

## **Incremento de la tasa de no retorno de celo en ovejas utilizando un antioxidante análogo de superóxido dismutasa (Tempo) durante la criopreservación de semen**

Improvement of no return rate in ewes using a superoxide dismutase mimic antioxidant (Tempo) during freezing of ram semen

Santiani, A.<sup>1\*</sup>; Ruiz, F.<sup>2</sup>; Sandoval, R.<sup>2</sup>; Evangelista, S.<sup>2</sup>; Urviola, M.<sup>3</sup>; Catacora, N.<sup>3</sup>; Coronado, L.<sup>1</sup>; Delgado, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. <sup>2</sup>PROGENIE S.A.C., Lima, Perú. <sup>3</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano. [asantiania@unmsm.edu.pe](mailto:asantiania@unmsm.edu.pe)

### **Resumen**

La inseminación intracervical en ovejas se realiza generalmente con semen fresco, debido a que las tasas de fertilidad obtenidas utilizando semen congelado son muy bajas, excepto cuando se realiza inseminación intrauterina mediante laparoscopia. El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar el efecto de la adición de un antioxidante análogo de superóxido dismutasa durante la criopreservación de semen ovino sobre la tasa de fertilidad en ovejas obtenida mediante inseminación intracervical. Cada muestra de semen (n=6) fue dividida en 2 grupos: sin antioxidante (Control) y con antioxidante (Tempo), utilizando un medio en base a Tris y ácido cítrico. Luego de finalizar el periodo de enfriamiento, el semen diluido fue envasado en pajillas de 0.25 ml con una dosis aproximada de 100 millones de espermatozoides y almacenado en nitrógeno líquido. Para la inseminación se utilizaron 75 ovejas Corriedale y Merino pertenecientes al CIP Chuquibambilla-UNA, de las cuales 40 fueron inseminadas con semen Control y 35 con semen Tempo. La tasa de no retorno de celo en el grupo control fue 42.50%, mientras que el grupo Tempo fue 60.60%. Estos resultados indican que la utilización del antioxidante Tempo durante la criopreservación de semen ovino constituye una alternativa para realizar inseminación intracervical en ovejas con semen congelado.

Palabras clave: tasa de no retorno, ovejas, criopreservación, Tempo, antioxidante

### **Abstract**

Fresh semen is commonly used for intracervical insemination in ewes because fertility rates using frozen-thawed semen are very low, except in intrauterine insemination by laparoscopy. The objective of our study was to evaluate the effect of the addition of a superoxide dismutase mimic antioxidant during the process of cryopreservation of ram semen on fertility rate in ewes inseminated by intracervical method. Semen samples were divided in two groups: without antioxidant (Control) and with antioxidant (Tempo) using an extender based on Tris-citric acid and. After that, semen was packaged in 0.25 ml straws with approximately 100 million sperm /straw and plunged to liquid nitrogen. For insemination, 75 Corriedale and Merino ewes belonging to CIP Chuquibambilla were used, 40 for IA with Control frozen semen, and 35 with Tempo frozen semen. No return rate in Control group was 42.4%, meanwhile in Tempo group was 60.6%. This results show that the addition of antioxidant Tempo during freezing of ram semen could be an alternative for intracervical artificial insemination with frozen-thawed semen in ewes.

Key words: no return rate, ewes, criopreservation, Tempo, antioxidant.

### **Introducción.**

La inseminación artificial (IA) en ovejas se realiza generalmente en la entrada de la cervix, debido a que es muy difícil penetrarla por la tortuosidad e irregularidad de sus pliegues. Esto constituye una gran limitante para realizar IA con semen congelado, debido a que la tasa de fertilidad es reducida en comparación con semen fresco. Hasta el momento la principal alternativa para realizar IA con semen congelado es depositando directamente el semen a nivel intrauterino mediante la técnica de laparoscopia. Sin embargo esta técnica es compleja y requiere de equipos de costo elevado. Es por ello que actualmente en nuestro país, el mejoramiento genético en ovinos es limitado porque no se ha masificado la IA con semen congelado. La baja tasa de fertilidad obtenida al utilizar semen congelado podría ser causada por la desestabilización prematura de las membranas del espermatozoide durante el proceso de criopreservación (Salamon y Maxwell, 2000). En ese sentido, se ha encontrado que los espermatozoides ovinos luego del proceso de congelamiento-descongelamiento presentan una gran proporción de capacitación prematura (Pérez et al., 1996; Santiani et al., 2003), lo cual estaría desestabilizando la membrana espermática y reduciendo el tiempo

de sobrevivencia espermática en el tracto reproductivo de la oveja. Por lo tanto se requieren desarrollar alternativas que permitan mejorar la fertilidad mediante inseminación intravaginal-intracervical. Un aspecto importante podría ser la prevención de la pérdida de la calidad seminal durante el proceso de criopreservación de semen ovino. El uso de antioxidantes podría constituir una alternativa para mejorar los protocolos de criopreservación de semen ovino mediante el bloqueo de la desestabilización espermática y así lograr mejores tasa de fertilidad. La gran susceptibilidad de los espermatozoides a los radicales libres de oxígeno se debe a que sus membranas plasmáticas tienen un alto contenido de ácidos grasos insaturados (Jones et al., 1979), lo cual las hace susceptibles a sufrir peroxidación lipídica (Álvarez y Storey, 1989). Dicha peroxidación lipídica ha sido relacionada además con una disminución en la motilidad espermática y muerte celular (Aitken, 1994). Es por ello que la adición de antioxidantes al medio de dilución podría prevenir la desestabilización temprana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación. Consecuentemente, la adición de antioxidantes al medio, permitiría al espermatozoide sobrevivir en el tracto reproductivo de la hembra un mayor tiempo para llegar a fecundar al ovocito, obteniendo mejores tasa de fertilidad. La utilización de antioxidantes para la criopreservación de semen aún no está estudiada completamente en ovinos. Algunos reportes indican la utilización de un análogo de la enzima superóxido dismutasa denominado Tempo (2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinyloxy) como antioxidante para prevenir la pérdida de la calidad espermática. (Santiani, 2003; Ruiz, 2005). En dichos trabajos se indican que la adición de Tempo previene parcialmente la pérdida de motilidad y vitalidad, así como reduce la proporción de espermatozoides capacitados prematuramente. Sin embargo, todos estos trabajos han medido parámetros de función espermática in vitro, y aún no está demostrado si la adición del Tempo durante la criopreservación de semen ovino podría mejorar las tasas de fertilidad cuando se insemina intracervicalmente. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición del antioxidante Tempo sobre la tasa de no retorno de celo en ovejas inseminadas intracervicalmente con semen congelado.

### **Materiales y métodos.**

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, ubicado en la Provincia de Melgar, departamento de Puno, a 3910 msnm, durante los meses de mayo y junio del presente año. Para tal efecto se colectaron muestras de semen de 2 carneros Corriedale y 1 carnero Merino mediante el uso de una vagina artificial de ovino. Los eyaculados (n=6) se caracterizaron por tener un volumen >1.5 ml, motilidad progresiva =80% y concentración =2000 millones esp/ml. Cada muestra fue dividida en 2 partes para formar los grupos Control (sin antioxidante) y Tempo (con antioxidante). En el grupo Tempo se añadió el antioxidante 2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinyloxy Tempo (Aldrich 214000) al dilutor base para obtener una concentración final de 1 mM. El protocolo de criopreservación utilizado fue el descrito por Aisen et al. (2000) utilizando un dilutor en base a Tris, ácido cítrico, yema de huevo, glicerol fructosa, trehalosa y EDTA. El semen fue diluido con la primera fracción del diluyente a 35°C y se inició la curva de enfriamiento hasta los 5°C en un tiempo aproximado de 90 minutos. Al llegar a 5°C se completó con la segunda fracción del diluyente y se dejó estabilizar por 30 minutos. Posteriormente el semen fue envasado en pajillas de 0.25 ml con una dosis aproximada de 100 millones de espermatozoides/pajilla. Las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido (15 cm sobre el nivel del nitrógeno) durante 15 minutos y almacenadas en el tanque respectivo hasta el momento de la evaluación o inseminación. Se evaluaron 2 pajillas por cada lote (10 pajillas) para comprobar la calidad seminal y la eficiencia del protocolo de criopreservación. La evaluación de la calidad seminal incluyó como parámetros: motilidad progresiva y evaluación de la integridad funcional de membrana (Test hipoosmótico descrito por Jeyendran et al., 1984). Para la IA se utilizaron 75 ovejas detectadas en celo mediante el uso de machos vasectomizados (retajos). Las ovejas fueron distribuidas aleatoriamente para ser inseminadas con el semen congelado Control (n=40) ó Tempo (n=35). El semen fue descongelado en baño maría a 38°C por 1 minuto. Con la ayuda de un espéculo vaginal, se observó la entrada cervical en las ovejas y se procedió a inseminar lo más profundo posible. La tasa de no retorno en celo por un periodo de 40 días fue utilizada como indicador de fertilidad. Para determinar si existe asociación entre la utilización del antioxidante tempo y la tasa de no retorno en celo se utilizó la prueba de Chi cuadrado.

### **Resultados y discusión.**

Los parámetros evaluados luego del proceso de congelamiento y descongelamiento de semen ovino muestran que los porcentajes de motilidad e integridad funcional de membrana (HOS positivos) son mayores en el grupo en donde se utilizó el antioxidante Tempo, aunque sin diferencias significativas (Tabla 1). Estos resultados son similares a los descritos por Santiani (2003) y Ruiz (2005), en donde la utilización de antioxidantes también evito parcialmente la pérdida de calidad seminal durante el proceso de criopreservación. Esto podría explicarse debido a la acción antioxidante del Tempo en los espermatozoides de ovino que impide la producción de radicales de oxígeno y por lo tanto evita la peroxidación lipídica de la membrana espermática (Santiani, 2003).

Comentario [F1]: RPTA:ES LA PRIMERA VEZ QUE SE INSEMINA CON ESTA METODOLOGÍA PARA CONGELAR SEMEN, LOS DATOS SE PRESENTAN PARA TENER UNA IDEA DE CON QUE CALIDAD DE SEMEN SE REALIZARON LAS INSEMINACIONES.

Tabla 1. Porcentaje de motilidad e integridad funcional de membrana en semen ovino luego del proceso de congelamiento-descongelamiento.

<b>Semen Congelado-Descongelado</b>	<b>Motilidad (%)</b>	<b>HOS positivos (%)</b>
Semen Control (sin antioxidante)	42.36 ± 13.10	33.65 ± 11.40
Semen Tempo (con antioxidante)	47.92 ± 11.64	40.53 ± 15.19

Con respecto a la tasa de no retorno en celo, en la Tabla 2 podemos observar los resultados de la inseminación en 73 ovejas, debido a que las 2 ovejas restantes fueron separadas del experimento luego de las inseminaciones por razones ajenas al diseño experimental. La tasa de no retorno en celo para el grupo control fue de 42.5%. Estos valores son mayores a la tasa de preñez obtenida mediante inseminación intracervical con semen congelada, de acuerdo a los descrito por Salamon y Maxwell (2000) que varían entre 25 a 35%. Esto podría explicarse porque del grupo de ovejas que no retornaron en celo, no necesariamente todas estaban preñadas.. Con respecto al grupo Tempo, estos son los primeros resultados que muestran in vivo el beneficio de la utilización de antioxidantes como componentes de los dilutores de semen ovino. La tasa de no retorno en celo en este grupo superó el 60%, siendo estos datos bastante similares a los reportados por Salamon y Maxwell (2000) para inseminación intrauterina con semen congelado (50-70%). Si bien no existen diferencias significativas entre los grupos Control y Tempo ( $p = 0.0618$ ), se observa una tendencia a mejorar la tasa de no retorno de celo cuando se utilizó el antioxidante Tempo. Esto se explicaría porque durante el proceso de criopreservación de semen se ha descrito un incremento significativo en los niveles de especies reactivas de oxígeno en ovinos (Santiani, 2003) y humanos (Wang et al., 1997). Este aumento de especies reactivas de oxígeno está relacionado con la capacitación espermática prematura y reacción del acrosoma afectando negativamente la fertilidad. Es por ello que podemos concluir que la utilización del antioxidante Tempo como componente del dilutor para criopreservación de semen de ovino permite aumentar la tasa de no retorno de celo en ovejas inseminadas intracervicalmente.

Tabla 2. Tasa de retorno y no retorno en celo en ovejas inseminadas intracervicalmente con semen congelado control (sin antioxidante) y semen congelado Tempo (con antioxidante)

<b>Ovejas inseminadas con:</b>	<b>Retorno en celo n (%)</b>	<b>No retorno en celo n (%)</b>	<b>Total n (%)</b>
Semen Control (sin antioxidante)	23 (57.5%)	17 (42.5%)	40 (100%)
Semen Tempo (con antioxidante)	13 (39.4%)	20 (60.6%)	33 (100%)

### Conclusiones

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que la utilización del antioxidante Tempo como componente del medio dilutor para criopreservación de semen ovino permite obtener mejores tasas de no retorno de celo cuando se insemina intracervicalmente ovejas y por lo tanto podría constituir una alternativa para la masificación de la IA con semen congelado en ovinos.

### Literatura citada.

- Aisen, E., Alvarez, H., Venturino, A. y Garde, J. 2000. Effect of trehalosa and EDTA on cryoprotective action for ram semen diluents. Theriogenology 53:1053-1061.
- Aitken, R.J. 1994. A free radical theory of male infertility. Reprod Fert. Dev. 6:19-24.

- Alvarez, J.G., y Storey, B.T. 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by lipid peroxidation. *Gamete Res.*23:77-90.
- Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. y Zaneveld, L. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70:219-228.
- Jones, R., Mann, T. y Sherins, R. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531-537.
- Mara, L., Accardo, C., Dattena, M., Branca, A., Casu, S. y Cappai, P. 2002. Efecto de un antioxidante en la conservación de semen ovino, *Prod. Ovina y Carpina N°XXVII, SEOC*, 1059-1065. España.
- Salamon, S. & Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:77-111.
- Santiani, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: Efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis Mag. Univ. La Frontera, Temuco, Chile. 95pg.
- Perez, L.J., Vlacárcel, A., De las Heras, M.A., Moses, D. y Baldassarre, H. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 46, 131-140.
- Ruiz, F. 2005. Efecto de dos antioxidantes (Tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovinos empleando un dilutor en base a tris. Tesis Bach. FMV-UNSM, Lima, Perú. 57 pg.
- Wang, A.W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D.J. y Loughlin, K.R. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49: 921-925.