

EFECTO DE LOS FITOESTRÓGENOS
PRESENTES EN LA ALFALFA (*Medicago
sativa*) Y LA SOYA (*Glycine max*) SOBRE LA
CALIDAD DEL SEMEN OVINO FRESCO Y
CRIOPRESERVADO

LUZ ANDREA SIERRA SANCHEZ

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Facultad de ciencias básicas
Maestría en ciencias biológicas
Tunja, Colombia
2015

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS
FITOESTRÓGENOS PRESENTES EN LA
ALFALFA (*Medicago sativa*) SOBRE LA
CALIDAD DEL SEMEN OVINO FRESCO Y
CRIOPRESERVADO

LUZ ANDREA SIERRA SANCHEZ

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Biológicas

Director:
MSc. JOSE LUIS PORRAS VARGAS

Línea de Investigación:
En reproducción animal
Grupo de Investigación:
Grupo de investigación en bioquímica y nutrición animal

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Facultad de ciencias básicas
Maestría en ciencias biológicas
Tunja, Colombia
2015

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	14
HIPOTESIS.....	15
5. MARCO TEORICO	17
5.1 VARIABILIDAD DE LA CALIDAD ESPERMATICA.....	17
5.1.1 Factores medioambientales.....	17
5.1.2 Edad.....	18
5.1.3 Nutricionales.....	18
5.1.4 Criopreservación.....	19
5.2 ANALISIS DE SEMEN.....	20
5.2.1 Análisis macroscópico	20
5.2.1.1 Volumen.....	20
5.2.1.2 Color, apariencia y pH.....	20
5.2.2 Análisis microscópico.....	21
5.2.2.1 Motilidad masal.....	21
5.3 CRIOPRESERVACION Y ANTIOXIDANTES	24
5.4 FITOESTRÓGENOS	27
5.4.1 Acción antioxidante de los fitoestrógenos	28
5.5 SUPLEMENTOS NUTRICIONALES	29
5.5.1 ALFALFA (<i>Medicago sativa</i>).....	29
5.5.1.1. Valores Nutricionales de la alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	30

5.1.2 SOYA (<i>Glycine max</i>).....	31
5.5.3 Contenido de fitoestrógenos en harina de alfalfa y soya extruida	34
6. METODOLOGÍA.....	35
6.1 UBICACIÓN GEOGRAFICA	35
6.2 MATERIALES Y METODOS	35
6.2.2 Población y muestra.....	37
6.2.3 Toma de muestras y análisis de semen.	38
6.2.4 Manejo del material vegetal.....	40
6.2.3 División de grupos de estudio.....	40
6.2.4 Diseño experimental.	41
6.2.5 Análisis estadístico	42
7. RESULTADOS	43
7.1 ANALISIS MACROSCOPICO	43
7.1.1 Volumen.....	43
7.2. ANALISIS MICROSCOPICO.....	46
7.2.1 Motilidad Masal.....	46
7.2.2 Motilidad progresiva individual.....	48
7.2.3 Grado de la motilidad progresiva individual	51
7.2.4 Vitalidad.....	52
7.2.5 Concentración espermática.....	54
DISCUSION	57
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMOS DE DEFENSA DEL DAÑO POR LAS ERO.....	26
FIGURA 2. MATERIALES USADOS DURANTE EL PROCESO DE ANÁLISIS DE CALIDAD SEMINAL	355
FIGURA 3. LOTE DE OVINOS MACHOS GRANJA TUNGUAVITA.....	37
FIGURA 4. ANIMALES SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO.....	37
FIGURA 5. COMPARACIÓN DEL VOLUMEN DE EYACULADO ANTES Y DESPUÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN	44
FIGURA 6. ANALISIS DE LA COLORACIÓN DEL SEMEN DESPUÉS DE LA COLECTA.....	455
FIGURA 7. MOTILIDAD MASAL ANTES Y DESPUÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN	477
FIGURA 8. ESPERMATOZOIDES TEÑIDOS CON MOVIE ESPERMA IRIS, PARA EVALUACIÓN DE MOTILIDAD Y VITALIDAD	499
FIGURA 9. MOTILIDAD PROGRESIVA INDIVIDUAL EN SEMEN FRESCO Y SOMETIDO A CRIOPRESERVACIÓN ANTES Y DESPUÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN	499
FIGURA 10. GRADO DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA INDIVIDUAL EN SEMEN FRESCO Y SOMETIDO A CRIOPRESERVACIÓN ANTES Y DESPUÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN.....	51
FIGURA 11. VITALIDAD EN SEMEN FRESCO Y SOMETIDO A CRIOPRESERVACIÓN ANTES Y DESPUÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN.....	533
FIGURA 12. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA ANTES Y DESPUÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN ..	554

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. VALORACIÓN DE LA MOTILIDAD MASAL MACROSCÓPICA.....	22
TABLA 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA (%) DE LA ALFALFA	31
TABLA 3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL GRANO DE SOYA CRUDO, GRANO DE SOYA PROCESADA Y DE LA TORTA DE SOYA.	32
TABLA 4. CONTENIDO DE FITOESTRÓGENOS EN DIFERENTES PRODUCTOS ALIMENTICIOS	34

acta

ded

gra

EN

Los fitoestrógenos son compuestos producidos como metabolitos secundarios en algunas plantas y forrajes usados en la alimentación animal, los cuales bajo condiciones normales se presentan en bajas concentraciones, este es el caso de la alfalfa (*Medicago sativa*), que en condiciones optimas de sanidad genera una concentración baja de dichos compuestos sin embargo, cuando esta es atacada por hongos patógenos como *Pseudopeziza medicaginis* (Romero et al., 1997), produce una mayor cantidad de fitoestrógenos. Su importancia radica en que cuando son consumidos por los animales, pueden tener actividad endógena de forma agónica o antagónica con los estrógenos. Dentro de los fitoestrógenos se pueden mencionar los flavonoides, isoflavonoides, coumestranos, líganos y estílenos, los cuales se clasifican según su estructura química. Dichos compuestos pueden llegar a afectar órganos y sistemas dentro de los cuales se mencionan grandes impactos a nivel hormonal y reproductivo, esto dado por la estimulación o inhibición de los receptores estrogénicos ER α y ER β . En tal caso se planteo una investigación de tipo experimental, con la finalidad de establecer los posibles efectos del consumo de dos dietas ricas en fitoestrógenos (alfalfa y soya) sobre la calidad seminal en fresco y criopreservado en ovinos de raza Hampshire x Suffolk. En relación a este se realizó un diseño experimental en bloques haciendo una prueba de comparación múltiple por Diferencia Mínima Significativa (DMS), encontrando que no existen diferencias significativas entre los grupos suplementados y el control antes y después de la suplementación, tanto en semen fresco como criopreservado. Lo que indica que un consumo bajo de fitoestrógenos no genera cambios perjudiciales que modifiquen negativamente la calidad del semen, ni cambios favorables que permitan mejorarlo.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los sistemas de producción ovina uno de los factores más importantes a tener en cuenta es la reproducción, en donde la inseminación artificial se ha convertido un procedimiento cada vez más común, así dentro de dicho proceso, la congelación y descongelación del semen reduce la viabilidad de los espermatozoides. Los cambios de temperatura a los que estos son sometidos provocan un choque por frío, lo que genera que una gran cantidad de células mueran y otras sean dañadas, afectándose la motilidad, la viabilidad y la fertilidad. Los radicales libres generados por la congelación y descongelación y por el metabolismo celular dañan la membrana plasmática espermática, que al estar formada por ácidos grasos poliinsaturados es altamente susceptible a una lipoperoxidación (Thundathil, et al., 1999, Roncoletta, et al., 2006).

En consecuencia, aunque los espermatozoides son protegidos por sistemas de defensa antioxidante, estos pueden ser rebasados bajo situaciones en las que las especies reactivas al oxígeno son generadas en exceso, lo que conduce al estrés oxidante, ocasionando daño estructural a nivel biomolecular del DNA, de los lípidos, de los carbohidratos y de las proteínas, así como agotamiento del ATP (Adenosin trifosfato). Dando como resultado la pérdida irreversible de la motilidad espermática y por ende una disminución de la función espermática y apoptosis celular (Vaisberg, et al., 2005), de ahí la importancia de buscar compuestos que disminuyan esa formación de radicales libres y ofrezcan al espermatozoide una protección que les permita cumplir con su función de fecundación.

En concordancia, se han venido probando diferentes crioprotectores con buenos resultados, sin embargo aún no se ha estudiado el posible efecto protector de los fitoestrógenos a nivel

reproductivo. Cabe decir que la importancia de los fitoestrógenos en la ganadería empezó a tener auge cuando (Bradbury et al, 1951) lograron aislar del trébol subterráneo dos compuestos estrogénicos (genisteína y formononetina), que pertenecen al grupo de las isoflavonas. De este mismo grupo, más tarde se identificó la daidzeína y la biochamina A (Bickoff *et al.*, 1962). Del grupo de coumestranos, se aisló el Coumestrol de la alfalfa que tiene una actividad de 15 a 20 veces superior a las isoflavonas, en general se puede decir que los niveles de fitoestrógenos en las plantas son geográficamente variables.

El Coumestrol principal fitoestrógeno presente en las alfalfas, se encuentra en pequeñas concentraciones (1-2 mg kg/MS en plantas sanas), sin influencia aparente sobre el animal que las consume. Sin embargo, suele ser aumentada su concentración en presencia de ataques foliares del hongo (*P. medicaginis*), pudiendo superar en estos casos los 100 mg kg/MS, lo que resulta bastante superior a la concentración mínima de 20-50 mg kg/MS considerada como biológicamente activa. Este mecanismo parece estar asociado a mecanismos de defensa de los vegetales expuestos a patógenos foliares (Valderrabano, 1992).

Además de lo anterior, se considera que los fitoestrógenos reducen los radicales libres especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción nociva de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores pueden ser por ejemplo, sobre los fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa (Merck S.A., 2000). A su vez, diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoléico o de los fosfolípidos de las membranas, por lo que podrían ser beneficiosos para prevenir el daño estructural en los espermatozoides tras los cambios de temperatura a los que son sometidos durante la congelación y la descongelación.

En relación a lo esto, aunque el consumo de fitoestrógenos presentes en la alfalfa y la soya puede tener algún efecto en el semen fresco y criopreservado, son pocos los estudios al respecto, por lo que se hace importante desarrollarlos a fin de establecer mecanismos de defensa antioxidativos, que mejoren la bioactividad seminal y por consiguiente los índices de preñez al hacer uso de técnicas como la inseminación artificial en las producciones ovinas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de los fitoestrógenos presentes en la alfalfa (*Medicago sativa*) y soya extruida (*Glycine max*) sobre la calidad seminal en ovinos, mantenidos en condiciones de semiestabulación.

Objetivos específicos

- Establecer el efecto de los fitoestrógenos presentes en la soya extruida sobre la fisiología y viabilidad espermática del semen fresco.
- Determinar el efecto de los fitoestrógenos presentes en la soya extruida sobre la fisiología y viabilidad espermática del semen sometido a criopreservación.
- Analizar el efecto de los fitoestrógenos presentes en la alfalfa sobre la fisiología y viabilidad espermática del semen fresco.
- Evaluar el efecto de los fitoestrógenos presentes en la alfalfa sobre la fisiología y viabilidad espermática del semen sometido a criopreservación.

HIPOTESIS

Ho: Los fitoestrógenos presentes en la alfalfa y la soya extruida no ejercen ningún efecto de protección en los espermatozoides, por lo cual no se mejora la calidad espermática del semen ovino sometido a criopreservación.

Ha: Los fitoestrógenos presentes en la alfalfa y la soya extruida ejercen algún efecto de protección en los espermatozoides, por lo cual se mejora la calidad espermática (en por lo menos una de las variables estudiadas) del semen ovino sometido a criopreservación.

5. MARCO TEORICO

5.1 VARIABILIDAD DE LA CALIDAD ESPERMATICA

Existen diversos factores que influyen sobre la calidad del semen en los ovinos, sin embargo se mencionaran aquellas que no están determinadas por factores infecciosos.

5.1.1 Factores medioambientales.

El estrés calórico, sumado a la humedad, impide que los mecanismos termorreguladores del macho sean capaces de mantener un equilibrio que no afecte la calidad seminal. Se ha establecido, que en bovinos de diferentes razas la temperatura ambiental y la lluvia están correlacionadas positivamente con el porcentaje de anomalías espermáticas (Brito, et al., 2002). Sin embargo otros reportes sustentan que el estrés por frío también impacta negativamente la calidad del esperma (Godfrey y Lunstra, 1998).

Se mencionan igualmente diferencias entre individuos en cuanto a la capacidad de tolerancia al estrés calórico; algo muy importante para tener en cuenta además de la temperatura del día de la colecta, es la temperatura promedio de los días previos y especialmente cuando los espermatozoides se encuentran en su última fase de maduración a nivel del epidídimo, por no decir que los 60 días anteriores que involucren todo un ciclo de espermatogénesis.

Para que el testículo logre mantener una temperatura ideal de 33-34.5 °C, debe mantenerse una termorregulación testicular constante, siendo la temperatura ambiental ideal para ello entre 18 y 22 °C, por tanto, el uso de aire acondicionado en centros de inseminación artificial, es una de las soluciones al impacto calórico, especialmente en el verano.

5.1.2 Edad.

La calidad seminal en animales hasta los 2 – 3 años es mejor en cuanto a motilidad, morfología y concentración. De otro lado de menciona que ovinos mayores, generalmente de más de 5 años de edad, presentan lesiones fibróticas testiculares, impidiendo los procesos de espermatogénesis y de maduración espermática.

Una de las posibles explicaciones de esta fibrosis para ovinos criados en condiciones de trópico es la distensión testicular y escrotal como dado por una posible respuesta de termorregulación y lo que conlleva a un trauma constante en el parénquima testicular (Angarita, 2000).

5.1.3 Nutricionales.

El estatus nutricional es un aspecto fundamental en el inicio y mantenimiento de la actividad reproductiva en el macho ovino, ya que las deficiencias o el desbalance nutricional pueden llegar a generar cambios en la calidad del semen, tanto a nivel de la célula espermática como del plasma seminal. En todas las especies se ha demostrado que la calidad del alimento, es un factor determinante en las primeras etapas de la vida, específicamente durante el inicio de la etapa reproductiva, así los individuos alimentados bajo un óptimo esquema nutricional podrán presentar pubertades más tempranas, con un desarrollo testicular adecuado y rápido, comparados con aquellos que estén subalimentados. No es nuevo que la nutrición va de la mano con la ganancia de peso, por lo que tanto en

hembras como en machos, la eficiencia reproductiva se relaciona más con el peso logrado que con la misma edad del animal. El peso corporal puede ser un indicador de la llegada a la pubertad, así como la evidencia de un buen desarrollo corporal, que finalmente se refleja en el desempeño reproductivo de los individuos.

Para el caso puntual de los animales subalimentados, una deficiencia nutricional puede ocasionar un retardo en la aparición de la pubertad, debido a una respuesta de tipo endocrina en donde por el inadecuado aporte nutricional se disminuye la producción de IGF-1 (hormona esencial en los procesos de crecimiento), en consecuencia, se inhibe la producción de LH y testosterona (Chenoweth et al., 2000).

5.1.4 Criopreservación.

La criopreservación implica una técnica de congelación a -196°C en donde las células se someten a una serie de alteraciones estructurales, tales como dilatación y rompimiento a nivel de la membrana, con cambios de permeabilidad en la misma. Hay cambios en la estructura de fosfolípidos y proteínas (siendo clasificados 27 tipos entre la SM40 y la SM391), que traen como consecuencia una reducción en su motilidad y viabilidad espermáticas (Thundathil, et al 199; Roncoletta et al, 2006). Dichos cambios generan un adelanto capacitación espermática, que finalmente determina la supervivencia de los espermatozoides y su capacidad de fecundación (Thundathil, et al 199; Maxwell, et al 1999).

Algunos autores mencionan alteraciones en la cromatina o en la integridad del DNA (Khalifa et al, 2007). A nivel general las alteraciones son dadas por eventos de estrés oxidativo que lesionan la membrana y conllevan a la disminución de la calidad espermática. Sin embargo, también se reporta que cuando la calidad del semen es buena, las células soportan la criopreservación y los procesos de descongelación, manteniendo una motilidad e integridad del acrosoma adecuada (Maxwell, et al 1999).

5.2 ANALISIS DE SEMEN

5.2.1 Análisis macroscópico

5.2.1.1 Volumen

La determinación del volumen se realiza inmediatamente después de su recogida, valorándolo directamente en el tubo colector (graduado en 10 ml), evitando el error producido al pasar el eyaculado de un recipiente a otro para su valoración (Maxwefl y Evans, 1990). La determinación precisa del volumen del eyaculado es imprescindible para determinar el número total de espermatozoides contenido en el mismo. En promedio un ovino tiene la capacidad de producir 1 ml (0.7-3 ml), sin embargo su concentración varía entre 2000-6000 millones/ml, existiendo variaciones según el método de recogida, especie, estado fisiológico del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete (Derivaux, 1982; Memon et al., 1986; Pérez, 1992; Cortés et al, 1994).

5.2.1.2 Color, apariencia y pH

El color del semen es un parámetro a tener en cuenta durante la evaluación del semen, sin embargo no es un indicativo definitivo de la concentración o de la vitalidad. Por lo que se considera que puede ser solo una buena señal de las condiciones asociadas a la concentración espermática y el estado sanitario del macho a nivel reproductivo. En general el color del semen ovino debe ser blanco cremoso, dicha coloración, producida es por la presencia de riboflavinas en el plasma seminal y dada por la secreción de las vesículas seminales, sin embargo dicho parámetro puede depender de variaciones raciales e individuales.

De otra parte las coloraciones grises y/o pardas, y rosáceas son indicadores de contaminación y/o infección del sistema reproductor y de la presencia de hematíes en el semen respectivamente, esta condición puede llegar a estar relacionada con una mala

calidad espermática y permiten evidenciar la presencia de lesiones o patologías del aparato reproductor del macho.

En cuanto al color existen algunas categorías a tener presente:

Muy bueno (++++): Color blanco cremoso

Bueno (+++): Color blanco marfil

Regular (++): Color blanco acuoso

Malo (+): Color francamente acuoso

5.2.2 Análisis microscópico

Bajo este se establecen las características de motilidad masal e individual, las cuales dependen básicamente de la vitalidad, la temperatura corporal (óptima 36°C), el pH, la concentración de iones y sales del plasma seminal y de una osmolaridad balanceada.

5.2.2.1 Motilidad masal.

Esta se refiere a la motilidad de la masa como resultado del movimiento conjunto de los espermatozoides en el semen fresco. En general esta es un parametro particularmente evidente en el eyaculado de los pequeños rumiantes, en los cuales por su elevada concentración espermática, se puede valorar la motilidad masal. A continuación se muestra una tabla en la que se establece el sistema de clasificación a fin de valorar dicha variable. En una escala de 0 a 5, otorgando una puntuación de 5 cuando se observan oleadas o remolinos con movimientos rápidos y vigorosos y de 0 cuando no se observa movimiento en ondas.

Tabla 1. Valoración de la motilidad masal macroscópica

		Movimiento en ondas
+++	5/5 y 4/5	Movimientos masivos muy marcados y rápidos
++	3/5	Movimientos en masa aparentes, pero moderados
+	1/5 y 2/5	Ondas en movimientos apenas aceptables
-	0	No hay ondas, semen sin movimiento

Fuente: (Bonadonna, 1989).

5.2.2.2 Motilidad individual

Esta se establece como una de las pruebas que con mayor frecuencia se utilizan para evaluar la calidad seminal y en algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide (Maxwell y Evans, 1990). Esta se puede valorar de una subjetiva mediante un microscopio óptico (a 10x o 20x) tomando una gota de semen, lo importante es determinar el porcentaje de espermatozoides móviles y su calidad de movimiento (Maxwell y Evans, 1990). Además de esto, actualmente se han incorporado sistemas de análisis de imagen asistidos por ordenador o sistemas C.A.S.A (Computer-Assisted- Sperm-Analysis) que ofrecen una mayor confiabilidad al determinar de manera objetiva, velocidad y angularidad del movimiento (Arruda et al., 2007).

El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de la especie y del estado fisiológico en que se encuentre el macho (movimiento tras la eyaculación, dilución, refrigeración, congelación e hiperactivación), estando sujeto también al efecto ejercido por el método de colecta, factores ambientales, manejo del semen tras su obtención (Maxwell y Evans, 1990).

Sin embargo aunque es un método de análisis subjetivo, el semen ovino puede ser catalogado dado su motilidad individual como:

Muy buena: 80 – 100%

Buena: 60 – 70%

Regular 40 – 59 %

Mala: < 40% de espermatozoides motiles progresivos

5.2.2.3 Concentración espermática

La concentración espermática viene definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por ml) de eyaculado. Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y seguridad. La determinación de la concentración espermática mediante hematímetros y cámaras Neubauer se realiza tras una dilución 1/200 en una solución acuosa de Eosina básica (Ax et al., 2000).

Otro método de recuento es la técnica de espectrofotometría, en donde la concentración seminal es obtenida mediante una tabla de conversión, asignando a cada valor de transmitancia un valor de concentración previamente calculado, mediante recuento directo o contador de partículas, esta es una técnica de alta sensibilidad y eficiencia, dado que no importa el grado de concentración del eyaculado (Knox et al., 2004).

La concentración media estimada en el ganado ovino es de 2000-6000 millones/ml (Maxwell y Evans, 1990), siendo esta especie susceptible a variaciones ambientales, raciales e individuales (Pérez 1992; Cortés et al., 1994). Las diferencias entre eyaculados son menores cuando los machos están sometidos a un ritmo periódico de colectas.

5.2.2.4 Morfología

La morfología espermática es una de las características más estudiadas en el análisis seminal con el objetivo de eliminar aquellos individuos no aptos para la reproducción. La

presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar asociada con una inmadurez sexual, a procesos degenerativos y patológicos (Smith y Sherman, 1994) e incluso con un excesivo ritmo de colectas.

El estudio de la morfología espermática ha utilizado tradicionalmente técnicas de tinción, entre las que se destacan la Eosina, Eosina-nigrosina y Eosina azul de anilina que permiten evidenciar la morfología y la vitalidad del espermatozoide (Maxwell y Evans, 1990; Smith y Sherman, 1994), de igual manera la tinta china permite apreciar la presencia de teratoespermias (Hidalgo, et al., 2006).

A su vez los sistemas C.A.S.A. han permitido realizar una evaluación morfológica objetiva y cuantitativa del semen de diversas especies (Mortimer, 2000; Verstegen et al., 2002).

Se considera normoespermia cuando el eyaculado de un macho ovino presenta un porcentaje de formas anormales inferior al 15% (Abraham, 1987; Maxwell y Evans, 1990).

5.3 CRIOPRESERVACION Y ANTIOXIDANTES

La criopreservación de semen es una técnica accesoria para la inseminación artificial y la fertilización in Vitro y ha jugado un papel bastante importante en los últimos 50 años en el mejoramiento reproductivo en diferentes especies de animales. Con estas técnicas, se ha logrado realizar mejoramiento genético de hatos, prevenir y controlar enfermedades, hacer un control reproductivo del hato, mejor aprovechamiento de los sementales y obtener un mejor rendimiento económico (Aitken et al., 1994).

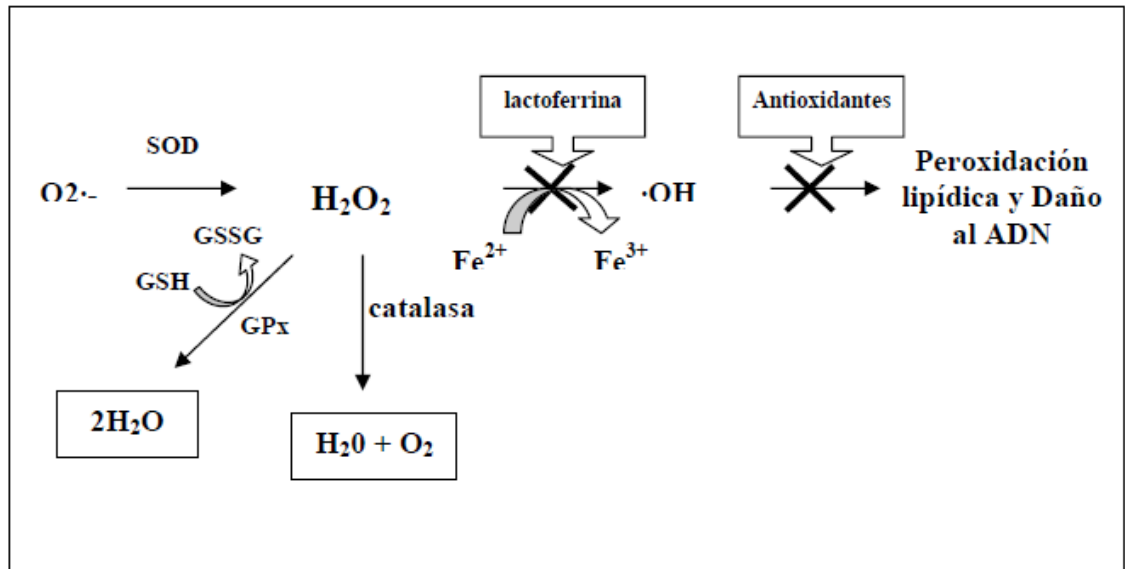
No obstante la manipulación del semen en estos procesos altera el óptimo desempeño de los espermatozoides. Por ejemplo, se ha reportado que la criopreservación de semen reduce la fertilidad comparativamente con el semen fresco y algunas de las razones que causan

perdida de fertilidad son, la susceptibilidad al choque térmico, la tasa de enfriamiento y la composición del diluyente. De otro lado, se ha reportado que las centrifugaciones seriadas y la remoción del plasma seminal, inducen una liberación significativa de ERO por los espermatozoides y leucocitos del semen resultando en una disfunción espermática.

Los espermatozoides y los glóbulos blancos que se encuentran en el semen producen ERO en su actividad metabólica normal y se ha reportado que en los espermatozoides humanos se generan especies como el anión superóxido ($O_2\bullet^-$) (Aitken et al., 1986), el cual espontánea o enzimáticamente es transformado rápidamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2); debido a su baja reactividad y corta vida media (1ms) el anión superóxido no es muy dañino, pero puede reaccionar con sus blancos y puede producir especies más tóxicas como los radicales Tiol ($RS\bullet$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) que son altamente reactivos (Zini et al., 1993).

El peróxido de hidrógeno es relativamente estable y tiene un alto potencial oxidante, no está cargado y puede cruzar libremente las membranas celulares. Sumado a lo anterior, las concentraciones considerablemente bajas de hierro presentes en casi todas las soluciones en las cuales se diluyen los espermatozoides, son suficientes para catalizar la formación del radical hidroxilo ($\bullet OH$) del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno (Figura 1), las cuales reaccionan virtualmente con cualquier componente celular y el efecto tóxico observado se ve limitado por su corta vida media; el (SOD) más catalasa o glutatión peroxidasa (GPx) elimina muchos daños ocasionados por EROs. La Lactoferrina (unida al hierro) y antioxidantes como la vitamina E limitan el daño adicional.

Figura 1. Mecanismos de defensa del daño por las ERO



Fuente: Watson, 2000

La membrana plasmática de los espermatozoides de los mamíferos es rica en ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son muy susceptibles al ataque de las ERO, además durante los últimos estados de la espermatogénesis los espermatozoides han descartado la mayoría de su citoplasma perdiendo gran parte del conjunto de defensas enzimáticas que los protegen del daño peroxidativo. Afortunadamente, el plasma seminal contiene una batería enzimática como, la superóxido dismutasa, la catalasa y el sistema de glutatión peroxidasa/reductasa que neutralizan las ERO, lo mismo que una gran cantidad de sustancias con actividad similar a la superóxido dismutasa o catalasa, como el α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión, piruvato, taurina, hipotaurina y albumina, que regulan el balance entre la generación de las ERO y su neutralización. La exposición de los espermatozoides al plasma celular antes de su separación con fines de criopreservación favorece la prevención del daño por oxidación.

De esta forma se hace claro que las ERO dañan las macromoléculas afectando el componente estructural y funcional de los espermatozoides sobrevivientes, lo que se ve reflejado en la inestabilidad de la membrana, daño de los receptores de membrana,

alteraciones del citoesqueleto (Watson, 2000), perturbaciones del axonema (el cual es asociado con la disminución de la movilidad), inhibición de la fusión espermato-ovocito, y daño nuclear entre otros (Watson, 2000).

Se ha establecido que los antioxidantes naturales ejercen un efecto protector sobre la membrana plasmática de los espermatozoides ovinos, conservando tanto su actividad metabólica y viabilidad celular. Así los flavonoides, compuestos fenólicos constituyentes de algunos vegetales, semillas y frutas, poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías.

5.4 FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos se metabolizan extensamente en el rumen, por lo que la importancia de los compuestos estrogénicos en los forrajes depende de su destino metabólico. Compuestos como 4-methoxy-coumestrol han demostrado una capacidad estrogénica después de desmetilación, lo que permite que los grupos hidroxilogroups se unan a los receptores de estrógeno. Por el contrario, las isoflavonas genisteína y biochanin A pueden ser degradados en el rumen a *p*-etil fenol y ácidos orgánicos (Cox y Braden, 1974). La estrogenicidad de formononetina se mejora por desmetilación, se reduce a un compuesto más estrogénico, equol, que se absorbe rápidamente por la pared del rumen. En los ovinos, buena cantidad de equol se excreta en la orina luego de un alto consumo de formononetina (Cox y Braden, 1974). Los microorganismos ruminales pueden tardar de 6 a 10 días para adaptarse plenamente a estos sustratos, así la genisteína la biochanina A pueden producir efectos estrogénicos en esta especie días después de su introducción en pastos ricos en dichas sustancias.

5.4.1 Acción antioxidante de los fitoestrógenos

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los fitoestrógenos se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica dada también por la inhibición estrogénica (Baker, 1998). Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria (Brasseur, 1989).

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides (Bors et al., 1990) son:

Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones. Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C41-42. Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

Siguiendo estos criterios, algunos flavonoides tienen una capacidad antioxidante medida como Trolox de 4,7 mM, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C y tienen una hidrosolubilidad similar a la de la vitamina E. Dicha función antioxidante muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico que combinado con estos permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo.

Así, se ha demostrado que los flavonoides inhiben la fotooxidación de la vitamina E en la membrana celular de las células sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador (Pace-Asciak et al., 1995). Los flavonoides retiran oxígeno reactivo

especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, en los espermatozoides, fibroblastos de la piel, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina- butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa.

5.5 SUPLEMENTOS NUTRICIONALES

5.5.1 ALFALFA (*Medicago sativa*)

La alfalfa es una leguminosa forrajera que se utiliza fundamentalmente para aportar proteína de gran calidad, macro minerales, micro minerales y vitaminas de forma natural a la ración del ganado. Además es una fuente importante de fibra efectiva, muy necesaria para animales rumiantes y herbívoros. En periodos difíciles de alimentación una oveja para mantenerse requiere de 1 a 1,2kg de heno de alfalfa diarios, pero esto puede resultar bastante costoso y sobrado en proteínas, por ello se puede mezclar con paja, cereales; una ración de 0,5 kg de heno de alfalfa y 1,2 kg de paja de leguminosas cubre así mismo sus necesidades nutricionales (Ibañez, 1996).

En rumiantes particularmente, no sólo tiene la virtud de aportar todos estos nutrientes necesarios sino que además contribuye a:

- ✓ Estimular la rumia. Esta estimulación y la efectividad de la fibra son proporcional a su largura. Cuanto más larga sea la fibra de la alfalfa la estimulación será mayor.
- ✓ Aumentar la salivación. Este efecto está relacionado con el anterior. La fibra de la alfalfa estimula la masticación y a su vez la salivación, con lo que aumenta la cantidad de bicarbonato que llega al rumen a través de la saliva. Éste ayudará a controlar el pH, subiéndolo y evitando problemas en la rumia.

✓ Ayuda a enlentecer el tránsito de los alimentos en el rumen. En determinadas ocasiones, esto nos puede ayudar a que se aprovechen más otros alimentos como concentrados proteicos y cereales.

✓ La alfalfa puede procesarse de diversas maneras para mejorar su almacenamiento y utilización posterior por el ganado (Hernandez, 2013).

Siendo las formas más frecuentes de suministrar alfalfa al ganado son: en verde (Pastoreada en la propia parcela o segada y administrada directamente al ganado); ensilada; henificada y en harina.

5.5.1.1. Valores Nutricionales de la alfalfa (*Medicago sativa*)

El aporte de proteína, lisina y treonina es significativo, siendo algo superior en la alfalfa deshidratada. Sin embargo, su utilización digestiva es limitada, incluso en rumiantes, por la elevada concentración en taninos. Alrededor de un 25% de la proteína bruta es nitrógeno no proteico altamente soluble en el contenido ruminal. La degradabilidad de la proteína es significativamente inferior en la alfalfa deshidratada que en el heno, por la mayor temperatura del procesado. El contenido en PB condiciona en gran medida su valor en el mercado. Cuanto más tierna se recoge, menor es la producción de MS por ha, pero mayor es la calidad nutritiva, al aumentar la proporción de hojas sobre tallo. Se estima que la PB es un buen indicador de su valor energético, de modo que un aumento de una unidad porcentual de PB sobre MS supone un incremento de 0,03 UFl y 0,04 UFc. En el mercado español se comercializan alfalfas en un rango entre 12 y 18% de PB. En productos de importación se pueden conseguir niveles superiores al 20%. (FEDNA)

Tabla 2. Composición química (%) de la alfalfa

VRF ¹	Humedad	Cenizas	PB	EE	FB	FND	FAD	LAD
Excelente (>151)	10.3	12.4	20.8	2.53	22.9	36.7	27.2	6.32
Primera (125-151)	9.7	11.4	18.7	2.14	27.7	43.6	32.7	7.51
Segunda (103-124)	10.4	11.0	16.8	1.92	30.4	49.1	36.1	8.25
Tercera (87-102)	10.4	10.7	15.0	1.80	34.3	56.0	40.9	8.96
Cuarta (75-86)	10.9	10.4	13.4	1.52	36.7	62.0	44.6	8.96
¹ Valor relativo del forraje = $[(88.9 - (0.779 \times \text{FAD}\%) \times (120 / \text{FND}\%)] / 1.29$								

Fuente: Hernandez, 2013

5.1.2 SOYA (*Glycine max*)

La utilización de la soya se inició en el oriente, en donde a esta leguminosa se le daba un valor tanto alimenticio como medicinal. Su procesamiento para obtener aceite y harina, comenzó en tiempos más recientes y solo despertó interés en Europa hasta el año de 1908. La harina desgrasada de soya sirvió inicialmente como fertilizante y como alimento para el ganado. Su valor nutritivo fue reconocido después de la Segunda Guerra Mundial y actualmente la mayor parte de la harina es utilizada en la formulación de alimentos concentrados para cerdos, aves, peces y ganado bovino (Albarracín, 2010).

Estudios realizados por la Asociación Americana de Soya (ASA) e investigadores como Buitrago, et al., 1992, han demostrado como el grano integral de soya para ser utilizado en dietas para animales debe ser sometido a un proceso térmico el cual destruya los factores antinutricionales presentes en el grano recién cultivado y permite aprovechar al máximo su potencial de energía y proteína (Albarracín, 2010).

Al realizar los análisis nutricionales de la soya tanto en forma de grano crudo como procesado (tostado) y como subproducto (torta de soya), encontraron que la principal diferencia se observa en el porcentaje de grasa en el grano entero el cual es del 17.5% comparado con la torta de soya que solo tiene el 1.5%. También observaron que el mayor porcentaje de proteína correspondía a la torta de soya siendo del 45% comparado con el grano de soya entero que solo tiene el 37.5% (Vergara, 2012).

Para alcanzar el máximo aprovechamiento de los diferentes valores nutricionales del fríjol soya es necesario someterlo a un proceso térmico adecuado el cual permita inhibir la actividad de dichos factores en razón a que son termolábiles la destrucción en mayor o menor grado de estos principios antinutricionales depende de la intensidad de la temperatura y de la duración del proceso (Buitrago, et al., 1992)

Tabla 3. Composición nutricional del grano de soya crudo, grano de soya procesada y de la torta de soya.

Componentes	Unidad	Grano de soya		Torta de soya
		Crudo	Procesado	
Materia seca	%	90	90	90
Grasa	%	17.5	17.5	1.5
Proteína	%	37.5	37.5	45.5
Metionina	%	0.52	0.52	0.70
Metionina + cistina	%	1.08	1.08	1.41
Ácido linoleico	%	8.5	8.5	0.55
Fibra	%	5.5	5.5	3.4
Calcio	%	0.26	0.26	0.30

Fuente: Buitrago, Portela, Eusse. 1992.

Los métodos comúnmente utilizados para procesar la soya son el tostado, extrusión e hidrotérmico. El Método de tostado utiliza equipos a base de calor seco (sin vapor), el cual es aplicado directamente a la superficie del grano por un breve periodo de tiempo. La mayoría de los equipos utilizan airea caliente con temperaturas que oscilan entre 300 a 350 °C durante un tiempo de paso del grano de 1 a 3 minutos y temperatura de salida de 130 a 170 °C. Desde el punto de vista sanitario, este proceso destruye la mayor parte de microorganismos patógenos, insectos, hongos y otros organismos que afectan la calidad del grano. Cuando se realiza con un estricto control, el producto que se obtiene es de alta calidad nutricional y con un nivel mínimo de factores antinutricionales.

El Método de extrusión se recomienda para ser utilizado a nivel empresarial y puede ser extrusión seca o húmeda. En el primer caso se involucra el uso de presión y fricción mecánica, para generar el calor requerido en el calentamiento del grano de soya. En este proceso el grano previamente molido se pasa por un cilindro mediante un tornillo sin fin. El calor originado por la fricción en el cilindro es suficiente para desactivar los factores antinutricionales. Estos equipos trabajan con temperatura entre 150 a 170 °C y un tiempo de retención del grano de 30 a 60 segundos presentándose disminución de un 15% de humedad. La extrusión húmeda incluye el uso de vapor durante el proceso y en el mismo no hay pérdida de humedad (Echegaray, 2011).

Buitrago, afirma que los procesos que involucra la ruptura de las paredes celulares de los esferosomas, mejoran la disponibilidad del aceite almacenado en el interior, elevando el valor energético de la harina integral de soya; debido a ello, la extrusión que combina el calor y daño físico, se asocia con los niveles energéticos más altos. No obstante, la molienda o peletizado en combinación con los procesos térmicos utilizados (tostado, micronización, hidrotérmico) modifican también la estructura celular del aceite y son igualmente efectivos (Wiseman, 1997).

5.5.3 Contenido de fitoestrógenos en harina de alfalfa y soya extruida

Le Bars et al., 1990 mencionan que para alfalfas con una infestación por hongos *Pseudopesisa medicaginis* el valor de fitoestrógenos es significativamente mayor, encontrándose de 50 a 200 mg/kg de forraje, lo que contrasta notablemente con valores de 2 a 5,8 mg/kg encontrados en alfalfas sanas por los mismos autores. En consecuencia es de mencionar que tanto Le Bars et al, como Valderrabano, indican que un consumo de 20 a 50 mg de Coumestrol en alfalfa son suficientes para inducir cambios reproductivos en los animales.

De otra parte la tabla 4 muestra valores obtenidos de la base de datos del USDA, sobre el contenido de isoflavonas en algunos alimentos seleccionados. Dichos parametros son producto de la media tras el análisis de un número considerable de muestras. Sin embargo se plantea que las concentraciones absolutas pueden diferir en poco, según el lote y la temporada de obtención del forraje.

Tabla 4. Contenido de fitoestrógenos en diferentes productos alimenticios

Producto alimenticio	Genisteína (mg / 100g)	Coumestrol (mg / 100g)	Daidzein (mg / 100g)	Isoflavonas totales (mg / 100 g)
Soya en polvo	13.5	-	6.32	26.3
Granos verdes crudos de soya	22.6	-	20.3	48.9
Soya texturizada	89.4	-	67.7	172.6
Soya extruida	57	-	31	91
Trébol rojo	10	-	11	21
Alfalfa (MS)	-	2.5-6.5		2.5 6.5

Fuente Adaptada de la base de datos de la USDA.

6. METODOLOGÍA

6.1 UBICACIÓN GEOGRAFICA

El estudio se realizó en La Granja Experimental Tunguavita, perteneciente a la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Ésta se localiza en el Municipio de Paipa (Boyacá) a una altitud de 2590msnm, a una latitud de 05°45' Norte, longitud 73°45' Oeste, presentando una temperatura promedio de 14.3C, humedad relativa del 78% y precipitación de 705.9mm³/año.

6.2 MATERIALES Y METODOS

6.2.1 Materiales

Figura 2. Materiales usados durante el proceso de análisis de calidad seminal.



Fuente: Sierra, 2014.

6.2.1.1 Material a emplear en la recolección del semen: Durante dicho proceso fueron necesarios varios implementos como: colectores graduados en 0,1 ml (10 ml), estufa de incubación, electroeyaculador para ovinos y caprino

6.2.1.2 Material a emplear en la conservación del semen: Para realizar el proceso de congelación se utilizaron: Pajillas 0,25 ml, peines de aspiración, pinzas con muesca para pajillas, rampa horizontal de congelación, soporte de distribución de pajillas 0,25 ml, termo criogénico para la congelación de pajillas, termo criogénico de almacenamiento de pajuelas, y nitrógeno líquido. De igual forma se utilizaron varios reactivos como: ácido Cítrico, alcohol de polivinilo, BES (Ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), fructosa D(+), glicerol (d 1;26), hidróxido potásico (KOH), penicilina-O sódica, sulfato de dihidroestreptomicina y TRIS (N-Tris (hidroximetil) anilometano)

6.2.1.3 Reactivos utilizados en el análisis del semen (Fresco y Criopreservado)

Reactivos específicos para recuento espermático. Movie esperma (iris), Cuenta esperma (iris).

6.2.2 Población y muestra.

Figura 3. Lote de ovinos machos granja Tunguavita



Figura 4. Animales seleccionados para el estudio



Fuente: Sierra, 2014

Se seleccionaron nueve machos ovinos Hampshire x Suffolk en etapa reproductiva., en edades que oscilaban en entre uno y dos años de edad y con condición corporal de 3,5. Todos los machos fueron mantenidos en régimen de semi-estabulación, con una alimentación homogénea durante todo el periodo de estudio, a base pastoreo en praderas de Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y agua a voluntad.

Todos animales fueron previamente desparasitados con Rafoxanide® 7.5mg/kg, vía oral y vitaminizados con Belamyl® 1 ml/25kg Vía IM y durante el estudio no fueron sometidos a ninguna aplicación de medicamentos ni procedimientos como la esquila que le pudieran causar estrés y modificar calidad espermática.

En cuanto al estado físico se hizo una exploración previa a la suplementación a fin de seleccionar los animales de estudio, los cuales alcanzaron en promedio 31 cm circunferencia escrotal. De igual forma se realizó una revisión física los animales incluyendo los órganos reproductores (escroto, testículos y pene) a fin de descartar

patologías y garantizar que la posible variabilidad en la calidad seminal es producto de la suplementación y no de una conformación anatómica y/o fisiológica de los animales.

6.2.3 Toma de muestras y análisis de semen.

Las diferentes muestras de semen ovino fueron obtenidas mediante electroeyaculador. Se realizó un muestreo antes de comenzar con la suplementación y otro al finalizar con la suplementación al cabo de 120 días, lo que permitió analizar las posibles variaciones en la calidad seminal de los ovinos suplementados comparados con el grupo control.

6.2.3.1. Análisis de semen fresco. Tras la recolección de los diferentes eyaculados, se procedió al traslado de los mismos al laboratorio, manteniendo el semen en todo momento en condiciones isoterma 36°C y posteriormente se realizaron dos tipos de análisis.

- **Análisis macroscópico** Determinándose el volumen, color y aspecto físico del semen, el cual se evaluó visualmente en el mismo tubo colector graduado donde fue recogido el semen, expresándose en ml.
- **Análisis microscópico**

Motilidad masal: Se valoró la formación y progresión de ondas producidas por la masa espermática en movimiento en una escala de 0 a 5 (Maxwell y Evans, 1990). Se colocó una gota de semen fresco sin diluir en un portaobjetos atemperado a 37°C (Derivan, 1982); las ondas fueron observadas mediante microscopio óptico (10x) (conectado a un circuito cerrado de T.V.).

Motilidad individual: Se estimó el porcentaje de espermatozoides en movimiento (de 0 a 100) y la calidad del mismo (de 0 a 5) (Maxwell y Evans, 1990). Se observó en una muestra de semen diluido en citrato sódico isoosmótico, en un portaobjetos previamente

atemperados a 37°C, mediante microscopio óptico (conectado a un circuito cerrado de TV) a 10x.

Concentración espermática: El recuento se realizó por medio de la Cámara de Neubauer y se llevó a cabo a través de los siguientes pasos:

- Se adhirió el cubreobjetos sobre la cámara humedeciendo sus bordes y ejerciendo una firme presión contra esta. Se observó en los bordes del cubreobjetos un fenómeno de difracción de la luz denominado "anillos de Newton".
- Se aspiró el semen con una micropipeta (realizando una dilución de 5 microlitros de semen en 2 ml).
- Se aspiró el líquido de dilución de semen hasta la marca 101.
- Se taparon ambos extremos de la pipeta y se agito horizontalmente en forma suave.
- Se colocó el extremo de la pipeta en el borde del cubreobjetos y se dejó que la cámara se cargara por capilaridad. El líquido no paso a los surcos laterales ni quedó zonas sin cargar.
- Se dejó reposar unos minutos antes de iniciar el recuento.
- Finalmente se colocó la cámara bajo observación microscópica (100 o 200 aumentos). Se contó el número de espermatozoides en un cuadrado "grande" (sin divisiones internas) por cada cuadrante y se repitió el conteo en uno de los cuadrantes elegido al azar, contándose en total 5 cuadrados. La concentración de espermatozoides/ml se calculó multiplicando la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadrados por 200 (factor de dilución) luego por 50.0000 y finalmente por el volumen de semen de cada individuo.

Luego de la contrastación seminal, se procedió a congelación del semen teniendo en cuenta que todos los individuos cumplían en su eyaculado los siguientes requisitos: volumen >0.4 ml; motilidad masal =3-4; concentración espermática = 3.000×10^6 espz/ml formas espermáticas normales = 85 %

La congelación del semen se realizó durante el mismo periodo de colecta y evaluación en fresco, evaluándose el posible efecto ejercido por los fitoestrógenos sobre la integridad de la membrana espermática durante los procesos de congelación-descongelación.

La descongelación del semen se realizó extrayendo la pajilla del tanque criogénico con ayuda de una pinza y colocándolo en baño de agua a 38 °C por 15 a 20 segundos, para luego poner una gota sobre un portaobjetos atemperado y realizar así el análisis de semen pos descongelación.

6.2.4 Manejo del material vegetal.

Se contó con una pradera de Alfalfa (*Medicago sativa*) completamente sana, en la vereda de Cheva municipio de Jenesano Boyacá, la cual cosechó a los 45 días, se sometió a un proceso de deshidratación y posteriormente se trituró para ofrecer a los animales en forma de harina. Se enviaron muestras de harina al laboratorio de Nutrición

animal de la Universidad Nacional para su respectivo análisis bromatológico encontrándose un 17,4% de proteína cruda (PC).

En relación a la Soya extruida, este material fue adquirido en la empresa procesadora de alimentos concentrados COPINALCO. De igual manera se envió una muestra del alimento al mismo laboratorio obteniéndose así un 37% PC.

6.2.3 División de grupos de estudio.

Se tuvieron nueve animales los cuales fueron divididos al azar en tres grupos, manteniendo condiciones homologas en el momento de la conformación de los mismos.

Grupo 1. Se tuvieron 3 machos ovinos suplementados con 1 kg de harina de alfalfa (25 grs de coumestrol según literatura), repartidos en dos dosis y ofrecidos en la mañana y en la tarde a los animales.

Grupo 2. Se tuvieron 3 machos ovinos suplementados con 200 grs de soya extruida (182 grs de fitoestrógenos según literatura), repartidos en dos dosis y ofrecidos en la mañana y en la tarde a los animales.

Grupo 3 o control. Se tuvieron 3 machos ovinos mantenidos con una alimentación a base de pasto kikuyo.

6.2.4 Diseño experimental.

El estudio duro 12 meses, tiempo suficiente para la determinación de la influencia de cada una de las dietas sobre la calidad espermática en semen fresco y congelado. Además es el tiempo estipulado en la mayoría de investigaciones que han realizado en calidad seminal.

Después de elegir y distribuir los animales objeto de estudio, se procedió con la fase de campo, en donde se realizaron dos suplementaciones diarias e individuales de cada suplemento (una en la mañana a las 7 am y otra en la tarde a las 3 pm). Es de mencionar que se estimó un periodo de acostumbramiento de un mes, en el cual los animales se adaptaron completamente a las dietas y al manejo, garantizando así el consumo total del suplemento.

Las dietas fueron suministradas durante un periodo de 120 días (contando 30 días de acostumbramiento y 90 de suplementación real), teniendo en cuenta que el recambio del epitelio de los túbulos seminíferos es de 61 días, lo cual garantizó que los posibles cambios en calidad espermática se dieran a la suplementación con alfalfa y soya.

El diseño experimental fue al azar para determinar diferencias de promedios de: volumen, movilidad masal, movilidad individual, concentración y vitalidad entre los diferentes tiempos (antes y después del tratamiento). Y también en semen fresco y sometido a criopreservación, es relación a esto se determinaron diferencias entre los promedios de las mismas variables por un diseño en bloques.

6.2.5 Análisis estadístico

Los resultados encontrados en este estudio están representados en diferentes tablas y gráficos tras un análisis de varianza univariado para el diseño al azar, para determinar si hubo o no diferencia entre promedios en las diferentes variables (se aplica para volumen, movilidad masal, movilidad individual, concentración y vitalidad) antes y después de la suplementación se determinan las hipótesis: hipótesis nula (H_0): los promedios de las variables son estadísticamente iguales en el tiempo “antes” para los tratamientos alfalfa, soya y control ($p \geq 0.05$); hipótesis alterna (H_a): por lo menos un promedio después de la suplementación es diferente ($p < 0.05$). También se realizó un análisis de varianza univariado para determinar si hay o no diferencia entre promedios de cada variable antes y después de la suplementación.

Se realizó un análisis multivariado para el diseño de bloques para determinar si hay diferencia entre los promedios de “viabilidad, motilidad individual y grado de la motilidad individual” antes y luego de la criopreservación.

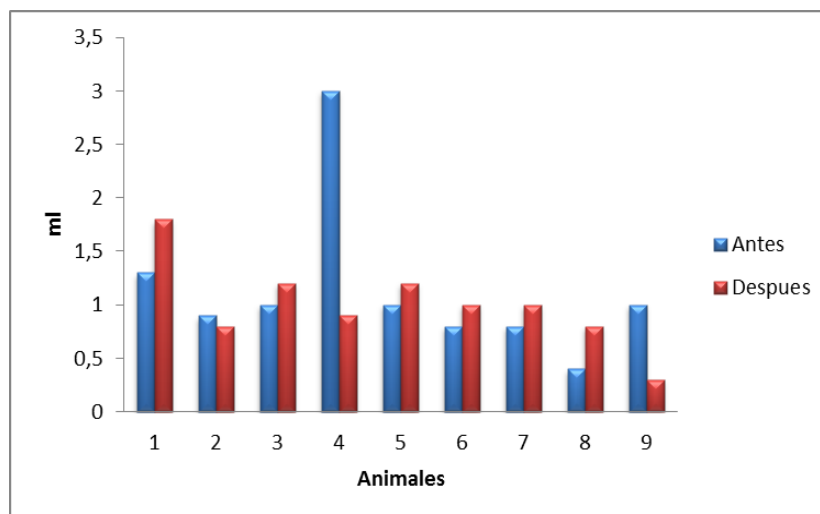
Finalmente se realizó una la prueba de comparación múltiple Diferencia Mínima Significativa (DMS, en inglés LSD: Least Significant Differences) la cual involucra la prueba *T de Student*.

7.RESULTADOS

7.1 ANALISIS MACROSCOPICO

7.1.1 Volumen

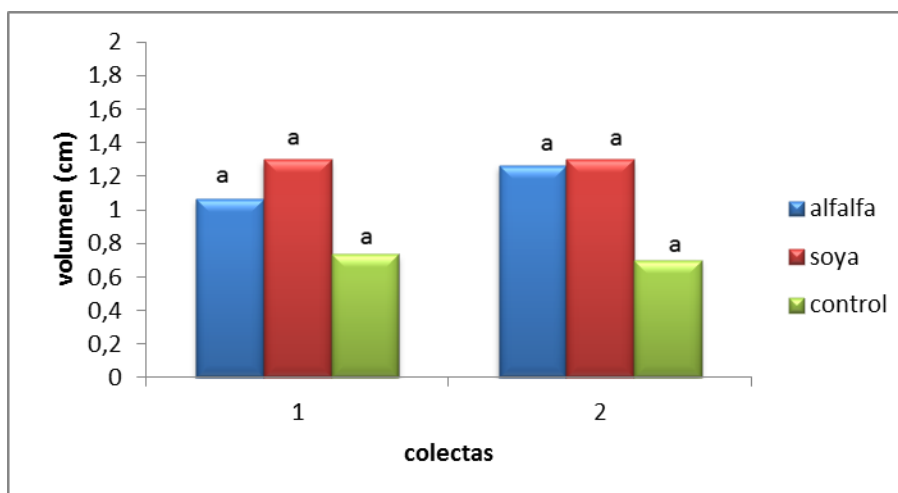
Figura 4. Volumen de eyaculado antes y después, por animal



Fuente: Sierra, 2014

La figura 4 muestra el comportamiento de cada animal antes y después de la suplementación. En donde se evidencia un comportamiento atípico en el animal identificado como 700, el cual mostró una disminución importante del volumen de eyaculado.

Figura 5. Comparación del volumen de eyaculado antes y después de la suplementación



Fuente: Sierra, 2014

Durante la primera colecta de semen en cuanto a la variable volumen el grupo suplementado con soya mostró el mayor promedio siendo el valor máximo 1.6 cm³, seguido del grupo alfalfa y finalmente por el grupo control. En la segunda colecta los mayores volúmenes de eyaculado estuvieron dados de igual manera por el por el grupo soya, seguidos del grupo alfalfa y el grupo control respectivamente. Es de mencionar que el grupo alfalfa presentó un leve aumento en la producción de semen, mientras que el grupo soya y el control se mantuvieron constantes; en relación a esto se estableció que no existen diferencias estadísticamente significativas $P > 0,05$ entre los grupos luego de la suplementación.

Según anteriormente descrito, se puede establecer que el volumen de eyaculado en los animales objeto de estudio está dentro de los valores promedio para este parámetro en las razas Hampshire x Suffolk. De igual forma es claro que existen variaciones (aunque no significativas) que para este caso se pueden deber tanto a la alimentación como al tamaño testicular de los individuos.

7.1.2 Color

Figura 6. Análisis de la coloración del semen después de la colecta



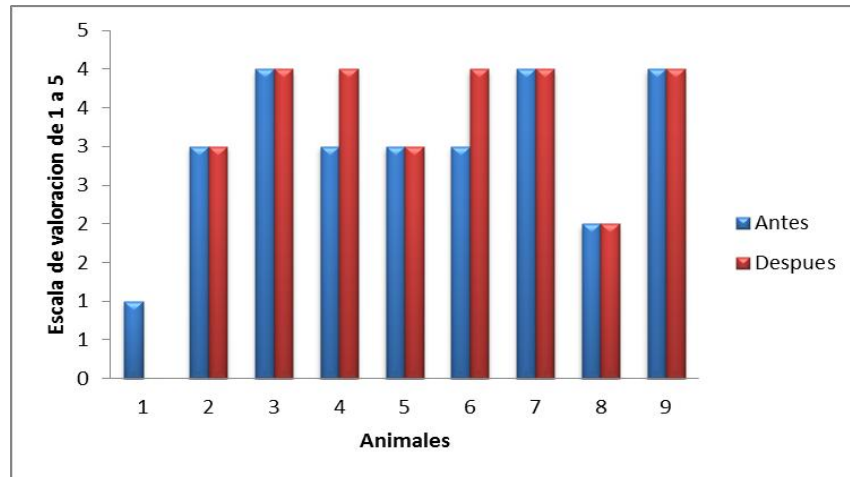
Fuente: Sierra, 2014

En el estudio se estableció que la coloración antes y después de la suplementación no tuvo ninguna variación y por ende no hay diferencias significativas $P > 0,05$ entre los grupos, esto en relación a que el total de los individuos mostraron una coloración blanco marfil independientemente del tiempo de colecta y el tratamiento.

7.2. ANALISIS MICROSCOPICO

7.2.1 Motilidad Masal

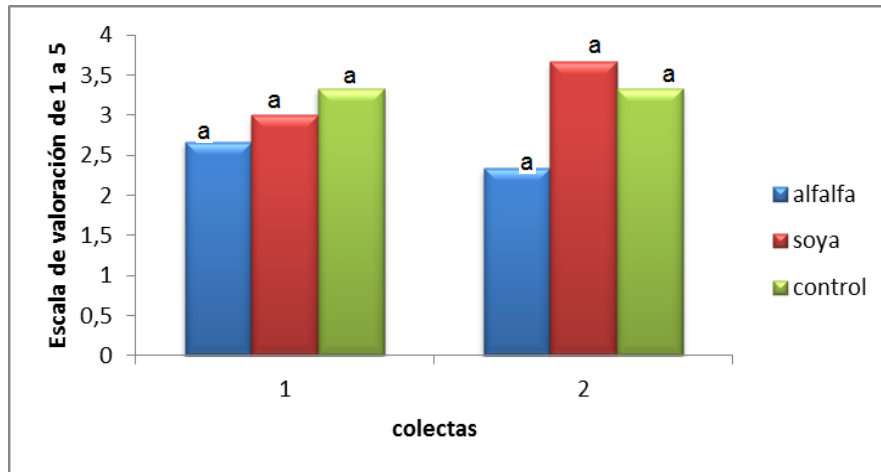
Figura 7. Motilidad masal antes y después de la suplementación, por individuos



Fuente: Sierra, 2014

De acuerdo a la figura anterior es posible establecer que todos los individuos tuvieron un desempeño similar, en donde a excepción del animal 1, no se presentaron reducciones antes y después de la suplementación para la variable motilidad masal (MS). Cabe decir además que los animales 4 y 6 sí presentaron incrementos en la valoración de la MS, por lo que se asume que el mejor desempeño del grupo soya se ve influenciado directamente con dichos resultados.

Figura 8. Motilidad masal antes y después de la suplementación, por grupos



Fuente: Sierra, 2014

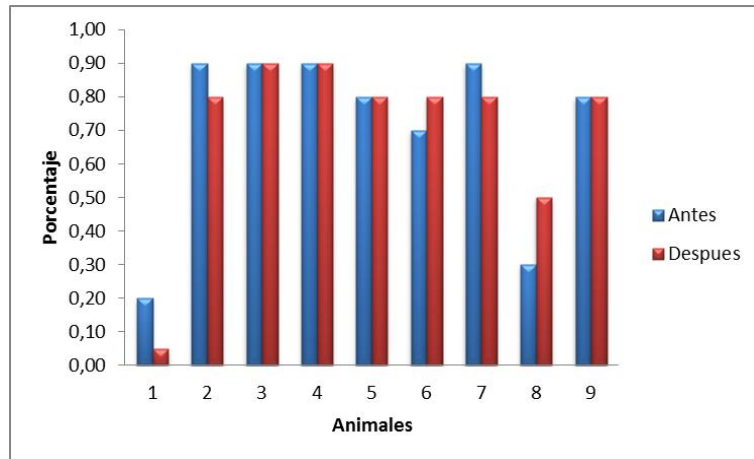
En relación a la Figura 8, se deduce que en cuanto a la variable motilidad masal los machos suplementados con soya tuvieron un mejor comportamiento, puesto que en la colecta 1 la valoración para este grupo tuvo un promedio de 3 mientras que en la colecta 2 el mismo grupo mostro una estimación mayor (3.5 en promedio), definida por la observación de movimientos masivos, muy marcados y rápidos. De otra parte el grupo alfalfa aunque comenzó con un promedio (2.8) este decayó luego de la suplementación, es de mencionar que en la segunda evaluación se evidenciaron movimientos en masa aparentes, pero un poco más moderados comparado con los grupos soya y control. Finalmente el grupo control no tuvo ninguna variación en el tiempo siendo la motilidad masal de 3.3 en promedio antes y luego de los 90 días de estudio. En referencia a esto no se establecen diferencias estadísticamente significativas $P > 0,05$ entre los grupos en ningún momento durante el tiempo de experimentación.

Según lo anteriormente descrito, se puede afirmar que la motilidad masal depende de muchos factores entre los cuales es preciso citar la edad, la raza, el reposo sexual, el manejo (con una total reducción del estrés), el estado fisiológico y sanitario y la alimentación; y teniendo en cuenta que en el presente estudio todos estos parametros fueron

altamente controlados, es posible asumir que la motilidad es una variable influenciada por la respuesta fisiológica y la capacidad reproductiva de cada individuo.

7.2.2 Motilidad progresiva individual

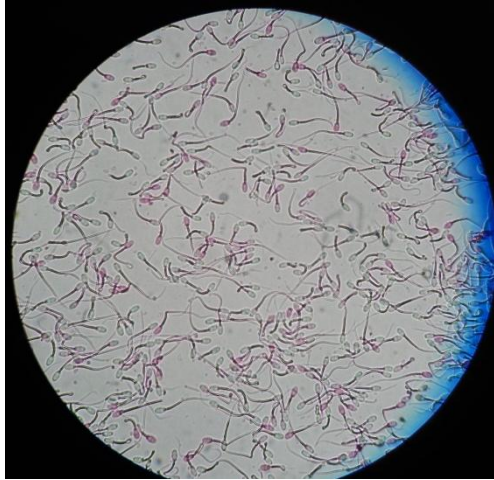
Figura 9. Motilidad progresiva individual, antes y después de la suplementación



Fuente: Sierra, 2014

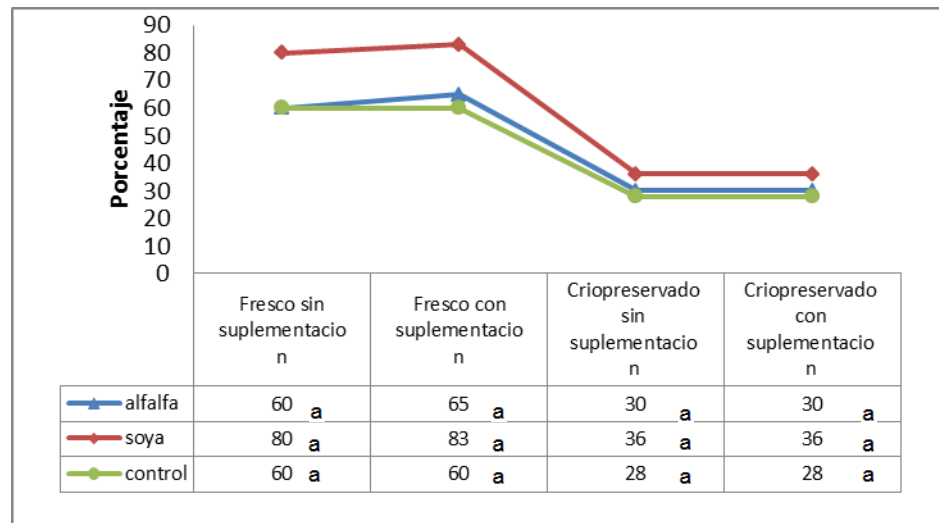
En relación a la Motilidad Progresiva Individual (MPI), se establece un comportamiento atípico en dos animales del grupo alfalfa (1 y 2) los cuales para la segunda colecta mostraron una reducción en el porcentaje de espermatozoides motiles. Dicho factor influencia directamente el desempeño del grupo y sobre todo deja ver que dicha variable está determinada por una respuesta propia de cada individuo.

Figura 10. Espermatozoides teñidos con Movie esperma IRIS, para evaluación de motilidad y vitalidad



Fuente: Sierra, 2014

Figura 11. Motilidad progresiva individual en semen fresco y sometido a criopreservación antes y después de la suplementación



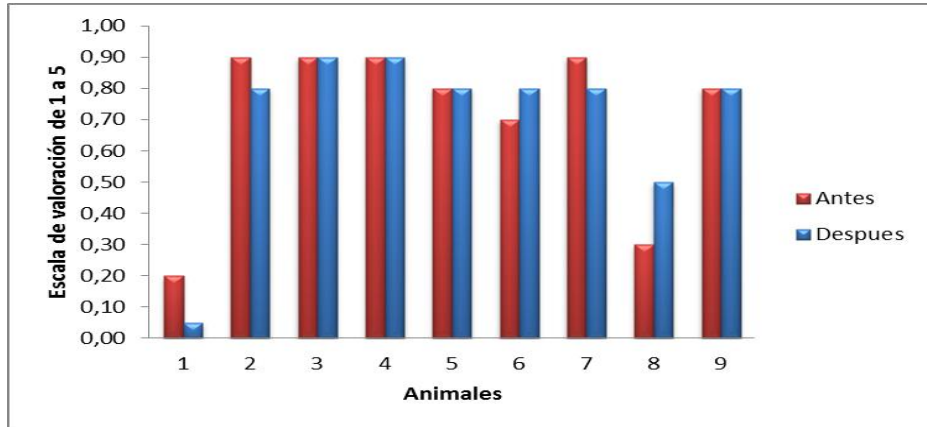
Fuente: Sierra, 2014

En la figura 11, se observan cambios durante el periodo de estudio para la variable MPI, la cual se determinó considerando como movimiento normal únicamente el movimiento progresivo rectilíneo, cualquier otro movimiento se tomó como anormal. En relación a esto, tras la evaluación del semen fresco se encontró que el grupo soya desde el comienzo tuvo el promedio más alto, alcanzando una MPI del 80% y la cual luego del tratamiento presentó un ligero aumento pero sin evidencias de diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). El grupo suplementado con alfalfa mostró un comportamiento similar, sin embargo el promedio estuvo siempre por debajo del ya mencionado; en dicho grupo se evidenció un leve incremento sin diferencias significativas ($P > 0,05$) de la MPI luego del tratamiento, alcanzando un promedio del 65%. De otra parte el grupo control tuvo un desempeño diferente, puesto que durante el estudio no se evidenciaron cambios, los valores de la MPI se mantuvieron constantes durante las dos colectas siendo el promedio del 60%.

En la figura también se muestra el impacto que tuvo la criopreservación del semen obtenido antes y después de la suplementación, como es normal se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre el semen fresco y criopreservado para la MPI en cada uno de los grupos pero no entre estos. Sin embargo, tras el análisis del semen criopreservado es posible afirmar que ninguno de los grupos tuvieron un aumento de la MPI luego del proceso de suplementación, por tanto no se establecieron diferencias significativas al respecto.

7.2.3 Grado de la motilidad progresiva individual

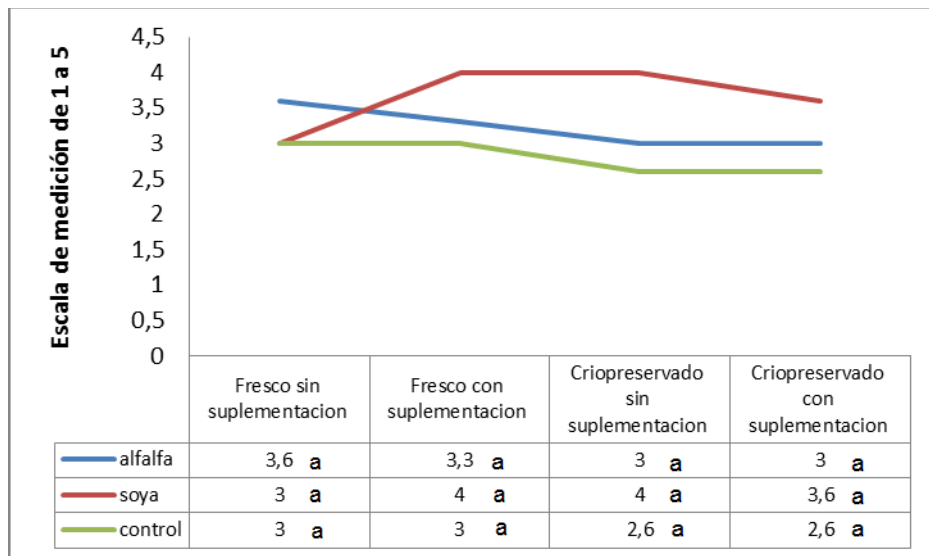
Figura 12. Grado de la motilidad progresiva individual en semen fresco y sometido a criopreservación antes y después de la suplementación por individuos



Fuente: Sierra, 2014

En relación a la figura 12 es posible establecer que el grado de la motilidad progresiva individual GMPI, tuvo un comportamiento similar a lo encontrado en la MPI, pues al igual que en esta, los individuos 1 y 2 (del grupo alfalfa) y el individuo 7 (del grupo control), mostraron un comportamiento atípico y mostrando una reducción de la MPI. Lo que sin lugar a dudas determino el desempeño del grupo.

Figura 13. Grado de la motilidad progresiva individual en semen fresco y sometido a criopreservación antes y después de la suplementación por grupos



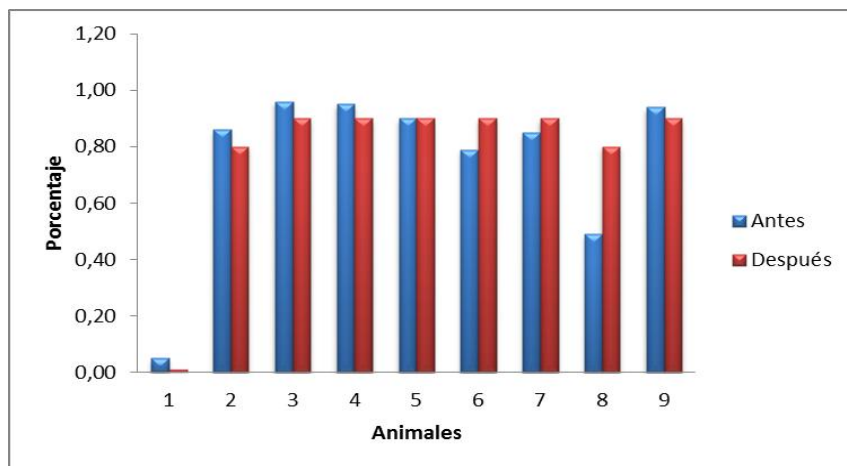
Fuente: Sierra, 2014

En la figura 13, se evidencia que el grado de la motilidad progresiva individual (GMPI) está íntimamente relacionada con la valoración de la propia motilidad, por tal razón durante el estudio fue claro que el grupo que presento desde el inicio un mayor GMPI fue el grupo suplementado con soya, sin embargo se debe mencionar que dicho grupo presentó un comportamiento distinto a los otros dos, sobre todo durante la valoración del semen criopreservado antes y después de la suplementación, pues se detectó un descenso del grado de motilidad en los dos periodos de estudio. Simultáneamente el grupo alfalfa decayó en cuanto al GMPI luego de la suplementación al evaluar el semen fresco pasando de 3.3 a 3.

Tras la evaluación del semen criopreservado para el mismo grupo los espermatozoides mostraron un GMPI constante entendiéndose como un grado 3 en donde se encontraron un buen número de espermatozoides con movimientos progresivos, con trayectorias rectilíneas aunque un poco moderados respecto al grupo soya. Finalmente el grupo control estuvo siempre por debajo de los dos grupos sometidos a tratamiento, mostrando en promedio un grado de 3 y 2.6 tanto en semen fresco como criopreservado respectivamente.

7.2.4 Vitalidad

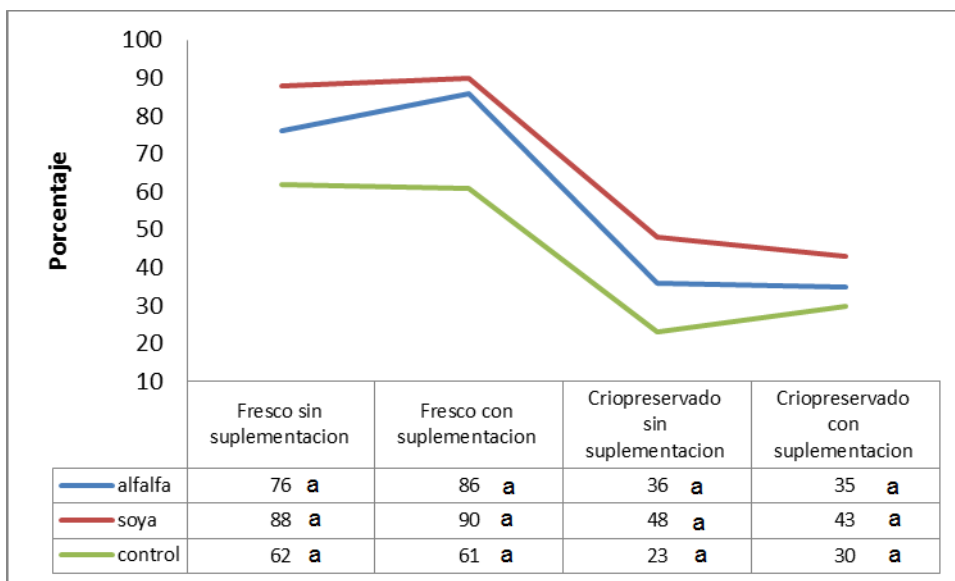
Figura 14. Vitalidad en semen fresco antes y después de la suplementación, por individuos



Fuente: Sierra, 2014

Según lo observado en la figura anterior, la vitalidad es un factor determinado no solo por el tipo de suplemento sino sobre todo por la respuesta fisiológica propia de cada individuo. Si bien el promedio del grupo soya, alfalfa y control muestran que soya puede ser un poco más eficiente, el comportamiento en todos los animales de estudio es similar. Es decir el vitalidad disminuye o aumenta sin importar el tipo de suplemento.

Figura 15. Vitalidad en semen fresco y sometido a criopreservación antes y después de la suplementación, por grupos



Fuente: Sierra, 2014

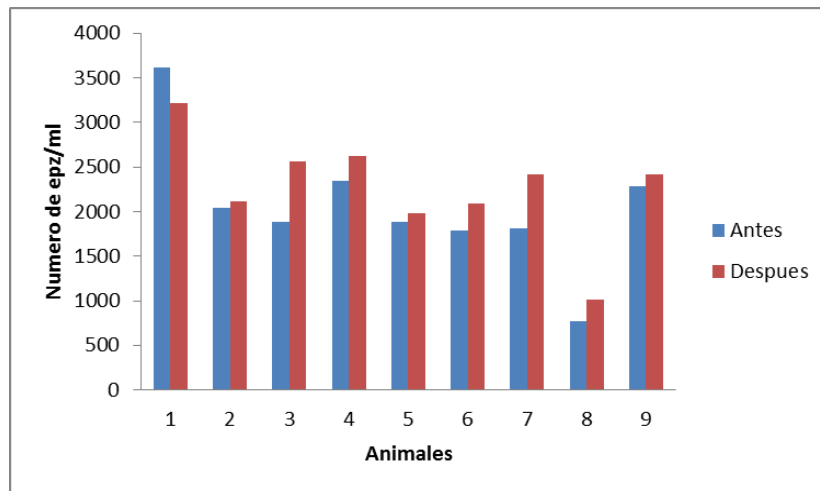
Al analizar la figura 15 se deduce que el grupo soya obtuvo los mejores rendimientos en cuanto a vitalidad de los espermatozoides, tanto antes como después de la suplementación en semen fresco. Dicho grupo obtuvo en promedio un mayor porcentaje de células vivas (88%) al iniciar el estudio, posteriormente tras la suplementación se evidenció un leve incremento (90%). Dichos parámetros estuvieron por encima del grupo alfalfa el cual mostró un 76% de vitalidad al inicio y posteriormente también elevó un poco el rango (comparado al grupo soya) hasta llegar al 86% de vitalidad. De otra parte el grupo control mantuvo los niveles más bajos de vitalidad comenzando con un 62% y decayendo en la segunda colecta al 57%.

Consecuentemente tras el proceso de congelación se estableció que un gran número de espermatozoides murieron, observándose en los tres grupos un descenso en el porcentaje de vitalidad. Es importante resaltar que el grupo soya paso del 88% al 48% de vitalidad en la primera colecta y en la segunda de 90% a 43%, es decir la reducción fue del 40% aproximadamente, rango un poco menor comparado con el grupo alfalfa en donde se estimó que la vitalidad en la primera colecta fue del 76% reduciéndose al 36% y en la segunda recolección de semen paso del 86% al 35%, mostrando un descenso un poco más brusco de la vitalidad luego de la criopreservación. En relación al grupo control la vitalidad paso del 62% al 23% y del 61% al 30% para la primera y segunda colecta respectivamente.

Durante el estudio los cambios inducidos por la criopreservación, se presentaron indistintamente en relación al suplemento y fueron muy similares en los nueve machos observados sin mostrar diferencias significativas entre estos ($P>0,05$). Las diferencias quedaron establecidas casi exclusivamente por el porcentaje de espermatozoides muertos luego de la congelación ($P<0,05$). Es interesante señalar que se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides motiles al inicio del experimento y la viabilidad luego de la congelación, lo que indica que los eyaculados que contenían la mayor proporción de espermatozoides rápidos y progresivos fueron también los de mayor resistencia a la congelación y los que mostraron mayor longevidad pos descongelación.

7.2.5 Concentración espermática

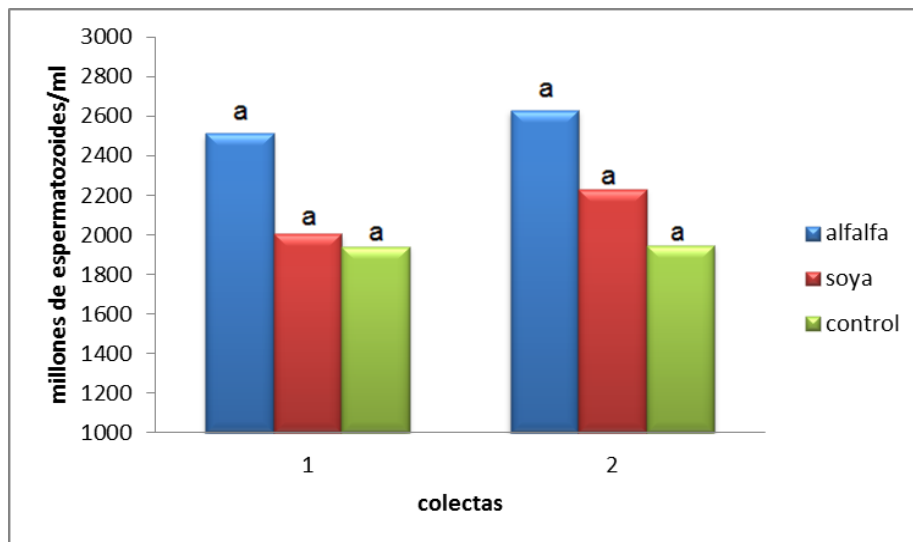
Figura 16. Concentración espermática antes y después de la suplementación, por individuo



Fuente: Sierra, 2014

De acuerdo a la figura anterior se afirma que todos los machos de estudio tuvieron un buen desempeño en cuanto a la variable concentración, sin embargo del individuo “1” al igual que en las demás variables, mostró un comportamiento diferente y atípico. Esto último dado a que se esperaba que luego de 90 días de reposo sexual y suplementación dichos valores aumentarían.

Figura 17. Concentración espermática antes y después de la suplementación por grupos



Fuente: Sierra, 2014

Tras el análisis de la figura 17 se deduce que la concentración espermática inicial no se vio afectada significativamente por la dieta y la presencia de fitoestrógenos en esta, dado que el que el grupo alfalfa a diferencia de los demás parámetros evaluados durante el estudio tuvo el mayor promedio en relación a los grupos soya y control. Sin embargo es de mencionar que dicho valor fue alto desde el inicio de la experimentación (2512×10^6 espermatozoides/ml) por consiguiente se mantuvo alto (2629×10^6 espermatozoides/ml) tras un leve incremento luego de los 90 días de suplementación. Respecto al grupo soya el comportamiento fue similar ya que el grupo comenzó con un buen promedio (2004×10^6 espermatozoides/ml) y de igual forma mostró un aumento sustancial en la segunda colecta (2229×10^6 espermatozoides/ml). Finalmente el grupo control siempre fue el de menor promedio sin mostrar cambio alguno en la concentración espermática (de 1941×10^6 espermatozoides/ml a 1946×10^6 espermatozoides/ml) luego del periodo de estudio. Lo que permite establecer que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los grupos en ningún tiempo de experimentación (antes y después de la suplementación).

8. DISCUSION

Variables macroscópicas

Volumen de eyaculado

En relación a esta variable, los resultados obtenidos concuerdan con otras investigaciones (Wilson, *et al* 1987), en las que trabajando con niveles de 9, 12 y 15% de proteína, encuentran un efecto lineal aunque no significativo en los parametros de calidad de semen específicamente para el volumen de eyaculado. Lo encontrado en el presente estudio también ratifica lo reportado en otros trabajos (Hocking, 1989), en donde se evaluó el efecto de diferentes niveles de proteína desde 8 a 40%, donde no se observaron evidencias de la interacción entre la edad y el tratamiento en el volumen y la concentración del semen eyaculado. De la misma manera Fontana *et al* (1990), utilizando diferentes valores de proteína en la dieta, observaron que estos niveles proteicos tienen un mínimo efecto sobre la calidad del semen.

En otro trabajo McDaniel (1986), estudio el efecto del nivel de proteína en la dieta sobre la producción de semen en machos reproductores en un periodo de 48 a 53 semanas, encontrando que un nivel de proteína alto puede llegar a reducir el volumen de semen, mientras que con un nivel proteico menor (12%) la producción de semen se mantiene dentro de los parámetros normales.

De igual forma se establecen variaciones según el método de recogida, especie, estado fisiológico, raza, edad, tamaño corporal y testicular, alimentación y régimen sexual al que

se somete el macho. En estudios realizados por Ceiro *et al.* (2006) se encontró que el diámetro testicular presenta una correlación en mayor con la cantidad de eyaculado respecto a otros parámetros de calidad seminal.

En relación al análisis macroscópico el color del semen ovino varía del blanco cremoso al amarillento. Dicha coloración, es producida por la presencia de un pigmento llamado riboflavina que se produce en las glándulas vesiculares (Mendoza *et al.*, 1989) (Hafez, 2003) y está sujeta a variaciones raciales e individuales.

La densidad que presenta el semen de pequeños rumiantes es debido a su alta concentración, evidente en este estudio, en donde este parámetro fue contrastado con la concentración espermática, reiterando lo informado por Maxweil y Evaus, 1990.

Variables microscópicas

En referencia a las variables microscópicas durante el estudio se reafirmaron los estudios de Mori (1959) y Setchell *et al.*, (1965), en donde diferentes grupos de ovinos de diferentes razas fueron sometidos a subalimentación observando no solo una reducción del volumen y concentración espermática sino una disminución drástica de la motilidad. Otros estudios destacan que la calidad del semen producido, medido como recuento de espermatozoides y motilidad, también se reduce por la desnutrición durante un período de tiempo mayor a 7 semanas (Parker y Thwaites, 1972; Robinson *et al.*, 2006). Hiroe y Tomizuka (1965), también encontraron que la pérdida de masa corporal se asocia con reducciones en la producción y motilidad de los espermatozoides. En tales casos la nutrición afecta claramente el desarrollo testicular y la producción y motilidad de espermatozoides, sin embargo dichos efectos negativos son solamente observables bajo condiciones de déficit nutricional excesivo, que para el caso de este estudio no se presentó en ninguno de los grupos.

Asimismo es pertinente hacer referencia a lo encontrado por Martin et al., 2010, quienes mencionan que en ovinos y caprinos maduros reproductivamente, los cambios en el consumo de alimento parecen tener poco efecto sobre la función endocrina gonadal excepto con la subalimentación grave, en donde se identifican pequeños cambios en la producción de testosterona y en consecuencia posiblemente sobre la motilidad. De igual manera se establece que los efectos de la nutrición en el comportamiento sexual es muy difícil de definir, dado a que este se ve afectado por una mezcla compleja de factores fisiológicos. (Martin, et al., 2010).

Finalmente en relación al consumo de dietas ricas en fitoestrógenos (soya y alfalfa) a corto plazo, parece no tener ningún efecto sobre la motilidad masal del semen ovino, lo cual confirma lo reportado por Mitchell et al., 2001 quienes al suplementar un grupos de machos con 40 mg de isoflavonas al día durante 2 meses establecen que no hubo ningún efecto observable en las mediciones endocrinas, volumen testicular o parámetros de semen (motilidad y concentración) durante el período de estudio (Mitchell, et al., 2001).

Motilidad individual

De otra parte en relación a la motilidad individual, lo encontrado en el experimento realizado se explica teniendo en cuenta que los espermatozoides maduros son esencialmente células catabólicas que tienen una serie de organelos como el axónema y las mitocondrias que aseguran los patrones de motilidad que ayudarán en la movilización del espermatozoide y a la penetración de la zona pélcida. El patrón de movimiento espermático está modulado por numerosos factores y a su vez está íntimamente relacionado con la gestión del metabolismo energético espermático (Rigau et al., 2001). La pérdida de la motilidad flagelar está directamente relacionada con alteraciones del axónema e indirectamente con una disminución en la producción ATP (Rodríguez-Martínez et al., 1997).

Siendo la motilidad flagelar progresiva y lineal, estimulada tras la eyaculación y modulada durante el tránsito a través del tracto reproductivo de la hembra (Davis y Siemers, 1995) e implicando cambios secuenciales importantes que reflejan modificaciones en la actividad metabólica de los espermatozoides, puesto que la motilidad es la principal causa del consumo energético espermático (Roldan et al., 1998). Finalmente se debe mencionar que la motilidad espermática postdescongelación se ve afectada por daños ultraestructurales, bioquímicos y cambios funcionales causados por la congelación y la descongelación (Dorado et al., 2007).

El efecto de los fitoestrógenos presentes en los suplementos ofrecidos durante el experimento a los ovinos, parece no tener ninguna influencia sobre la MPI tanto en el semen fresco como criopreservado. Es posible establecer que la presencia de dichos compuestos en los forrajes para consumo animal no provee una mayor protección de la membrana del espermatozoide que permita aumentar la MPI luego del proceso de descongelación. Esto es igualmente reportado por Kyselova et al., 2004 en donde se demuestra no hay ningún efecto reproductivo (sobre el peso de órganos reproductivos y calidad seminal) en dos generaciones de ratones expuestos a fitoestrógenos durante toda su vida.

También Tetsuji et al., 2003 estudiaron los efectos reproductivos a largo plazo ante la exposición a diferentes niveles de fitoestrógenos (0, 0,1, 0,5, 2,5 y 10 mg / kg / día) en ratones machos, evaluando así el crecimiento testicular, el recuento de espermatozoides, la motilidad y el número de espermatozoides con capacidad fecundante, observando que no hay efectos significativos relacionados con el tratamiento sobre el peso de órganos reproductivos, así como tampoco sobre el recuento de espermatozoides y el porcentaje de espermatozoides móviles a cualquier edad, por lo que se concluyó que las diferentes concentraciones de fitoestrógenos en la alimentación en ratones no induce efectos adversos o benéficos en la calidad del espermatozoide o los cambios la conformación testicular. (Tetsuji, et al., 2003)

En el otro extremo estudios in vitro, han demostrado que la Genisteina GEN (fitoestrógeno presente la alfalfa y soya) induce la apoptosis en líneas celulares derivadas de las células de Leydig en ratones, de manera dependiente de la concentración administrada. Así mismo produce disminución en el número de montas y eyaculaciones en ratones (Iwase *et al.*, 2006). En ratas macho de 2 días de nacidos a los cuales se les inyectaron 4 mg kg⁻¹ de GEN por vía subcutánea durante 16 días, se inhibió el desarrollo testicular a corto y largo plazo. Así mismo, cuando llegaron a la edad adulta, se afectó el número de crías por camada (Atanassova *et al.*, 2000).

Del mismo modo, en un estudio efectuado en toros, la ingestión de pasturas que contienen Coumestrol ocasiono metaplasia glandular y epitelial tanto en próstata como glándulas bulbo-uretrales. Así mismo, se presenta mayor número de espermatozoides inmaduros y con una disminución significativa en la motilidad (Romero *et al.*, 1997).

Grado de la motilidad individual

En consecuencia, el grado de la motilidad espermática esta intrínsecamente relacionada con la el porcentaje de células motiles. Y con respecto a esta variable, los resultados que se obtuvieron en el presente estudio revelaron que el cambio de temperatura de fresco a descongelado provocó en los espermatozoides pérdida de la motilidad y del grado, con diferencias significativas ($P < 0.05$) en relación a la temperatura, mas no entre grupos ($P > 0.05$). El porcentaje más alto de espermatozoides y con mayor grado se observó en el grupo soya, el segundo lugar fue para el grupo alfalfa y con el porcentaje y grado más bajo el control. Resultados que coinciden con lo reportado por Flores (2005), quien describe que la motilidad individual y el grado de la misma se disminuye al someter el semen a un proceso de congelación. Otros estudios realizados en diferentes especies mencionan que la motilidad y el grado puede variar entre un 20 y 50 % después de la congelación, encontrándose por ende tasas de parición menores (Almlid y Hofmo, 1996; Gadea et al., 2001 2003). El proceso de congelado-descongelado del semen ocasiona una disminución en

el porcentaje de espermatozoides motiles, lo que afecta el grado o fuerza del movimiento (Huang et al., 1999, Ruiz et al., 2002, 2003).

De Leeuw, et al. (1991), reportaron que el enfriado del espermatozoide en general disminuye el porcentaje de células con membrana intacta, ya que se considera que la membrana plasmática es la estructura celular que presenta mayor daño en su integridad (Watson, 2000; Holt et al., 2005; Meyers, 2005). El cambio de fluidez hace que la membrana plasmática se desestabilice y sea susceptible a que ocurra una reacción acrosomal prematura, lo que trae como consecuencia un menor grado de la MPI y finalmente hace que la vida de los espermatozoides se vea acortada (Ruiz et al., 2002; Matás et al., 2002; Martínez et al., 2006

Vitalidad

Resultados similares se encontraron también en eyaculados humanos (Davis y cols., 1995) y de perros (Núñez-Martínez y cols., 2006) y se ha sugerido que los espermatozoides que pertenecen a los clusters de mayor velocidad y con movimiento más progresivo pueden ser considerados los de mayor capacidad fecundante (Quintero, et al 2003; Cremades, et al., 2005; Núñez., et al., 2006).

A partir de lo observado en el estudio se establece que la criopreservacion conlleva a una disminución de la viabilidad, tal vez dada por la formación de cristales de hielo intracelulares que es el factor letal (Mazur, 1977). No hay discusión en cuanto a la idea de que la muerte celular está asociada con la presencia de gran cantidad de cristales de hielo intracelulares, pero algunos estudios han demostrado que pequeñas cantidades de hielo intracelular, no necesariamente son incompatibles con la supervivencia (Sherman, 1962). Sin embargo Farrant et al., (1977) demostraron que el hielo intracelular y el tamaño de los cristales son lo que determinan la supervivencia. Las células congeladas rápidamente (con conteniendo cristales de hielo intracelulares), sobrevivirán sólo si son descongeladas

rápidamente. El recalentamiento lento da tiempo para la re cristalización y la descongelación es el proceso perjudicial.

Otros trabajos reportan que en general se reconoce una alteración de la fertilidad al comparar el semen de mamíferos criopreservados en comparación al semen fresco. La reducción surge tanto en la viabilidad como en la motilidad, los factores que afectan la supervivencia de los espermatozoides pueden ser la susceptibilidad al choque por frío, la composición del diluyente y el estrés osmótico durante la congelación, pero también se mencionan factores implícitos al espermatozoide como es el estado funcional, la estabilidad de la membrana y la estructura nuclear (Watson, 2000). Es así como no se establece un efecto directo de la suplementación con ricas en fitoestrógenos sobre la viabilidad del semen luego de la congelación, lo que se confirma con lo reportado por Zhang, et al., 2014, en donde se establece que las isoflavonas exhiben débiles efectos estrogénicos y potencialmente antioxidantes en el semen en ratas.

De igual forma es pertinente mencionar que el efecto de la leche de soya (con alto contenido de fitoestrógenos) sobre la fertilidad de ratones macho de 4 semanas de edad y suplementados durante 90 días si causa un efecto aunque nocivo sobre algunos parametros de calidad seminal. En dicho estudio la movilidad y el porcentaje de células vivas disminuyo muy significativamente ($p < 0,01$), en todos los animales que consumieron leche de soya (Zerriouh, et al., 2014).

Concentración espermática

Lo observado en el estudio se corrobora según los experimentos de Ryökkynen et al., 2006 en donde ratones machos recién nacidos fueron expuestos al consumo de GN encontrándose mayores pesos en la próstata y las vesículas seminales en relación control. En los machos adultos el tratamiento genisteína disminuyó las concentraciones de

estradiol en plasma. Sin embargo tras el análisis de calidad seminal no se observaron diferencias significativas que pudieran poner en peligro la vida reproductiva de los ratones. (Ryökkynen, et al., 2006).

Otros estudios en animales y ensayos de intervención humana han demostrado que luego de la suplementación con fitoestrógenos, el volumen de eyaculado, concentración espermática, el recuento total de espermatozoides, la motilidad y morfología no muestra ningún efecto observable durante el período de estudio (Mitchell., et al., 2001).

Sin embargo es necesario mencionar otros estudios en donde demuestra que el consumo de fitoestrógenos tras la ingesta de soya puede influenciar negativamente sobre el número de células testiculares y epididimales las cuales disminuyeron de manera significativa ($p < 0,01$). De igual forma la tasa de testosterona sérica disminuye significativamente ($p < 0,01$) para el grupo suplementado ($1,08 \pm 0,41 \text{ ng / ml}$) con respecto a los testigos ($6,21 \pm 1,54 \text{ ng / ml}$). Estos resultados indican que la ingestión de la leche de soya provoca un cambio significativo de la fertilidad de los ratones macho (Zerriouh, et al., 2014).

CONCLUSIONES

- A una dosis de 200grs/día/animal de soya extruida en ovinos Hampshire x Suffolk en etapa reproductiva no se encontraron efectos sobre la concentración espermática, viabilidad y motilidad espermática en semen fresco. Por tanto no se establecen diferencias significativas respecto a los animales que fueron mantenidos en praderas de pasto kikuyo.
- A una dosis de 1000grs/día/animal de alfalfa Hampshire x Suffolk en etapa reproductiva, no se generan cambios significativos en la calidad del semen fresco en ovinos, esto en relación al grupo control.
- La soya y la alfalfa y su concentración de fitoestrógenos no influyen sobre la calidad espermática del semen ovino criopreservado. Los cambios son dados únicamente por la variación de temperatura durante y después de la congelación. Por tanto no se relaciona la calidad seminal con algún efecto antioxidante o crioprotector de los fitoestrógenos.
- En este estudio las dietas ricas en fitoestrógenos no desmejoraron la calidad del semen fresco, así como tampoco ofrecieron al espermatozoide una protección antioxidante durante el proceso de congelación.
- De acuerdo con los resultados obtenidos tras el experimento, se concluye que en el semen congelado, se presenta una reducción de motilidad debido a cambios estructurales y fisiológicos de los espermatozoides y su severidad depende del genotipo (individuo) y el efecto de la temperatura.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, N.R. Detección of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 1995; 73: 1509-1515.
- Aitken, R.J. A free radical theory of male infertility. *Reproduction fertility and development.* 1994, vol. 6 9–23.
- Angarita E. El uso del ultrasonido en pruebas de fertilidad en los toros. *El Cebú* 2000; 314: 59-66
- Arruda R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescencia, citometria de fluxo, análises computarizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000; (Livre docencia), Tese de pós-graduação. Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de Sao Pablo. 121p
- Ax R.L.; Dally M.R.; Didion B.A.; Lenz R.W.; Love C.C.; Varner D.D.; Hafez B.; Bellin M.E. (2000a) Evaluación del semen. En: Hafez, E.S.; Hafez. B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*, 7ªed. Mexico, McGraw-Hill Interamericana pp. 375-386
- Barth AD, Bowman PA. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Can Vet J* 1994;34:93–102.
- Baker, M.; Medlock, K. & Sheehan, D. Flavonoids inhibit estrogen binding to rat alpha-fetoprotein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217:317. 1998

- Bonadonna, T. Reproducción animal e inseminación artificial, 1989; 2ª ed. Buenos Aires. Hemisferio Sur, 2v.
- Bickoff, E.M., A.L. Livingston, A.P. Hendrickson and A.M. Booth. 1962. Relative potencies of several estrogen like compounds found in forages. *Agric. Food Chem.*, 10: 410-412.
- Brito LF, Silva AE et ál. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci* 2002; 70 (3-4): 181-90).
- Buitrago, A. J., y Eusse, G. Grano de soya en alimentación de cerdos y aves, 1992. Asociación Americana de Soya
- Cantero, M.A., I. Vázquez y T. González. 1993. Alteraciones del moco cervical ovino debidas al consumo de fitoestrógenos. *Subdirección General de Investigación Agraria. Vol II: 271-277.*
- Conquer, J.A., Martin, J.B., Tummon, I., Watson, L., Tekpetey, F. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. *Lipids*, 2000. 35, 149–154.
- Cortes, S. 2002. Efectos de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Universidad Complutense de Madrid. 202 p.
- Cox, R.I. & Braden, A.W.H. The metabolism and physiological effects of phyto-oestrogens in livestock. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 10:122. 1974
- Cuoto, R.J. 1989. *Toxicología Veterinaria*. Salvat, México.

- Chenoweth PJ, Chase CC Jr et ál. Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. *Theriogenology* 2000; 53 (5): 1193-203
- Dewick, P.M. and M. Martin. 1979. Biosynthesis of pterocarpan, isoflavan and coumestran metabolites of *Medicago sativa*: Chalcone, isoflavone and isoflavanone precursors. *Phytochemistry*, 18: 597-602.
- Echegaray, J. K. (2011). WPSA. Recuperado el 23 de 11 de 2014, de http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/05_06_51_SojaIntegral.pdf
- Franke, A.A., L.J. Custer and C.M. Cerna. 1994. Cuantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC: *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1905-1913. Galina, C., A. Sattied y J. Valencia. 1991. Reproducción de animales domésticos. Editorial Limusa. México.
- Hafez, B. 2003. *Reproduction in farm animals*. 8th edition. Baltimore/USA. LEA & FEBIGER. Pp.: 09.
- Hidalgo, Carlos Olegario; Tamargo, Carolina y Diez, Carmen (2006). Análisis del semen bovino. *Boletín informativo del Serida* N° 2
- Ibañez, M. d. *La alfalfa su cultivo y aprovechamiento*, 1996. Madrid: Mundi - Prensa
- JH, Cawood E, Kinniburgh D, Provan A, Collins AR, Irvine DS. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clin Sci (Lond)* 2001;100:613–618. [PubMed] .
- Knox RV, Rodríguez-Zas SL, Roth S, Ruggiero K. Use and accuracy of instruments to estimate sperm, 2004. University of Illinois at Urbana Champaign.

- Le Bars, J., P. Le Bars et G. Brice. 1990. Presence, accumulation et devenir du cumestrol dans la luzerne et ses dérivés. *Rec. Med. Vet.*, 166: 463-469.
- Lookhart, G.L. and K.F. Finney. 1978. Determination of cumestrol in soybeans by highperformance liquid and thin-layer chromatography. *Cereal Chem.*, 55: 967-972.
- Lotane, E. and J.K. Adler. 1966. Early effects of excessive alfalfa feeding on bovine fertility. *Refuah. Vet.*, 23: 102-110.
- Muñoz, M.R., R.R. Arista y C. Romero. 1996. En grandes cantidades la alfalfa altera al ganado hormonalmente. Seminario de la UAM, Mayo 27. México.
- Muñoz, M.R., R.C.M. Romero y C.M.R. Tarragó. 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de cumestrol. *Veterinaria México*, 28: 12-18.
- Pasqualotto FF, Sharma RK, Kobayashi H, Nelson DR, Thomas Jr AJ, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl* 2001; 22:316–22.
- Pérez, J.F. y F. Pérez. 1960. *Fisiopatología de la Reproducción animal*. Editorial Científico Médica Española, España.
- Peters, A.R. y P.J.H. Ball. 1991. *Reproducción de ganado vacuno*. Acribia. Zaragoza, España.
- Martin, D. Blache, D. W. Miller and P. E. Vercoe (2010). Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *animal*, 4, pp 1214-1226. doi:10.1017/S1751731109991674.)

- Maxwell WM, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 1999; 52 (8): 1353-62.
- Mortimer, S.T. (2000) CASA: practical aspects. *Journal of Andrology* 21:515-524.
- Nichi M, Bols P.E.J., Zuñiga R.M., Barnabe V.H., Goovaerts I.G.F., Barnabe R.C., Cortada C.N.M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions . *Theriogenology* 2006; 66: 822–828
- Ryökkönen, A., Kukkonen, J. V., & Nieminen, P. (2006). Effects of dietary genistein on mouse reproduction, postnatal development and weight-regulation. *Animal reproduction science*, 93(3), 337-348.
- Roncoletta M, Morani Eda S et ál. Fertility associated proteins in Nelore bull sperm membranes. *Anim Reprod Sci* 2006; 91 (1-2): 77-87. 44.
- Smith, M.C.; Sherman, D.M.: *Goat Medicine*. Edited by Lea & Febiger, 1994.
- Tetsuji Nagao, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Madoka Nakagomi, Kenji Usumi, Hiroshi Ono. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproductive Toxicology*, Volume 15, Issue 4, July–August 2001, Pages 399-411 Volume 41, Issue 4, April 2003, Pages 447–454.
- Thundathil J, Gil J et ál. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int J Androl* 1999; 22 (6): 366-73. 43.
- Valderrabano, J. 1992. Alteraciones reproductivas asociadas al consumo de fitoestrógenos. *Invest. Agric. Produc. Sanid. Animal*, 7: 120-130.

- Vendula Kyselova, Jana Peknicova, Michael Boubelik, Daniela Buckiova. Body and organ weight, sperm acrosomal status and reproduction after genistein and diethylstilbestrol treatment of CD1 mice in a multigenerational study Original Research Article. *Theriogenology*, Volume 61, Issues 7–8, May 2004 , Pages 1307-1325
- Verstegen, J.; Iguer- Ouada, M.; Oclin, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research an veterinary practice, 2002. *Theriogenology* 57:149 - 179.
- Vergara, V. determincaion de la energia metabolizable aparente para aves de harina integral de soya de tres procesos por el metodo de coleccion total, 2012. 12
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreseved semen, 2000. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61: 481–492 doi: 10.1016/S0378-4320(00)00099-310844218
- Wiseman. Processing of full fat soybena meal to maximizeenergy and amino acid nutriition oof swine, 1997. Singapore: American Soybean Assocation.
- Zhang, L.-D., Li, H.-C., Chong, T., Gao, M., Yin, J., Fu, D.-L., ... Wang, Z.-M.(2014). Exposición prepuberal de genisteína Alivia di- (2-etilhexil) fáltate inducida testicular estrés oxidativo en ratas adultas. *BioMed Investigaciones Internacionales* , 2014 , 598630. doi: 10.1155 / 2014/598630
- Zeriouh, I.F., Addou, S., Souferkas, Y., Kheroua, O., Saidi, D.Effect of the consumption of milk of soya on the male fertility of Swiss mice (Article). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Volume 6, Issue 4, 2014, Pages 669-676

- Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxi dismutase and catalase like activitier in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 1993;16:183-8.