

Evaluación comparativa del ácido ascórbico y del tocoferol sobre la fertilidad de semen de gallo

Marcial Cumpa G.¹, Joel Pomahuali²

Resumen

El presente trabajo de investigación se realizó en el Banco Nacional de Semen y la Unidad Experimental de Avicultura de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Los objetivos de este estudio fueron evaluar comparativamente al ácido ascórbico y tocoferol sobre la fertilidad del semen refrigerado a 5°C de gallo. Se utilizaron 28 gallinas reproductoras de postura de 25 semanas de edad de las líneas Hy Line Brown y 6 gallos cruzados adultos de 30 meses de edad. Se establecieron 4 tratamientos designados como: T1 (CINa al 1%, control), T2 (ácido ascórbico 200µg/ml), T3 (tocoferol 8µg/ml) y T4 (tocoferol 8µg/ml + ácido ascórbico 200µg/ml) diluidos en una proporción de 1:1 a una temperatura de 38°C y luego refrigerado a 5°C. La colección de semen fue de 3 veces por semana. La inseminación artificial fue vía vaginal con una jeringa de tuberculina modificada a una profundidad de 3 cm aproximadamente, con una dosis de 0.01 ml por gallina con 100 millones de espermatozoides y una frecuencia de inseminación de una vez por semana. Los huevos seleccionados por tratamiento fueron incubados para determinar la fertilidad (aquellos que presentaron el blastodisco germinal), incubabilidad y natalidad. Se utilizó un diseño completamente al azar y prueba de comparación de medias Duncan. Los mejores resultados para motilidad (69%), fertilidad (76.3%) se obtuvieron cuando en la dilución de semen se adicionó conjuntamente el tocoferol con el ácido ascórbico, siendo altamente significativo a los demás tratamientos utilizados. El mayor porcentaje de incubabilidad fue de 81.70% con el uso conjunto del ácido ascórbico y tocoferol en la dilución de semen. En natalidad, el mayor porcentaje se logró con la adición solamente de ácido ascórbico en la dilución de semen; sin embargo, estos resultados no son estadísticamente significativos entre tratamientos. Concluyéndose que el uso conjunto de tocoferol y ácido ascórbico en la dilución de semen, mantiene la motilidad espermática post refrigeración a 5°C dando mayores porcentajes de fertilidad, mas no en la incubabilidad debido a factores externos como la incubación propiamente dicha; sin embargo se pueden utilizar como componentes de un dilutor de semen de gallos para la inseminación artificial de gallinas ponedoras.

Palabras clave: ácido ascórbico, tocoferol, gallo.

Abstract

This research was carried out in the National Bank of Semen and Poultry Experimental Unit from La Molina Agrarian University. The objectives of this study were to evaluate the ascorbic acid and tocopherol comparatively on the semen fertility of cock. The experiment used 28 hens (Hy Line Brown) of 25 weeks of age during the incubation period and 6 mature crossed cocks of 30 months. It was established 4 treatments named such as: T1 (CINa at 1% - control), T2 (ascorbic acid 200 ug/ml), T3 (tocopherol 8 ug/ml) and T4 (tocopherol 8 ug/ml + ascorbic acid 200 ug/ml). The dilution of semen at 38°C of temperature was in a 1:1 proportion and then refrigerated at 5 °C. The semen collection was 3 times per week. The artificial insemination was vaginal via at 3 cm of depth approximately using a modified tuberculin syringe with 0.01 ml for hen containing 100 million sperms once per week. The eggs selected by treatment were incubated to determine the fertility (those that shown the germinal blastocist), incubability and natality. The statistical analysis of data was done by ANOVA for randomized complete design and the comparison of means was done using Duncan. The best result of motility (69 %), fertility (76.3 %) and incubability percentage (81.7 %) were obtained when the tocopherol and the ascorbic acid were added in the semen diluted. As a result, T4 was statistically different over the treatments. For natality the biggest percentage (72.9 %) was achieved only with acid ascorbic added in the diluted semen; however, this result is not statistically significant among treatments. It was concluded that the tocopherol and ascorbic acid combination have great effect in the motility, fertility and incubability percentage of diluted semen and maintain the spermatic motility post refrigeration at 5 °C. As a result, this combination is recommended to use as a dilutor of cock's semen for the artificial insemination.

Key words: ascorbic acid, tocopherol, rooster acid.

1. Introducción

La inseminación artificial cumple un rol fundamental en la industria avícola, particularmente en la mejora genética, formando líneas puras de pedigree que dan origen a bisabuelos y abuelos aprovechando al máximo, obtener mayor progenie- un macho élite. Asimismo, debido al esfuerzo de lograr aves de

mayor peso, los gallos reproductores de carne continúan aumentando su peso corporal, siendo la inseminación artificial una herramienta que permite producir mayor cantidad y calidad de huevos fértiles que por monta natural. El uso de la inseminación artificial en gallinas reproductoras de postura para obtener pollos BB de postura permite reducir los costos de producción por polla BB y evitar la transmisión de enfermedades sexuales. La adición de antioxidantes al semen de mamíferos y aves favorece la viabilidad de los espermatozoides contrarrestando los efectos deletéreos contra la membrana celular, de sustancias reactivas y radicales libres de oxígeno

¹ Profesor Principal, Facultad de Zootecnia, Departamento de Producción Animal de la UNALM. Lima, Perú. E-mail: mcumpa@lamolina.edu.pe.

² Magister Scientiae en Ciencias – Producción Animal. UNALM

producidos en el metabolismo de los espermatozoides. La conservación *in vitro* de espermatozoides producen fenómenos de toxicidad por la peroxidación lipídica de la membrana espermática debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados susceptibles a radicales libres de oxígeno. El nivel de toxicidad es controlado, entre otras sustancias como enzimas, por antioxidantes, que tienen tendencia a unirse a los radicales libres de oxígeno donando electrones, deteniendo así la peroxidación lipídica manteniendo y elevando la calidad de semen del gallo a través de la conservación de la integridad de la membrana espermática logrando motilidades altas. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo, evaluar comparativamente al ácido ascórbico y tocoferol sobre la fertilidad del semen de gallo.

Los espermatozoides de gallo difieren de los mamíferos, en el contenido de cloruro careciendo casi por completo de fructosa, citrato, ergotensina, inositol, fosforilcolina y glicerofosforilcolina, siendo el principal anión el glutamato (Hafez, 1996).

La presencia de alto contenido de cloruro y glutamato en el eyaculado de gallo, producen un desgaste energético rápido haciendo que la motilidad sea alta, por lo que la vida de los espermatozoides de gallo es breve (Mann, 1975).

La fuente energética para la motilidad está en la cabeza de los espermatozoides donde se encuentran los nucleótidos adenina y guanina, ricos en energía. En la vaina mitocondrial se encuentran enzimas del sistema respiratorio citocromo-oxidasa, lactato deshidrogenasa (Garner y Hafez, 1986).

Los espermatozoides del gallo metabolizan los hidratos de carbono apreciándose un grado notable de glucólisis. Existiendo un metabolismo aerobio y anaerobio. El metabolismo aerobio está dado sobre la base de fructosa, glucosa y manosa. El metabolismo anaerobio utiliza diversos azúcares y acetatos (Yoshida y Masuda, 1978 citado por Pérez y Pérez, 1986).

Scott (1983) refiere que, en los espermatozoides de gallo el metabolismo endógeno es mucho más importante que el exógeno, resultando el nivel metabólico total muy bajo traduciendo en uso mínimo de energía.

La degradación de glucosa, fructosa o manosa a ácido láctico en un medio anaerobio permite a los espermatozoides sobrevivir en esas condiciones (ausencia de oxígeno), factor importante para el almacenamiento de espermatozoides para uso en inseminación artificial (Wishart y Palmer, 1986).

Los espermatozoides en presencia de oxígeno emplean lactato o piruvato resultantes de la fructólisis de azúcares para su actividad respiratoria con la producción de dióxido de carbono y agua. Por medio de esto, los espermatozoides en las mitocondrias convierten la mayor fracción de la energía en adenosin trifosfato (ATP) que son empleados para la motilidad de los espermatozoides y para mantener la integridad de los procesos de transporte activo de las membranas del espermatozoide (White, 1980).

Los espermatozoides del gallo a diferencia de los mamíferos tienen la tendencia de realizar movimientos circulares con relación a su morfología específica, debido a cambios en la presión osmótica y velocidad media de los espermatozoides del gallo que son menores a los mamíferos (Pérez y Pérez, 1986).

El espermatozoide de gallo en condiciones aeróbicas (4°C *in vitro*), necesita una concentración óptima de oxígeno aproximadamente 400nMO₂ /ml para una buena viabilidad (Wishart, 1982).

La alta cantidad de oxígeno provoca producción de altos niveles de peróxidos por parte de la célula. Los ácidos grasos insaturados, poliinsaturados y fosfolípidos de la membrana son susceptibles a la peroxidación, produciéndose reacción en cadena de estos ácidos poliinsaturados con la consiguiente destrucción de la integridad de la membrana (Blesbois, 1985).

Los antioxidantes previenen la oxidación, a través de un proceso químico uniéndose químicamente a los radicales libres de oxígeno y a la sustancia que lo produce para neutralizarlos desempeñando un rol protector de las células (Martini, 1999).

Los antioxidantes que se vienen utilizando como parte de los ingredientes de la dilución de semen de vacunos (Beconi, 1997) como también de pavos (Donoghue y Donoghue, 1997) son las vitaminas E y C que dan buenos resultados de fertilidad.

En el proceso de producción de energía celular se producen los radicales libres de oxígeno, estos son compuestos que al encontrarse en exceso son altamente reactivos y tóxicos que se van incrementando por ruptura de enlaces covalentes en compuestos orgánicos o por captura de un electrón por una molécula, reaccionando con los ácidos grasos poliinsaturados (Mc Cay y King, 1980).

Los fosfolípidos de las membranas mitocondriales del retículo endoplasmático poseen afinidades para tocoferol, concentrándose esta vitamina en estos sitios. Los tocoferoles actúan como antioxidantes por tener la capacidad de transferir un nitrógeno fenólico a un radical peróxido libre de un ácido graso poliinsaturado peroxidado, interrumpiendo las destructivas reacciones en cadena de la peroxidación lipídica (Villavicencio, 1995).

El tocoferol impide la autooxidación espontánea de los ácidos grasos poliinsaturados son expuestos al oxígeno molecular, se produce la polimerización de los ácidos grasos insaturados. La acción antioxidante del tocoferol es eficaz en altas concentraciones de oxígeno (Afaf Kamal y Appelqvist, 1996).

En un estudio realizado sobre los efectos de la suplementación de la vitamina E sobre la motilidad y fertilidad de semen aviar almacenado por 24 horas a 4°C, se llegó a determinar que la suplementación de vitamina E, no tiene efecto alguno sobre la motilidad espermática, sin embargo mejora la habilidad fertilizante a una dosis de 8µg/ml de semen diluido (Bleisbois *et al.*, 1993).

La adición de las vitaminas E y C al semen diluido de pavo mejora la viabilidad del esperma, la integridad de la membrana, y reduce la pérdida de motilidad

después de estar almacenado por 48 horas (Donoghue y Donoghue, 1997).

Surai *et al.* (1998) demostraron que los espermatozoides de cinco especies aviares (gallo, pavo, gallo de guinea, pato y ganso), se caracterizan por tener altas proporciones de ácidos grasos poliinsaturados, de 46 a 55%. Siendo los ácidos más abundantes el araquidónico y el docosateranóico representando entre el 22 y 40% del total de ácidos. Asimismo, determinaron una actividad significativamente mayor de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa como protectores de la peroxidación muy asociado a la presencia de ácidos grasos insaturados.

En un estudio se utilizó antioxidantes para favorecer la resistencia del espermatozoide al proceso de congelamiento y descongelamiento debido a la alta sensibilidad del semen bovino a la peroxidación lipídica. En este estudio se utilizó un diluyente estándar sin y con vitamina E (1mg/ml) y heparina (60mg/ml) como inductor de la capacitación espermática, fue medido a través del ensayo de clortetraciclina y, el ensayo de 2-tiobarbitúrico para la determinación del grado de peroxidación lipídica. Notándose una disminución de sustancias reactivas al ácido tóbarbitúrico (TBARS) en el semen congelado con vitamina E. Esta vitamina protege la membrana plasmática del espermatozoide contra la peroxidación lipídica durante la capacitación espermática para el congelamiento y descongelamiento (O' Flaherty *et al.*, 1997).

El aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y su posterior detoxificación por antioxidantes, juega un rol muy importante en la fertilidad del semen bovino, que sufre estrés oxidativo durante el congelamiento-descongelamiento, aumentando las especies reactivas de oxígeno, que reducen el nivel y la actividad de los antioxidantes (glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) en un 78% y 50% respectivamente, siendo esto detrimental para el espermatozoide (Bilodeau *et al.*, 2000).

2. Materiales y métodos

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del Banco Nacional de Semen y en la Unidad Experimental de Avicultura de la Universidad Nacional Agraria la Molina.

Se utilizaron 6 gallos cruzados de 30 meses de edad, alojados individualmente en piso. Asimismo, se trabajó con 28 gallinas Hy Line Brown de 25 semanas de edad, divididas al azar en 4 grupos en jaulas individuales.

Para la evaluación de semen, dilución de semen e inseminación artificial se utilizaron: pipetas Pasteur, tubos de colección graduados de 15ml, rejillas metálicas, cámara de Neubauer, láminas porta y cubreobjeto, contómetro, cocina eléctrica, autoclave, baño María, microscopio con platina incorporada, balanza analítica con 0.05mg de aproximación, refrigeradora, termómetro digital de 200 a +100°C, jeringa descartable modificada para inseminar y baguetas de vidrio. El cloruro de sodio, agua

bidestilada, ácido ascórbico y α - tocoferol fueron conservados de acuerdo a las recomendaciones del laboratorio.

Metodología

La ejecución del trabajo se efectuó en tres etapas:

Etapas I. Adiestramiento de los gallos

Se empezó a trabajar con 11 gallos, el adiestramiento se realizó por las mañanas 3 veces por semana con 15 minutos por sesión por un periodo de 16 semanas. Antes del adiestramiento se desplumó y limpió la región de la cloaca, para facilitar el masaje y evitar la contaminación de semen. La técnica utilizada fue de Burrows y Quinn (1937) que consiste en masajes en forma circular con ligeras presiones, aplicados en la región dorso-abdominal, dirigidos a la cloaca entre el final de la quilla y el encuentro de los huesos isquión, hasta lograr eyaculados sobre una plataforma de bolsa temperada a 37°C. Se seleccionaron 6 gallos que respondieron al adiestramiento con características seminales óptimas, concentración espermática de 2.0 a 4.0 x 10⁹ por cc, volumen mínimo 0.2 cc.

Etapas II. Evaluación y dilución de semen

La colección, evaluación y dilución seminal se realizaron en el Laboratorio del Banco Nacional de Semen. El color se evaluó inmediatamente después de la eyaculación, el volumen se determinó en el tubo de colección graduado después de recoger el semen de la plataforma de colección. El aspecto se evaluó al momento de depositar el semen en el tubo de colección y el pH se midió, antes y después de la dilución con los respectivos tratamientos.

La motilidad se determinó en tres momentos sobre la base de 10 evaluaciones, estos son: motilidad post colección, motilidad post dilución y motilidad post conservación, para esto se empleó un microscopio electrónico con platina incorporada temperada a 37°C. Para la concentración espermática se utilizó la técnica del hemocitómetro, que consta de una micropipeta y una cámara de Neubauer. Los cálculos se realizaron con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración espermática/mm}^3 = \text{N}^{\circ} \text{ espermatozoides} \times 5 \times 200 \times 10000$$

El porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se realizó por contraste con eosina a una gota de semen puro aquellos que no presentaban ninguna tinción en la cabeza se considero vivos y muertos a aquellos con cabeza de aspecto rojizo.

El porcentaje de espermatozoides anormales se realizó por contraste con eosina y nigrosina a una gota de semen, después se observó las anomalías, en tres regiones del espermatozoide (cabeza, pieza intermedia y cola)

Los dilutores se prepararon en el Laboratorio del Banco de Semen el mismo día de la inseminación. Se formó un pool de semen de aquellos 6 machos seleccionados, diluyéndose 1:1, a una temperatura de 38°C. La adición del dilutor en el semen fue en forma lenta, luego se dejó en refrigeración a 5°C después se evaluó la motilidad antes de la inseminación artificial.

Tratamientos

La distribución de los tratamientos fue de la siguiente manera:

Tratamiento I. Suero fisiológico al 1 % (control).

Tratamiento II. Suero fisiológico al 1% + ácido ascórbico (200µg/ml).

Tratamiento III. Suero fisiológico al 1%+ tocoferol (8µg/ml).

Tratamiento IV. Suero fisiológico al 1% + ácido ascórbico (200µg/ml) + tocoferol (8µg/ml).

Etapa III. Inseminación artificial e incubación

Se agruparon 7 gallinas por tratamiento, inseminadas por las tardes, prolapsando la vagina de la gallina y con la jeringa de tuberculina (adaptada) se depositó una dosis de 0.1 ml de semen, por gallina por semana (dosis aprox. contenía 100 millones de espermatozoides). Los huevos fueron colocados en la incubadora con un periodo de almacenamiento no mayor a 7 días.

Para evaluar el efecto de los antioxidantes ácido ascórbico y tocoferol sobre la motilidad, fertilidad, incubabilidad y natalidad se utilizó el Diseño Completo al Azar previa transformación de los datos porcentuales al arco seno.

3. Resultados y discusión

Características seminales

En la Tabla 1 se muestran los resultados de características seminales macroscópicas y microscópicas de los gallos empleados en la investigación. En el pH del semen se obtuvo un valor promedio de 7.46 siendo similar con lo reportado por North (1986), Pérez y Pérez (1986), quienes encontraron una máxima motilidad espermática a un pH de 7.4 a 7.5 a 30°C. Así mismo, Hafez (1996), Hajar (1994), Cumpa (1995) y Barna (1996) encontraron valores de pH entre los rangos de 7.0 a 7.6, coincidiendo con lo reportado por Díaz (1999). En relación al color los gallos exhibieron un color de semen blanco perlado y un aspecto denso.

En volumen seminal (Tabla 1) se halló diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.01$) entre los gallos empleados en el presente experimento, por ser estos animales producto de múltiples cruces y de edades variables; sin embargo, estos valores se encuentran dentro de los rangos de volumen reportados por Pérez y Pérez (1986), Hafez (1996), Cumpa (1995) y Díaz (1999), quienes reportan valores que oscilan entre 0.1 a 0.6 cc

En concentración espermática (Cuadro 1), se observan diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.01$) entre los gallos evaluados. Sin embargo, estos valores están dentro de los rangos de 2.7 a 3.3 x 10⁹ espermatozoides por centímetro cúbico, reportados por Hajar (1994), Cumpa (1995) y Díaz (1999). Esta diferencia observada entre gallos depende principalmente del comportamiento individual, edad y raza (Bonadonna, 1989).

La motilidad encontrada después de la colección muestra diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), entre las muestras seminales de los gallos (Cuadro 1), siendo esta característica evaluada, un comportamiento inherente principalmente a raza, edad y manejo del animal, estos valores encontrados concuerdan con los encontrados por Hafez (1996) y Bonadonna (1989). Asimismo, el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos de gallos post colección (Tabla 1), no muestran diferencias estadísticas significativas entre gallos ($P < 0.05$), evidenciándose un porcentaje máximo de espermatozoides muertos de 15% y un mínimo de 13.3%, valores que se encuentran dentro de los rangos reportados por Hafez (1996). Del mismo modo los porcentajes hallados para anomalías espermáticas entre gallos (Tabla 1) no muestran diferencias estadísticas. Los máximos valores encontrados de espermatozoides anormales fueron de 16%, concordando con los reportados por Pérez y Pérez (1986), Hafez (1996), siendo mayor la frecuencia de cabezas desprendidas y presencia de gota protoplasmática.

Tabla 1. Valores promedio para Características Seminales macroscópicas y microscópicas de Gallos.

| Gallo | Volumen (ml) | pH | Concentración Espermática (10 ⁷ /cc) | Motilidad Post Colección (%) | Mortalidad Post Colección* (%) | Anormalidad Esper-mática* (%) |
|-------|--------------------------|------------------|---|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 0,34 ± 0.13 ^b | 7,4 ^a | 309,7 ± 32.94 ^b | 76,5 ± 2.41 ^{ab} | 15.0 ^a | 15.0 ^a |
| 2 | 0,34 ± 0.06 ^b | 7,4 ^a | 323,4 ± 31.38 ^b | 75,5 ± 3.13 ^{ab} | 13.3 ^a | 16.7 ^a |
| 3 | 0,25 ± 0.18 ^b | 7,5 ^a | 393,5 ± 42.65 ^a | 75,0 ± 3.37 ^{abc} | 15.0 ^a | 16.7 ^a |
| 4 | 0,38 ± 0.08 ^b | 7,5 ^a | 309,6 ± 29.68 ^b | 70,0 ± 5.06 ^c | 15.0 ^a | 15.0 ^a |
| 5 | 0,24 ± 0.06 ^b | 7,5 ^a | 329,7 ± 30.00 ^b | 71,5 ± 4.48 ^{bc} | 15.0 ^a | 16.7 ^a |
| 6 | 0,58 ± 0.13 ^a | 7,5 ^a | 400,3 ± 87.62 ^a | 77,5 ± 3.85 ^a | 13.3 ^a | 15.0 ^a |

Valores con letras diferentes tienen diferencia ($P < 0.05$)

Se observó diferentes significados entre gallos

Motilidad post dilución con antioxidantes en el dilutor

Los índices de motilidad encontradas a la adición de las vitaminas se muestran en la Tabla 2, observándose diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) entre tratamientos, notándose que la adición en forma conjunta de vitamina C + vitamina E dan mayores valores de motilidad espermática.

Este mayor porcentaje de motilidad se encuentra dentro de los valores reportados por Cumpa (1995) cuando realizó diluciones de semen de gallo con citrato de sodio al 2.9%, pero inferior cuando realizó diluciones seminales solamente con cloruro de sodio al 1%, la evaluación de esta característica es subjetiva

Tabla 2. Efecto de los Antioxidantes sobre la Motilidad Espermática Post Dilución, Post Refrigeración y Porcentaje de Fertilidad.

| Variable | Tratamientos | | | |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | T1 CINa al 1% | T2 VIT C | T3 VIT E | T4 VIT C+E |
| Motilidad post colección | 74.3 ± 1.95 ^a | 74.3 ± 1.95 ^a | 74.3 ± 1.95 ^a | 74.3 ± 1.95 ^a |
| Motilidad post dilución | 68.5 ± 2.41 ^b | 69.5 ± 1.13 ^b | 69.5 ± 1.13 ^b | 73.5 ± 1.73 ^a |
| Motilidad post refrigeración | 60.0 ± 3.77 ^c | 64.0 ± 3.52 ^b | 66.5 ± 2.41 ^{ab} | 69.0 ± 2.26 ^a |
| Fertilidad | 65.9 ± 1.63 ^d | 69.1 ± 1.56 ^c | 71.6 ± 1.43 ^b | 76.3 ± 2.12 ^a |

Valores con letras diferentes tienen diferencia estadística significativa (P < 0.05)

380 huevos en promedio fueron utilizados por tratamiento

Motilidad post refrigeración con antioxidantes en el dilutor.

Los valores de motilidad encontrados muestran diferencias estadísticas significativas (P < 0.05) entre tratamientos (Tabla 2) observándose mayor motilidad post refrigeración con el uso conjunto de ambas vitaminas en la dilución de semen de gallo. Comparando con las motilidades obtenidas post dilución, estos valores son menores debido posiblemente a la mortalidad espermática de algunos espermatozoides que tuvieron principios de descomposición lipídica de la membrana espermática antes de la refrigeración, haciéndolos altamente sensibles a temperaturas bajas de 5°C de conservación (Roldan y Harrison, 1993).

La vitamina C al reaccionar con la vitamina E oxidada, lo reduce y así nuevamente la vitamina E vuelve a ser activa y el ácido ascórbico cuando se oxida puede ser reducido nuevamente a vitamina C por el NADH. Este círculo de reacciones químicas es continua en medios altamente contaminados por radicales libres de oxígeno causantes de la mortalidad celular y por lo tanto disminuye la motilidad masal espermática (Neswender, 1996).

Estos porcentajes de motilidad son inferiores a los reportados por Donoghue y Donoghue (1997) para la vitamina E (rango de 75 a 78%) y para la vitamina C (rango de 67 a 75%) en la refrigeración de semen de pavo durante 24 horas, pudiendo deberse esto a la sustancia Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) que utilizaron para diluir el semen ya que este dilutor contiene sustancias energéticas y antibióticos que reducen la carga de microbios patógenos y, porque en el presente trabajo, la conservación de los espermatozoides fue por mas de 24 horas.

Los efectos de la suplementación de vitamina E sobre la motilidad del espermatozoide de gallo almacenado por 24 horas a 4°C diluido en BPSE (Blesbois *et al.*, 1993) son superiores (80%) a los encontrados en el presente trabajo pudiendo deberse a la eliminación del plasma seminal por centrifugación, ya que el bajo peso molecular del plasma daña la habilidad de motilidad y fertilidad del espermatozoide.

Sin embargo, estos valores encontrados están dentro de los rangos recomendados por Pérez y Pérez (1986) y Hafez (1996) quienes consideran valores óptimos para inseminación artificial motilidades mayores a 60% para lograr buena fertilidad.

Fertilidad

La fertilidad de los respectivos tratamientos (Cuadro 2) muestran diferencias significativas, encontrándose que el porcentaje de fertilidad post refrigeración del

semen diluido con vitamina E y vitamina C en forma conjunta fue significativamente mayor en comparación con los otros tratamientos.

Este valor de fertilidad puede deberse a la motilidad alta encontrada post refrigeración, característica que tiene una alta correlación con el porcentaje de fertilidad (Donoghue *et al.*, 1997), así como por la conservación de la integridad de la membrana celular importante en el transporte de sustancias y para el deslizamiento del espermatozoide hacia el oviducto (Froman *et al.*, 1997). La vitamina C reacciona con el radical vitamina E para regenerar la misma vitamina E y el radical ácido ascórbico resultante de esta reacción química puede a su vez ser reducido también nuevamente a vitamina C por el NADH y luego seguir dos rutas: Reaccionar nuevamente con la vitamina E o reaccionar con otro radical peróxido libre. Este sistema de interacción de estas vitaminas ofreciendo una acción protectora a las membranas de las estructuras del espermatozoide (Afaf Kamal y Appelqvist, 1996).

Al comparar la fertilidad obtenida en los tratamientos se observa un mejor resultado cuando se utiliza en forma conjunta la vitamina E con la vitamina C en la dilución de semen de gallo que usarlo por separado; sin embargo, Blesbois *et al.*, (1993) reporta mejores resultados cuando trabaja solamente con la vitamina E adicionado al semen diluido con BPSE, esta diferencia en los resultados con el presente trabajo puede deberse al efecto favorable de los ingredientes del BPSE y a la eliminación del plasma seminal que contiene alto contenido de cloruros y glutamatos (Hafez, 1996) por ser estos aniones los que originan un rápido y prematuro desgaste energético haciendo que la motilidad sea alta y la vida de los espermatozoides sea breve (Mann, 1975).

Estos porcentajes de fertilidad logrados en el presente trabajo son menores a los reportados por Studen y Rajamahendram (1995) quienes hallaron fertilidades de 83.7% y 88.7% cuando usó los dilutores BPSE y Lake, respectivamente. Asimismo, también Van Wambeke (1984) reporta fertilidad de 93% cuando usó leche descremada, glutamato de sodio, citrato de sodio, glucosa, clara de huevo y agua destilada como dilutor de semen de gallos. Bonadonna (1989) usando semen diluido con solución Ringer logra fertilidades de 87.5%. Estos resultados explican de alguna manera el efecto significativo de los componentes usados en los dilutores, sobre la fertilidad final (Sexton, 1980).

La forma como se comportan estas variables entre sí se aprecia en la Tabla 3 indicando que a mayor fertilidad se logra también una mayor incubabilidad, mas no así en la natalidad. Es decir, que el desarrollo embrionario siendo un proceso continuo de producción de energía celular se origina también radicales libres que en altas cantidades son reactivos y tóxicos, rompiendo enlaces covalentes en los compuestos orgánicos (Mc Cay y King, 1980) posiblemente la vitamina E esta determinando el equilibrio optimo de la cantidad de oxígeno, por tener la capacidad de transferir un nitrógeno fenólico a un

radical peróxido libre interrumpiendo reacciones en cadena (Villavicencio, 1995).

La deficiencia de esta vitamina E produce acumulación de lipofuscina, asimismo eleva favorablemente la actividad detoxificadora de las enzimas presentes en el embrión tales como: Catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa. Estas enzimas en forma conjunta con la vitamina E disminuyen la peroxidación lipídica microsomal en el hígado y corazón (Geetha *et al.*, 1989).

Tabla 3. Fertilidad, Incubabilidad y Natalidad (%) de Gallinas Inseminadas con Semen Diluido con adición de Antioxidantes y Utilidad Bruta por Pollo (S/).

| Variable (%) | Tratamientos | | | |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | T1 CINa al 1% | T2 VIT C | T3 VIT E | T4 VIT C+E |
| Fertilidad | 65.9 ± 1.63 ^d | 69.1 ± 1.56 ^c | 71.6 ± 1.43 ^b | 76.3 ± 2.12 ^a |
| Incubabilidad | 46.6 ± 4.15 ^a | 50.4 ± 6.13 ^a | 49.3 ± 5.99 ^a | 53.1 ± 6.50 ^a |
| Natalidad | 70.8 ± 6.19 ^a | 72.9 ± 8.47 ^a | 68.8 ± 6.90 ^a | 70.4 ± 7.11 ^a |
| Utilidad Bruta por Pollo (S/) | 0,73 | 0,80 | 0,78 | 0,84 |

Valores con letras diferentes tienen diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), 380 huevos en promedio fueron utilizados por tratamiento.

Merito económico

En el T4 (vitaminas C y E) se obtuvo una mayor utilidad bruta por pollo BB nacido en comparación a los demás tratamientos, corroborando de esta manera el efecto sinérgico de los antioxidantes en cuanto se refiere a la conservación de la célula espermática bajo refrigeración para lograr buena motilidad espermática, fertilidad y natalidad. Estos valores económicos son inferiores a los reportados por Hammerstedt (1994) y Díaz (1999).

4. Conclusiones

Considerando las condiciones en que se llevó a cabo el presente estudio experimental se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El uso del ácido ascórbico (200µg/ml) y el tocoferol (8µg/ml) adicionada conjuntamente en el dilutor de semen para refrigeración a 5°C, permite obtener una motilidad significativamente mayor que cuando se adicionan por separado.
2. La adición de antioxidantes en el dilutor de semen favorece la conservación de la motilidad espermática post refrigeración.
3. Los mayores porcentajes de fertilidad se obtuvieron con el uso de antioxidantes, tocoferol y ácido ascórbico en el dilutor con respecto al control.
4. La adición de tocoferol y ácido ascórbico en forma conjunta sería lo mas adecuado en el dilutor de semen para lograr una buena fertilidad (76.3%).

5. Referencias bibliográficas

Afaf Kamal, E. y L. A. Appelqvist. 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, Vol. 31 N° 7.

Barna J. 1996. Motility and agglutination of fowl spermatozoa in media of different amino acid content and pH value in vitro. *Acta Vet. Hung* 44:2 221-232.

Beconi M. 1997. Maduración de ovocitos bovinos "in vitro", requerimientos metabólicos y preservación del daño oxidativo. CYT área de Química UBA.

Bilodeau J. F., S. Chatteriee, M.A. Sirard y C. Cargnon. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in Bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Reprod. Dev.* 55:3 282 - 288.

Bleisbois E.; I. Grasseau y J.C. Blum. 1993. Effects of vitamin E on semen storage at 4 °C. *Theriogenology* 39: 771 - 779.

Blesbois E. 1985. Conservation in vitro des spermatozoides de coq. These 3eme cycle, Universite Pierre et Marie Curie, Paris.

Bonadonna T. 1989. Reproducción animal e Inseminación artificial Tomo II. Ed. Hemisferio Sur S.A. Argentina.

Burrows W. H. y J. P. Quinn. 1937 A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl. *Poultry Sci.* 14: 251 - 254.

Cumpa G. 1995. Efecto de los dilutores de semen citrato de sodio y cloruro de sodio y del número de inseminaciones sobre la fertilidad de gallinas ponedoras. Tesis de M. Sci. UNALM. Lima.

Charlotte, J. A. 1991. Biología celular. 2 Edic. Editorial Iberoamericana S.A. México.

Díaz Z.J. 1999. Estudio de la criopreservación de semen de Gallos Reproductores de Carne (Cornish) y Criollos utilizando BPSE y DMSO. Tesis para optar el Grado de M. Sc. UNALM Lima - Perú.

Donoghue A. M. y D. J. Donoghue 1997. Effects of water -and lipid-soluble antioxidants on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. *Poultry Science* 76: 1440 - 1445.

Froman D.P., A. J. Feltmann, y D.J. Mclean. 1997. Increased Fecundity.

- Resulting from Semen Donor Selection Based Upon In Vitro Sperm Motility. Department of Animal Sciences, Oregon State University, Corvallis. *Poultry Science* 76:73 - 77.
- Garner, D.L. y E.S.E. Hafez. 1986. Spermatozoa and seminal plasma in reproduction in farm animals, 5th. ed. E.S.E., Hafez Ed. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Geetha, A.; J. Catherine y C.S. Shyamala Devi. 1989. Effect of alpha - tocopherol on the microsomal lipid peroxidation induced by doxorubicin: influence of ascorbic acid. *Indian J. Physiol Pharmacol* 33(1): 53 - 58.
- Hafez, E. S. 1996. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Ed. Interamericana 5ta. Ed. México.
- Hijar, R. 1994. Fertilidad obtenida en gallinas (*Gallus gallus*) por el método de inseminación artificial. Tesis Ing. Zootecnista. Universidad Nacional Agraria la Molina Lima - Perú.
- Mann, T. 1975. Biochemistry of semen. In hand - book of physiology, sección 7, endocrinology, vol V, male reproductive system R. O., Greep and E.B., Astwood (eds) Washington, D.C. American Physiological Society.
- Martini J. M. 1999. Antioxidantes y Nutrición. *Revista InfoMedica* N° 4 - Julio. Argentina.
- McCAY, P.B. y M.M. King. 1980. Vitamin E: Its role as a biological free radical scavenger and its relationship to the microsomal mixed function oxidase system. Pp. 289 in Vitamin E. Machlin, L.S. Edic. Marcel Dekker Inc. NY, USA.
- Neswender J. 1996. Maintenance of ATP concentrations in and fertilizing ability of chicken and turkey spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 66: 457 - 462.
- North, M.O. 1986. Manual de Producción Avícola. Ed. Manual Moderno.
- O'flaherty C., M. Beconi y N. Beorlegui. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen - thawed bull spermatozoa. *Andrología* 29: 5 269 - 275.
- Perez y Perez, F. 1986. Reproducción e inseminación artificial ganadera Edit. Científico Médica. Barcelona España.
- Roldan, E.R.S. y R.A.P., Harrison. 1993. Diacylglycerol in the exocytosis of the mammalian sperm acrosome. *Biochemical Society Transactions* 21: 284 - 289.
- Scott T.W. 1983. Lipid metabolism of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 18: 65 - 76.
- Sexton T.J. 1980. Optimal rates for cooling chicken semen from +5 to -196 °C *Poultry Sci* 59: 1765 - 2770.
- Studen C.E. y R. Rajamahendran. 1995. Comparison of two poultry semen extender. *Abstracts of Papers. Vol. 74 Supplement 1 August* 14 - 18.
- Surai P.F., E. Blesbois, I. Grasseau, T. Chalah, J.P. Brillard, G.J. Wishart, S. Cerolin y N.H Sparks. 1998. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comp. Biochem. Physio B. Mol Biol.* 120: 3 527 - 533.
- Van Wambeke, F. 1984. Effect of semen storage time and numbers of spermatozoa inseminated on the fertility and hatchability of eggs from dwarf breeders hens. *Br. Poultry Sci.* 25: 583 - 587.
- Villavicencio, M. 1995. Antecedentes de la investigación institucional en las áreas de producción y transformación de alimentos y nutrición. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima - Perú.
- White, I.G. 1980. Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. In reproduction in farm animals, 4th ed. E.S.E., Hafez (ed) Philadelphia, Lea & Febiger.
- Wishart G.J. y PALMER F.H. 1986. Correlation of the fertilizing ability of semen from individual male fowls with sperm motility and ATP content. *Br. Poult. Sci.*, 27:97 - 102.
- Wishart G.J. 1982. *Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría* 2da Edic. Edit. Aspa S.A. España.