



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2022; 12:1-15. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.23>  
Artículo Original. Recibido: 13/12/2020. Aceptado:03/08/2022. Publicado: 20/08/2022. Clave: e2020-13.  
<https://www.youtube.com/watch?v=cLgN2zeaeOs>

## Inclusión de aceite de soya en la dieta sobre la criopreservación del semen ovino

Inclusion of soybean oil in the diet on cryopreservation of ram semen



Tun-Moo Maximiliano<sup>2</sup> ID, Ramón-Ugalde Julio<sup>2</sup> ID, Loeza-Concha Henry<sup>3</sup> ID, Rodríguez-Gutiérrez Itzel<sup>2</sup> ID, Castellanos-Zacarías Carlos<sup>2</sup> ID, Domínguez-Rebolledo Álvaro<sup>\*1</sup> ID

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mocochoá. Km. 25 Antigua carretera Mérida-Motul. C.P. 97454. Mocochoá, Yucatán. México. <sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México, Campus Conkal. Antigua carretera Mérida-Motul km 16.3, Conkal, C. P. 97345, Yucatán, México. Antigua Carretera Mérida-Motul km 16.3, C.P. 97345, Conkal, Yucatán. México. <sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Campeche. Carretera Haltunchén-Edzná. km 17.5, C.P. 24450; Sihochac, Champotón, Campeche. México. \*Autor para correspondencia: Álvaro Domínguez Rebolledo. E-mail: maxtun\_14@hotmail.com, julio.ramon9@gmail.com, loeza.jesus@colpos.mx, Itzel.rgutierrez@outlook.com, carlos.castellanos@itconkal.edu.mx, dominguez.alvaro@inifap.gob.mx

### RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto del aceite de soya (AS) en la dieta, sobre la criopreservación del semen ovino. Durante 60 días, 27 ovinos permanecieron divididos en tres tratamientos (n=9): T1: 0% AS (control); T2: 3% AS y T3: 6% AS. Se analizaron los parámetros de motilidad, viabilidad, actividad mitocondrial, integridad del acrosoma y de la membrana de la cola (Host) a la descongelación. Los datos se analizaron con un ANOVA y una prueba de Tukey para la comparación de medias. El T1 y T3 fueron similares y superiores (P<0.05) al T2 tanto en la motilidad total como en la motilidad progresiva. La velocidad media y la integridad de los acrosomas del T1 resultó mayor (P<0.05) respecto al T2 y T3. La viabilidad del T1 fue similar al T2 y T3, aunque el T2 y T3 fueron diferentes (P<0.01). Por otra parte, la actividad mitocondrial del T3 fue mayor respecto al T1 y T2 (P<0.05). No se encontraron diferencias (P>0.05) en los demás parámetros de motilidad y en Host. La inclusión de aceite de soya en la dieta no mejora la criopreservación del semen ovino a pesar de que la adición de un 6% favorece la actividad mitocondrial.

**Palabras clave:** ácidos grasos, espermatozoides, congelado-descongelado.

### ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of soybean oil (AS) supplemented diet on the cryopreservation of Pelibuey ram semen. Twenty-seven rams were divided three treatments (n= 9): T1: 0% AS (control); T2: 3% AS and T3: 6% AS, for a period of 60 days. The frozen-thawed semen was assessed for sperm motility parameters, plasma membrane integrity, mitochondrial activity, acrosome integrity and tail membrane integrity (Host). The results were analyzed by ANOVA, followed by Tukey's comparison test. T1 and T3 were similar and superior (P<0.05) to T2 in total motility and progressive motility. Mean velocity and acrosome integrity in T1 were higher (P<0.05) compared to T2 and T3. Viability in T1 was similar to that of T2 and T3, however, T2 and T3 were different (P<0.01). Mitochondrial activity in T3 was higher, compared to T1 and T2 (P<0.05). No differences (P>0.05) were found in the other motility parameters and in host. The inclusion of soybean oil in the diet did not improve the cryopreservation of ram semen, although the inclusion of 6% soybean oil in the diet increased mitochondrial activity.

**Keywords:** fatty acid, spermatozoa, frozen-thawed.



## INTRODUCCIÓN

La nutrición y la reproducción generalmente se encuentran vinculadas, debido a que el éxito reproductivo del animal depende de su estado nutricional. A lo largo de los años se ha estudiado el efecto de esta asociación, a menudo mediante la alteración de las dietas de diversas maneras con el fin de observar los cambios resultantes en los parámetros reproductivos de los animales (Yeste *et al.*, 2011). Uno de los cambios más significativos, es la adición de ácidos grasos poliinsaturados (frecuentemente denominados por su acrónimo en lengua inglesa PUFAs (Polyunsaturated Fatty Acids) a su dieta. Se han estudiado diferentes fuentes de PUFAs en la dieta de mamíferos, como los omega-3 y omega-6, observándose que su consumo influye en algunas funciones reproductivas de la hembra, como un aumento en el diámetro y el número de folículos presentes en el ovario (Nurlatifah *et al.*, 2020); así como un periodo más corto para la primera ovulación (Salehi *et al.*, 2016) y un efecto positivo sobre la fertilidad (Rebollar *et al.*, 2014). En los machos, produce aumento del líbido (Castellano *et al.*, 2010), tamaño testicular (Van Tran *et al.*, 2017; Mínguez-Alarcón *et al.*, 2017), concentración espermática (Alizadhe *et al.*, 2014; Fair *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2017), motilidad (Alizadeh *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2017) y viabilidad espermática (Alizadhe *et al.*, 2014; Esmaeili *et al.*, 2012<sup>b</sup>). Asimismo, en la composición y estructura de las membranas de las mitocondrias espermáticas (Gürler *et al.*, 2015), las cuales se encargan de producir la energía necesaria para producir el movimiento flagelar, aumentando su fluidez y plasticidad y, por ende su función (Sullivan *et al.*, 2018).

En la mayoría de los tejidos de mamíferos, el ácido graso que más predomina es el ácido linoleico (18:2 n-6), donde su concentración refleja la ingesta dietética (Guyenet & Carlson, 2015). El ácido linoleico se obtiene a través de la dieta de aceites vegetales, como el girasol, soya, maíz y aceites de canola; así como nueces y semillas (Sullivan *et al.*, 2018). El aceite de soya, está compuesto por varias sustancias, principalmente de ácidos grasos poliinsaturados, particularmente ácido linoleico (LA, C18: 2), un ácido graso omega-6 ( $\omega$ 6) que constituye ~ 55% del aceite de soya (Deol *et al.*, 2017) y también ácido linolénico (ALA, C18: 3), un ácido graso omega-3 ( $\omega$ 3) que constituye ~ 5-9% (Sullivan *et al.*, 2018).

Por otro lado, el PUFAs más abundante en las membranas de los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos es el omega-3, el cual tiene una función importante en la funcionalidad de la célula espermática, al proporcionarle fluidez y permeabilidad; las cuales se relacionan con la capacidad de llevar a cabo la fertilización (Esmaeili *et al.*, 2012<sup>b</sup>), y con un aumento en la crioresistencia (Towhidi *et al.*, 2012; Fair *et al.*, 2014).

Se ha descrito que los espermatozoides de ovino son más susceptibles al choque frío durante la criopreservación que otros mamíferos (Grötter *et al.*, 2019). Estas diferencias



se atribuyen, en parte, a la composición lipídica (Mandal *et al.*, 2014; Chunrong *et al.*, 2019) y al contenido de PUFAs presentes en las membranas de los espermatozoides (Mandal *et al.*, 2014). Asimismo, los mamíferos son incapaces de sintetizar *de novo* ácidos grasos con dobles ligaduras en las posiciones n-6 (serie linoleica) y en la n-3 (serie linolénica), debido a que carecen de enzimas desaturadas (Byrne *et al.*, 2017), por lo cual los PUFAs deben ser incluidos en la dieta.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del aceite de soya rico en PUFAs n-6 y n-3 añadido en la dieta en cantidades del 3 y 6%, sobre la criopreservación del semen ovino Pelibuey.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Ubicación

El estudio se realizó durante los meses de septiembre a noviembre de 2018 en el Banco de Germoplasma Ovino Pelibuey y Blackbelly, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en el municipio de Mocochoá, Yucatán, México, ubicado en la región centro norte del estado, entre los paralelos 21° 05' y 21° 10' de Latitud Norte y los meridianos 89° 27' y 89° 30' de Longitud Oeste, a una altitud de 9 m sobre el nivel del mar. El clima predominante en la región es cálido sub-húmedo (Aw0) con lluvias en verano, con una precipitación pluvial de 997 a 1132 mm, y temperatura media anual de 26.5 °C.

### Animales

Se utilizaron 27 ovinos machos de la raza Pelibuey, con una edad promedio de  $2.0 \pm 0.5$  años, peso vivo promedio de  $42.5 \pm 2.9$  kg y condición corporal de 3.5 de acuerdo en la escala de 1 a 5 puntos. Asimismo, se constató que los animales no presentarían ninguna anomalía física que pudiera excluirlo del estudio.

### Alimentación

Los ovinos se distribuyeron al azar en tres grupos (n=9 por grupo), suministrando a cada grupo diferentes porcentajes de aceite de soya (AS) en la dieta: Tratamiento control (T1): (0% AS); Tratamiento 2 (T2): 3% AS y Tratamiento 3 (T3): 6% AS, complementados con un 30% de alimento comercial (NUTRIMYN Borrego 14% PC, MYN Distribuidora de S.A de C.V.) y un 70% de pasto CT-115 (*Pennisetum purpureum*) (tabla 1). Las dietas fueron proporcionadas a libre acceso a razón de  $450 \text{ g}^{-1}/\text{a}^{-1}/\text{d}^{-1}$  por la mañana (11:30h), durante 60 días (espermatogénesis en el ovino: 58 días; Díaz *et al.* 2017), incluyendo un periodo de adaptación de 14 días, donde se les suministró gradualmente el aceite soya (Bakers & Chefs®, Hermosillo, México) en la dieta hasta alcanzar lo establecido en cada tratamiento.



**Tabla 1. Composición química de las dietas experimentales**

Componentes	T1	T2	T3
Proteína (%)	14.00	14.00	14.00
Energía (Mcal EM/kg MS) *	2.71	2.79	2.64
Calcio (g).	6.3	6.3	6.3
Fosforo (g).	3.2	3.2	3.2
Aceite de soya 3 % (g).	0	300	0
Aceite de soya 6 % (g).	0	0	550

\*Estimado con base al NRC (2007).

### Obtención de muestras seminales

Mediante una vagina artificial y con la ayuda de una oveja que sirvió como maniquí, se seleccionaron 162 eyaculados (6 eyaculados/ovino<sup>-1</sup>; 54/grupo<sup>-1</sup>) que cumplieron con los siguientes criterios: volumen >0.5, motilidad masal >4 (escala 0-5), motilidad >70% y concentración espermática >3,000 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL (Arando *et al.*, 2019, 2020). El semen se colectó con una frecuencia de dos veces por semana (un eyaculado/día/semental) en horas de la mañana (8:00), y durante 3 semanas posteriores al periodo de suplementación.

### Dilución espermática

Los eyaculados seleccionados se diluyeron con Triladyl® + agua bidestilada + 20% de yema de huevo a una concentración final de 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, para luego ser envasadas en pajillas francesas (Minitüb®, Tiefenbach, Alemania) de 0.25 mL.

### Congelación de semen

La congelación de las muestras se realizó colocando las pajillas a 4 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido (LN2), durante 10 minutos; inmediatamente después las pajillas se sumergieron en LN2 y se almacenaron hasta su evaluación.

### Descongelación de semen

El procedimiento de descongelación se realizó mediante la inmersión de las pajillas en un baño maría a 37°C durante 30 segundos.

### Concentración espermática

Se diluyeron 5 µL de la muestra de semen en 995 µL de agua destilada. Posteriormente, se colocaron 9 µL de la muestra diluida sobre cada uno de los dos lados de la cámara Búcker y se capturaron 4 campos de cada lado con el sistema computarizado de análisis espermático AI Station (SPERM.TECH®, Valencia, España).

### Motilidad espermática

La motilidad se analizó con el sistema AI Station, colocando 5 µL de semen descongelado y diluido a ~30 x10<sup>6</sup>/mL de espermatozoides, sobre una cámara de recuento Makler® (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) precalentada a 37°C; y se



procedió a la captura de al menos cinco campos con un mínimo de 300 espermatozoides/muestra. Los parámetros de motilidad analizados fueron: Motilidad total (MT, %), Motilidad progresiva (MP, %), Velocidad curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), Velocidad rectilínea (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), Velocidad promedio (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), Índice de linealidad (LIN= VSL/VCL x 100), Índice de rectitud (STR= VSL/VAP x 100), Índice de oscilación (WOB= VAP/VCL x 100), Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu\text{m}$ ) y Frecuencia de batido de la cola (BCF, Hz).

### **Viabilidad espermática**

Se evaluó mediante la tinción de SYBR-14 y yoduro de propidio (PI) (Live/Dead® kit L-7011, Invitrogen™). Las muestras se tiñeron con 1  $\mu\text{L}$  de SYBR-14 (10  $\mu\text{M}$ ) y 1  $\mu\text{L}$  de PI (12  $\mu\text{M}$ ) y se dejaron incubar durante 10 minutos a 37°C en la oscuridad. Posteriormente se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre un portaobjeto precalentado a 37°C, y se procedió a su evaluación por medio de un microscopio de epifluorescencia (LWScientific i40-ADN). El porcentaje de células viables se determinó contabilizando 200 espermatozoides por muestra. Las células teñidas con SYBR 14 (fluorescencia verde) fueron consideradas como viables; mientras que las células teñidas con PI (Fluorescencia roja) fueron consideradas como muertas.

### **Integridad del acrosoma**

Se evaluó mediante la tinción de FITC-PSA (100 $\mu\text{g/mL}$ , L-0770, Sigma-Aldrich™). Las muestras se tiñeron con 5  $\mu\text{L}$  de FITC-PSA y se dejaron incubar durante 30 minutos a 37°C en la oscuridad; inmediatamente después se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre un portaobjeto y se procedió a su evaluación. El porcentaje de células con acrosoma íntegro se determinó contabilizando 200 espermatozoides por muestra. Los espermatozoides teñidos con FITC-PSA (fluorescencia verde) fueron considerados con acrosoma dañado; mientras que los que no presentaron fluorescencia se consideraron como intactos.

### **Actividad mitocondrial**

Se analizó con la tinción JC-1 (153  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes® T-3168, Invitrogen™). Las muestras se tiñeron 1  $\mu\text{L}$  de JC-1 y se dejaron incubar durante 10 minutos a 37°C en la oscuridad; después se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre un portaobjeto y se analizó. El porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial se determinó contabilizando 200 células por muestra. Se consideraron espermatozoides con actividad mitocondrial a aquellos que presentaron fluorescencia naranja en la parte intermedia del flagelo; mientras que los que no presentaron fluorescencia se consideraron sin actividad mitocondrial.



## Integridad de la membrana plasmática de la cola (HOST)

Se evaluó con una dilución de 5  $\mu$ L de muestra espermática en 50  $\mu$ L de solución de endósmosis (0.735 g de citrato de sodio dihidratado y 1.351 g de fructosa en 100 mL de agua destilada) a 100 mOsm/L y se dejó incubar durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se colocaron 5  $\mu$ L de la muestra sobre un portaobjeto y se analizó con un microscopio de contraste de fases. El porcentaje de espermatozoides con HOST se determinó contabilizando 200 células por muestra. Los espermatozoides que presentaban colas enrolladas fueron considerados con la membrana de la cola intacta (endósmosis positiva); mientras que los que no presentaron colas enrolladas fueron considerados con la membrana de la cola dañada (endósmosis negativa).

## Análisis estadístico

Las variables expresadas como porcentajes: motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad, actividad mitocondrial, acrosomas intactos y Host, fueron transformadas al  $\arcseno\sqrt{(variable)/100}$  antes de su análisis. Posteriormente se analizó con un ANOVA; y para encontrar las diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la prueba de Tukey a  $P \leq 0.05$ , a través del paquete estadístico del Statistical Analysis System (SAS Inst. Inc., 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Numerosos estudios han demostrado que la inclusión de PUFAs en la dieta puede mejorar la funcionalidad de la célula espermática (Sullivan *et al.*, 2018), así como su crioresistencia (Towhidi *et al.*, 2012; Fair *et al.*, 2014), al influir en la composición y estructura de sus membranas. Por otra parte, otros estudios mencionan que las dietas conformadas con PUFAs producen un aumento en la incorporación de DHA en los lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides (Gholami *et al.*, 2010), provocando una disminución en el contenido de colesterol y por consiguiente una mayor susceptibilidad de los espermatozoides al choque por frío (Díaz *et al.*, 2017). En este sentido, los valores obtenidos de los tratamientos T1 y T3 fueron similares y superiores ( $P < 0.05$ ) al T2, tanto en la motilidad total ( $57.8 \pm 2.3; 59.6 \pm 2.6\%$  vs  $46.8 \pm 3.3\%$ ) como en la motilidad progresiva ( $27.0 \pm 0.3; 30.2 \pm 1.2\%$  vs  $14.0 \pm 2.1\%$ ), respectivamente. Estos resultados son similares a los registrados por Losano *et al.* (2017) en semen descongelado de toro que fueron alimentados previamente con un 6% de aceite de palma durante 60 días; al igual que los reportados por Díaz *et al.* (2017) en muestras espermáticas descongeladas de ovino de la raza Araucano suplementados previamente con 3% de aceite de pescado, donde la motilidad total disminuyó y los demás parámetros de motilidad no presentaron diferencias respecto al tratamiento testigo.

Por su parte, Khoshvaght *et al.* (2016), observaron una mayor motilidad progresiva en semen descongelado de toro Holstein previamente suplementados con 3.5% de aceite de pescado durante 11 semanas, siendo similar a lo reportado en muestras de semen



descongeladas de toros de la raza Holstein suplementados con 50 g de ácido linoleico conjugados (Lutrell®) durante 10 semanas (Karimi *et al.*, 2016). En la velocidad media (VAP), el T1 ( $71.4 \pm 4.7 \mu\text{m/s}$ ) resultó mayor ( $P < 0.05$ ) respecto al T2 y T3 ( $53.8 \pm 3.0$  y  $50.3 \pm 6.8 \mu\text{m/s}$ , respectivamente); mientras que para el resto de los demás parámetros de la motilidad analizados (LIN, STR, WOB, ALH y BCF) no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos (tabla 2); siendo esto similar a lo encontrado por Byrne *et al.* (2017) en muestras espermáticas descongeladas de toros púberes de la raza Holstein, alimentados con aceite de cártamo; donde los parámetros de motilidad no se vieron afectados, pero sí la amplitud del desplazamiento de las cabezas (ALH), que fue mayor respecto al testigo.

Se conoce que los aceites de origen animal como el aceite de pescado, contienen altas concentraciones de PUFAs n-3 (Omega-3) que los de origen vegetal (Omega-6); incluso se ha demostrado que la suplementación de PUFAs n-3 en la dieta, modifica la composición de los ácidos grasos de la membrana espermática, mejorando la calidad del semen. Estos efectos han sido reportados en espermatozoides de ovino (Samadian *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2017), caballo (Brinsko *et al.*, 2005), cerdo (Rooke *et al.*, 2001), toros (Khoshvaght *et al.*, 2016; Byrne *et al.*, 2017), perros (Alonge *et al.*, 2019) y en humanos (Martínez-Soto *et al.*, 2012).

**Tabla 2. Efecto de la suplementación del aceite de soya en la dieta sobre la motilidad del semen descongelado de ovino**

Parámetros de motilidad	Tratamiento (aceite de soya %)		
	T1 (0 %)	T2 (3 %)	T3 (6 %)
TM (%)	$57.8 \pm 2.3^a$	$46.8 \pm 3.3^b$	$59.6 \pm 2.6^a$
PM (%)	$27.0 \pm 0.3^a$	$14.0 \pm 2.1^b$	$30.2 \pm 1.2^a$
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	$71.4 \pm 4.7^a$	$53.8 \pm 3.09^b$	$50.3 \pm 6.8^b$
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	$113.3 \pm 6.0^a$	$91.7 \pm 3.50^a$	$82.1 \pm 4.7^a$
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	$53.9 \pm 1.9^a$	$36.8 \pm 2.76^a$	$36.5 \pm 3.2^a$
LIN (%)	$44.4 \pm 0.5^a$	$36.1 \pm 1.94^a$	$41.3 \pm 1.7^a$
STR (%)	$69.0 \pm 0.8^a$	$59.0 \pm 2.80^a$	$65.0 \pm 2.9^a$
WOB (%)	$61.9 \pm 2.5^a$	$57.0 \pm 1.55^a$	$59.6 \pm 1.4^a$
ALH ( $\mu\text{m}$ )	$3.6 \pm 0.2^a$	$3.2 \pm 0.10^a$	$2.9 \pm 0.1^a$
BCF (Hz)	$11.1 \pm 1.6^a$	$8.8 \pm 3.51^a$	$8.7 \pm 6.7^a$

(<sup>ab</sup>) Diferentes superíndices en la misma línea indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). TM, motilidad total; PM, motilidad progresiva; VAP, velocidad promedio; VCL, velocidad curvilínea; VSL, velocidad rectilínea; LIN, índice de linealidad ( $\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$ ); STR, índice de rectitud ( $\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$ ); WOB, índice de oscilación ( $\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL} \times 100$ ); ALH, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF, frecuencia de batido de la cola.



En cuanto a la integridad de los acrosomas, el T1 ( $66.6 \pm 7.6\%$ ) resultó mayor ( $P < 0.05$ ), respecto al T2 y T3 ( $41.3 \pm 3.8$  y  $29.2 \pm 5.2\%$ , respectivamente). Esto es similar a lo reportado por [Losano et al. \(2017\)](#) en muestras espermáticas descongeladas de toros que fueron alimentados previamente con ácidos grasos al 6% durante 60 días; sin embargo, difiere a lo reportado por [Byrne et al. \(2017\)](#) en semen descongelado de toros púberes de la raza Holstein-Friesian, alimentados con aceite de cártamo y de pescado durante 10 días. Contrario a lo descrito por [Díaz et al. \(2017\)](#) en muestras espermáticas descongeladas de ovino de la raza Araucano, que fueron alimentadas con aceite de pescado durante 60 días. Este resultado probablemente se debió al aumento del estrés oxidativo causado por los procesos de congelación y descongelación de las muestras, que fue exacerbado por el efecto de los PUFAs en el aumento de la susceptibilidad de la membrana del espermatozoide a la peroxidación lipídica.

La viabilidad del T1 ( $43.3 \pm 6.5\%$ ) fue similar al T2 ( $36.6 \pm 3.1\%$ ) y T3 ( $53.0 \pm 4.6\%$ ); aunque el T2 y T3 fueron diferentes ( $P < 0.01$ ) (tabla 3). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por [Moallem et al. \(2015\)](#), [Losano et al. \(2017\)](#) y [Byrne et al. \(2017\)](#) en muestras espermáticas descongeladas de toros alimentados con ácidos grasos y omega-3 durante 13 semanas; al igual que en toros alimentados con ácidos grasos (Megalac®) durante 60 días y en muestras de semen descongelado de toros púberes de la raza Holstein-Friesian, que fueron alimentados con aceite de cártamo y de pescado durante 12 días respecto al tratamiento testigo, respectivamente. Sin embargo, estos resultados difieren a lo reportado por [Díaz et al. \(2017\)](#), donde la viabilidad de las muestras espermáticas descongeladas de ovino fue mayor en el tratamiento testigo, respecto al tratamiento de suplementación en la dieta con aceite de pescado durante 60 días. Por otra parte, [Khoshvaght et al. \(2016\)](#) reportaron una mayor viabilidad espermática en muestras de semen descongelado de toros Holstein, que fueron previamente suplementados con aceite de pescado durante 11 semanas.

Diferentes estudios indican que el aumento de la concentración de PUFA n-3 de cadena larga de los espermatozoides bovinos no produce mejoras apreciables en la fluidez de la membrana plasmática, en comparación con una dieta basal ([Moallem et al. 2015](#)); [Byrne et al. \(2017\)](#), lo cual podría haber sucedido con las PUFAs n-6 del aceite de soya en los espermatozoides de ovino de pelo de este estudio.

La actividad mitocondrial en el T3 ( $65.3 \pm 6.5\%$ ) fue mayor, respecto al T1 y T2 ( $37.3 \pm 7.3$  y  $33.6 \pm 3.5$ ), respectivamente ( $P < 0.05$ ). Estos resultados difieren a lo reportado por [Losano et al. \(2017\)](#) donde la actividad mitocondrial no presentó diferencias entre los tratamientos de muestras espermáticas descongeladas de toros que fueron alimentados previamente con ácidos grasos al 6% durante 60 días. Se ha demostrado que la inclusión de PUFAs n-6 en la dieta puede producir una integración de los fosfolípidos a la membrana plasmática, sustituyendo a los ácidos grasos saturados que son más lineales





y rígidos, generando un aumento en la fluidez y plasticidad de las membranas, facilitando la interacción con las proteínas enzimáticas de la membrana y, por tanto su función (Sullivan *et al.*, 2018). Asimismo, la reducción en la cantidad de estos fosfolípidos que compone el 10% de los fosfolípidos mitocondriales, altera el potencial de membrana (Jiang *et al.*, 2000). En la mayoría de los tejidos de mamíferos, el ácido graso que más predomina es el ácido linoleico (18:2 n-6) (Guyenet & Carlson, 2015), el cual se obtiene a través de dieta de aceites vegetales, como girasol, soya, maíz y aceites de canola; así como nueces y semillas. Este ácido es necesario para el correcto funcionamiento de varios complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que está relacionada con procesos tan esenciales como la generación de ATP (Mileykovskaya *et al.*, 2005), la conducción de protones a través del citocromo bc1 (Lange *et al.*, 2001); así como en la prevención de la inestabilidad osmótica y el desacoplamiento de la cadena, cuando la tasa de respiración es elevada (Koshkin & Greenberg, 2002).

En la integridad de la membrana plasmática de la cola (test host), no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ); lo cual concuerda a lo reportado en semen descongelado de toro de la raza Holstein alimentados con 50 g de ácido linoleico (Karimi *et al.*, 2016). Sin embargo, Gholami *et al.* (2010) mencionan que los PUFA n-3 aumentan la incorporación de DHA en la cabeza y en la pieza principal de la cola de los espermatozoides, lo cual influye en la composición bioquímica de la membrana de los espermatozoides, otorgándole una mejor plasticidad y estabilidad.

**Tabla 3. Efecto de la suplementación del aceite de soya en la dieta sobre la motilidad, actividad mitocondrial, acrosomas intactos y Host del semen descongelado de ovino**

Tratamiento	Aceite de soya (%)	Viabilidad (%)	Actividad mitocondrial (%)	Acrosomas intactos (%)	Host (%)
T1	0	43.3 ± 9.5 <sup>ab**</sup>	37.3 ± 7.3 <sup>b*</sup>	66.6 ± 7.6 <sup>a*</sup>	29.3 ± 1.6 <sup>a</sup>
T2	3	36.6 ± 3.1 <sup>b</sup>	33.6 ± 3.5 <sup>b</sup>	41.3 ± 3.8 <sup>b</sup>	21.5 ± 2.1 <sup>a</sup>
T3	6	53.0 ± 4.6 <sup>a</sup>	65.3 ± 6.5 <sup>a</sup>	29.2 ± 5.2 <sup>b</sup>	25.0 ± 2.5 <sup>a</sup>

(<sup>ab</sup>) Diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05^*$ ) ( $p < 0.01^{**}$ ).

Por último, estos resultados contradictorios obtenidos en este estudio con la de otros autores, pueden estar asociados a muchos factores, tales como: la especie y raza del animal, tiempo de la suplementación, estatus reproductivo del animal, cantidad de PUFAs presentes en la membrana de los espermatozoides, concentración y tipo de los PUFAs añadidos a la dieta, entre otros (Esmaili *et al.*, 2012<sup>a</sup>; Liu *et al.*, 2015; Martínez-Soto *et al.*, 2012).

En los ovinos, los PUFAs n-3 en la dieta provocan modificaciones en los perfiles de los ácidos grasos de los espermatozoides, desempeñando una función importante sobre la calidad del semen y su tolerancia al choque por frío, esto es debido a la incorporación de DHA a los fosfolípidos de la membrana celular (Esmaili *et al.*, 2012<sup>b</sup>), ya que se ha



demostrado que existe una relación de las cantidades de DHA en la membrana de los espermatozoides con su crioresistencia (Martínez-Soto *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha documentado que los PUFAS n-3 en la dieta promueven la susceptibilidad de la membrana de los espermatozoides a la peroxidación lipídica, afectando la capacidad fecundante de los espermatozoides. A pesar de esto, se ha reportado que una dieta enriquecida con vitamina E, zinc, selenio, ácido fólico y n-3 PUFA durante al menos dos meses, en cantidades adecuadas, mejora la cantidad de espermatozoides y calidad, especialmente el recuento y la movilidad de los espermatozoides, modificando las propiedades físicas y funcionales de la membrana celular de los espermatozoides (Alonge *et al.*, 2019). En este sentido, sería conveniente un estudio futuro con suplementación a base de ácidos grasos PUFAs n-6 y su asociación con antioxidantes, para prevenir los posibles daños provocados por el efecto de la peroxidación lipídica.

## CONCLUSIÓN

La inclusión de aceite de soya en la dieta a base de alimento comercial y pasto CT-115 no mejora la criopreservación del semen ovino Pelibuey a pesar de que la adición de un 6% favorece la actividad mitocondrial.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por el proyecto Fiscal No. 1513272874 del INIFAP.

## LITERATURA CITADA

ALIZADEH A, Esmaeili V, Shahverdi A, Rashidi L. 2014. Dietary fish oil can change sperm parameters and fatty acid profiles of ram sperm during oil consumption period and after removal of oil source. *Cell Journal*. 16(3): 289-298. ISSN: 2228-5806. <https://celljournal.org/journal/article/abstract/292>

ALONGE S, Melandri M, Leoci R, Lacalandra GM, Caira M, Aiudi GG. 2019. The effect of dietary supplementation of vitamin E, selenium, zinc, folic acid, and N-3 polyunsaturated fatty acids on sperm motility and membrane properties in dogs. *Animals*. 9(2):34. ISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani9020034>

ARANDO A, Delgado JV, Bermúdez-Oria A, León JM, Fernández-Prior A, Nogales S, Pérez-Marín CC. 2019. Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology*. ISSN:1439-0531. 86(2):33-39. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.002>



ARANDO A, Delgado JV, Bermúdez-Oria A, León JM, África Fernández-Prior A, Nogales S, Pérez-Marín C. 2020. Effect of olive-derived antioxidants (3,4-dihydroxyphenylethanol and 3,4 dihydroxyphenylglycol) on sperm motility and fertility in liquid ram sperm stored at 15°C or 5°C. *Reproduction in Domestic Animals*. ISSN:1439-0531. 55(1):325-332. <https://doi.org/10.1111/rda.13631>

BRINSKO S, Varner D, Love C, Blanchard T, Day B, Wilson M. 2005. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen Stallion semen. *Theriogenology*. 63(5):1519-1527. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.010>

BYRNE CJ, Fair S, English AM, Holden SA, Dick JR, Lonergan P, Kenny DA. 2017. Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation of young post-pubertal dairy bulls alters the fatty acid composition of seminal plasma and spermatozoa but has no effect on semen volume or sperm quality. *Theriogenology*. 90(1):289-300. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.014>

CASTELLANO CA, Audet I, Bailey JL, Laforest JP, Matte JJ. 2010. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. *Theriogenology*. 74(8):1482-1490. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.020>

CHUNRONG LV, Guoquan WU, Hong Q, Quan G. 2019. Spermatozoa Cryopreservation: State of art and future in small ruminants. *Biopreservation and Biobanking*. 17(2):171-182. ISSN: 1947-5535. <http://doi.org/10.1089/bio.2018.0113>

DEOL P, Fahrman J, Yang J, Evans RJ, Rizo A, Grapov D, Salemi M, Wanichthanarak K, Fiehn O, Phinney B, Hammock DB and Sladek MF. 2017. Omega-6 and omega-3 oxylipins are implicated in soybean oil-induced obesity in mice. *Scientific Reports*. 7(12488): 1-13. ISSN: 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12624-9>

DÍAZ R, Torres MA, Paz E, Quiñones J, Bravo S, Farías JG, Sepúlveda N. 2017. Dietary inclusion of fish oil changes the semen lipid composition but does not improve the post-thaw semen quality of ram spermatozoa. *Animal reproduction science*. 183:132-142. ISSN:0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.002>

ESMAEILI V, Shahverdi A, Alizadeh AR, Alipour H, Towhidi A, Zarrabi M. 2012<sup>a</sup>. Fatty acid profiles of ram's sperm after removing some fatty acid sources from the diets and persistency of fatty acids in sperm. *International Journal of Fertility and Sterility*. 5 (4):211–216. ISSN: 2008-076X. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4152183/pdf/Int-J-Fertil-Steril-5-211.pdf>



ESMAEILI V, Shahverdi AH, Alizadeh AR, Alipour H, Chehrazi M. 2012<sup>b</sup>. Saturated, Omega-6 and Omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. *Andrology*. 46(1):42-49. ISSN:1439-0272. <https://doi.org/10.1111/and.12040>

FAIR S, Doyle D, Diskin MG, Hennessy AA, Kenny DA. 2014. The effect of dietary N-3 polyunsaturated fatty acids supplementation of rams on semen quality and subsequent quality of liquid stored semen. *Theriogenology*. 81(2):210-219. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.002>

GHOLAMI H, Chamani M, Towhidi A, Fazeli MH. 2010. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. *Theriogenology*. 74(9):1548-1558. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.025>

GRÖTTER LG, Cattaneo L, Estela P, Kjelland ME, Ferré LB. 2019. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*. 54(4):655-665. ISSN: 1439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>

GÜRLER H, Malama E, Heppelmann M, Calisici O, Leiding C, Kastelic JP, Bollwein H. 2015. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*. 86(2):562-571. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>

GUYENET SJ, Carlson SE. 2015. Increase in adipose tissue linoleic acid of US adults in the last half century. *Advances in Nutrition*. 6(6):660-664. ISSN: 21565376. <https://doi.org/10.3945/an.115.009944>

JIANG F, Ryan MT, Schlame M, Zhao M, Gu Z, Klingenberg M, Pfanner N, Greenberg ML. 2000. Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem*. 275(29):22387-94. ISSN: 0021-9258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909868199>

KARIMI S, Staiger MP, Buunk N, Fessard A, Tucker N. 2016. Uniaxially aligned electrospun fibers for advanced nanocomposites based on a model PVOH-Epoxy System. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 81:214–221. ISSN: 1359-835X. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.11.016>



KHOSHVAGHT A, Towhidi A, Zare-shahneh A, Noruozi M, Zhandi M, Dadashpour N, Karimi R. 2016. Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. *Theriogenology*. 85(5):807-812. ISSN: 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.023>

KOSHKIN V, Greenberg ML. 2002. Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria. *Biochemical Journal*. 364(Pt 1): 317-322. ISSN: 1470-8728. <https://doi.org/10.1042/bj3640317>

LANGE C, Nett JH, Trumpower BL, Hunte C. 2001. Specific roles of protein–phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. *The EMBO Journal*. 20(23): 6591-6600. ISSN: 1460-2075. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6591>

LIU Q, Zhou YF, Duan RJ, Wei HK, Jiang SW, Peng J. 2015. Effects of dietary n-6: n-3 fatty acid ratio and vitamin E on semen quality, fatty acid composition and antioxidant status in boars. *Animal Reproduction Science*. 162:11–19. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.08.012>

LOSANO JDA, Angrimani DSR, Dalmazzo A, Rocha CC, Brito MM, Perez EGA, Nichi M. 2017. Effect of vitamin E and polyunsaturated fatty acids on cryopreserved sperm quality in *Bos taurus* bulls under testicular heat stress. *Animal Biotechnology*. 29(2): 100-109. ISSN: 1049-5398. <https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1322973>

MANDAL R, Badyakar D, Chakrabarty J. 2014. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. *Advances in Andrology*. 2014:9. ISSN: 2314-8446 <https://doi.org/10.1155/2014/190542>

MARTINEZ-SOTO JC, Landeras J, Gadea J. 2012. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. 1(3):365-375. ISSN: 2047-2927. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00040.x>

MILEYKOVSKAYA E, Zhang M, Dowhan W. 2005. Cardiolipin in energy transducing membranes. *Biochemistry*. 70:154-158. ISSN: 1608-3040. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0095-2>

MINGUEZ-ALARCÓN L, Chavarro JE, Mendiola J, Roca M, Tanrikut C, Vioque J, Jørgensen N, Torres-Cantero AM. 2017. Fatty acid intake in relation to reproductive hormones and testicular volume among young healthy men. *Asian Journal of Andrology*. ISSN:1745-7262. 19(2):184-190. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.190323>



MOALLEM U, Neta N, Zeron Y, Zachut M, Roth Z. 2015. Dietary  $\alpha$ -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 83(7):1110-1120. ISSN 0093-691X.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.008>

National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington, DC: The National Academies Press. ISBN: 978-0-309-47324-8. <https://doi.org/10.17226/11654>

NURLATIFAH A, Khotijah L, Komalasari K, Astuti A. 2020. The effect of flushing with fatty acid supplementation in ewes ration on folliculogenesis. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 411: 012036. ISSN 1755-1315. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/411/1/012036>

REBOLLAR PG, García-García RM, Arias-Álvarez M, Millán P, Rey AI, Rodríguez M, Formoso-Rafferty N, De la Riva S, Masdeu M, Lorenzo PL. 2014. Reproductive long-term effects, endocrine response and fatty acid profile of rabbit does fed diets supplemented with n-3 fatty acids. *Animal Reproduction Science*. 146 (3-4):202-209. ISSN: 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.021> .

ROOKE J, Shao CC, Speake BK. 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction*. 121(2): 315-322. ISSN: 1470-1626. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210315>

RODRIGUES CA, Ruiz MC, Dan De Nardo DC, Mothé BG, Rossi MF, De Sousa BD, Netto AH, De Souza FF. 2017. Effect of dietary supplementation with omega-3 and -6 on fresh and frozen/thawed sperm quality of dogs. *Semina: Ciências Agrárias*. 38(5):3069-3076. ISSN: 1676-546X. <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445753229018.pdf>

SALEHI R, Colazo MG, Oba M, Ambrose DJ. 2016. Effects of prepartum diets supplemented with rolled oilseeds on calf birth weight, postpartum health, feed intake, milk yield, and reproductive performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 99(5):3584-3597. ISSN 0022-0302. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10186>

SAMADIAN F, Towhidi A, Rezayazdi K, Bahreini M. 2010. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. *Animal*. 4(12): 2017-2022. ISSN: 1751-732X. <https://doi.org/10.1017/S1751731110001308>

S.A.S. Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.3. User's Guide. Cary, NC, USA.



SULLIVAN ME, Pennington RE, D Green W, A Beck M, Brown AD, Shaikh RS. 2018. Mechanisms by Which Dietary Fatty Acids Regulate Mitochondrial Structure-Function in Health and Disease. *Advance in Nutrition*. 9(3): 247-262. ISSN 2161-8313. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy007>

TOWHIDI A, Parks JE. 2012. Effect of n-3 fatty acids and  $\alpha$ -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 29(10):1051-1056. ISSN: 1058-0468. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9834-7>

VAN TRAN L, Malla BA, Kumar S, Tyagi AK. 2017. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction - A review. *Asian-Australas Journal of Animal Science*. 30(5):622-637. ISSN: 1976-5517. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.1034>

YESTE M, Barrera X, Coll D, Bonet S. 2011. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with Omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. *Theriogenology*. 76(1):184-96. ISSN:0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.032>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>