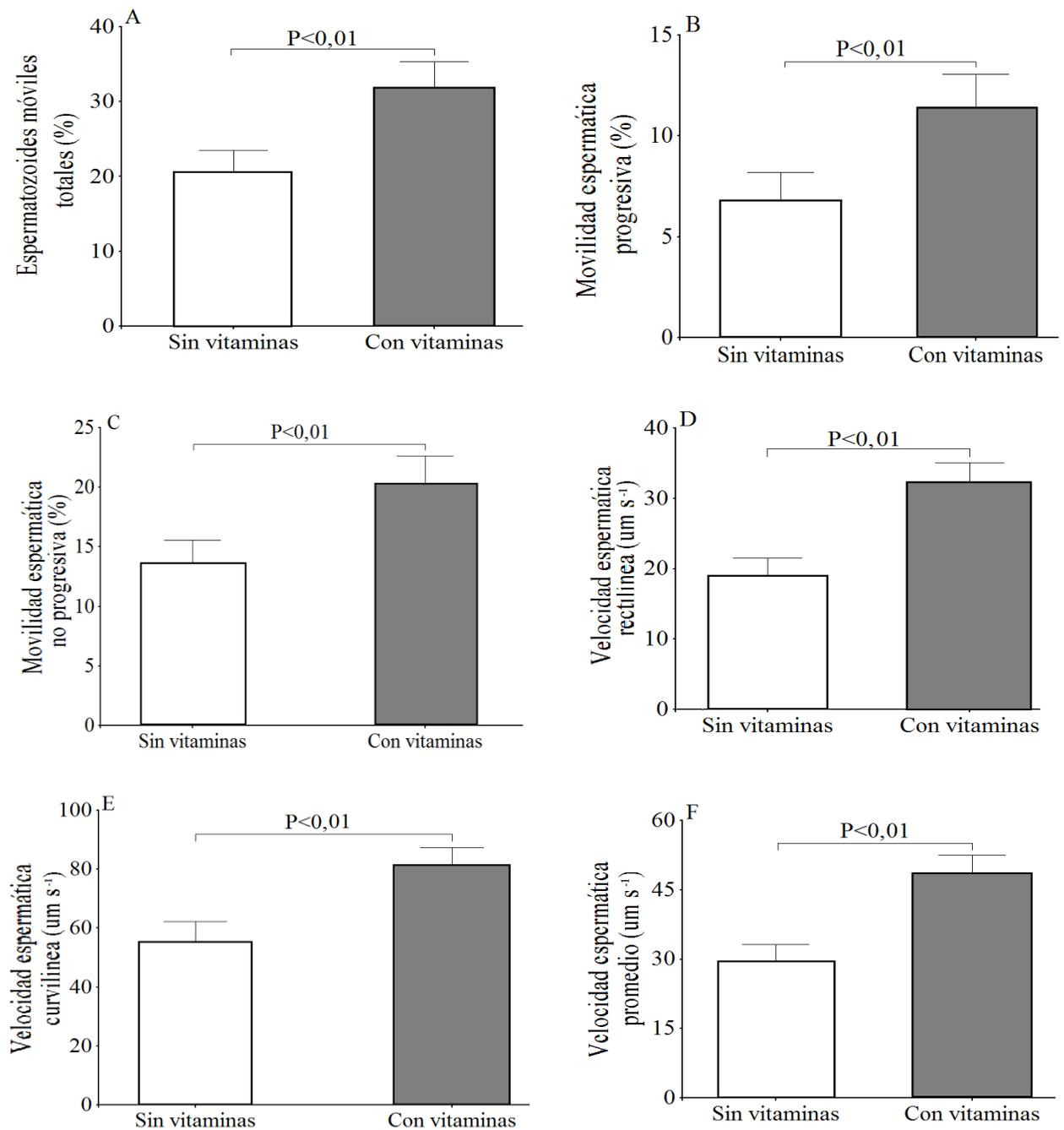
calidad seminal, a excepción de los valores de movilidad espermática progresiva y no progresiva. La validación de los datos fue realizada mediante test de *t* de Student de dos colas, con un  $\alpha$  0,025 a un nivel de confianza 97,5%.

**Cuadro 4.** Efecto de la suplementación oral de las vitaminas C y E en las distintas variables de la calidad seminal de los carnerillos, al tiempo 0 (eyaculado recién extraído). Los valores representan las medias con sus respectivas SEM. Letras distintas entre columnas indican diferencias estadísticamente significativas.

Parámetros	Sin vitaminas	Con vitaminas
Volumen del eyaculado (mL)	2,06 ± 0,34 <sup>a</sup>	2,14 ± 0,20 <sup>a</sup>
Motilidad de masa (1-4)	3,80 ± 0,20 <sup>a</sup>	4,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Concentración espermática (x10 <sup>9</sup> millones mL <sup>-1</sup> )	2,21 ± 3,71 <sup>b</sup>	3,35 ± 1,84 <sup>a</sup>
Vitalidad espermática (%)	70,42 ± 0,01 <sup>b</sup>	88,88 ± 0,01 <sup>a</sup>
Espermatozoides móviles totales (%)	85,72 ± 0,01 <sup>a</sup>	80,42 ± 0,04 <sup>a</sup>
Movilidad espermática progresiva (%)	45,40 ± 0,01 <sup>b</sup>	62,54 ± 0,06 <sup>a</sup>
Movilidad espermática no progresiva (%)	40,32 ± 0,01 <sup>a</sup>	17,88 ± 0,06 <sup>b</sup>
Velocidad espermática rectilínea (µm s <sup>-1</sup> )	96,92 ± 4,34 <sup>a</sup>	104,62 ± 16,38 <sup>a</sup>
Velocidad espermática curvilínea (µm s <sup>-1</sup> )	148,98 ± 4,84 <sup>a</sup>	140,72 ± 13,55 <sup>a</sup>
Velocidad espermática promedio (µm s <sup>-1</sup> )	138,32 ± 11,89 <sup>a</sup>	125,96 ± 14,77 <sup>a</sup>

**8.3. Efectos de suplementación y temperatura de almacenamiento sobre las principales características seminales (espermatozoides móviles totales, movilidad espermática progresiva, movilidad espermática no progresiva, velocidad espermática rectilínea, velocidad espermática curvilínea y velocidad espermática promedio).**

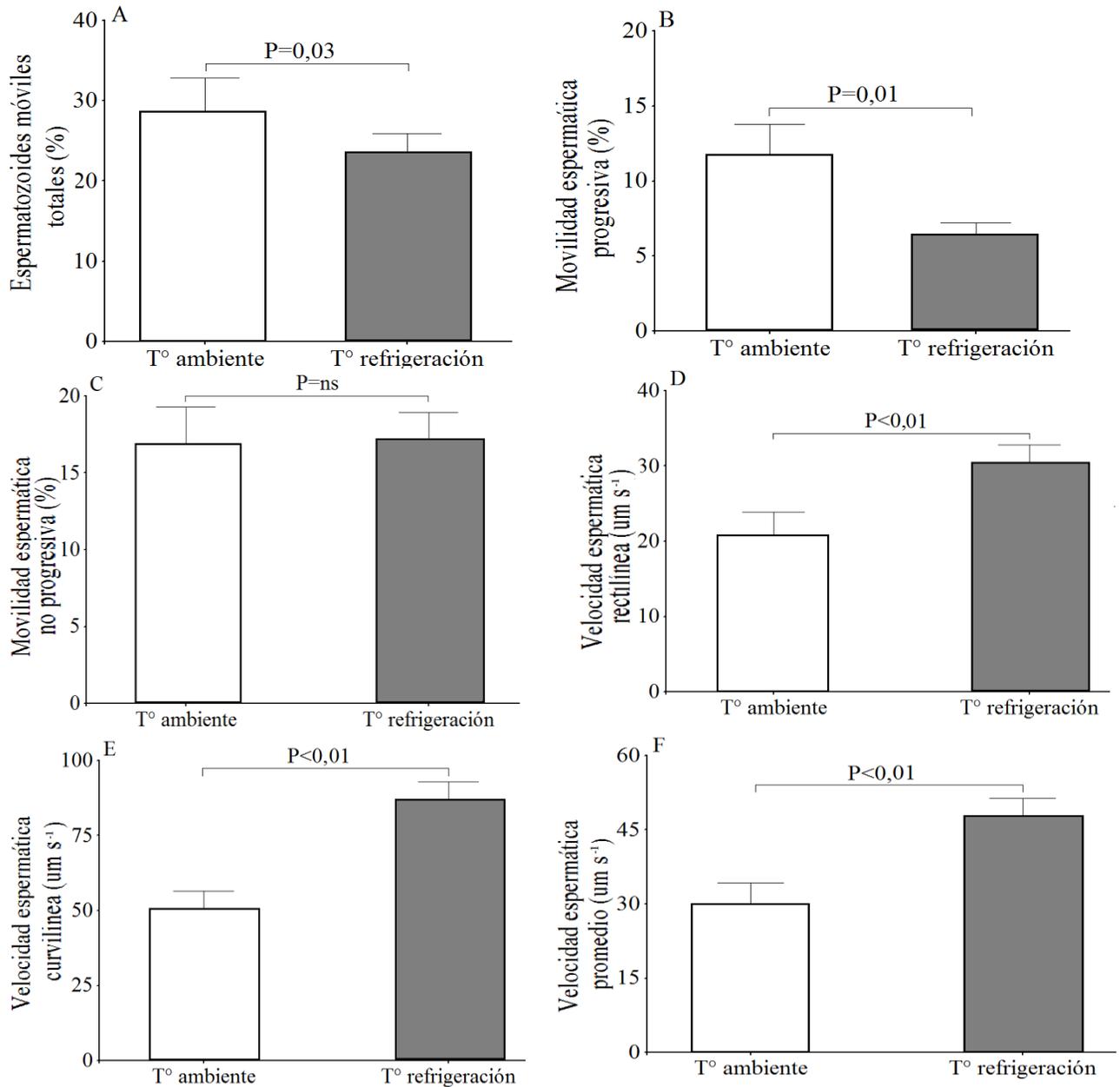
En la Figura 2 se observa el efecto de la suplementación oral con vitaminas C y E en las distintas variables de calidad seminal de los carnerillos, durante todo el período de conservación. En las Figuras 2A, 2B, 2C, 2E y 2F se puede apreciar que hubo un efecto significativo de la suplementación con vitaminas, presentando mayor porcentaje de espermatozoides y mayores velocidades para cada variable respectivamente. La validación de los datos fue realizada a través de una análisis de varianza con un  $p < 0,05$ , a un nivel de confianza 95%.



**Figura 2.** Efecto de la suplementación oral de las vitaminas C y E en las distintas variables de la calidad seminal de los carnerillos, durante todo el período de conservación. Las barras representan las medias con su SEM.

En la Figura 3 se observa el efecto de la temperatura de almacenamiento de los eyaculados en las distintas variables de la calidad seminal de los carnerillos, durante todo el período de conservación. Se presentaron diferencias significativas entre T° ambiente y T° refrigeración, para las variables porcentaje espermatozoides móviles totales (Figura 3A) y movilidad espermática progresiva (Figura 3B), donde los mayores valores obtenidos para

estas variables fueron a T° ambiente. Para la variable porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos (Figura 3C) no se observaron diferencias significativas. En las Figuras 3D, 3E y 3F se observan diferencias significativas entre T° ambiente y T° refrigeración, en donde las mayores velocidades se presentaron a T° refrigeración. La validación de los datos fue realizada a través de un análisis de varianza con un  $p < 0,05$ , a un nivel de confianza 95%.



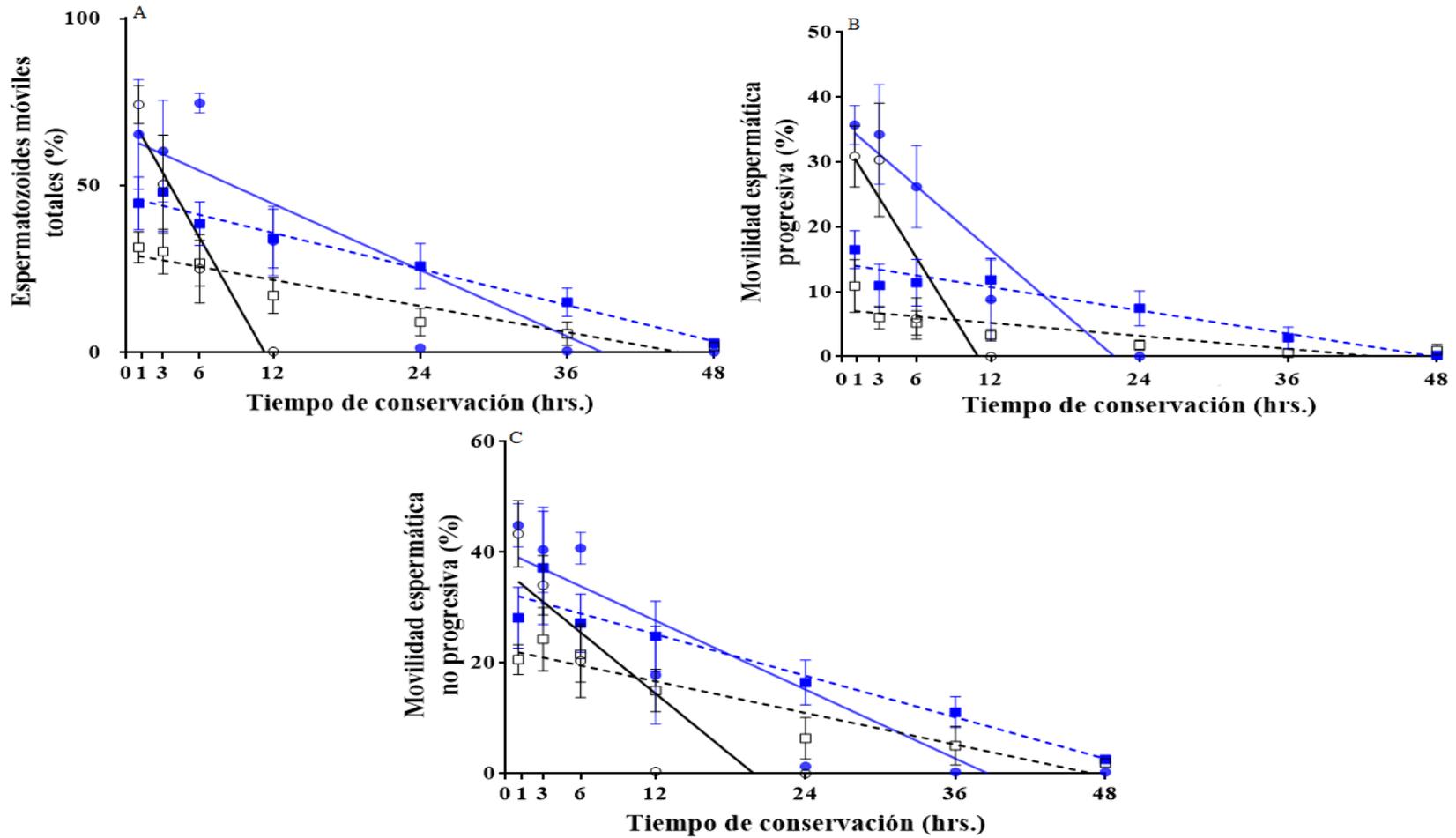
**Figura 3.** Efecto de la temperatura de almacenamiento de los eyaculados en las distintas variables de la calidad seminal de los carnerillos, durante todo el período de conservación. Las barras representan las medias con su SEM.

Con respecto al tiempo de conservación este fue estadísticamente significativo, obteniendo los mejores resultados dentro de las primeras 3 horas de conservación. La validación de los datos fue realizada a través de un análisis de varianza con un  $p < 0,05$ , a un nivel de confianza 95%.

En la Figura 4 se observa los efectos de la temperatura de almacenamiento y de la suplementación con vitaminas C y E, sobre algunas variables de calidad seminal en carnerillos, a través del tiempo de conservación.

En las figuras 4A, 4B y 4C se observa que el mayor porcentaje de espermatozoides móviles, en cualquiera de sus formas de evaluación, se presenta a la primera hora de conservación, en los grupos sin vitaminas/T° ambiente y con vitaminas/T° ambiente. En el grupo sin vitaminas/T° ambiente la movilidad espermática cesó a las 12 horas de conservación aproximadamente, en comparación con el grupo con vitaminas/T° ambiente donde esto ocurrió a partir de las horas 24-36 aproximadamente. En los eyaculados sometidos a T° refrigeración, aunque la motilidad inicial fue afectada, esta perduró por un mayor tiempo de conservación. El grupo con vitaminas/T° refrigeración presentó el mayor porcentaje de espermatozoides móviles a partir de la hora 12, en comparación con los otros grupos.

Las funciones de regresión que mejor representan las distintas características de motilidad espermática a través del tiempo de conservación, se presentan en el cuadro 5. Las pendientes negativas de las rectas representan un deterioro de la motilidad espermática, presentando la misma tasa de deterioro para los grupos grupo sin vitaminas/T° refrigeración versus con vitaminas/T° refrigeración. Con respecto a los interceptos los grupos sin vitaminas/T° ambiente versus con vitaminas/ T° ambiente, no presentaron diferencias, siendo estos grupos los de mayor movilidad espermática. Los interceptos de los demás grupos presentaron diferencias, debido a la influencia de las temperaturas.



**Figura 4.** Efectos de la temperatura de almacenamiento y de la suplementación con vitaminas C y E, sobre algunas variables de calidad seminal en carnerillos, a través del tiempo de conservación (graficado con sus valores promedios, con su SEM) y sus respectivas líneas de tendencias. Sin vitaminas/T° ambiente —○—, sin vitaminas/T° refrigeración —□—, con vitaminas/T° ambiente —●— y con vitaminas/T° refrigeración —■—.

**Cuadro 5.** Funciones de la rectas de algunas variables de calidad seminal bajo el efecto de temperatura de almacenamiento y suplementación con vitamina C y E, a través del tiempo de conservación.

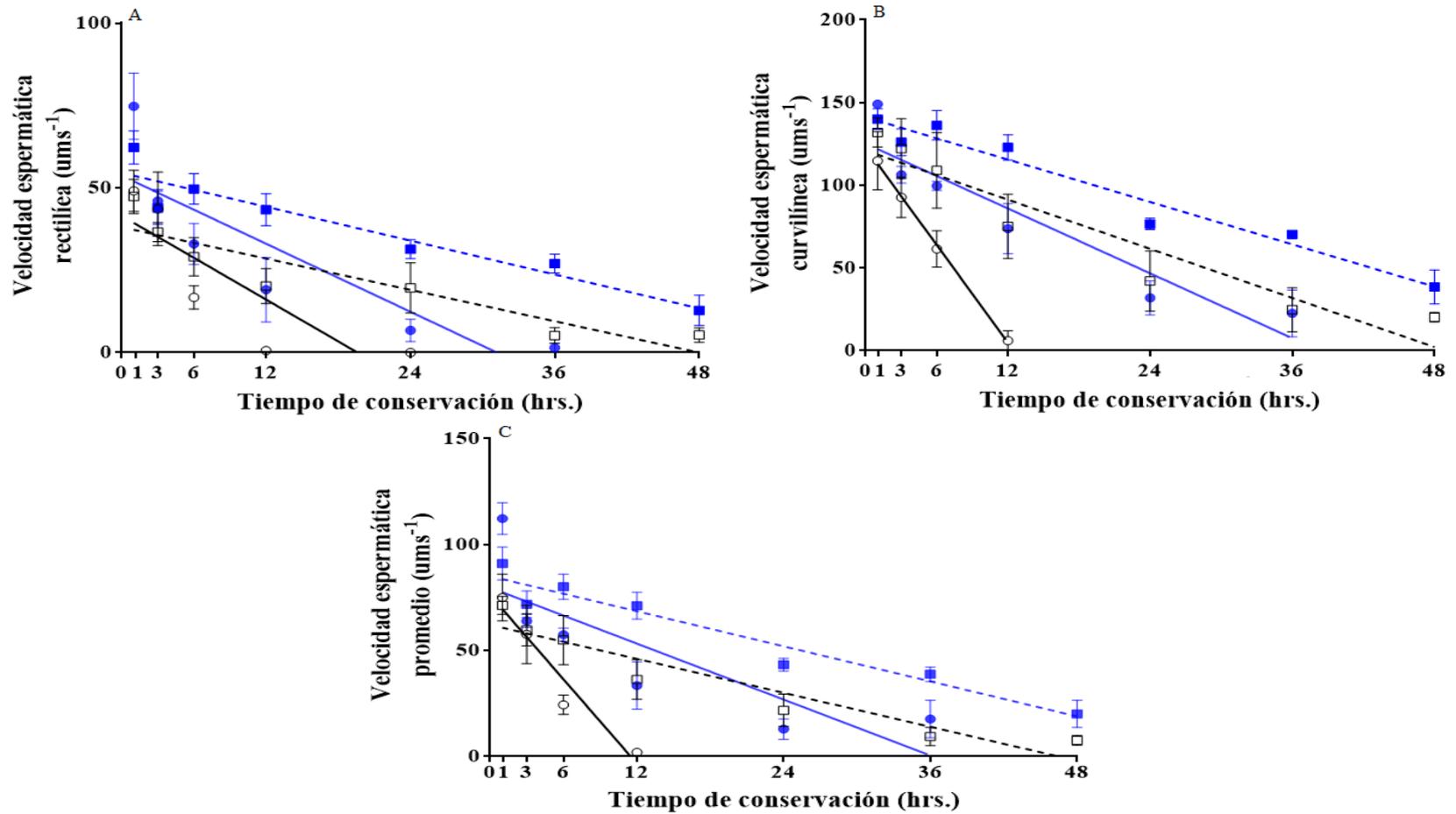
Espermatozoides totales móviles (rectas)	Función	r <sup>2</sup>	p
Sin vitaminas/T° ambiente	y=69,05 – 4,66t	0,61	<0,01
Sin vitaminas/T° refrigeración	y=29,66 – 0,67t	0,54	<0,01
Con vitaminas/T° ambiente	y=73,25 – 1,95t	0,76	<0,01
Con vitaminas/T° refrigeración	y=46,65 – 0,90t	0,50	<0,01
Movilidad espermática progresiva (rectas)	Función	r <sup>2</sup>	p
Sin vitaminas/T° ambiente	y=35,86 – 3,85t	0,42	0,00
Sin vitaminas/T° refrigeración	y=7,24 – 0,18t	0,34	0,00
Con vitaminas/T° ambiente	y=37,96 – 1,69t	0,67	<0,01
Con vitaminas/T° refrigeración	y=13,95 – 0,28t	0,38	<0,01
Movilidad espermática no progresiva (rectas)	Función	r <sup>2</sup>	p
Sin vitaminas/T° ambiente	y=40,21 – 2,64t	0,59	<0,01
Sin vitaminas/T° refrigeración	y=22,42 – 0,49t	0,50	<0,01
Con vitaminas/T° ambiente	y=42,12 – 1,10t	0,70	<0,01
Con vitaminas/T° refrigeración	y=32,70 – 0,63t	0,44	<0,01

y: variable observada t: tiempo de conservación

En la Figura 5 se observa los efectos de la temperatura de almacenamiento y de la suplementación con vitaminas C y E, sobre algunas variables de cinética espermática en carnerillos, a través del tiempo de conservación.

En las figuras 5A, 5B y 5C se observa que la mayor velocidad espermática, se presenta a la primera hora de conservación en los grupos sometidos a temperatura de refrigeración. En el grupo sin vitaminas/T° ambiente la movilidad espermática cesó a las 12 horas de conservación aproximadamente, en comparación con el grupo con vitaminas/T° ambiente donde esto ocurrió a partir de la hora 36 aproximadamente. En los eyaculados sometidos a T° refrigeración, la velocidad espermática presentó mayores valores a través del tiempo de conservación.

Las funciones de regresión que mejor representan las distintas características de velocidad espermática a través del tiempo de conservación, se presentan en el cuadro 6. Las pendientes negativas de las rectas representan un deterioro de la velocidad espermática, presentando la misma tasa de deterioro para los grupos grupo sin vitaminas/T° refrigeración versus con vitaminas/T° refrigeración. Con respecto a los interceptos los grupos sin vitaminas/T° ambiente versus con vitaminas/ T° ambiente, no presentaron diferencias, siendo estos grupos los de mayor velocidad espermática. Los interceptos de los demás grupos presentaron diferencias, debido a la influencia de las temperaturas.



**Figura 5.** Efectos de la temperatura de almacenamiento y de la suplementación con vitamina C y E, sobre algunas variables de cinética espermática en carnerillos, a través del tiempo de conservación (graficado con sus valores promedios, con su SEM) y sus respectivas líneas de tendencias. Sin vitaminas/T° ambiente —○—, sin vitaminas/T° refrigeración —□—, con vitaminas/T° ambiente —●— y con vitaminas/T° refrigeración —■—.

**Cuadro 6.** Funciones de la rectas de algunas variables de cinemática espermática bajo el efecto de temperatura de almacenamiento y suplementación con vitamina C y E, a través del tiempo de conservación.

Velocidad espermática rectilínea (rectas)	Función	r <sup>2</sup>	p
Sin vitaminas/T° ambiente	y=45,92 – 3,09t	0,53	<0,01
Sin vitaminas/T° refrigeración	y=38,01 – 0,85t	0,62	<0,01
Con vitaminas/T° ambiente	y=59,04 – 1,87t	0,64	<0,01
Con vitaminas/T° refrigeración	y=54,53 – 0,86t	0,67	<0,01
Velocidad espermática curvilínea (rectas)	Función	r <sup>2</sup>	p
Sin vitaminas/T° ambiente	y=109,25 – 6,89t	0,63	<0,01
Sin vitaminas/T° refrigeración	y=121,45 – 2,66t	0,62	<0,01
Con vitaminas/T° ambiente	y=124,27 – 3,29t	0,73	<0,01
Con vitaminas/T° refrigeración	y=141,17 – 2,13t	0,83	<0,01
Velocidad espermática promedio (rectas)	Función	r <sup>2</sup>	p
Sin vitaminas/T° ambiente	y=66,26 – 4,45t	0,54	<0,01
Sin vitaminas/T° refrigeración	y=62,21 – 1,41t	0,67	<0,01
Con vitaminas/T° ambiente	y=79,91 – 2,30t	0,64	<0,01
Con vitaminas/T° refrigeración	y=85,12 – 1,38t	0,76	<0,01

y: variable observada t: tiempo de conservación

Los datos descritos en la figura 4 y 5 son complementados con las interacciones para las variables de calidad seminal, presentadas en el cuadro 7.

**Cuadro 7.** Efecto de la temperatura de almacenamiento y la suplementación oral de las vitaminas C y E en las distintas variables de la calidad seminal de los carnerillos, a través del tiempo de conservación. Asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas.

Fuentes de variación	Esperma. móviles totales	Movilidad espermá. Progresiva	Movilidad espermá. no progresiva	Velocidad espermá. Rectilínea	Velocidad espermá. curvilínea	Velocidad espermá. promedio
Vitaminas	*	*	*	*	*	*
Temperatura	*	*	ns	*	*	*
Tiempo	*	*	*	*	*	*
Vitam/temp.	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Vitam/tiempo	*	*	*	*	*	ns
Temp/tiempo	*	*	*	*	ns	ns
Vitam/temp/tiempo	*	*	ns	ns	ns	ns

La validación de los datos fue realizada a través de un análisis de comparaciones múltiples, mediante valor crítico de Fischer.

## 9. DISCUSIÓN

Los resultados de la concentración plasmática de vitaminas C y E permitieron demostrar que la suplementación utilizada fue efectiva, llevando a un aumento significativo de ellas en el grupo con vitamina en comparación con el grupo sin vitaminas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Parraguez *et al.* (2011) en ovejas suplementadas con 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E, donde se observa que la concentración plasmática de las vitaminas, aumentó al doble en ovejas tratadas respecto a las no tratadas. De igual forma, los resultados descritos por Matsui (2012) en donde suplementó a vacas con distintas dosis de vitamina C 20 mg, 40 mg y 60 mg las concentraciones plasmáticas aumentaron significativamente con cada una de las dosis suplementadas, siendo la mayor dosis de suplementación la que duplicó las concentraciones plasmáticas. Estos resultados señalan que a pesar de que la vitamina C es sintetizada por el hígado (Combs, 2008) y parte de la consumida por la vía oral es degradada por el rumen (Knight *et al.*, 1941; Nockels, 1988; MacLeod *et al.*, 2003; Matsui, 2012), su concentración plasmática aumenta con la suplementación, como la utilizada en el presente estudio. Asimismo, la vitamina E también aumentó su concentración plasmática, a pesar de que posee un porcentaje de pérdida a nivel de intestino delgado en su etapa de absorción (Hymoller and Jensen, 2010). Por lo tanto, el presente estudio confirma la efectividad de la suplementación oral de vitaminas C y E para incrementar las concentraciones plasmáticas.

La suplementación oral con vitaminas C y E no mostró efectos significativos en los eyaculados recién extraídos, para las variables volumen del eyaculado, motilidad de masa, espermatozoides móviles totales, velocidad espermática rectilínea, velocidad espermática curvilínea y velocidad espermática promedio. Esto podría deberse a la cantidad de días que fueron suplementados los carnerillos, ya que estudios realizados por Yue *et al.* (2010) describen un aumento en el volumen del eyaculado, concentración espermática y movilidad espermática, cuando suplementó diariamente 200 UI de vitamina E por carnero durante 12 meses. Asimismo, estudios realizados por Jafaroghli *et al.* (2014) en carneros suplementados diariamente con 300 mg de vitamina C durante 14 semanas, aumentaron el valor de las características: volumen del eyaculado, motilidad de masa, concentración espermática, vitalidad espermática, movilidad espermática progresiva y velocidad espermática promedio, con respecto a los carneros no tratados. Sin embargo, la suplementación con vitaminas C y E tuvo efectos significativos sobre los parámetros de concentración espermática, vitalidad espermática, movilidad espermática progresiva y movilidad espermática no progresiva, obteniendo los mayores valores en el grupo con vitaminas con respecto al grupo sin vitaminas, lo que concuerda con lo descrito por Yue *et al.* (2010) y Jafaroghli *et al.* (2014). Con respecto a los resultados de espermatozoides móviles no progresivos, estos tuvieron un incremento en el grupo sin vitaminas, ya que estos perdieron la capacidad de tener una movilidad progresiva, al no tener el efecto antioxidante de las vitaminas.

Con respecto a los valores de los parámetros de calidad seminal, para ambos grupos se mantuvieron dentro de los rangos normales de calidad seminal en los eyaculados recién extraídos, a excepción de la variable movilidad espermática progresiva y movilidad espermática no progresiva, ya que tuvieron valores que estaban bajo y sobre lo normal, respectivamente. Esto se puede explicar debido a que son valores altamente variables, pero

la calidad seminal adecuada involucra varios parámetros que fueron mencionados anteriormente y estos se encuentran dentro de los valores normales (Mansano *et al.*, 2014 y Cox *et al.*, 2015).

Los resultados del efecto de la suplementación oral de las vitaminas C y E en las distintas variables de calidad seminal de los carnerillos, durante todo el periodo de conservación, muestran un efecto significativo de la suplementación en las distintas variables de calidad seminal, donde el grupo con vitaminas obtuvo los mejores resultados. Esto indica que la suplementación con vitaminas C y E evita parcialmente el deterioro de la movilidad y velocidad espermática durante el período de conservación. La movilidad espermática no progresiva a través del tiempo obtuvo una media mayor en los grupos con vitaminas. Esto se debió a que al pasar las horas de conservación los eyaculados sin suplementación van perdiendo la movilidad espermática no progresiva hasta ser estáticos y la movilidad espermática progresiva que pasa a ser no progresiva, se torna rápidamente estática (Cox *et al.*, 2015). Si bien, en el presente estudio no se midió marcadores de estrés oxidativo, los resultados obtenidos se podrían interpretar de acuerdo a lo obtenido por Yue *et al.* (2010), donde el efecto de la suplementación de vitamina E en carneros, además de mejorar los parámetros de calidad seminal ya mencionados anteriormente, disminuyó la cantidad de biomarcadores de estrés oxidativos en el tejido testicular, demostrando la eficacia antioxidante de estas vitaminas.

Los resultados del efecto de la temperatura de almacenamiento en la calidad seminal de los carnerillos, muestra un efecto significativo en todas las variables excepto para movilidad espermática no progresiva. Se observó que a temperatura ambiente se obtienen los mejores resultados para las variables espermatozoides móviles totales y movilidad espermática progresiva. Esto se puede explicar debido a que la refrigeración tiene un efecto negativo en el metabolismo del espermatozoide, haciéndolo más lento al generar un shock térmico (Azevedo *et al.*, 2005). Esto concuerda con los resultados de O' Hara *et al.* (2010), quienes compararon semen de carnero refrigerado por 24 horas con semen fresco, demostrando que la calidad seminal bajo refrigeración disminuye. Del mismo modo, en el trabajo realizado por Anand and Yadav (2016), donde se estudió la calidad del semen de chivatos (*Capra aegagrus hircus*) sometido a bajas temperaturas y al compararlo con semen puro recién extraído, se demostró disminución en los parámetros de calidad seminal. Sin embargo, al cabo del paso de las horas esto sería beneficioso ya que al tener una tasa metabólica más lenta tendrá como consecuencia una producción de ROS más lenta, lo que afectaría principalmente a la movilidad espermática progresiva y, por ende, a los espermatozoides móviles totales (Alvarez and Aitken, 2012).

Por otro lado, la preservación del semen a temperatura ambiente, conlleva a una disminución gradual en la capacidad del espermatozoide de generar ATP a través de la respiración mitocondrial, debido a la producción de ROS (Yu *et al.*, 2011) y además de la liberación oxidasa ácido amino aromática (AAAO) ligada a membrana de los espermatozoides muertos, que tiene un efecto tóxico, catalizando la formación ROS (Thiangtum *et al.*, 2012). Por otra parte, en el caso de las variables de velocidad espermática se obtienen mejores resultados a temperaturas de refrigeración, debido a que el metabolismo del espermatozoide se ve disminuido con las bajas temperaturas como se mencionó anteriormente y por ende el gasto energético es menor, prolongando así

la velocidad en los eyaculados a temperaturas de refrigeración (Azevedo *et al.*, 2005). Para el caso de la variable movilidad espermática no progresiva, la refrigeración no tuvo efectos significativos, comportándose de manera opuesta a la movilidad progresiva, esto podría deberse a los valores de esta variable, ya que se mueven en rangos más bajos.

Para el caso del efecto del tiempo de conservación en las variables, se puede observar que los mejores resultados son obtenidos en las primeras horas de conservación. Esto se debe a que al pasar el tiempo desde la extracción del eyaculado se genera un aumento en la cantidad de ROS, cambios de pH, cambios permeabilidad iónica, afectando los parámetros de calidad seminal (Hernández *et al.*, 2010).

Los resultados del efecto de la suplementación y refrigeración en forma conjunta en las variables movilidad espermática total y movilidad espermática progresiva, a través del tiempo de conservación, muestra un efecto significativo, debido a que la suplementación, por un lado, tiene un efecto antioxidante protector, disminuyendo la producción de ROS, en comparación con los eyaculados sin vitaminas que produciría una mayor peroxidación lipídica al no tener este efecto protector (Najjam *et al.*, 2013). Esto concuerda con lo descrito por Kumar *et al.* (2014) donde adicionó vitaminas C y E al semen diluido de toro, obteniendo mejores resultados que el semen diluido sin vitaminas, demostrando el efecto protector de los antioxidantes. Por otro lado, la refrigeración como medio de almacenamiento, mantiene una mejor respuesta en las variables de calidad seminal a través del tiempo de conservación. Esto concuerda con los resultados descritos por Mansano *et al.* (2014) donde se comparó semen de carnero refrigerado por 48 horas, con semen mantenido en fresco por el mismo periodo, obteniendo una adecuada calidad seminal a temperatura de refrigeración. Además Medina *et al.* (2008) describieron que en el semen de cerdo (*Sus scrofa domesticus*) incubado a T° ambiente por 4 horas postcrioconservación, disminuye considerablemente la movilidad progresiva. Además, señalan que podría atribuirse a la acción de las ROS, ya que la acción de bajas temperaturas para la preservación del semen mantuvo una adecuada calidad seminal y una vez que este fue sometido a temperaturas superiores a 15°C, el semen presentó una disminución en su calidad seminal. Asimismo, el efecto de las vitaminas y refrigeración por sí solas, no son tan eficaces como el método en conjunto de suplementar y almacenar a temperatura de refrigeración.

Con respecto a las variables movilidad espermática no progresiva, velocidad espermática rectilínea, velocidad espermática curvilínea y velocidad espermática promedio no presentaron un efecto significativo de la suplementación y refrigeración en forma conjunta, a través de tiempo de conservación. Esto se podría deber a que la variable más sensible al daño por ROS es la movilidad espermática progresiva (Alvarez and Aitken, 2012) y por esto el efecto de los tratamiento podría ser observado en esta variable y por ende en la variable espermatozoides móviles totales, en un corto periodo de suplementación.

Tanto la interacción temperatura de refrigeración-tiempo de conservación en las variables velocidad espermática curvilínea y velocidad espermática promedio y la interacción suplementación- tiempo de conservación en la variable velocidad espermática promedio no fueron estadísticamente significativas. Esto se puede explicar debido a que estas variables no serían tan susceptibles al efecto de la suplementación y a la temperatura de almacenamiento. Además, estas respuestas podrían verse influenciadas por el corto periodo

de suplementación, ya que se sabe, que la velocidad espermática curvilínea disminuye bajo los efectos de la suplementación a través del tiempo, por el efecto antioxidante de las vitaminas (Azevedo *et al.*, 2005).

Con respecto a la interacción suplementación-temperatura de almacenamiento, esta no fue significativa, ya que la temperatura de desnaturalización para estas vitaminas es superior 60°C y la desnaturalización a bajas temperaturas es mínima (Combs, 2008). Es por esto, que el efecto de la vitamina no se vio condicionado por la temperatura, ya que en el presente trabajo se utilizó temperaturas donde las vitaminas no tienen modificaciones significativas de actividad.

Respecto al protocolo de refrigeración utilizado en el presente estudio, se observa una disminución de la movilidad espermática en los eyaculados refrigerados en comparación con los mantenidos a temperatura ambiente. Esto se debería en un principio a la disminución del metabolismo de los espermatozoides, a causa de la disminución de la temperatura, tal como se mencionó anteriormente. Pero al transcurrir el tiempo el daño producido por choque térmico fue bajo, debido a que la tasa de enfriamiento utilizada se estima que fue <10° C/min. Esto es coincidente con lo descrito por Parks (1997), donde se recomienda un velocidad de enfriamiento <10 °C/min hasta alcanzar la temperatura de 4°C para el caso de eyaculados sin medios de dilución antioxidante. Esto se debe a la sensibilidad de los espermatozoides al choque por frío (enfriamiento súbito de 15 a 0 °C), que produce una irreversible pérdida de motilidad, pérdida de proteínas y enzimas celulares, el incremento de la permeabilidad de la membrana y desintegración del acrosoma (Watson y Plummer, 1985). Por ello la severidad del daño espermático dependerá de la tasa de enfriamiento (Watson, 1981). Actualmente, los protocolos de refrigeración utilizan medios de dilución antioxidante, para disminuir el choque por frío. Otros protocolos que usan cajas térmicas de transporte, recomiendan un volumen de 100 mL a transportar en cada caja, para disminuir el choque de frío, cuando el volumen transportado es menor a 100 mL se recomienda adicionar un frasco de agua, con el volumen restante hasta alcanzar los 100 mL. Este último protocolo demostró que la calidad seminal se logró prolongar por hasta 48 horas (García, 2014 y Mansano *et al.*, 2014).

Por lo anterior, se sugiere utilizar diluyentes en conjunto con antioxidantes cuando el semen es congelado, ya que estos demuestran una calidad seminal más prolongada, tal como se describe en el estudio realizado por Emamverdi *et al.*, (2013) donde utilizan diluyente de tris + lecitina de soja para la crioconservación de semen de carneros, obteniendo alta calidad seminal post descongelación. Asimismo, el estudio realizado por Ibrahim and Khudhur (2013), donde compararon la calidad del semen de carnero sometido a refrigeración en tres diluyentes, el primero con tris-fructosa-huevo, el segundo con tris-fructosa-huevo + vitamina C y el tercero con tris-fructosa-huevo + vitamina E, obteniendo las mayores calidades seminales en los últimos dos medios, comprobando el efecto antioxidante en la calidad seminal. También Kumar *et al.* (2014) demostró que el uso de diluyentes junto a vitaminas C y E en semen de toro tiene efectos protectores contra las ROS y el choque de frío para semen crioconservado. Del mismo modo el trabajo realizado por Mostafapor and Farrokhi (2014) demuestra que la utilización de distintos medios de dilución pueden llevar a diferencias significativas en la calidad espermática de carneros.

Con respecto a la calidad del semen para mantener su capacidad fertilizante, esta se mantuvo dentro de un valor aceptable hasta por 12 horas en los grupos suplementados con vitaminas C y E, ya sea a temperatura ambiente o a temperatura de refrigeración. Si bien, estudios descritos por Mansano *et al.* (2014) muestran una mejor calidad seminal en los eyaculados refrigerados, en comparación con los almacenados a temperatura ambiente, posterior a las 3 horas de conservación, el efecto de las vitaminas en el presente trabajo prolongaría la calidad seminal de los eyaculados a temperatura ambiente por sobre los eyaculados suplementados a temperatura de refrigeración hasta por 6 horas de conservación. Si bien, en el presente estudio no se evaluó la tasa de fertilización, los resultados obtenidos se podrían complementar con los conseguidos por Maxwell y Salamon (1993), donde describieron que entre el 68% al 75% de las ovejas parieron después de una única inseminación con semen fresco, en cambio la tasa de parto para el semen refrigerado durante 24, 48 y 72 horas fue en promedio de 45%, 25% y 15% respectivamente. De acuerdo a lo anterior, la fertilidad a la inseminación cervical en ovejas, disminuye rápidamente cuando el semen es refrigerado por más de 24 horas, presentando una tasa de disminución del 10% al 35% por día de refrigeración. También estudios más recientes por Mehr *et al.* (2013) en ovejas, muestran una tasa de parición de 41,6% en ovejas inseminadas con semen refrigerado a 5°C por 52 horas.

Finalmente se propone que la refrigeración puede ser un paso inicial para la congelación, cuando hay dificultad de congelar el semen después de la colecta. Esto se confirma con lo descrito por Hermansson y Forsberg (2006), que congelaron el semen de caninos (*Canis lupus familiaris*) después de uno o dos días de refrigeración a 4°C, no obteniendo diferencia en la motilidad, integridad de la membrana espermática y acrosomal, cuando compararon con el congelado después de la colecta.

## 10. CONCLUSIONES

La suplementación de carnerillos con vitaminas C y E durante 30 días consecutivos, por la vía oral:

Incrementó las concentraciones plasmáticas de vitamina C y E.

Mejora la calidad y retrasa el deterioro del semen conservado a temperatura ambiente y de refrigeración.

Atenúa el deterioro inicial de la motilidad espermática provocada por la refrigeración bajo condiciones domésticas, pero no afecta la tasa de deterioro de la motilidad seminal durante las 48 horas de conservación.

Disminuye la tasa de deterioro de la motilidad espermática cuando el semen se mantiene a temperatura ambiente, duplicando el tiempo de pérdida de la motilidad progresiva.

Finalmente, la presente investigación permite demostrar que la suplementación con vitaminas C y E, es una herramienta simple y de bajo costo para mejorar la preservación de la calidad seminal, cuando solo se cuenta con recursos domésticos para la conservación seminal durante la inseminación en el campo.

## 11. LITERATURA CITADA

Alimentos Cisterna. 2014. Suplemento alimenticio. Alimentos concentrado cisterna. Chile, Maipo. [En línea]. Recuperado en: <<http://www.alimentoscisternas.cl/>>. Consultado el: 02 marzo 2016.

Alvarez, J. and Aitken, J. 2012. Lipid peroxidation in human spermatozoa: studies on Mans Health and Fertility. New York: Springer. 119-130.

Anand, L. and R. Yadav. 2016, february. Assessment of motion and kinematic characteristics of frozen-thawed Sirohi goat semen using computer-assisted semen analysis. *Veterinary World*, 9:203-206.

Arieta, R.; J. Fernández and J. Menchaca. 2014, enero. Métodos de extracción de semen bovino. *Revista Veterinaria*, 15:109-120.

Azevedo, H.; M. Maia; S. Bicudo; D. Sousa; L. Rodello and C. Sicherle. 2005, march. Cinética e integridade dos espermatozoides no sêmen ovino submetido a diferentes ritmos de refrigeração e congelação em sistemas automatizados. *Ciência Animal Brasileira*, 25:227-248.

Cabrera, P.; A. Ayulo y C. Pantoja. 2011, july. Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Journal of Veterinary Research*, 22: 13.

Carr, A.; B. Zhu; and B. Frei. 2000, september. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha- tocopherol (vitamin E). *Circulation Research*, 87: 349-354.

Chan, A. 1993, september. Partners in defense, vitamin E and vitamin C. *Canadian Journal of Physiology Pharmacology*, 71: 725-731.

Chang, M. 1984, february. The meaning of sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 5: 45-50.

Combs, G. 2008. Vitamin C: fundamental aspects in nutrition and health. Third edition. Ithaca, New York: Division of Nutritional Sciences Cornell University Academic Press. 235-263.

Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants (NRC). 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. United States of America: National Research Council of the National Academes. 350p.

Emmanverdi, M.; M. Zhandi; A. Zare; A. Shahneh; M. Sharafi and A. Akabar-Sharif. 2013, september. Optimization of ram semen cryopreservation using a chemicaly defined soybean lecithin-based extender. *Reproduction in Domestic Animals*, 48: 899-904.

García, W. 2014. Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción *Xisqueta* y *Aranesa*. Tesis doctoral. Barcelona, España: Facultad de Veterinaria de Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. 315p.

Hermansson, U. and C. 2006, december. Linde, Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*, 65: 584-593.

Hernández, J.; R. Suástegui; C. Sánchez y R. Ramírez. 2015, abril. Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos. *Revista de Salud Animal*, 37: 15-20.

Hernández, Y.; L. Delgado; R. López; Martínez G. y Mallok A. 2010, septiembre. Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 18: 153-158.

Hymoller, L. and S. Jensen. 2010, september. Stability in the rumen and effect on plasma status of single oral doses of vitamin D and vitamin E in high-yielding dairy cows. *Journal Dairy Science*, 93: 5748-5757.

Ibrahim, O. and E. Khudhur. 2013, september. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C. *Veterinary Research Forum*, 4:157 – 160.

Jafaroghli, M.; H. Abdi-benemar; M. Zamiri; B. Khalili; A. Farshad and A. Shadparvar. 2014, March. 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.

Jiménez P.; O. García; A. Vidal; A. Maroto; M. Iniesta; M. Ramón; E. del Olmo; R. Fernández; J. Garde and A. Soler. 2015, september. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71: 85-90.

Khan, R. 2011, january. Antioxidants and poultry semen quality. *World's Poultry Science Journal*, 67: 20-25.

Knight, C.; R. Dutcher; N. Guerrant and S. Bechtel. 1941, october. Destruction of ascorbic acid in the rumen of dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 24:567-577.

Kumar, P.; M. Anand; K. Madan; S. Yadav and J. Kumar. 2014, december. Antioxidative capacity of vitamin E, vitamin C and their combination in cryopreserved Bhadavari bull semen. *Veterinary World*, 7: 1127-1131.

Ledesma A.; J. Manes; G. Ríos; J. AllerM; A. Cesari; R. Alberio and F. Hozbor F. 2015, april. Effect of seminal plasma on post-thaw quality and functionality of corriedale ram sperm obtained by electroejaculation and artificial vagina. *Reproduction in Domestic Animals*, 50: 386-392.

MacLeod, D.; L. Ozimeck and J. Kennelly. 2003, december. Supplemental vitamin C may enhance immune function in dairy cows. *Journal Dairy Science*, 45: 230-242.

Mansano, M.; C. Scott; D. Souza; T. Torre; V. Vallejo y F. Ferreira de Souza. 2014, junio. Viabilidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5° y 15°C en diferentes sistemas de refrigeración. *Revista Brasileira de Ciência Veterinarias*, 21: 122-126.

Matsui, T. 2012, May. Vitamin C nutrition in cattle. *Journal of Animal Science*, 25: 597-605.

May, J. 1999, juny. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 13: 995-1006.

Maxwell, W. and S. Salamon. 1993, october. Salamon. Liquid storage of ram semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 5: 613-638.

Medina, V.; B. Perez y P. Cruz. 2008, noviembre. Efecto de la incubación postdescongelación sobre la calidad de espermatozoides crioconservados de cerdo. *Orinoquia*, 12:25-32.

Mehr, M.; B. Chambary and N. Hossein. 2013, september. Effect of different diluents and storage time on field fertility of cooled ram semen after vaginal insemination. *Small Ruminant Reserach*, 115: 82-85.

Membrillo, A.; A. Córdova; J. Hicks; J. Valencia y H. Castillo. 2011, agosto. Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. *Revista Veterinaria*, 22:5-90.

Mostafapor, S. and F. Farhad. 2014, september. Effects of diluting medium and holding time on sperm motility analysis by CASA in ram. *Veterinary Research Forum*, 5: 101-105.

Naijian, H.; H. Kohram; Z. Shahneh; M. Sharafi and M. Bucak. 2013, april. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze-thaw process. *Cryobiology*, 66: 151-155.

Nockels, C. 1988, april. Immunoenhancing vitamins for cattle. *Agri-Practice* 9:10-17.

O'Hara, L.; J. Hanrahan; L. Richardson; A. Donovan; S. Fair; A. Evans and P. Lonergan. 2010, july. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73: 541-549.

Parks, J. 1997. Hypothermian and mammalian gametes. Academic Press, San Diego, E.E.U.U. 229-296p.

Parraguez V.; Atlagich M.; Araneda O.; García C.; Muñoz A.; De los Reyes M. and Urquieta B. 2011, september. 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: 285–296.

Rojas, D. 2012. TMBIM3/GRINA: un gen regulado por la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) que inhibe la apoptosis mediante la modulación de la homeostasis del calcio. [En línea]. Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Bioquímica. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas: Universidad de Chile. <[www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2012/rojas\\_d/sources/rojas\\_d.pdf](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2012/rojas_d/sources/rojas_d.pdf)> Consultado el: 20 de septiembre de 2015.

Salamon S. and A. Marrant. 1963, april. A comparison of two methods of artificial breeding in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture Animal Husbandry*, 3: 72-77.

Silva, S.; A. Soares; A. Batista; F. Almeida; J. Nunes; C. Peixoto and M. Guerra. 2013, february. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 137: 37-44.

Thiangtum, K.; T. Hori and E. Kawakami. 2012, april. Effect of Catalase and Superoxide Dismutase on Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Canine Spermatozoa during Storage at 50C. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 42: 447-453.

Universidad Nacional de Córdoba. 2008. Software estadístico InfoStat-estudiantil. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. [En línea]. Recuperado en: <<http://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=34>>. Consultado el: 27 Octubre 2015.

Waddel, G. and W. Gemmel. 1991. Statistical methods. Eighth edition. Iowa State University Press. 503p.

Walczak, R.; J. Karol and J. Slowikowska. 2012, november. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*, 120: 60-68.

Watson, P. 1995, september. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7: 871 – 891.

Yue D.; Y. Leyan; L. Hailing; X. Xu and J. Xiaoxia. 2010, August. Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Animal Reproduction Science*, 118: 217-222.

Yu, D.; L. Simon and S. Lewis. 2011, october. The impact of sperm processing and cryopreservation on sperm DNA integrity. *Theriogenology*, 397-409.