



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

**EFFECTO DEL ANTIOXIDANTE FUcoxANTINA SOBRE LA
CONGELACIÓN DE SEMEN DE OVINO**

REPOSITORIO

Que presenta:

Carla Concepción Chalé Kantún

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical

Director de tesis:

Dr. Roberto Zamora Bustillos

Conkal, Yucatán, México

Diciembre, 2021



TecNM



Conkal, Yucatán, México a 15 de Diciembre de 2021.

El comité de tesis del candidato a grado: **Carla Concepción Chalé Kantún**, constituido por los CC. Dr. Roberto Zamora Bustillos, Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo, Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde y Dr. Luis Pinzón López, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **EFFECTO DEL ANTIOXIDANTE FUCOXANTINA SOBRE LA CONGELACIÓN DE SEMEN DE OVINO**, que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Producción Pecuaria Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. Roberto Zamora Bustillos

Director de Tesis

Dr. Álvaro Efrén Domínguez Rebolledo

Co-director de Tesis

Dr. Julio Porfirio Ramón Ugalde

Asesor de Tesis

Dr. Luis Leonardo Pinzón López

Asesor de Tesis



Conkal, Yucatán, México a 15 de Diciembre de 2021.

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

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

Carla Concepción Chalé Kantún

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE GENERAL | i |
| ÍNDICE DE CUADROS | iii |
| I CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.2 ANTECEDENTES | 3 |
| 1.2.1 Estructura del espermatozoide ovino | 3 |
| 1.2.1.1 Cabeza | 3 |
| 1.2.1.1.1 Núcleo | 4 |
| 1.2.1.1.2 Acrosoma | 4 |
| 1.2.1.1.3 Membrana plasmática | 4 |
| 1.2.1.2 Cuello | 5 |
| 1.2.1.3 Cola | 5 |
| 1.2.2 Evaluación de calidad seminal | 5 |
| 1.2.2.1 Plasma seminal | 6 |
| 1.2.2.2 Contrastación seminal | 6 |
| 1.2.2.3 Evaluación macroscópica. | 7 |
| 1.2.2.3.1 Color | 7 |
| 1.2.2.3.2 Volumen | 7 |
| 1.2.2.3.3 Olor | 7 |
| 1.2.2.3.4 pH | 8 |
| 1.2.2.4 Evaluación microscópica | 8 |
| 1.2.2.4.1 Motilidad | 8 |
| 1.2.2.4.2 Motilidad con sistema CASA | 9 |
| 1.2.2.5 Evaluación de vitalidad. | 11 |
| 1.2.2.5.1 Integridad de la membrana plasmática y acrosomal | 11 |
| 1.2.2.5.2 Evaluación del ADN espermático | 12 |
| 1.2.2.5.3 Test de endósmosis celular | 14 |
| 1.2.3 Congelación de semen ovino | 14 |
| 1.2.3.1 Diluyentes | 16 |
| 1.2.3.1.1 Fuentes de energía | 17 |

| | | |
|------------|--|----|
| 1.2.3.1.2 | Amortiguadores de pH | 17 |
| 1.2.3.1.3 | Protección contra shock térmico | 18 |
| 1.2.3.1.4 | Antibióticos | 18 |
| 1.2.3.2 | Diluyentes comerciales | 19 |
| 1.2.3.3 | Crioprotectores | 21 |
| 1.2.3.4 | Estrés Oxidativo | 21 |
| 1.2.3.4.1 | Radicales libres | 22 |
| 1.2.3.5 | Antioxidantes | 23 |
| 1.2.4 | Fucoxantina | 24 |
| 1.3 | HIPÓTESIS | 25 |
| 1.4 | OBJETIVOS | 25 |
| 1.4.1 | <i>Objetivo general</i> | 25 |
| 1.4.2 | <i>Objetivos específicos</i> | 25 |
| 1.5 | PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 26 |
| 1.5.1 | Área de estudio | 26 |
| 1.5.2 | Animales estudiados | 26 |
| 1.5.3 | Obtención de eyaculados | 26 |
| 1.5.4 | Evaluación del semen fresco | 26 |
| 1.5.4.1 | Análisis macroscópico | 27 |
| 1.5.4.1.1 | Volumen | 27 |
| 1.5.4.1.2 | Color | 27 |
| 1.5.4.1.3 | Olor | 27 |
| 1.5.4.2 | Análisis microscópico | 27 |
| 1.5.4.2.1 | Evaluación de motilidad con CASA | 27 |
| 1.5.4.2.2 | Evaluación de concentración con BURKER | 27 |
| 1.5.5 | Proceso de congelación | 28 |
| 1.5.5.1 | Preparación del diluyente | 28 |
| 1.5.5.2 | Preparación y adición de antioxidante | 28 |
| 1.5.5.3 | Empajuelado, estabilización y almacenamiento | 28 |
| 1.5.6 | Evaluación Post descongelación | 29 |
| 1.5.6.1 | Pruebas de integridad y funcionalidad de las membranas | 29 |
| 1.5.6.1.1 | Evaluación de viabilidad e integridad de membranas plasmáticas | 29 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1.5.6.1.2 | Evaluación del estrés oxidativo (CellRox) | 29 |
| 1.5.6.1.3 | Test de endósmosis celular (HOST) | 30 |
| 1.5.6.1.4 | Prueba de fragmentación del ADN | 30 |
| 1.6 | LITERATURA CITADA | 31 |

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO I

Cuadro 1.1 Relación de la motilidad masal y progresiva de los espermatozoides ovinos 9

I CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

La producción ovina en México, se realiza bajo sistemas de pastoreo tradicionales, con escasa tecnología y baja productividad. La región sur y sureste, se describen con características tropicales donde destacan razas de pelo como la Pelibuey y Black Belly, aunque actualmente se han incorporado razas especializadas para producción de carne, estas son la Dorper y Kathadin (Hernández et al., 2017).

En el estado de Yucatán, actualmente la ovinocultura en la zona centro-norte, presenta cambios sustanciales como la conformación de asociaciones especializadas en ovinos, un mercado constante, precios atractivos y apoyos gubernamentales, reflejando la inclusión de nuevos productores con inversiones importantes, lo que permite, la incorporación de prácticas y tecnológicas en el manejo del rebaño, con finalidades de producción definidas (Góngora et al., 2010). Estudios en sistemas de producción ovina basados en la raza Pelibuey en Yucatán, indican que de acuerdo al tipo de productor (asociado o no) se refleja el tamaño del rebaño, grado de tecnificación, y por consiguiente su proceso de comercialización (Magaña et al., 2000).

El uso de las biotecnologías como la evaluación de la calidad seminal, es una técnica hasta ahora poco usada por los productores, pero que es una herramienta que ayuda a evaluar a los sementales y que está asociada a su fertilidad (Canto et al., 2012). La evaluación estándar, incluye varios parámetros: volumen, concentración, movilidad, vitalidad y morfología, a ellas se suman mediciones que proveen información de la cantidad del eyaculado y de la calidad de espermatogénesis, sin embargo, estos parámetros tienen limitaciones y no pueden ser utilizados como pronóstico confiable de la capacidad fecundante del espermatozoide in vivo o in vitro (Bedoya et al., 2003).

Por otro lado, la criopreservación es una tecnología muy útil para conservar el material genético de los sementales, sin embargo, los espermatozoides ovinos resultan intolerantes a los cambios de temperatura del proceso de congelación-descongelación, presentado daño mecánico en la membrana plasmática a causa de la alta cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que ésta posee (Salamón y Maxwell, 2000). Durante los procesos de

criopreservación, se produce un aumento excesivo de especies reactivas de oxígeno (ROS), que ocasionan estrés oxidativo a las macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, afectando la actividad endógena de los antioxidantes enzimáticos, reduciendo la motilidad, comprometiendo la integridad de la membrana plasmática, por el daño ocasionado en el ADN, y la transcripción de RNA, lo que se traduce en la pérdida de la viabilidad e incapacidad fecundante. (Sariözkan et al., 2009; Bisht et al., 2017).

Con el fin de reducir los daños ocasionados por las especies reactivas de oxígeno, se han realizado estudios donde se demuestra que la adición de antioxidantes exógenos de origen vegetal a los diluyentes de congelación, logra extender el periodo de almacenamiento, aumentando la motilidad, reduciendo la degradación celular, mejorando la integridad acrosomal e incrementando la viabilidad y la habilidad fecundante (Maia et al., 2010). Los cuales son una buena alternativa para contrarrestar los daños ocasionados por los ROS, gracias a la capacidad antioxidante que estos extractos poseen. (Valdez, 2018; Guedea, 2019).

La suplementación de extractos de algas marinas pardas a los diluyentes para criopreservación, ejerce una efectiva capacidad antioxidante al neutralizar las especies reactivas de oxígeno y mejorar notablemente los parámetros de calidad seminal en espermatozoides de humanos (Fardmanesh et al., 2015; Sobhani et al., 2016) y bovinos (Mizera et al., 2018).

En las regiones costeras de la península de Yucatán, podemos encontrar cerca de 111 especies algales, de las cuales 29 son de color café o pardo. Dentro de las 4 lagunas más importantes de nuestro estado, se han reportado 5 especies café (*Phaeophyta*), mientras que en el ambiente arrecifal se han estudiado 45 especies pardas aproximadamente (Ortegón et al., 2010). La coloración común de las feofíceas resulta de una combinación de pigmentos carotenoides, entre los cuales predomina la fucoxantina (León y Nuñez, 2017).

La fucoxantina, presenta propiedades benéficas, para la salud, al ser utilizado como preventivo antiobesidad, antidiabetes, antiinflamatorias, anticancerígenas y hepatoprotectora, de igual manera se le atribuyen efectos protectores cardio y cerebros vasculares (Ikeda et al., 2003; Woo et al., 2010). Este carotenoide, posee una estructura inestable por su inusual enlace alénico, que le brinda su capacidad antioxidante, comprobando

que ejerce una eficaz labor con la eliminación de radicales libre (Nomura et al., 1997; Kawee-ia et al., 2013). A pesar de ser un prometedor antioxidante, no se tiene registro de su uso ni de las reacciones que pudiera ejercer al ser adicionado a los diluyentes para la conservación, por lo que es conveniente realizar estudios que comprueben su efectividad en la reducción de radicales libres en los parámetros de calidad seminal de diferentes especies, en especial en la conservación de espermatozoides ovinos.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Estructura del espermatozoide ovino

El espermatozoide es una célula haploide, altamente especializada que presenta características funcionales específicas, que cumplen con el objetivo de transferir el genoma masculino al gameto femenino (Caille, 2012). Este gameto se forma en los tubos seminíferos de los testículos. Son células alargadas consistentes de cabeza aplanada portadora de un núcleo y una cola que es el apartado que utilizan para desplazarse por en el aparato reproductor femenino y realizar la fecundación (Angelino, 2009).

Para poder realizar esta tarea, el espermatozoide se encuentra muy bien equipado con una batería de estructuras especializadas, una membrana plasmática que muestra áreas delimitadas, organelos con disposición específica tales como la vaina mitocondrial, un acrosoma y una cola especializada también conocida como flagelo. Todo este conjunto garantiza la interacción particular con el ovocito y sus envolturas. (Tapia, 2014).

Los espermatozoides constituyen el 25% del volumen del eyaculado, el resto son secreciones de los tubos y las glándulas seminíferas. Fisicoquímicamente, están integrados por un 86% de agua, sustancias inorgánicas (como el sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo entre otros), sustancias orgánicas (como proteínas, hidratos de carbono, fructuosa, ácido láctico, cítrico, vitaminas), entre otras sustancias en cantidades menores (Tapia, 2014). El tamaño de un espermatozoide ovino es de 70 a 80 μ (Aisen, 2004).

1.2.1.1 Cabeza

La cabeza de los espermatozoides es aplanada, es portadora del núcleo que contiene el material cromosómico o ADN, quien es el responsable directo de la transmisión hereditaria, también tiene una cromatina compacta (Tapia, 2014). Si lo vemos de adentro hacia afuera, la

cabeza está compuesta por tres principales que son, el ya antes mencionado núcleo, el acrosoma y la membrana plasmática.

1.2.1.1.1 Núcleo

El núcleo posee una cromatina altamente condensada, resultando denso y homogéneo. La envoltura nuclear, membrana que recubre al núcleo, posee numerosos poros (Eddy, 1988).

1.2.1.1.2 Acrosoma

Es una especie de vesícula delgada limitado por un saco membranoso de capa doble, en forma de capuchón que se encuentra estrechamente adherido al núcleo y lo rodea en las 2/3 durante las últimas etapas del espermatozoide. (Cooper y Yeung, 2006). La matriz acrosomal se encuentra limitada por la membrana acrosomal interna, en estrecho contacto con la envoltura nuclear, y la membrana acrosomal externa, ubicada por debajo de la membrana plasmática del espermatozoide. Esta matriz acrosomal es considerada como un gránulo secretor de zimógenos, con origen en el Golgi, debido a su contenido de enzimas proteolíticas, acrosina y hialuronidasa entre otras (Gimeno, 2014). Esta estructura en forma de casquete, contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, esterases, ácidohidrolasa y neuraminidas, que ayudarán en la rotura de la zona pelúcida que se encuentra alrededor del ovocito, durante la penetración. (Barragán, 2017).

1.2.1.1.3 Membrana plasmática

Rodea al acrosoma y al núcleo para separarlos del resto del cuerpo del espermatozoide. En su interior se encuentra una pequeña cantidad de citoplasma con altos niveles de ácidos grasos. Tiene la clásica estructura trilaminar con una composición variable. Mediante diferentes estudios de distribución de cargas, de unión específica a lectinas, de patrones de criofractura y marcación con anticuerpos, se ha determinado que se presentan regiones o dominios que le confieren y participan de diferentes funciones, y esto es variable según la etapa en la que se encuentre el espermatozoide (Cooper y Yeung, 2006). Los principales dominios son: a) región anterior de la cabeza, recubre la región acrosomal y se asocia con el proceso de capacitación y reacción acrosomal (RA); b) región post-acrosomal, se asocia a eventos de reconocimiento y fusión con el oolema; c) región del flagelo, participa en el desarrollo del movimiento (Cooper y Yeung, 2006).

1.2.1.2 Cuello

Une la cabeza del espermatozoide con la cola (flagelo), la cual se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal (Muñoz, 2002). La placa basal del cuello es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola (Hafez y Garner, 1996). En su interior existen miles de mitocondrias que se encargan de obtener la energía necesaria para producir el movimiento flagelar que permite el avance del espermatozoide.

1.2.1.3 Cola

Formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, constituye el axonema. Este se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de los filamentos centrales. El axonema y las fibras densas que lo rodean están cubiertos periféricamente por numerosas mitocondrias dispuestas en un patrón helicoidal (vaina mitocondrial) (Muñoz, 2002).

1.2.2 Evaluación de calidad seminal

Un solo macho se aparea con muchas hembras, de su calidad seminal depende que las hembras resulten preñadas y por consiguiente sea óptima la reproducción del rebaño. En la valoración de la calidad seminal no solo se analiza la concentración espermática, motilidad, volumen seminal, aspecto, color y pH, sino que también sirve para evaluar a los espermatozoides y establecer el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, mediante las técnicas de tinción también llamadas morfometría espermática (Forcada y Abecia, 2000).

En el estudio básico del semen se valoran fundamentalmente los parámetros físicos, citomorfológicos y bioquímicos, a partir de los que puede estar indicado el estudio hormonal, inmunológico, bacteriológico o citogenético. Cada test analiza diferentes parámetros que puedan afectar a la capacidad potencial de fertilización del macho (Álvarez Lleó, 2003). Generalmente se evalúan cinco parámetros para medir la calidad del semen: concentración, motilidad, integridad de la membrana e integridad acrosómica. De estas, la concentración, la motilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides son tal vez las más usadas rutinariamente.

Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas a la fecundación, capacidad de penetración y transferencia optima del material genético. Sin embargo, este análisis integral es muy difícil de desarrollar, debido a la enorme complejidad inherente de la función espermática. Los estudios de calidad seminal, persiguen como objetivo identificar algún parámetro cinético, morfológico o bioquímico que indique el estado de la célula espermática en un momento dado y que, al mismo tiempo, pueda ser relacionado con la fertilidad y calidad del eyaculado (Hidalgo, 2007).

1.2.2.1 Plasma seminal

Si bien la colecta seminal primer paso dentro de un programa de inseminación artificial (I.A). Esta labor resulta de gran importancia, no sólo para la obtención de eyaculados de óptima calidad, sino también para la utilización adecuada de los sementales empleados en diversos programas, consiguiéndose así una vida sexual prolongada para los mismos.

La eyaculación está formada por dos partes el plasma seminal y los espermatozoides. El plasma seminal es una mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas en agua, que es secretado principalmente por las glándulas vesiculares y una contribución menor de las glándulas bulbo uretrales. El plasma posee cuatro funciones principales: el proceso de emisión que se origina del movimiento del líquido espermático (espermatozoides) de la cola del epidídimo hasta la uretra pélvica en donde se mezcla con las secreciones de las glándulas accesorias, constituyendo así el semen (Gómez-Vargas, 2019). También posee características buffer para ayudar en la supervivencia de los espermatozoides, después de ser depositados dentro del tracto reproductivo de la hembra. En los ovinos, la eyaculación es espontánea y dura solo una fracción de segundos, se caracteriza por un violento empujón de la pelvis del macho, conocido como “golpe de riñón” (Aké et al., 2017).

1.2.2.2 Contrastación seminal

El desarrollo de pruebas de laboratorio que anticipen de forma precisa el poder fecundante del semen obliga a evaluar diversos factores o funciones de las células

espermáticas. La única prueba definitivamente válida de la calidad real de una muestra seminal, la constituye la fecundación de las hembras inseminadas.

En respuesta a ello, existen técnicas de laboratorio de contrastación seminal que utilizadas correctamente arrojan datos con distintos grados de correlación sobre la capacidad fecundante del espermatozoide de un determinado semental. De aquí que el resultado del análisis seminal clasifique a la muestra como apta o no, para su posterior uso dependiendo si servirá en la inseminación artificial ya sea en fresco, refrigerado o criopreservado (Fitzgerald y Morgan, 2007). El semen está compuesto de espermatozoides y plasma seminal, sustancias que son producidas por el epidídimo, conducto deferente y las glándulas accesorias en diferentes proporciones, siendo muy poca la contribución del epidídimo y el conducto deferente, en cuanto a la constitución y calidad seminal de los borregos (Mejía, 2017).

1.2.2.3 Evaluación macroscópica.

1.2.2.3.1 Color

El semen de carnero es normalmente blanco cremoso. Deben descartarse los eyaculados que presentan coloración blanco-rosácea, indica la presencia de sangre probablemente a causa de una lesión del pene al momento de la recolección. Cuando es gris, indica algún tipo de infección o contaminación en el aparato reproductor. La presencia de orina es un suceso frecuente cuando el semen se obtiene por electroeyaculación y le confiere un olor característico (Aisen, 2004).

1.2.2.3.2 Volumen

El volumen promedio es de 1 mL dependiendo la raza, edad, estado general de macho y habilidad del recolector. En general, para los trabajos de rutina se descartan aquellos eyaculados con un volumen menor de 0.4 ml. Puede medirse directamente en el tubo colector si está graduado o bien con una pipeta calibrada. Si existiese espuma, esta se desestimará en la determinación del volumen. Si las muestras se recolectan 3 o más veces al día, o durante periodos extensos, dicho volumen disminuye (Aisen, 2004).

1.2.2.3.3 Olor

El semen normal del carnero es inodoro (Barth et al., 2003).

1.2.2.3.4 pH

El pH inicial del semen es ácido siendo de 6.85 y se hace alcalino en los individuos poco fecundos o estériles. Parece ser un indicador adecuado para estimar la proporción de plasma seminal y espermatozoides en el eyaculado y se altera su valor normal promedio de 6.9 aumentando conforme se eleva la cantidad de plasma seminal. El método de recolección y algunos aspectos patológicos del epidídimo y vesículas seminales pueden aumentar el pH, alcanzando en el semen valores, hasta de 7.3 La medición con potenciómetro o papel indicador con rango de 6 a 9 no muestra diferencias significativas, se ha mencionado una alta correlación de tipo negativo con la fertilidad. Las eyaculaciones normales de un espermatozoide altamente concentradas son más ácidas y el pH puede alcanzar hasta 5.9 (Hafez, 2000; Trejo, 2001).

1.2.2.4 Evaluación microscópica

1.2.2.4.1 Motilidad

Es la capacidad de movimiento de la célula espermática. La motilidad espermática a pesar de ser indispensable para la fecundación, no pronostica de una forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide. Se han realizado numerosos esfuerzos para poner a punto métodos que determinen de una forma más precisa y objetiva el porcentaje de espermatozoides motiles en una muestra de semen.

Se puede evaluar subjetiva y objetivamente mediante sistemas computarizados de análisis, pero la más utilizada y a su vez la más simple, es la valoración visual de la motilidad en masa (MM) que refleja el movimiento de las células espermáticas en conjunto (Gallego et al., 2018).

Esta valoración requiere de una elevada concentración espermática para que las ondas y remolinos se hagan visibles, siendo empleada a nivel práctico en el análisis de semen de pequeños rumiantes (Aisen, 2004). La motilidad progresiva (MP) se obtiene mediante observación en microscopio óptico con 100 o 400 aumentos de una gota seminal colocada entre un porta y cubreobjetos. La valoración se realiza de forma subjetiva calculando el porcentaje de espermatozoides motiles, clasificando a los espermatozoides con movimiento progresivo y la calidad del movimiento (González et al., 2006). En el siguiente cuadro 1.1 se

muestra la clasificación de la motilidad masal en el semen ovino y la relación con la motilidad individual.

Cuadro 1.1 Relación de la motilidad masal y progresiva de los espermatozoides ovinos

| MM | Descripción | MP |
|----|---|----------|
| 5 | Movimiento masal con formación y desaparición de remolinos con ondas de movimiento muy rápidos y súbitos o intensos | 85 – 95% |
| 4 | Movimiento masivos en forma de oleaje con buen vigor y definidos, pero sin la formación de remolinos | 75 – 85% |
| 3 | Movimientos masivos en forma de oleaje con buen vigor y definidos, pero sin la formación de remolinos. | 60 – 75% |
| 2 | Movimiento más débil tipo oleaje, se observa movimiento de espermatozoides con vigor, pero el movimiento en masa es débil | 40 – 60% |
| 1 | El movimiento espermático es muy débil, apenas se aprecia un ligero movimiento u oscilante y una gran cantidad de espermatozoides están muertos | 15 – 40% |
| 0 | En el campo se aprecian pocos espermatozoides con vida o no se aprecia ninguno con movimiento | 0 – 15% |

Fuente: Tomado de Aké et al., (2017).

1.2.2.4.2 Motilidad con sistema CASA

El uso cada vez más frecuente de sistemas de análisis computarizados, han hecho más prácticas las evaluaciones de la motilidad de los espermatozoides en las diferentes especies, sustituyendo en gran parte la evaluación subjetiva, que era la mayormente utilizada en las evaluaciones clásicas.

El sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), fue diseñado originalmente para la evaluación del espermatozoide de los mamíferos, lo que ayuda a proporcionar resultados claros y repetibles sí se tiene un especial cuidado al momento de interpretar los

datos, pues estos pueden verse afectados por el propio sistema, al realizar ajustes al instrumento y por las condiciones en las que se registró la motilidad (Boryshpolets et al., 2013).

Si bien, el principio básico de este sistema es la interpretación de imágenes, existen diferentes sistemas CASA en el mercado, y se encuentran integrados por varios equipos que lo ayudan en su funcionamiento tales como; un microscopio óptico de contraste de fases, una cámara de vídeo y una pantalla, en donde se realizan capturas seriadas de fotografías de los distintos campos seleccionados en un tiempo no mayor a un segundo, el software se encarga de separar a los espermatozoides de las demás partículas existentes y luego analiza la trayectoria del movimiento de los espermatozoides de forma individual (Muiño, 2008).

Para realizar las lecturas, estos programas cuentan con unos parámetros que se encargan de leer el movimiento espermático, algunos de los más utilizados se pueden clasificar en dos partes, la primera es la que registra lecturas de la velocidad espermática y la segunda describe los parámetros de angularidad y oscilación de las cabezas. Donde la velocidad de los espermatozoides, es representada por la motilidad total o progresiva, está en función de la velocidad curvilínea (VCL) o la velocidad media (VAP), lo que clasifica a las células en estáticas, móviles progresivos, no progresivos y en los que poseen movimiento en rápidos, medios y lentos. Esta información es objetiva, precisa y repetible en cada muestra. A continuación, se enlistan los parámetros tomados de (Muiño, 2008), donde enumera los movimientos de los espermatozoides.

Parámetros de velocidad:

- Velocidad curvilínea (VCL): Distancia del recorrido del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real por unidad de tiempo.
- Velocidad rectilínea (VSL): Distancia recorrida del espermatozoide entre el primer y último punto de su trayectoria por unidad de tiempo.
- Velocidad media (VAP): Distancia recorrida del espermatozoide a lo largo de la trayectoria media.
- Índice de linealidad (LIN): Es el porcentaje entre la velocidad rectilínea y la curva. $LIN: (VSL/VCL) \times 100$.

- Índice de rectitud (STR): Es la relación del porcentaje entre la velocidad rectilínea y la velocidad media. $STR: (VSL/VAP) \times 100$.
- Índice de oscilación (WOB): Es el porcentaje entre la velocidad media y la velocidad curvilínea. $WOB: (VAP/VCL) \times 100$.

Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:

- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH): Es el movimiento de efectúa la cabeza del espermatozoide en la trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
- Frecuencia de batido (BCF): Es la frecuencia con la que la trayectoria curvilínea atraviesa la trayectoria lineal o media en función del tiempo.

Para los rumiantes, la evaluación de la motilidad masal, puede evaluarse de forma subjetiva, por su alta concentración de espermática, esta acción puede llegar a sobrestimar el porcentaje de espermatozoides motiles, y no resulta como método confiable.

1.2.2.5 Evaluación de vitalidad.

1.2.2.5.1 Integridad de la membrana plasmática y acrosomal

La membrana plasmática es una estructura de las más afectadas por el proceso de congelación-descongelación, por ello, es indispensable evaluar su estado. Las técnicas de tinción son las más ampliamente utilizadas en la valoración de la membrana plasmática, tanto las convencionales, como las fluorescentes. Las tinciones convencionales se basan en el principio de que los espermatozoides con la membrana plasmática intacta (vivos) presentan mecanismos de permeabilidad selectiva que impiden la entrada del colorante, mientras que en aquellos donde existe ruptura o daño de la membrana, presentan permeabilidad y el colorante logra penetrar a la célula, por consecuencia teñirla. Algunos de los colorantes son: azul tripán, verde/eosina, eosina/azul de anilina o el amarillo de naftol/eritrosina, siendo el más utilizado la combinación de la eosina/nigrosina (Gómez, 2019).

Con la aparición de fluorocromos capaces de determinar con mayor objetividad el estado de integridad de la membrana, las tinciones clásicas se han desechado como técnica de elección para valorar este parámetro; así se han desarrollado una gran variedad de protocolos basados en la utilización de tinciones fluorescentes. Estas sustancias se clasifican

en dos grupos principales en función de su mecanismo de acción. De manera que, las tinciones de membrana impermeable solo son capaces de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración. Por otra parte, las tinciones de membrana permeable son capaces de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permiten identificar la población de células viables (García, 2014).

La normalidad acrosómica se valora de diversas formas. Por ejemplo, Watson y Martin (1972) emplearon la microscopía de campo claro para el examen de muestras previamente teñidas con una solución de Giemsa al 6%. Años más tarde (Tasseron et al., 1977) realizaron esta determinación por medio del microscopio electrónico de transmisión. Mientras que Carbonero y Vázquez (1984) y (Pontbriand et al., 1989) utilizan una solución de glutaraldehído para fijar las muestras y evaluar, por medio de la microscopía de contraste de fase, el estado del borde apical del acrosomal. Por su parte (Garde et al., 1992) emplean el método descrito por Talbol y Chacón (1981) para espermatozoides humanos.

1.2.2.5.2 Evaluación del ADN espermático

La transferencia del ADN de manera íntegra e intacta del espermatozoide al ovocito, es esencial para la concepción y el desarrollo embrionario, por ello en los últimos años se ha venido estudiando como causa probable esterilidad, pues su rotura, es causante de alteraciones en la fertilización. De aquí el interés en desarrollar técnicas que estudien el daño del ADN espermático, para introducir las en la evaluación rutinaria de la calidad seminal (Morales et al., 2007).

Recordemos que la espermatogénesis es el proceso de proliferación y maduración de los gametos masculinos de espermatogonias diploides a espermatozoides haploides (Kretser et al., 1998), pero durante cualquier etapa de este proceso se puede producir daño espermático (Erenpreiss et al., 2006), esta acción es un fenómeno multifactorial, del cual se conocen algunos factores que la ocasionan, hasta llegar a provocando daño irreversible, como son: generación de radicales libres de oxígeno o estrés oxidativo (Zini et al., 2001; Aitken y Krausz., 2001).

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), se involucran en las acciones fisiológicas de los espermatozoides, como la capacitación espermática, reacción

acrosomal, e hiperactivación de la motilidad (Aitken y Fisher, 1994; De Lamirande et al., 1997). Diversos estudios prueban que niveles altos de ROS causan daño a los espermatozoides al disminuir su motilidad y viabilidad e inducir una capacitación espermática prematura, también aumentan la peroxidación de ácidos grasos insaturados de la membrana y por lo tanto afectar la integridad del ADN (Peris et al., 2007; Ruiz et al., 2007; Santiani., 2003; Aitken et al., 1998).

Algunos daños que puede haber en el ADN, son por motivos externos como las condiciones ambientales, tales como la contaminación, alimentación o temperatura testicular elevada, o bien por diversas patologías como criptorquidia, varicocele, procesos inflamatorios o infecciones del tracto genital, episodios febriles e incluso por estrés (Morales et al., 2007). Otro motivo es el empaquetamiento anormal de la cromatina, por errores en la sustitución de histonas por protaminas (Manicardi et al., 1995; Sakkas et al., 1999), deficiencias en la recombinación (Agarwal y Allamaneni., 2004), apoptosis tras la salida de los espermatozoides a los túbulos.

Existen diversos métodos para el estudio de la fragmentación del ADN espermático, y estos se pueden dividir en dos., las que miden la susceptibilidad del ADN para ser desnaturalizados por diversos tratamientos y aquellos que marcan las roturas en la cadena de ADN, al incorporar moléculas marcadas con fluorocromos en los extremos de roturas. Uno de ellos es el Test de Naranja de Acridina (NA). Este test sirve para evaluar la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización, al ser un flourocromo metacromático que se utiliza en tinción natural o desnaturalizada. Se puede usar en conjunto con la tinción del bromuro de etidio o yoduro de propidio con el fin de analizar la viabilidad celular y descartar las células apoptóticas viables y necróticas según la coloración que tienen y su forma visible. Es utilizado para la evaluación de calidad espermática antes y después de la criopreservación tanto en bovinos, equinos, aves y cerdos. El test somete a las células a un agente desnaturalizante para después realizar una tinción con NA. El espectro de emisión (verde o naranja) del fluorocromo depende del estado de la hebra del ADN, donde, sí el colorante logra integrarse en la doble hélice intacta del ADN, se observa una fluorescencia color verde, pero cuando se encuentra desnaturalizado el ADN, la unión del fluorocromo con la hebra simple, genera una fluorescencia naranja (Álvarez et al., 2015).

1.2.2.5.3 Test de endósmosis celular

La prueba de permeabilidad de membrana (endósmosis ó Hipo-osmotic swelling test, HOST) está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática. La inclusión de células espermáticas en una solución hipo osmótica provoca el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico (Eckert et al., 1989), observándose cambios morfológicos a nivel de la cola. Si la membrana se encuentra dañada, o se ha vuelto altamente permeable, no se observan dichos cambios.

Los espermatozoides de mamíferos bajo condiciones hipoosmóticas se “hinchan” debido al influjo de agua extracelular que origina la expansión de las membranas (Drevius y Eriksson, 1966), por lo tanto, sometiendo a los espermatozoides a estos medios se puede evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática, ya que aquellos espermatozoides que aparecen con el flagelo hinchado y plegado helicoidalmente sobre la porción intermedia son los que mantienen su membrana plasmática funcional y permite el paso de agua al interior, para establecer el equilibrio osmótico entre los espacios intra y extracelular (Jeyendran et al., 1984). El hinchamiento se evidencia más fácilmente en el flagelo espermático por ser en esta porción la membrana plasmática más flexible y estar más separada de las estructuras inferiores que en la cabeza (Vázquez et al., 2011).

El test de endósmosis se ha aplicado para el control de la calidad seminal en varias especies animales, entre ellas la ovina, porcina y bovina (Vázquez, 1980; Watson y Duncan, 1988; Anel, 1990). Las presiones osmóticas de los medios empleados para realizar esta prueba en la especie ovina oscilan entre las más bajas de 75 y 150 mOsm/ Kg (Vázquez, 1980), hasta las más altas de 375 a 400 mOsm/ Kg (Soylu et al., 2007). La observación de las variaciones de volumen en la célula espermática se realiza a través de microscopia de contraste de fases, previa fijación de la muestra. La presión osmótica del medio utilizado y el tiempo requerido son característicos de cada especie (Gafo, 1992; Cortés et al., 1993; Donoghue et al., 1996).

1.2.3 Congelación de semen ovino

La primera referencia sobre la criopreservación del semen se debe a Spallanzani en (1776), él observó que los espermatozoides de hombre, caballo y rana llegaban a una

inactividad total tras ser enfriados en nieve durante un tiempo superior a 30 minutos, recuperando posteriormente su actividad al ser calentados. Por lo tanto, se conoce desde hace mucho tiempo que el hecho de reducir la temperatura implica una disminución de la actividad metabólica de los gametos, prolongándose con ello la vida media de los mismos. Durante los últimos 50 años, se ha ido desarrollando y perfeccionando técnicas de preservación con el fin de conseguir animales con un mejor material genético. (Grötter et al., 2019).

La criopreservación tiene como objetivo mantener la funcionalidad y vitalidad de las células a bajas temperaturas, en este caso el de las células espermáticas con ello, disminuir sus funciones vitales y mantenerlas en condiciones de vida suspendida, por periodos largos de tiempo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que éste proceso puede ocasionar problemas serios, al inducir a variaciones extremas las propiedades térmicas, químicas y eléctricas, lo que altera las membranas celulares, organelos y la interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar (Woods et al., 2004; Essawe et al., 2018).

La disminución de la temperatura produce daño drástico en algunos espermatozoides conocido también como shock térmico, y provoca alteraciones en la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial, inclusive puede llegar a provocar una reacción acrosómica prematura, acortando la vida del espermatozoide, y reducir su fertilidad (Watson, 1995). La criopreservación ocasiona daño celular debido al estrés osmótico y tóxico por las concentraciones molares de los agentes crioprotectores, así como daño mecánico debido a la formación y disolución de cristales de hielo. Es así que algunos componentes, como son los fosfolípidos y los ácidos grasos de la membrana espermática, son importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides al proceso de criopreservación. (Salamon y Maxwell, 2000).

En la actualidad, se reportan bajos porcentajes de gestación asociados al uso de semen de ovino congelado, esto se le atribuye al daño del acrosoma en las células espermáticas congeladas, lo que ocasiona múltiples cambios en la estructura y función de los espermatozoides similar al que ocurre en el tracto reproductor de la hembra durante la capacitación espermática, lo que se ve reflejado en una baja capacidad de fertilización (Agredo, 2015). Esta respuesta de los espermatozoides de ovino a los procesos de congelación-descongelación puede variar entre individuos dentro de la misma especie y estación del año, lo que parece ser debido a diferencias en la composición de las membranas,

lo cual determina requerimientos específicos entre especies en la composición de los diluyentes (Salamon y Maxwell, 2000).

La conservación del material seminal de ovino en nitrógeno líquido bajo temperaturas de -196°C , reduce la capacidad de fertilización. Los parámetros de calidad seminal se afectan por la osmolaridad del diluyente, la naturaleza y concentración del agente crioprotector así como los ritmos de congelación y descongelación (Owen et al., 1994). Las características de las células espermáticas en cada especie son diferentes, por lo que debe establecerse un protocolo de criopreservación en función a las características biológicas de las mismas. Un protocolo implica la exposición y el equilibrio del material biológico a agentes crioprotectores, el enfriamiento y almacenamiento a temperaturas bajo cero, el descongelamiento y evaluaciones con ensayos funcionales, tanto *in vitro* como *in vivo*, que permitan determinar la viabilidad y capacidad fecundante de las células espermáticas después de haber sido sometidas al proceso de criopreservación (Agredo, 2015).

1.2.3.1 Diluyentes

Los diluyentes son compuestos químicos, o conjunto de sustancias que preservan la viabilidad y fertilidad del semen., dentro de los cuales encontramos: soluciones fisiológicas, glucosa, sulfatos, lecitinas y peptonas que también pueden proteger la membrana lipídica del espermatozoide (Cavestany, 1994). El empleo de diluyoconservadores permite prolongar la viabilidad de la célula espermática, rentabilizar los eyaculados obtenidos y conservar las dosis por un período amplio de tiempo. Diversas soluciones preparadas a base de leche desnatada, se han empleado como diluyentes para la congelación del semen, mostrando resultados de viabilidad muy satisfactorios en la descongelación (Colas, 1975). Recientemente, se han utilizado diluyentes sintéticos, los cuales contienen junto a pequeñas proporciones de leche o yema de huevo, azúcares y electrolitos, actúan como fuentes energéticas una vez que el espermatozoide recupera su vitalidad. (Salamon y Visser, 1972; Graham et al, 1987) Estos diluyentes aportan un grado de protección, durante los procesos de congelación-descongelación.

Phillips (1939), fue el primero en informar que la inclusión de yema de huevo en el diluyente, prolonga la viabilidad del semen de toro conservado a $+10^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, Jones y Martin (1973), comprobaron el mismo efecto de la yema de huevo sobre la

conservación del semen de ovinos, a partir de ello, este compuesto se ha convertido en un constituyente común de los diluyentes seminales de la mayoría de las especies mamíferas (Graham et al., 1987).

Los diluyentes seminales deben cumplir unos requisitos para proteger a la célula, entre ellos está, pH cercano a la neutralidad, capacidad tampón, osmolaridad y fuerza iónica. Además, han de contener una fuente de energía para el espermatozoide, pues no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y sobre todo deben proporcionar a la célula espermática protección frente a los efectos de la bajada de temperatura, refrigeración, congelación y descongelación (Mann, 1964; Graham, 1987; Watson, 1995).

1.2.3.1.1 Fuentes de energía

La energía necesaria para los espermatozoides, es adquirida a través del suministro de monosacáridos en las rutas metabólicas de la glucólisis y el ciclo de Krebs (Rigau et al., 2002). Los azúcares aportan la energía necesaria para que el espermatozoide desarrolle sus procesos metabólicos (Evans y Maxwell, 1989).

Diversos estudios que indican que los espermatozoides únicamente pueden glicosilar la glucosa, fructosa y manosa (Mann, 1964); mientras que por vía oxidativa emplean también la arabinosa (White et al., 1954). Además, los azúcares actúan como sustancias crioprotectoras contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico (Meryman, 1971). La adición de azúcares a los diluyentes para la congelación de semen tiene un efecto beneficioso sobre la vitalidad e integridad acrosómica de la célula espermática (Martin-Rillo et al., 1980). En este sentido, son los azúcares de elevado peso molecular (di y trisacáridos) son los que mayor protección aportan al situarse recubriendo la membrana plasmática y disminuyendo los efectos lesivos de la concentración de solutos (Unal et al., 1978).

1.2.3.1.2 Amortiguadores de pH

La adición de buffers a los diluyentes, es con el fin de neutralizar los desechos resultantes del metabolismo de las células, en especial el ácido láctico (Sorensen, 1982).

En un principio, el más utilizado fue el fosfato de sodio, pero con el paso del tiempo, fue sustituido por el citrato de sodio, (Sathe y Shipley., 2015) demostraron que mejora la supervivencia de los espermatozoides. Sustancias no iónicas, se encuentran en el medio para

mantener la osmolalidad y pH, algunas son además del citrato de sodio (dihidrato), TRIS, TES, TEST, (TRIS + TES), glutamato monosódico, entre otros buffers combinados con soluciones salinas o azúcares, así como preparados a base de leche ayudan a mejorar la motilidad espermática y aumentan la integridad funcional de la membrana plasmática (Yañiz et al., 2011).

1.2.3.1.3 Protección contra shock térmico

Durante el proceso de congelación-descongelación, se han empleado diversos diluyentes a base de yema de huevo y leche, esto con el fin de brindar a los espermatozoides de protección contra el choque térmico durante el enfriamiento (Foulkes et al., 1980). Al ser sometidos a bajas temperaturas como los 5°C, se afecta directamente a la membrana plasmática, ocasionando la pérdida de enzimas intracelulares lipoproteínas, potasio, ATP así como otros materiales de la célula, estas pérdidas se ven reflejadas en motilidad baja y presencia de colas dobladas.

Sí los espermatozoides se enfrían de manera progresiva lentamente, el daño es menor, puesto que la célula logra adaptarse a las modificaciones que ocurren simultáneamente tanto al interior como en su exterior. El medio efectivo para proteger a los espermatozoides contra el choque térmico es la lecitina, proteínas, lipoproteínas y compuestos similares que se encuentran en la leche y la yema de huevo. Se ha tenido evidencia sobre diluyentes que poseen concentraciones de aproximadamente el 20% de yema de huevo y se encuentra conformado con una lipoproteína de baja intensidad (LDL) (Amirat et al., 2004).

Algunos diluyentes a base de huevo, expresaron efectos negativos como contaminación bacteriana xenobiótica, variabilidad en su composición (Aires et al., 2003), así como presencia de vacuolas entre otras partículas visibles al momento de la evaluación (Singh et al., 2013). Es por ello que con el paso del tiempo se ha intentado sustituir el uso de la yema de huevo con otras sustancias naturales que ayuden a prevenir los daños en la membrana plasmática durante la congelación (Layek et al., 2016).

1.2.3.1.4 Antibióticos

La contaminación por bacterias influye de manera negativa en la calidad espermática, pues las bacterias compiten con los espermatozoides por los nutrientes que existen en los

diluyentes, los cuales proporcionan el medio ambiente adecuado para su proliferación. Estos microorganismos pueden ser transferidos a las hembras a través de la inseminación artificial y provocar enfermedades en el tracto reproductivo. La adición de antibióticos a los medios de crio protección, es con el fin de controlar la contaminación e inhibir la producción de bacterias, que pueden surgir durante la recolección y procesamiento del semen (Gloria et al., 2014).

La inclusión de antibióticos tales como penicilina y estreptomina juntas en equivalencias de 1000 UI y 1000 μ g respectivamente, es una práctica cada vez más común para la conservación del semen, sin embargo, en el año (2010), Yániz et al., estudiaron que existe una resistencia bacteriana a dicha combinación empleada en la criopreservación. Por ello en los últimos años se ha tratado de aplicar combinaciones nuevas de antibióticos que sean eficientes durante la criopreservación como lo es ceftiofur/tilosina y ofloxacina (Gloria et al., 2014).

1.2.3.2 Diluyentes comerciales

Hoy en día muchas de las compañías a nivel mundial que prestan el servicio de inseminación artificial, elaboran sus propios diluyentes ajustados a sus requerimientos. A medida que se avanza en el estudio y formulación de los mismo, estos pueden ser adquiridos en el mercado., así que nos podemos encontrar con diluyentes que presentan doble propósito, sirviendo tanto para utilizar de forma líquida como para congelar semen.

Para el proceso de criopreservación del material seminal, los diluyentes cuentan con componentes básicos como: agua, que actúa como solvente de los componentes seminales y del diluyente, sustancias iónicas y no iónicas, para mantener la osmolaridad y tamponar el pH del medio (por lo general el citrato de sodio, Tris amino metano o glutamato monosódico)., así como sustancias orgánicas con capacidad de impedir el shock frío (como la yema de huevo o la leche); también agentes crioprotectores, como glicerina o DMSO (dimetil-sulfóxido); igual azúcares simples como fuente de energía (di y tri-sacaridos) como crioprotectores adicionados., también aditivos como enzimas que puedan mejorar la fertilidad y antibióticos para controlar el crecimiento microbiano (Curbelo y Rodríguez, 2013).

Algunos de los que podemos encontrar comúnmente en el mercado son:

- **Optidyl:** Elaborado por Cryo Vet S.A.S. Es un concentrado para diluyente con fórmula tris, yema de huevo ionizada, glicerol, antibiótico (penicilina, estreptomina, espectinomicina, lincomicina). (Garcia, L, 2016).
- **Triladyl y Biladyl:** distribuidos por la marca Minitub Tiefembach, Germany. Formula basada en TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, agua purísima y antibióticos de acuerdo a la Directiva 88/407 de la UE (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina) solo en el caso del Biladyl. (Minutube, 2018).
- **AndroMed:** También distribuido por la marca Minitub Tiefembach, Germany. Contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de la UE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina). (Minutube, 2018).
- **OviPlus:** Distribuido por la marca Minitub Tiefembach, Germany. Diluyente para semen fresco, 24 ml, adecuado para semen de pequeños rumiantes. Necesita yema de huevo. (Minutube, 2018).
- **Biociphos plus:** Distribuido por IMV, L'Aigle, France, Medio de dilución de un solo paso, contiene extracto de soya en sustitución de la yema de huevo.
- **Laciphos:** Suministrada por IMV, L'Aigle, France, Este medio es de leche descremada en polvo, por lo que necesita la adición de agua. Tanto este como el anterior se le adicionan ATB.
- **Tris concentrado:** Gibco, Holland Genetics. Es un medio común a base de Tris pero 5 veces más concentrado. Es el diluyente más común para la congelación de semen. El diluyente Tris también ha sido usado como diluyente líquido.
- **Caprogen concentrado:** Creado para almacenamiento a temperatura ambiente (18 a 24°C). Suministrado por Livestock Improvement, New Zealand. Permite el almacenamiento de semen líquido hasta por 4 días sin afectar su fertilidad (Vishwanath y Shannon, 2000).
- **Optixcell:** De IMV Technologies, es un diluyente basado en liposomas sintetizados, libre de proteína animal, lo que permite una preparación y conservación eficaz, conservando una alta calidad en las dosis ya sea en fresco o congelado. Optixcell es un medio sin partículas, que hace más eficaz la evaluación en sistemas CASA, mejora la vida de los eyaculados y es tolerante a los cambios de temperatura. Es un diluyente muy fácil de preparar, ya que solo se le debe de agregar agua destilada.

1.2.3.3 Crioprotectores

Al material seminal se le adiciona un crioprotector para proteger a los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación (Squires et al., 1999). Estas sustancias son de gran importancia para evitar la formación de partículas de hielo intracelular, así se reduce el estrés osmótico mediante la sustitución de agua necesaria para mantener el volumen celular, también sirve de tampón para ajustar los cambios de pH (Medeiros et al., 2002). El pH óptimo para el espermatozoide se encuentra cercano a la neutralidad, por lo tanto, la mayoría de los diluyentes están tamponados a pH entre 6.9 y 7.1 (Oliverira, 2003).

Existen dos clases de crioprotectores, intra y extracelulares. Los intracelulares conocidos como permeables, reducen el grado crioscópico intracelular, es decir, que la mayor cantidad de agua ha de permanecer en estado líquido cuando se somete a bajas temperaturas, reduciendo la concentración intracelular de solutos y proporcionando de esta manera una mínima afectación a las células espermáticas durante la congelación (Watson, 1995). Dentro de esta clase de crioprotectores los más utilizados son: el glicerol, sulfóxido de dimetilo, estilenglicol, propilenglicol y sus combinaciones. Los usados con mayor frecuencia son el glicerol, el cual se adiciona de forma fraccionada o no a una temperatura de 37°C o 5°C (Leboeuf et al., 2000).

Los crioprotectores extracelulares son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación., su importancia radica en la acción crioprotectora que ejercen, promoviendo la rápida deshidratación celular. Dentro de esta clase de crioprotectores los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes de hidrogeno con el agua, reduciendo la actividad del agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar. Algunas sustancias, tales como lípidos, proteínas y macromoléculas, son eficientes en la protección de la célula espermática durante el proceso de congelación, sin la necesidad de penetrar en su interior. Estas sustancias se pueden encontrar en la yema de huevo, leche, algunos azúcares y albúmina sérica bovina (Watson, 1995).

1.2.3.4 Estrés Oxidativo

Es el proceso donde se produce un desequilibrio en la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante del organismo (Sharma y Agarwal., 1996). Sí bien el oxígeno, es

esencial para la producción de energía, en las células espermáticas es dañino por la producción de ROS, cuando los espermatozoides son expuestos a condiciones *in vitro*, durante las técnicas de reproducción asistida (Córdova et al., 2017).

El estrés oxidativo, ocasiona daños en la funcionalidad del espermatozoide, al aumentar la peroxidación lipídica por el exceso de ROS (Tuncer et al., 2010). El plasma defiende a los espermatozoides del estrés oxidativo de manera natural, pero las altas diluciones utilizadas en las tecnologías de reproducción, ocasionan la pérdida de las defensas y esto es más evidente cuando los eyaculados son almacenados en nitrógeno líquido, lo que desencadena la peroxidación de lípidos de la membrana (Córdova et al., 2017)

Los principales objetivos del estrés oxidativo en las células son las macromoléculas como los lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, por lo tanto, las características que se ven afectadas, son la motilidad, actividad endógena de antioxidantes enzimáticos, integridad de la membrana plasmática y en consecuencia existe infertilidad (Sariözkan et al., 2009). El aumento del estrés oxidativo (EO) produce daños en el ADN espermático, transcripción de RNA y telómeros, ocasionando infertilidad, mortalidad embrionaria y/o la pérdida de la gestación (Bisht et al., 2017).

1.2.3.4.1 Radicales libres

El término radical libre es por ser un intermediario químico, pues en su estructura presenta uno o más electrones desapareados, por ello son considerados altamente reactivos y también participan en reacciones químicas de la mayoría de los componentes de las células (Aprioku., 2013; Sharma y Agarwal., 1996; Henkel., 2011). Los principales radicales libres se clasifican en: especies reactivas de nitrógeno (NOS) y especies reactivas del oxígeno (ROS), siendo estas últimas las de mayor abundancia e importancia (Chihuailaf et al., 2002; Agarwal et al., 2005).

Entre los ROS comunes, se encuentran el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH), peroxilo (RO_2), alcoxilo (RO) e hidroperoxilo (HO_2) (Michel et al., 2008). La producción fisiológica de ROS sucede durante el metabolismo del oxígeno, en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, al incrementar la demanda de ATP (Lavranos et al., 2012). En los espermatozoides, la producción de ROS es a través del proceso oxidasa, en la membrana plasmática mediante el sistema NADPH (nicotinamida adenina dinucleotido

fosfato), oxido-reductasa a nivel mitocondrial NAD (nicotinamida adenina dinucleotido-dependiente en donde se incrementa la producción de ROS y L-aminoácido oxidasas citosólicas (Aitken., 2017; Agarwal et al., 2014).

Los ROS en el semen es por dos fuentes; de espermatozoides inmaduros y leucocitos (macrófagos y neutrófilos), de origen endógeno. Es así que, en las técnicas de reproducción, se generan ROS de tipo exógeno, resultando en estrés oxidativo (Agarwal y Majzoub., 2017).

1.2.3.5 Antioxidantes

Un antioxidante es capaz de prevenir, retardar y frenar, como bien lo menciona, la oxidación de un sustrato o molécula diana, la acción del antioxidante es minimizar la formación de los radicales libre a través de diferentes mecanismos como la recolección de especies que inician la peroxidación, la quelación de iones metálicos inofensivos, al no generar ROS, la desaparición de O₂ previniendo la formación de peróxido, interrupción de la reacción en cadena autooxidativa y la disminución de concentraciones de O₂ focalizadas (Halliwell y Gutteride., 2015; Asimi et al., 2013).

Los espermatozoides contienen un sistema antioxidante formado por enzimas, que les sirven como mecanismo de defensa ante la peroxidación lipídica. Dichas enzimas son: glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GSH-PX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Bucak et al., 2010).

En los últimos años, se ha estudiado con mayor frecuencia la suplementación de antioxidantes a los diluyentes antes de la congelación, pues se ha demostrado que son fundamentales para prevenir los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en los procesos de criopreservación, de la especie ovina (Torres et al., 2019).

Los espermatozoides ovinos, poseen una mayor sensibilidad en la membrana lipídica en comparación con otras especies, por eso la adición de los antioxidantes al semen ovino, extiende el periodo de almacenamiento, aumentando la motilidad, también reduce la degradación celular, mejora la integridad de la membrana acrosomal e incrementa la viabilidad y habilidad de fertilización *in vitro* (Maia et al., 2010).

1.2.4 Fucoxantina

La fucoxantina, es un carotenoide presente en algas pardas, posee una estructura molecular única, con enlace alénico, un 5,6-monoepóxido, 9 enlaces dobles conjugados y algunos grupos funcionales oxigénicos como los grupos hidroxilo, epoxi, carbonilo y carboxilo (Aman et al., 2005; Henry et al., 1998). El inusual enlace alénico no se encontró en otros carotenoides de algas marinas marrones. Su estructura es muy similar a la de la neoxantina, dinoxantina y peridinina. Su estructura única y quiralidad son inestables. Dicha inestabilidad y el enlace alénico, ha contribuido a presentar una alta actividad como antioxidante. Aunque, también tiene propiedades antiobesidad, antidiabetes, antiinflamatorias, anticancerígenas y hepatoprotectora, de igual manera se le atribuyen efectos protectores cardio y cerebros vasculares (Woo et al., 2010; Ikeda et al., 2003).

Diversos estudios que proporcionan la información necesaria sobre sus propiedades, al ser una sustancia que puede afectarse por el calentamiento, la exposición al aire y la luz (Achir et al., 2010; Zhao et al., 2019). Por lo que es recomendable evitar su exposición a estos elementos en la medida de lo posible durante el proceso de extracción, purificación, almacenamiento, así como en su utilización.

Zhao et al., (2013) a través de un análisis espectrofotométrico de la fucoxantina en aceite de canola, demostrando que, el calentamiento ocasiona la degradación del carotenoide, al experimentar con temperaturas que oscilaron 25 y 100°C, esto en ausencia de luz y aire. Pero que se promueve la degradación oxidativa de la fucoxantina al estar a 25°C en exposición aérea, y luminosa.

Cinco años más tarde Zhao et al (2019), miden los efectos sobre la estabilidad de la fucoxantina analizando la cinética y termodinámica en su degradación, al exponerla a temperaturas entre 25 o 60°C, luz de hasta 2000 lx y un pH oscilante de 1.2 a 7.4. Registrando que, con aire a 25°C, pH de 1.2 y en ausencia de luz, ocurre una degradación significativa, pero cuando se aumenta el pH a 7.4 se retrasa la degeneración. La propiedad con mayor influencia en la estabilidad es el pH, después la temperatura y la intensidad de exposición a la luz.

El uso de la fucoxantina como antioxidante, es gracias a su estructura única, al incluir un enlace alénico, grupo epóxico y un hidroxilo (Sangeetha et al., 2009). Algunos

experimentos realizados con este carotenoide, demuestran que posee una efectiva capacidad de eliminación de radicales libre (Nomura et al., 1997; Kawee-ia et al., 2013).

Ha et al (2013) determinaron el efecto antioxidante de la fucoxantina en vivo, al evaluar a ratas alimentadas por 4 semanas, con una dieta normal en grasas (NF), dieta alta en grasas (HF) y una dieta alta en grasas con fucoxantina al 0.2% (HF + Fxn), evaluando marcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante como la peroxidación de lípidos, la capacidad antioxidante total en plasma (TAC) y las actividades de las enzimas (catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutación peroxidasa (GAH-Px)), la suplementación de fucoxantina mejora la capacidad antioxidante, obteniendo resultados favorables en el grupo que HF+Fxn, en comparación con el resto, al verse una reducción del riesgo de estrés oxidativo.

1.3 HIPÓTESIS

La adición del antioxidante fucoxantina en el diluyente de congelación, mejora la calidad de los espermatozoides descongelados de ovino.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del antioxidante fucoxantina en el diluyente sobre la congelación del semen ovino.

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar los parámetros de motilidad espermática con el sistema computarizado CASA.
- Analizar la viabilidad, estado acrosomal, actividad mitocondrial, fragmentación del ADN e integridad de la membrana plasmática de la cola de los espermatozoides a la descongelación.
- Evaluar la calidad del semen descongelado e incubado durante 6 horas.

1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1.5.1 Área de estudio

El trabajo se realizará en la unidad de producción ovina y el laboratorio de biotecnologías del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro de Investigación Regional Sureste (CIRSE) campo experimental Mocochoá, ubicado en el kilómetro 25 de la antigua carretera Mérida-Motul, en el municipio del mismo nombre. Mocochoá Se localiza entre los paralelos 21° 05" y 21° 10" de latitud norte y los meridianos 89° 27" y 89° 30" de longitud oeste. Colinda al norte con Ixil, al sur con Conkal y Yaxkukul, al este con Baca, al oeste con Chicxulub Pueblo y Conkal.

1.5.2 Animales estudiados

Se seleccionarán a 2 machos reproductores ovinos de la raza Blackbelly, que tendrán edades entre 1 a 2 años y medio de edad, alimentados con forrajes nativos, previamente desparasitados y vacunados.

1.5.3 Obtención de eyaculados

Con la técnica de vagina artificial, se realizará la colecta de 2 veces por semana. Colectando solo la fracción rica en espermatozoides. El recolector, constará de un tubo rígido de goma con medida de aproximadamente 20 cm, en su interior un látex con extremos enrollados, sujetos con bandas de goma, un cono de colección (embudo de látex) y un tubo de propileno graduado de 12 ml. Por dentro se le añadirá agua caliente a una temperatura de 60 a 70 °C y se ejercerá una presión de aire. Una vez obtenido el eyaculado, se protegerá evitando que los rayos de luz le den directamente, mientras se traslada al laboratorio, colocándolo en un termo con agua caliente temperatura de 37°.

1.5.4 Evaluación del semen fresco

A cada eyaculado se realizará la evaluación de concentración espermática, movilidad, vitalidad, morfología e integridad de la membrana plasmática. A la llegada de la muestra, se depositarán en el baño María previamente preparado a 37°C, donde también estarán colocados los tubos eppendorf de 1.5 ml donde se realizará la dilución de los diferentes tratamientos con el antioxidante, así como el diluyente para su posterior congelación.

Se comenzará la evaluación, realizando una evaluación macroscópica (Volumen, color, olor) y posterior en el microscopio, con el fin de hacer más precisas las lecturas, usando el sistema CASA, se evaluará concentración y el tipo de movilidad.

1.5.4.1 Análisis macroscópico

1.5.4.1.1 Volumen

Puede ser observado a través de los tubos colectores graduados, esperando eyaculados con volúmenes entre 1 a 1.5 ml por animal

1.5.4.1.2 Color

En cuanto al color, es posible que aparezcan colores, como el blanco, blanco lechoso, opalescente, y amarillento en algunos casos.

1.5.4.1.3 Olor

El olor debe ser característico a los del semen de la especie.

1.5.4.2 Análisis microscópico

1.5.4.2.1 Evaluación de motilidad con CASA

El movimiento masivo debe ser característico por la formación de olas espermáticas (remolinos). De aquí se estimará el porcentaje de espermatozoides vivos, clasificándolos en escala del 1 al 5, donde 1 es cuando no presente ondas y 5 cuando el movimiento sea rápido y forme remolinos. Para poder realizar esta parte de la evaluación, se tomará una gota de 5 μ l del semen puro y se colocará el módulo de motilidad del Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), para ser observados con el microscopio de contraste de fases y otorgar a los movimientos una calificación. Se observa con aumento 10X, observando un mínimo de 200 espermatozoides, como mínimo de observación serán tres campos con distribución homogénea por cada muestra.

1.5.4.2.2 Evaluación de concentración con BURKER

Para evaluar la concentración, se colocará 5 μ l de semen puro en 995 μ l de solución de agua destilada, se homogeniza invirtiendo el tubo varias veces. Una vez homogeneizado,

se tomará aproximadamente 9 μ l con micropipetas y se cargará la Cámara de BURKER por capilaridad, dejando sedimentar la muestra por 5 minutos para luego proceder al conteo.

1.5.5 Proceso de congelación

El proceso de enfriamiento consistirá en el descenso gradual de temperatura del semen diluido de una temperatura de 37 °C a 5 °C. Esto colocando las diferentes pajillas del semen diluido (4 por tratamiento), junto con un recipiente que contendrá agua a 37 °C, dentro de un refrigerador temperatura de 5 °C, con el fin de equilibrar la muestra durante 4 h. Para ello se realizará un pool con los eyaculados obtenidos del día, al cual, se le realizará evaluaciones de concentración con cámara de Burker, para obtener los cálculos de la concentración total de los espermatozoides y de esta manera, proceder a agregar la cantidad correcta al diluyente. En el baño maría, se depositarán en 5 tubos eppendorf para realizar la mezcla con el antioxidante, y luego, iniciar con la estabilización y posterior congelación.

1.5.5.1 Preparación del diluyente

Se preparará una solución stock total de 9 ml de Optixcell, en un tubo de propileno graduado, dilución (1:2) con agua destilada, colocando 3 ml de diluyente, para posterior agregar 6 ml de agua destilada, dejando incubar en el baño maría a una temperatura de 37°C hasta su uso.

1.5.5.2 Preparación y adición de antioxidante

Se preparará una solución stock de fucoxantina con etanol al 1%, concentración de 54 mM. Se tendrán 5 tubos eppendorf (1.5 ml) a los cuales se les agregará 1300 μ l de semen diluido. Posterior se les agregarán una solución final de 0, 25, 50, 100 y 200 mM de fucoxantina.

Una vez realizada la última dilución, se dejará estabilizar por un lapso de 10 minutos y se hará una lectura más de la motilidad, para ver si el etanol afecta la calidad del semen, luego se procederá al empajuelado de forma manual.

1.5.5.3 Empajuelado, estabilización y almacenamiento

Para el empajillado, se hará uso del kit de llenado manual del semen. Se colocarán con anterioridad 20 pajuelas marcadas de 0.25 ml (4 por tratamiento), sobre la placa térmica

a una temperatura de 37°C. Una vez terminada la última visualización de la motilidad de los espermatozoides después de la dilución y adición del antioxidante, se procederá a llenar los 20 pajillas para después sellarlas y luego ser colocadas en el refrigerador a 5°C junto con un vaso de precipitado, para lograr un curva de congelación, y su estabilización en un tiempo de 4 horas, posterior, se someterán a vapores de nitrógeno en una nevera a una altura de 5 cm durante 10 minutos y a continuación, se colocaran en el tanque para su almacenamiento, hasta su descongelación.

1.5.6 Evaluación Post descongelación

Se procederá a la descongelación de las pajuelas, colocándolas en agua a temperatura de 37°C por 30 segundos aproximadamente. Posterior se colocará todo su contenido en un tubo a temperatura dentro del baño maría para proceder a realizar la evaluación rutinaria (Motilidad, vitalidad, morfología, concentración, etc).

1.5.6.1 Pruebas de integridad y funcionalidad de las membranas

1.5.6.1.1 Evaluación de viabilidad e integridad de membranas plasmáticas

Se hará uso de las técnicas de fluorescencia de triple tinción, con el fin de realizar evaluación de viabilidad, estado del acrosoma y actividad mitocondrial en los espermatozoides. Se realizará una dilución de semen descongelado colocando 15 µl en 85 µl solución salina (PBS) en un tubo eppendorf de 1.5 ml, posterior le añadirá 1 µl de solución stock de PI, FITC-PSA y JC-1, se dejará incubar a 37°C por 30 minutos, pasado el tiempo, se podrán 5 µl de la muestra en un portaobjetos, para ser observado en un microscopio de fluorescencia donde se contarán los espermatozoides que se encuentren por completo, verdes (vivos), rojos (muertos), la mitad de la cabeza verde (acrosomas dañados), sin color (intacto), y en el caso de las mitocondrias, naranja (activa) y verde (inactiva).

1.5.6.1.2 Evaluación del estrés oxidativo (CellRox)

Se preparará una solución stock a 1mM. Cada frasco de CellRox™ Green, contiene 50 µl que serán disueltos en 20 µl de solución DMSO (1mM), para obtener un total de 70 µl de solución stock. Dicha solución, se almacenará en un refrigerador a -20°C.

Para realizar la evaluación, se colocará en un tubo eppendorf, 1 µl de solución stock en 200 µl de muestra seminal diluida en PBS, que contiene 170 µl PBS y 30 µl de semen

descongelado, posterior ser colocará a incubar a una temperatura de 37°C por una 1 hora. Después de este lapso se tomará 5 µl de muestra homogénea que se colocará para su observación en microscopio a objeto 40X.

1.5.6.1.3 Test de endósmosis celular (HOST)

Para poder realizar esta prueba se preparará una solución hipoosmótica de (150 mOsm/Kg) para la determinación del porcentaje de endósmosis. La solución stock se realiza diluyendo 0.735 g de citrato de sodio y 1.351 g fructosa en 100 ml de agua destilada.

Este test consiste en mezclar 5 µl de semen descongelado con 40 µl de solución hipoosmótica, dejándose incubar a 37°C durante 1 hora, luego se colocará una gota de 10 µl en el portaobjetos, para ser observado al microscopio de contraste de fase a objetivo 40x, donde se contarán hasta 200 espermatozoides por placa, lo que determinará el porcentaje de espermatozoides que muestren hinchamiento de la cola, en respuesta al estrés hipoosmótico.

1.5.6.1.4 Prueba de fragmentación del ADN

Se utilizará una tinción de naranja acridina (AO) para la evaluación de ADN. Para ello se preparará una solución stock de 500 ml. Para ello, se colocarán 0.5 g de AO en 500 ml de agua destilada, se mezclará y se almacenará a una temperatura de 8°C a 5°C, en un empaque, el cual se cubrirá para cubrirlo de la luz. También se realizará una solución fijadora de Carnoy's de 200 ml, a una proporción (3:1), esto es 37.5 ml de metanol y 12.5 ml de ácido acético glacial. Se realizará otra solución de tinción de 52.5 ml, esto es, se tomará 10 ml de solución stock, que se agregará a 40 ml de ácido cítrico (0.1 M), junto con 2.5 ml de (0.3 M) de Na₂ HPO₄ 7H₂O).

Para la evaluación, se harán frotis con muestras de semen diluido en PBS relación (1:10), que se dejarán secar, para luego ser sumergido en solución de Carnoy's por dos días. Posterior, se sacarán y secarán por 10 minutos, para luego ser sumergidos por 5 minutos en solución de tinción, se lavará y sumergirá posterior en agua destilada dos veces, luego se le colocará un cubreobjetos para ser evaluado.

1.6 LITERATURA CITADA

- Achir N., Randrianatoandro V. A., Bohuon P., Laffargue A., Avallone S. (2010). Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment,” *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112 (3):349–361.
- Agarwal A., Allamaneni S. S. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Minerva Ginecol*. 56: 235-45.
- Agarwal A., Virk G., Ong C., y Du Plessis. S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *World. J. Mens. Health*. 32: 1–17.
- Agarwal A., y Majzoub A. (2017). Role of Antioxidants in Assisted Reproductive Techniques. *World. J. Mens. Health*. 35: 77-93.
- Agarwal, A., Gupta S., y Sharma R. K. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 3: 28.
- Agredo Palechor, J. A. (2015). Evaluación en fresco y post-descongelación de los parámetros de calidad seminal en la especie ovina (*Ovis aries*) en el municipio de bello (antioquia) (Doctoral disertación).
- Aires, V. A., K. D. Hirsch, F. Mueller-Schloesser, K. Bogner, S. Mueller-Schloesser y E. Hirsch. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolkbased and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60: 269-279.
- Aisen, E.G. (2004). *Reproducción Ovina y Caprina*, 1ed. Intermedica, Buenos Aires, pág. 216
- Aitken R, Fisher H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 16: 259-267.
- Aitken R, Gordon E, Harkiss D, Twigg J, Milne P, Jennings Z, Irvine D. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 59: 1037-1046.
- Aitken RJ, Krausz C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 122: 497-506.

- Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.* 84: 1039-1052.
- Aké López, J. R., Aké Villanueva, N., Aké Villanueva, J., Segura Correa, J. C. (2017). Evaluación reproductiva del macho ovino. Editorial Académica Española.
- Álvarez Lleó, C. (2003). Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del sperm class analyzer [tesis]. Valencia, España: Universidad de Valencia;
- Álvarez, C., Arellano, F. E., Pérez, A. (2015). Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal.
- Aman R., Schieber A., Carle R. (2005) Effects of heating and illumination on trans-cis isomerization and degradation of beta-carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.53(24):9512-9518. doi: 10.1021/jf050926w.
- Amirat, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gérard, J. L. Courtens y M. Anton. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61: 895-907.
- Anel, E. (1990). Inducción experimental de la nucleación en la congelación del semen de morueco: Efectos sobre motilidad, endósmosis celular e integridad acrosómica. Tesina. Universidad de León.
- Angel D, Perez N, Pareja A, Camargo O & Urrego R. (2009). Efecto de la preparación espermática previo a la fertilización in vitro sobre la membrana plasmática y el ADN del semen bovino sexado. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 4, 29-37.
- Angelino J. (2009). Manual de evaluación de semen en bovinos. Veracruz - México.
- Aprioku, J. S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil*. 14: 158-172.
- Arieta R. (2014). Métodos de extracción de semen bovino. México: Revista electrónica de Veterinaria.

- Asimi, O. A., N. P. Sahu., A. K. Pal. (2013). Antioxidant capacity of crude water and ethyl acetate extracts of some Indian spices and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. *J Med Plant Res.* 7: 1907-1915.
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C. & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4), 291-300.
- Barragán Barragán, I. F. (2017). Evaluación del efecto crioprotector de diferentes fuentes de antioxidantes en el semen bovino (Bachelor's thesis), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Barth, A. D. Bull, Thundathill y Mapletoft, R. J (2003). Importancia de la calidad seminal y el uso de FIV para el estudio de efectos espermáticos. *Memorias y simposio Internacional de Reproducción animal- INRA* pág 205-221.
- Bedoya N., Vásquez N., Rivera M., Correa G & Trujillo L. (2003). Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hiposmótico (HOST). *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 56, 1983-1997.
- Bisht, S., M. Faiq, M. Tolahunase y R. Dada. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 14: 470-485.
- Boryshpolets, S., Kowalski, RK, Dietrich, GJ, Dzyuba, B. y Ciereszko, A. (2013). Los diferentes sistemas de análisis de espermatozoides asistido por computadora (CASA) influyen en gran medida en los parámetros de motilidad de los espermatozoides. *Teriogenology* , 80 (7), 758-765.
- Bucak, M. N., S. Sariözkan, P. B. Tuncer, F. Sakin, A. Ateşşahin, R. Kulaksız., M. Çevik. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small. Rumin. Res.* 89: 24-30.
- Caille, A. (1996). Influencia del ión potasio y la osmolalidad en los cambios fisiológicos que experimenta el espermatozoide humano incubado in-vitro. Tesis de Magíster.
- Caille, A. M. (2012). Efecto de la osmolalidad sobre la habilidad fecundante del espermatozoide humano: un modelo de estudio in vitro.

- Carbonero, D. Y Vazquez, I. (1984). Congelación del semen de morueco. Conservación del acrosoma. *Zootecnia*, XXV: 30-42.
- Casslén B. y Nilsson B. (1984): Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am J Obstet Gynecol.* 150(7):877-881,
- Casslén, B. (1987). Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration. *J. Reprod Med.* 32(3):181-184.
- Cavestany, D (1994). Procesamiento y congelación de semen de toro. Montevideo. Santa Catalina pág 23.
- Chihuailaf, R. H., P. A. Contreras y F. G. Wittwer. (2002). Artículos de revision Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet. Méx.* 33: 265-283.
- Colas, G. (1975). The use of progestagen SC-9880 as an aid for artificial insemination in ewes. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique.* 15: 317- 27.
- Cooper T., Yeung C. (2006). Sperm maturation in the human epididymis. En Cap 4: The sperm cell. production, maturation, fertilization, regeneration. Ed. por Christopher J. de Jonge y Christopher L. R. Barratt, Cambridge University Press,
- Córdova, I. A., Espinosa, C. R., Guerra, L. J., Iglesias, R. A., Huerta, C. R., Villa, M. A., Méndez, M. M., Rodríguez, D. B. (2017). Importancia del estrés oxidativo en los espermatozoides. *Bmeditores México.* Pág 207- 214.
- Cortes, S., Nuñez R y Vázquez I. (1993). Capacidad de reacción del espermatozoide de macho cabrío a la prueba de endósmosis. 5° Simposium Internacional Reproducción Animal. Luso (Portuaal). Vol. II: 225-230
- Curbelo, M y Rodríguez, Z (2013). Relevamiento de laboratorios de procesamiento de semen ovino en Uruguay. Tesis doctoral, Universidad de la Republica. Facultad de veterinaria. Recuperado de: http://www.fvet.edu.uy/drupal-6.16/sites/default/files/biblio_curbelo2013.pdf
- De Lamirande E, Leclere P, Gagnon C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* 3: 175-194.

- Donoghue, A.M., Garner D.I., Donoghue D.J. y Johnson L.A. (1996) "Assessment of the membrane integrity of freshand stored tunkey spermatozoa using a combination of hypo-osmotic stress, fluorescent staining and flow cytometry". *Thenogenologv.* 46: 153-163
- Drevious, L. y Eriksson, H. (1966). Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Expl. Cell Res.*, 42: 136-156.
- Eckert R, Randall D. y Auoustitne O. (1989) "Fisiología animal". Ecl McGraw-Hill Interamericana: 65-100
- Eddy E. (1988). The spermatozoon. En: *The physiology of reproduction*. Ed.: E. Knobil y J. Neill y col.. Raven Press, Ltd., N.Y. pág. 29
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. (2006). Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl.* 8: 11-29.
- Essawe, E.M., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., Morrell, J.M. 2018. Addition of seminal plasma to thawed stallion spermatozoa did not repair cryoinjuries. *Animal Reproduction Science* (196) 48-58
- Evans, g., Maxwell, W.M.C. (1989). Manejo y valoración del semen. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Ed. Acribia, pg. 95-107.
- Fiser, P.S., Fairfull, R.W. y Marcus, G.J. (1986). The effect ofthawing velocity on survíval and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates itt straws. *Criobiologv.* 23: 141-149.
- Fitzgerald, J., Morgan, G. (2007). Reproductive physiology of the ram. In R. Youngquist, & W. Threlfall, *Current therapy in large animal theriogenology* (2nd Edition ed., pp. 617-620). Elsevier.
- Forcada F. y J.A. Abecia., (2000), Control de la Actividad Reproductiva del Ovino *Revista Mundo Ganadero*, nº 122, Zaragoza-España, Pp. 1-2.
- Foulkes, J. A., D. Sweasey y R. G. Goodey. (1980). Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *J. Reprod. Fertil.* 60:165-169.

- Gafo, C. (1992) “Respuesta del espermatozoide de conejo a la prueba de endósmosis y su relación con otros parámetros de valoración seminal”. Tesina. Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid: pág. 105.
- Gallego, V., Herranz-Jusado, J. G., Rozenfeld, C., Pérez, L., Asturiano, J. F. (2018). Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. *Fish Physiol Biochem*, 6(44), 1457-1467. doi:10.1007/s10695-018-0505-1
- García, W. C. (2014). Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa. s.l.: Universidad Autónoma de Barcelona.
- García, L. (2016). Comparación de la motilidad posdescongelación de semen de bovino criopreservado en triladyl y optidyl fresco y congelado. Veracruz - México.
- Garde, J., G Artiga, C., Gutiérrez, A. y Vazquez, I. (1992). Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med. Vet.*, 9: 107-114.
- Garner, D., Hafez, E. (2002). Espermatozoides y plasma seminal. En E. Hafez, & B. Hafez, *Reproducción e inseminación en animales* 7a. Edición ed. México. pp. 98- 112.
- Geigy (1981). En: *Geigy Scientific Tables*. Vol. 1. Eighth Ed., Ed: Lentner C. Ciba-Geigy Ltd., Basle, Switzerland; p.:185-196.
- Gimeno Miquel, I. M. (2015). Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos (Doctoral disertación).
- Gloria, A., A. Contri, L. Wegher, G. Vignola, D. Dellamaria y A. Carluccio. (2014). The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen–thawed bull semen. *Anim. Reprod. Sci.* 150: 15-23.
- Gómez Vargas, M. J. C. (2019). Evaluación de espermatozoides criopreservados de ovinos de pelo en condiciones de trópico de guerrero en el LAPROSEM–UAGro” TESIS (Doctoral disertación). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO.
- Gómez, C. (2013). Evaluación de la efectividad de un electroeyaculador experimental comparado a uno de marca comercial en ovinos. Universidad Central de Ecuador. Quito-Ecuador.

- Góngora R.D., Góngora S.F., Magaña M.A., Lara P.E. (2010). Caracterización técnica y socioeconómica de la producción ovina en el estado de Yucatán, México. *Agronomía Mesoamericana* 21: 131-144.
- González Urdiales, R.; Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; Alegre, B.; Ferreras, A.; Peláez, J.; Bernal, S.; Cárdenas, S. (2006) Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, viabilidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. “Manuel de técnicas de reproducción asistida en porcino” Universidad de Girona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp: 19-38.
- Graham, J., Foote, R. (1987). Diluently phosphatidyl choline liposome effects on the acrosome reaction and “in vitro” penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm. A fertility assay for frozen-thawed semen. *Gamete Res.*, 16: 147-158.
- Grötter, L.G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E y Ferré, L. B. (2019). Avances recientes en las técnicas de criopreservación de espermatozoides bovinos con un enfoque en la optimización de la calidad de espermatozoides después de la descongelación. *Reproducción en animales domésticos*, 54 (4), 655-665.
- Ha A. W., Na S. J., Kim W. K. (2013). Antioxidant effects of fucoxanthin rich powder in rats fed with high fat diet. *Nutrition Research Practice*. 7(6):475-480. doi: 10.4162/nrp.2013.7.6.475.
- Hafez, B. (2000). *Espermatogénesis, Reproducción e inseminación en animales*. USA: Mc Graw Hill.
- Halliwell, B. y J. M. C. Gutteridge. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Quinta edición. Oxford University Press. U. K.
- Harper M. (1988). Gamete and zygote transport in: *The physiology of reproduction*. Vol. 1. Ed: Knobil E. and Neill J., p.: 103-134.
- Henkel, R. R. (2011). Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian J. Androl.* 13: 43.
- Henry L. K., Catignani G. L., Schwartz S. J., (1998). Oxidative degradation kinetics of lycopene, lutein, and 9-cis and all-trans β -carotene. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 75 (7):823–829.

- Hernández J. A., Valencia M., Ruíz J. E., Mireles A. I., Cortez C., Gallegos J. (2017). Contribución de la ovinocultura al sector pecuario en México. *Agroproductividad*, 10(3).
- Hidalgo C. (2007). *Análisis del semen bovino*. México.
- Ikeda K., Kitamura A., Machida H., Watanabe M., Negishi H., Hiraoka J., Nakano T. (2003). Efecto de *Undaria pinnatifida* (Wakame) en el desarrollo de enfermedades cerebrovasculares en ratas espontáneamente hipertensas propensas a accidentes cerebrovasculares. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 30 (1-2):44-8. doi: 10.1046 / j.1440-1681.2003.03786.x.
- Jeyendran R., Van Der Ven H., Perez-Pelaez M., Crabo B & Zaneveld L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journal Reproduction Fertility* 70, 219-228.
- Jones, R.C. y Martín, I.C.A. (1973). The effects of dilution, egg-yolk and cooling to 5°C en the ultrastructure of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 35:311-320.
- Kawee-ai A., Kuntiya A., Kim S. M. (2013). Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Natural Product Communications*. 8(10):1381-1386.
- Killian G., Chapman D., Kavanaugh J., Deaver D. y Wiggin H. (1989). Changes in phospholipids, cholesterol and protein content of oviduct fluid of cows during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*. 86(2):419-426.
- Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. (1998). Spermatogenesis. *Hum Reprod*. 13: 1-8.
- Lavranos, G., M. Balla, A. Tzortzopoulou, V. Syriou y R. Angelopoulou. (2012). Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. *Reprod. Toxicol*. 34: 298-307.
- Layek, S. S., T. K. Mohanty, A. Kumaresan y J. E. Parks. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim. Reprod. Sci*. 172: 1-9.
- Leboeuf, B., Restall, B. y Salomon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62: 113-141.

- Leese H., Tay J., Reischl J. Y Downing S. (2001).: Formation of Fallopian tubal fluid: role of a neglected epithelium. *Reproduction*. 121:339-346.
- León A, D., Núñez R, M. L. (2017). Géneros de algas marinas tropicales de México II: Algas pardas. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán 04510. Ciudad de México. 79 pp.
- Magaña, M; Sierra, V. A; Martínez, A. (2000). Caracterización del sistema productivo de ovino Pelibuey en Yucatán. In: XL Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario, Villa Ocuilzapotlan, Tabasco, México. Pag. 207
- Maia M. D. S, Bicudo S. D, Sicherle C. C, Rodello L, Gallego I. C. S. (2010). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim Reprod Sci*. 122(1-2):118-23. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci>.
- Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. (1995). Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*. 52: 864-7.
- Mann T. y Lutwak-Mann C. (1981). Male fertility and sterility. p.:89. Ed.: Mancini-Martini. Academic Press, London.
- Mann, T. (1964). The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen, London.
- Martin Rillo, S., Alias, C., Vubero, C.D. y Marcos, C.P. (1980). Freezing of boar semen. 9th I.C.A.R.. Madrid, 5:431-434.
- Mathews, K M., Van Holde, K.E., Ahern, K. G. (2003). Biochemistry. Third edition. Addison Wesley pp 363-92.
- Medeiros, C.M., Forell, F., Oliveira, A.T. y Rodríguez, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, 57: 327-344.
- Mejía, V.O. (2017) Recolección, evaluación, dilución y congelación de semen en ovinos. Memorias curso "Manejo de semen (fresco y congelado) e inseminación artificial en ovinos". Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Meryman, H.T. (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiology*. 8:173-183.

- Michael, A. J., C. Alexopoulos, E. A. Pontiki, D. J. Hadjipavlou-Litina, Ph. Saratsis, H. N. Ververidis y C. M. Boscos. (2008). Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. *Theriogenology*. 70: 827-835.
- Minutube., (2018). Tecnologías de reproducción animal. Recuperado de: <https://www.minutube.es/productos/pequenos-rumiantes/diluyentes-de-semen>
- Morales, R. Lledó, B. Ortiz, J. A. Rodríguez-Arnedo, D. Fabregat, A. Bernabeu, R. (2007). Fragmentación del ADN espermático y su implicación en la fertilidad. *Revista Iberoamericana de fertilidad*, 24(5), 305-313.
- Morillo, M; Salazar, S; y Castillo, E. (2012). Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay: Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas.
- Muhye. A. (2019). Lifer. Recuperado de: <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:w3KKXioym9oJ:https://www.lifer.com/osmolaridad/+&cd=13&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx>
- Muñoz Otero, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Univ Santiago de Compostela.
- Muñoz O. (2002). Predicción del potencial fértil del semen bovino mediante pruebas in vitro de la capacidad funcional espermática. Maracaibo - Venezuela: Astro Data S.A.
- Nomura T., Kikuchi M., Kubodera A., Kawakami Y. (1997). Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem Mol Biol Int*. 42(2):361-370. doi: 10.1080/15216549700202761.
- Oliveira L., Corona, M., & Das Neves P. (2010). Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria* 32, 146-150
- Oliveira, E.C. (2003). Efecto de diferentes diluyentes sobre a criopreservación de semen canino. Tesis de maestría. Escuela de veterinaria de universidad federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte pág 61.

- Ortegón A, I., Frelle P, Y., Robledo R, D., (2010). Algas. Capítulo 4. Especies, Diversidad Vegetal In: Durán R. y M. Méndez (Eds). Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán. CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA 496 pp.
- Owen, J., Fayez, I. y Marai, M. (1994). Nuevas técnicas de producción ovina. Ed. Acribia, S.A, Zaragoza, España, pp 101-112.
- Peris S, Bilodeau J, Dufour M, Bailey J. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 74: 878-892.
- Phillips, P.H. (1939). Preservation on bull semen. *J. Biol. Chem.* 130:415.
- Pontbrtrand, D., Howard, J.C., Schiewe, ML., Stuart, L.D. y Wildt, D.E. (1989). Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing en survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Criobiology*. 26:34 1-354.
- Pursel, Y. y Johnson, L. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Thenogenology*, 1 (2): 63-68.
- Ruiz L, Santiani A, Sandoval R, Huanca W, Coronado L, Alzamora C. (2007). Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev Inv Vet, Perú* 18: 99-106.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. (1999). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 4: 31-7.
- Salamon, S. and Visser, D. (1972). Effect of composition of tris-based diluent asid of thawing solution on survival of ram spermeatozoa frozen by the pellet method. *Australian J. Biol. Sci.*, 25:605.
- Salamon, S. y Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduccion Science* 62: 77-111.
- SAMIUC (2018). Sociedad andaluza de medicina intensiva y unidades coronarias. Recuperado de: <http://www.samiuc.es/osmolalidad-plasmatica/>

- Sangeetha R. K., Bhaskar N., Baskaran V. (2009). Comparative effects of beta-carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 331(1-2):59-67. doi: 10.1007/s11010-009-0145-y.
- Santiani A. (2003). Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis de Magíster. Temuco, Chile: Univ La Frontera. 95 p.
- Sarıözkan, S., M. N. Bucak, P. B. Tuncer, P. A. Ulutaş y A. Bilgen. (2009). The influence of cysteine and taurine on microscopic–oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology*. 58: 134 -138.
- Sathe, S. y C. F. Shipley. (2015). Cryopreservation of Semen. En *Bovine Reproduction*. R. M. Hopper. Eds John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Sharma, R. K. y A. Agarwal. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 4295: 835-850.
- Singer, S.J; Nicholson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-31.
- Sorensen, A. M. (1982). Reproducción animal, principios y prácticas. 1ª ed. Editorial McGraw-Hill. México. pp. 125-152.
- Soylu, MK, Nur, Zekariya, Ustuner, Burcu, Dogan, Ibrahim, Sagirkaya, Hakan, Gunay, U., y Ak, K. (2007). Efectos de diversos agentes crioprotectores y osmolalidad del extensor sobre el semen de ram poscongelado. *Boletín-Instituto Veterinario en Pulawy* , 51 (2), 241.
- Squires, E.L., Pickett, B.W., Graham, J.K., Vanderwall, D.K., McCue, P.M. y Bruemmer, J. (1999). Cooled and frozen stallion Semen. 9º *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin*, pág 80.
- Talbot, P. y Chacon, R.S. (1981). A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *3. Exo. Zoel.* 215: 201-208.
- Tapia Jácome, L. E. (2014). Valoración seminal en ovinos de raza corriedale y mestizos en la parroquia Cochapamba del cantón Saquisilí (Bachelor's thesis, Latacunga: Universidad Técnica de Cotopaxi; Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; Carrera de Medicina Veterinaria).

- Tasseron, F., Amir, D. and Schindler, H. (1977). Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing. *J. Reorod. Fertil.*, 55:461-462.
- Torres-Ruda F, Manjarrez C. I, Carvajal-Serna M, Grajales-Lombana H. A. (2019). Efecto de la adición de antioxidantes en los diluyentes para la preservación de semen ovino. *Rev Med Vet.* (38):101-109. <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss38.9>
- Trejo, G.A., (2001), El manejo del semental ovino, Memorias del IV Congreso Nacional de Producción Ovina. Universidad Autónoma de Chiapas, México. Pag: 178-180. ISBN:978-607-00-4015-3
- Trejo, G.A., (2001), El manejo del semental ovino, Memorias del IV Congreso Nacional de Producción Ovina. Universidad Autónoma de Chiapas, México. Pag: 178-180. ISBN:978-607-00-4015-3
- Tuncer, P. B., M. N. Bucak, S. Büyükleblebici, S. Sariözkan, D. Yeni, A. Eken, P.P. Akalın, H. Kinet, F. Avdatek, A. F. Fidan y M. Gündoğan. (2010). The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology.* 61: 303-307.
- Unal, M.B; Berndtson, W.E. y Pickeit, B.W. (1978). Influence of sugars with glycerol on post-thaw motility of bovine spermatozoa in straws. *J. Davri Sci.*, 61:83-89.
- Vásquez J., Florentini E., Camargo L & Valdivia C. (2011). Test hipoosmótico en espermatozoides epididimarios en ovinos (*Ovis aries*). *Spernova* 1, 119-120.
- Vázquez I. (1980) Nueves métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de la Universidad Conipltense de León. España.
- Vázquez, L, Martínez, F., Alcaide, M. y Diaz Vubero, C. (1986). Congelación del semen de morueco. XI Jornadas Científicas de la S.E.O.C. Palencia. pag. 169-176.
- Vishwanath, R. y Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animals Reproduction Science* 62: 23-53.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of their post-thawing function. *Reproduction, Fertilidad and Development.* 7: 871-891.

- Watson, P.F. y Duncan, A.E. (1988) "Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa". *Criobiology*. 28: 131-142.
- Watson, P.F. y Martin, I.C.A. (1972). A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 28:99-101.
- White, I.G., Blackshaw, A. W. y Emmens, C.W. (1954). Metabolic and motility studies relating to low temperature storage of ram and bull spermatozoa. *Aust. Vet. J.* 30: 85-94.
- Woo M. N., Jeon S. M., Kim H. J., Lee M. K., Shin S. K., Shin Y. C., Park Y. B., Choi M. S. (2010). Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice. *Chemico-Biological Interactions*. 186(3):316-22. doi: 10.1016/j.cbi.2010.05.006.
- Yániz, J. L., J. A. Mateos y P. Santolaria. (2011). Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15 °C. *Small Rumin. Res.* 95: 54-60.
- Yániz, J. L., M. A. Marco-Aguado, J. A. Mateos y P. Santolaria. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 122: 142-149.
- Zhao D., Kim S. M., Pan C. H., Chung D. (2014). Effects of heating, aerial exposure and illumination on stability of fucoxanthin in canola oil. *Food Chemistry*. 145:505-513. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.045.
- Zhao D., Yu D., Kim M., Gu M. Y., Kim S. M., Pan C. H., Kim G. H., Chung D. (2019). Effects of temperature, light, and pH on the stability of fucoxanthin in an oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*. 291:87-93. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.04.002.
- Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenzes MT. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 75: 674-7

1 Efecto del antioxidante Fucoxantina sobre la criopreservación del semen ovino

2 Antioxidant effect of Fucoxanthin on the criopreservation of ram semen

3 Carla Concepción Chalé-Kantún¹, Álvaro Domínguez-Rebolledo*, Julio Porfirio Ramón-
4 Ugalde, Luis Leonardo Pinzón-López, Castellanos-Zacarías Carlos, Roberto Zamora-
5 Bustillos

6 Correo del tesista y primer autor¹: carla.chale@itconkal.edu.mx

7 Director de tesis: Roberto.zamora@itconkal.edu.mx

8 *Autor para correspondencia: Domínguez Rebolledo Álvaro.
9 dominguez.alvaro@inifap.gob.mx

10 RESUMEN

11 El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del antioxidante Fucoxantina en el diluyente
12 de congelación sobre la criopreservación del semen de ovino de la raza Blackbelly. Los
13 eyaculados obtenidos se mezclaron, dividieron y congelaron en 5 tratamientos: 0
14 (control), 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de Fucoxantina. Las muestras se congelaron a una
15 concentración final de 100×10^6 spz./mL en pajuelas de 0.25 mL y se almacenaron en
16 LN₂. Se analizó a la 0 hora (descongelación) y 6 horas de incubación a 37 °C, la motilidad
17 total (MT) y progresiva (MP), viabilidad, integridad del acrosoma y estrés oxidativo (EOx).
18 Los datos se analizaron con ANOVA y las diferencias estadísticas con la prueba de rango
19 múltiple de Duncan. A las 0 y 6 horas, la MP fue mayor ($P < 0.05$) a 50 μM y 200 μM ,
20 respectivamente, que el control; sin embargo, éstas fueron similares entre las demás
21 concentraciones. En los demás parámetros no se observaron diferencias. De 0 a 6 horas,
22 la MT se mantuvo a concentraciones de 25 y 50 μM , la MP a 0, 25, 100 y 200 μM , la
23 viabilidad a 0 y 50 μM , la integridad del acrosoma a 0 y 25 μM y en el EOx todas las
24 concentraciones se mantuvieron a través del tiempo. En conclusión, la Fucoxantina a
25 concentraciones de 50 y 200 μM mejora ligeramente la MP a las 0 y 6 horas,
26 respectivamente. Asimismo, concentraciones de 25 y 50 μM permiten mantener la MT
27 durante 6 horas de incubación.

28 **Palabras clave:** Antioxidante, diluyente, semen, criopreservación, ovino.

29 TRABAJO ENVIADO A: CONGRESO INTERNACIONA ABANICO VETERINARIO