

Efecto del isoespintanol y el timol en la actividad antioxidante de semen equino diluido con fines de congelación

Giovanni Restrepo Betancur¹ / Benjamín Alberto Rojano²

Resumen

Una amplia variedad de antioxidantes evaluados en la congelación de semen equino no ha arrojado resultados satisfactorios en el mantenimiento de su calidad y fertilidad. El isoespintanol y el timol son moléculas de origen natural con una alta actividad antioxidante, lo que las hace potencialmente útiles para reducir el estrés oxidativo del semen durante la criopreservación. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del isoespintanol y el timol en la actividad antioxidante total y enzimática de semen equino diluido con fines de congelación. El semen de cinco caballos criollos colombianos se diluyó en un medio de congelación, se dividió en tres alícuotas que se asignaron aleatoriamente a los tratamientos isoespintanol (40 μ M), timol (50 μ M) o control (sin antioxidante). Se evaluó la capacidad antioxidante total (TAC) por los ensayos ORAC y FRAP. La actividad de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) se evaluaron mediante pruebas enzimáticas. La evaluación estadística se realizó mediante modelos mixtos, análisis de correlación y comparación de medias por la prueba de Tukey. Las actividades de SOD y GPx fueron menores para el isoespintanol ($6,7 \pm 2,2$ U/ml y $0,16 \pm 0,02$ U/ml), comparadas con el timol ($6,9 \pm 2,2$ U/ml y $0,20 \pm 0,02$ U/ml) y el control ($7,2 \pm 2,2$ U/ml y $0,22 \pm 0,02$ U/ml) ($p < 0,05$). No hubo diferencias para la TAC o la CAT del semen ($p > 0,05$). El isoespintanol reduce la actividad de SOD y GPx en el semen equino diluido con fines de congelación.

Palabras clave: antioxidantes, criopreservación, enzimas.

Effect of isoespintanol and thymol on the antioxidant activity of equine semen diluted for freezing purposes

Abstract

A wide variety of antioxidants that were evaluated for freezing equine semen failed to yield satisfactory results in maintaining their quality and fertility. Isoespintanol and thymol are molecules of natural origin with a high antioxidant activity, which makes them potentially useful for reducing semen oxidative stress during cryopreservation. This study aimed to evaluate the effect of isoespintanol and thymol on total antioxidant and enzymatic activity of equine semen diluted for freezing purposes. The semen of five Colombian creole horses was diluted in a freezing medium, divided into three aliquots that were randomly assigned to treatments with isoespintanol (40 μ M), thymol (50 μ M), or control (no antioxidant). Total antioxidant capacity (TAC) was evaluated using ORAC and FRAP tests. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activity were evaluated by enzymatic assays. The statistical evaluation was performed using mixed models, correlation analysis, and comparison of means by

- 1 Zootecnista. Médico veterinario. MSc. PhD. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal, Medellín, Colombia. ✉ grestre0@unal.edu.co
- 2 Químico. MSc. PhD. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Medellín, Colombia. ✉ brojano@unal.edu.co

Cómo citar este artículo: Restrepo Betancur G, Rojano BA. Efecto del isoespintanol y el timol en la actividad antioxidante de semen equino diluido con fines de congelación. *Rev Med Vet.* 2017;(35):149-58. doi: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.4397>

Tukey's test. SOD and GPx activities were lower for isoespintanol (6.7 ± 2.2 U/ml and 0.16 ± 0.02 U/ml), compared to thymol (6.9 ± 2.2 U/ml and 0.20 ± 0.02 U/ml) and to control (7.2 ± 2.2 U/ml and 0.22 ± 0.02 U/ml) ($p < 0.05$). There were no differences for TAC or CAT in semen ($p > 0.05$). Isoespintanol reduces SOD and GPx activity in equine semen diluted for freezing purposes.

Keywords: antioxidants, cryopreservation, enzymes.

Efeito do isoespintanol e o timol na atividade antioxidante de sêmen equino diluído para fins de congelação

Resumo

Uma ampla variedade de antioxidantes avaliados na congelação de sêmen equino não tem mostrado resultados satisfatórios na manutenção de sua qualidade e fertilidade. O isoespintanol e o timol são moléculas de origem natural com uma alta atividade antioxidante, fator que as faz potencialmente úteis para reduzir o estresse oxidativo do sêmen durante a criopreservação. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do isoespintanol e do timol na atividade antioxidante total e enzimática de sêmen equino diluído para fins de congelação. O sêmen de cinco cavalos nativos da Colômbia foi diluído em um meio de congelação, depois dividido em três partes designadas aleatoriamente aos tratamentos isoespintanol ($40 \mu\text{M}$), timol ($50 \mu\text{M}$) o controle (sem antioxidante). Avaliou-se a capacidade antioxidante total (TAC) pelos ensaios ORAC e FRAP. A atividade de catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) se avaliaram mediante provas enzimáticas. A avaliação estatística realizou-se mediante modelos mistos, análise de correlação e comparação de médias pela prova de Tukey. As atividades de SOD e GPx foram menores para o isoespintanol ($6,7 \pm 2,2$ U/ml e $0,16 \pm 0,02$ U/ml), comparadas com o timol ($6,9 \pm 2,2$ U/ml e $0,20 \pm 0,02$ U/ml) e o controle ($7,2 \pm 2,2$ U/ml e $0,22 \pm 0,02$ U/ml) ($p < 0,05$). Não houve diferenças para a TAC ou a CAT do sêmen ($p > 0,05$). O isoespintanol reduz a atividade de SOD e GPx no sêmen equino diluído para fins de congelação.

Palavras chave: antioxidantes, criopreservação, enzimas.

INTRODUCCIÓN

Los procesos de congelación de semen son conocidos por producir un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (1), a causa del desacoplamiento del metabolismo oxidativo normal de los espermatozoides (2). Se ha descrito que la criopreservación del semen conduce a la pérdida de la actividad de defensa antioxidante, principalmente a causa de la alteración de las enzimas antioxidantes (3).

El plasma seminal equino posee actividades considerables de superóxido dismutasa (SOD) y de glutathione peroxidasa (GPx) (4,5). Igualmente, la catalasa (CAT) se encuentra en grandes cantidades en el semen de los equinos, a excepción de la primera fracción del eyaculado, conocida como fluido preespermático, el cual se origina como secreción de las glándulas bulbouretrales (6). Vitaminas como el α -tocoferol y el ácido ascórbico, así como otras moléculas presentes en el plasma seminal equino como lactato, ácido úrico, taurina,

hipotaurina, piruvato, ergotioneína y albumina han sido reconocidas por su funcionalidad como antioxidantes (7,8). Sin embargo, es común la extracción del plasma seminal durante los procesos de criopreservación del semen equino, por su posible relación con la incapacidad de los espermatozoides para sufrir reacción acrosómica y completar la fertilización (9,10). Adicionalmente, esto podría favorecer el estrés oxidativo del semen, ya que las moléculas antioxidantes presentes en el plasma seminal son descartadas (11). Además, el proceso de centrifugación por sí mismo es deletéreo para los espermatozoides, y se ha relacionado con un incremento en la producción de ERO (12,13).

Se conoce que los diluyentes para la congelación de semen equino tienen un efecto compensatorio de la capacidad antioxidante (14). Así mismo, la adición de SOD y otras moléculas antioxidantes pueden reducir las alteraciones espermáticas generadas por el estrés oxidativo (15,16). De tal forma, antioxidantes no evaluados aún en la criopreservación de semen equino podrían potenciar su actividad antioxidante. El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un antioxidante de origen natural, presente en aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgare*) y orégano (*Origanum vulgare*), que es conocido por su capacidad de inducir un incremento en la actividad de enzimas como la glutatión-S-transferasa y la alanina aminotransferasa (ALT) (17,18).

El isoespintanol (2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol) es un análogo biosintético del timol, extraído de las hojas de *Oxandra cf xylopioides* (Annonaceae), y es considerado mejor antioxidante que el timol, por su mayor capacidad de neutralización de radicales libres, evaluada experimentalmente mediante los ensayos FRAP (poder antioxidante reductor férrico) y DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo), al igual que por su mayor capacidad de transferencia de electrones y átomos de hidrógeno. Esta se evaluó teóricamente a través del potencial de ionización y la entalpia de disociación del enlace O-H, respectivamente (19). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del isoespintanol y el timol en la actividad antioxidante total y enzimática de semen equino diluido con fines de congelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y obtención de muestras

Se empleó el semen proveniente de cinco caballos criollos colombianos (*Equus caballus*), ubicados en el municipio de Girardota (Antioquia, Colombia), 6° 23' 41,50" latitud norte y 75° 25' 27,95" longitud oeste, con una altitud promedio de 1475 m s. n. m., una temperatura promedio de 22 °C y una pluviosidad cercana a los 2200 mm/año. Los animales estuvieron entre los 2 y 8 años de edad, todos en un régimen mínimo de una colecta semanal, con fertilidad comprobada con crías nacidas vivas y con una condición corporal entre 6 y 7 (escala 1 a 9). Se realizó la evaluación física de los genitales externos de cada reproductor, para descartar alteraciones anatómicas. Se sometieron a condiciones iguales de manejo en estabulación y alimentación a base de pasto estrella henificado (*Cynodon nlemfuensis*) suministrado a voluntad. Se colectaron dos eyaculados por animal, mediante una vagina artificial modelo Missouri (Minitube, Tiefenbach, Alemania), lubricada con gel no espermicida y sobre una yegua. La fracción en gel del eyaculado se removió por filtración. El semen se diluyó en proporción 1:1 en diluyente EquiPlus® (Minitube, Tiefenbach, Alemania), y se transportó a 5 °C en una caja de transporte aislante durante 2 h.

Evaluación seminal

La concentración de espermatozoides se evaluó por espectrofotometría (Spermacue®, Minitube, Tiefenbach, Alemania) con una gota de semen fresco. La movilidad espermática se evaluó por microscopía de contraste de fase (Eclipse E200®, Nikon Inc., Tokio, Japón), en mínimo cinco campos de observación (20). La morfología normal y la vitalidad espermática se evaluaron por la técnica de eosina-nigrosina modificada, para lo cual, sobre un portaobjetos, se mezclaron una gota de semen y una gota de eosina-nigrosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), y se realizó un extendido. En un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon Inc., Tokio, Japón), se realizó la evaluación individual de 200 espermatozoides (21). La integridad de la membrana

plasmática de los espermatozoides se evaluó por la prueba hipoosmótica (HOS), de acuerdo con lo descrito por Neild y colaboradores (22). En un tubo se mezclaron 100 μ l de semen con 500 μ l de solución hipoosmótica de sacarosa 5,4% (100 mOsmol/L). Dicha mezcla se incubó a 38,5 °C por 30 min, y luego se evaluó la integridad de membrana de 200 espermatozoides, mediante un microscopio de contraste de fase Eclipse E200 (Nikon Inc. Tokio, Japón).

Preparación de muestras

Con la finalidad de retirar la mayor proporción de plasma seminal, como se realiza de forma convencional, una muestra de semen diluido de 30 ml, se centrifugó por 15 min a 1200 \times g, y se descartó un 90% del sobrenadante. La muestra se resuspendió en un diluyente a base de leche semidescremada, caseinatos de sodio y azúcares, suplementado con 4% de yema de huevo y 5% de *N,N*-dimetilformamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), en cantidad suficiente para una concentración final de 100×10^6 espermatozoides/ml. Luego se dividió en tres alícuotas, las cuales se asignaron aleatoriamente a los tratamientos: isoespintanol (40 μ M), timol (50 μ M) o control (sin antioxidante), tomando como referencia un análisis preliminar de inhibición de la producción de ERO en semen equino. Con la finalidad de realizar la medición de la actividad antioxidante, se recuperó la fracción soluble de la muestra, para lo cual cada alícuota se centrifugó a 1200 \times g durante 10 min. Se descartó el precipitado (células espermáticas) y se recuperó el sobrenadante (mínimo 5 ml), el cual se mantuvo en refrigeración a 5 °C durante máximo 1 h antes de su evaluación.

Evaluación de la capacidad antioxidante total (TAC)

La TAC se evaluó mediante los ensayos de la capacidad atrapadora de radical oxígeno (ORAC) y de la capacidad reductora férrica (FRAP). El método ORAC estuvo basado en estudios previos de Ou y colaboradores (23). Se utilizaron soluciones de fluoresceína 1×10^{-5} M en PBS (75 mM, pH 7,4) y de AAPH 0,6 M en PBS

(75 mM, pH 7,4). Cada tubo de reacción se preparó con 21 μ l de fluoresceína, 2,899 μ l de PBS, 30 μ l de muestra y 50 μ l de AAPH. Se emplearon condiciones controladas de temperatura 37 °C, pH 7,4 y Trolox® (Merck, Darmstadt, Alemania) como antioxidante de referencia. Las lecturas se realizaron por duplicado en un espectrofluorímetro LS 55 (Perkin Elmer, Waltham, USA) a longitudes de excitación/emisión de 493/515 nm. El valor ORAC se calculó usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre un blanco y la muestra, lo cual se comparó contra una curva patrón con Trolox®. Para el método FRAP se adicionaron 50 μ l de muestra a 900 μ l de solución FRAP compuesta por buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), TPTZ y FeCl₃, en relación 10:1:1. Luego de 30 min de reacción, se midió por cuadruplicado la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway, Burlington, USA). El valor encontrado se comparó con una curva de referencia construida con ácido ascórbico (24).

Evaluación de la actividad antioxidante enzimática

La actividad de la GPx y la superóxido dismutasa (SOD) provenientes de la fracción conservada de plasma seminal se midieron mediante los kits Ransel® y Ransod® (Randox Laboratories, Crumlin, UK), respectivamente, de acuerdo con los procedimientos descritos por Tavilani y colaboradores (25). Para la GPx se preparó una solución de reacción con glutatión (4 mmol/L), NADPH (0,34 mmol/L) y glutatión reductasa (0,5 U/L). Dicha solución se mezcló con hidróperóxido de cumeno (0,18 mmol/L) y 0,05 mL de muestra. Se midió por cuadruplicado el descenso en la absorbancia por espectrofotometría a 340 nm. Para la SOD la muestra se diluyó en proporción 1:31 en buffer fosfato (10 mM, pH 7). Se empleó xantina (0,05 mmol/L) y la enzima xantina oxidasa (80 U/L) para generar radical superóxido, el cual reaccionó con INT (2-(4-yodofenol)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolium cloruro) (0,025 mmol/L), para generar formazán. Se definió una unidad de SOD como aquella que inhibió el 50% de la producción de formazán. Las lecturas se realizaron por cuadruplicado mediante

espectrofotometría a 505 nm. La actividad catalasa (CAT) se evaluó mediante la medición de la desaparición de peróxido de hidrógeno, de acuerdo con el procedimiento descrito por Aebi (26). Se mezclaron 30 μ l de muestra con 720 μ l de una solución de peróxido compuesta por buffer PBS (10 mM, pH 7,0), Tritón X-100 (0,1%) y peróxido de hidrógeno (20 mM). Luego se midió por cuadruplicado el descenso de la absorbancia por espectrofotometría a 240 nm, durante 3 min. Una unidad de TAC se definió como 1 μ mol de peróxido de hidrógeno consumido por minuto. Las lecturas para las tres enzimas se realizaron mediante un espectrofotómetro 6405 UV/Vis (Jenway, Burlington, Estados Unidos).

Análisis estadístico

Se realizó el ajuste de modelos mixtos completamente aleatorizados. En cada modelo se incluyó el efecto fijo

del tratamiento y el efecto aleatorio anidado del eyaculado dentro del equino. Las covariables incluidas en cada modelo se definieron mediante un análisis de correlación de Pearson. Dado el uso de pruebas paramétricas, se evaluó la normalidad de los datos por la prueba de Shapiro-Wilk. La comparación de las medias entre los tratamientos se realizó mediante la prueba de Tukey. El nivel de significancia considerado para todas las evaluaciones fue $p < 0,05$. Todos los análisis se realizaron mediante el programa SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, USA).

RESULTADOS

Un total de 10 muestras de semen (eyaculados) se procesaron bajo los diferentes tratamientos. Los resultados para los parámetros de calidad del semen fresco se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados de la evaluación del semen fresco

Variable	n	Media	DE	CV (%)
Volumen (ml)	10	24,7	14,4	58,2
Concentración (10^6 /ml)	10	194,0	121,8	62,7
Movilidad espermática (%)	10	72,2	11,1	15,3
Vitalidad espermática (%)	10	83,7	7,0	8,3
Morfología normal (%)	10	80,5	5,8	7,2
Integridad de membrana (%)	10	77,3	7,3	9,4

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Los resultados de los modelos estadísticos ajustados para la TAC y la actividad de enzimas antioxidantes se presentan en la tabla 2. El efecto aleatorio anidado del eyaculado dentro del equino fue significativo para to-

das las variables ($p < 0,05$). Los resultados de la comparación de medias por tratamiento, para la TAC y la actividad de las enzimas antioxidantes se presentan en la tabla 3.

Tabla 2. Resultados para los modelos de actividad antioxidante

Variable	n	Media	DE	CV (%)	R ²	Valor de p
ORAC	60	8160	1605,80	19,68	0,74	< 0,0001
FRAP	120	25,99	3,92	15,10	0,93	< 0,0001
SOD	120	6,90	0,74	10,69	0,99	< 0,0001
GPX	120	0,17	0,08	46,76	0,49	< 0,0001
TAC	120	76,15	17,24	23,57	0,89	< 0,0001

n: número de repeticiones; R²: coeficiente de determinación; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; ORAC: μmol trolox equivalente/L; FRAP: mg de ácido ascórbico equivalente/L; SOD, GPx y TAC: unidades de enzima/ml.

Tabla 3. Capacidad antioxidante total y actividad enzimática por tratamiento

Tratamiento	ORAC	FRAP	SOD	GPx	TAC
Control	8560,6 \pm 0,8 ^a	24,2 \pm 4,4 ^a	7,2 \pm 2,2 ^a	0,22 \pm 0,02 ^a	74,9 \pm 17,2 ^a
Timol	7800,0 \pm 0,8 ^a	27,0 \pm 4,4 ^a	6,9 \pm 2,2 ^{ab}	0,20 \pm 0,02 ^{ab}	74,1 \pm 17,2 ^a
Isoespintanol	8270,7 \pm 0,8 ^a	25,8 \pm 4,4 ^a	6,7 \pm 2,2 ^b	0,16 \pm 0,02 ^b	74,9 \pm 17,2 ^a

Nota. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0,05$). Los resultados se expresan como media \pm error estándar. ORAC = μmol trolox equivalente/L; FRAP = miligramos de ácido ascórbico equivalente/L; SOD, GPx y TAC = unidades de enzima/ml.

DISCUSIÓN

Los resultados de la evaluación seminal realizada en el presente estudio (tabla 1) permiten considerar las muestras obtenidas como de *buena calidad*, si se toman como referencia otras investigaciones en las que se ha evaluado el semen de caballos criollos colombianos. Mesa (27) halló resultados de concentración, movilidad total y vitalidad de $209,2 \pm 49,1 \times 10^6$ espermatozoides/ml, $71,2 \pm 11,2\%$ y $73,3 \pm 6,0\%$, respectivamente; mientras Ospitia y Gonzales (28) encontraron resultados de volumen, movilidad total y morfología normal de $25,6 \pm 9,53$ ml, $63 \pm 7,8\%$ y $59,8 \pm 7,7\%$, respectivamente.

La criopreservación incrementa la producción de ERO y a su vez ocasiona un descenso en la actividad antioxidante del semen (29). Adicionalmente, la remoción del plasma seminal, produce la pérdida de diversos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que tendrían como función proteger los espermatozoides de los efectos nocivos de las ERO (8).

En algunas investigaciones se ha evaluado la TAC del plasma seminal equino (11,30); sin embargo, poco se conoce de dicha propiedad, en el semen diluido con fines de criopreservación. La evaluación de la TAC cobra mayor importancia cuando se pretende evaluar el aporte antioxidante de diferentes moléculas suplementadas a los diluyentes para semen. Yildiz y colaboradores (31) hallaron un incremento de la TAC del semen de carneros suplementado con ergotioneína.

De acuerdo con los resultados de esta investigación (tabla 2), FRAP y ORAC forman parte de los mecanismos antioxidantes del semen equino procesado con fines de criopreservación. El método FRAP se basa en la reducción de iones férricos (Fe^{2+}) a iones ferrosos (Fe^{3+}), por efecto del poder reductor de la muestra (32). Se ha observado la presencia de iones ferrosos en el semen, que podrían actuar como catalizadores (metales de transición) (33) y reaccionar con el peróxido de hidrógeno del semen equino (34), para producir el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), capaz de desencadenar la peroxidación de los

lípidos y otras alteraciones celulares (35,36). Por otro lado, el ensayo ORAC mide de la reacción de oxidación en cadena inducida por los radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), los cuales son producidos por la peroxidación de los ácidos grasos poli-insaturados, presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides (23,37).

En el plasma seminal equino se han encontrado valores FRAP y ORAC, cercanos o incluso inferiores a los hallados en este trabajo (30), lo cual podría indicar un efecto compensatorio de la capacidad antioxidante del semen, por la adición de los diluyentes de criopreservación (14). Otros estudios han encontrado valores FRAP y ORAC en plasma seminal y plasma sanguíneo humano, respectivamente (38,39).

El ensayo ORAC se basa en la detección de la actividad antioxidante debida a la transferencia de átomo de hidrógeno (HAT), igual mecanismo de acción antioxidante del timol y el isoespintanol (19). Por otro lado, mediante el método FRAP se ha demostrado la capacidad reductora férrica del timol (40). Sin embargo, la suplementación con timol e isoespintanol no generó diferencias estadísticas ($p > 0,05$) en la TAC del semen equino, evaluada por los métodos FRAP y ORAC (tabla 2). Lo anterior es contrario a lo observado por Rojano y colaboradores (41), quienes comprobaron la capacidad del isoespintanol para reducir el Fe^{3+} hasta Fe^{2+} en el ensayo FRAP, siendo considerado mejor reductor que el antioxidante sintético butilhidroxitolueno (BHT). Así mismo, se ha encontrado que la actividad antioxidante del isoespintanol se manifiesta en su capacidad para interactuar con radicales peroxilo y controlar la formación de hidroperóxidos, en modelos ricos en lípidos (42). Es probable que el semen diluido, por tratarse de un medio predominantemente acuoso y con una baja proporción de lípidos, no permita evidenciar dicho efecto.

Dado que no se tienen antecedentes de evaluación de la TAC del semen equino suplementado con timol e isoespintanol, es probable que otros métodos, como el de total de captura de radicales peroxilo (TRAP), el de la capacidad antioxidante reductora del ion cúprico (CUPRAC), el del radical libre DPPH \cdot , o el de la deco-

loración del radical catiónico ABTS \cdot^+ , puedan ser más adecuados para la evaluación de su actividad antioxidante en este medio. El método ABTS se ha utilizado para evaluar la TAC del plasma seminal equino (11), mientras que frente al radical DPPH \cdot se conoce que el isoespintanol reacciona con una velocidad similar al BHT (42). Por otro lado, el estudio de la propiedad de solubilidad del timol y el isoespintanol podría dirigir de mejor forma el análisis de su aporte a la TAC del semen. Esto mediante el uso de técnicas específicas como ORAC hidrofílico y ORAC lipofílico (43).

La actividad de enzimas antioxidantes como la CAT y la SOD se ha relacionado con la disminución del estrés oxidativo y el mejoramiento de la calidad del semen equino (15,35). Como se realiza convencionalmente, en este estudio se removió la mayor proporción del plasma seminal, antes de la dilución del semen en el medio de congelación. Sin embargo, dado que no se realizó la adición de enzimas antioxidantes en el diluyente utilizado, la actividad enzimática encontrada correspondería a la proporción conservada de plasma seminal. En consecuencia, la concentración encontrada para SOD, GPx y TAC (tabla 1) fue bastante inferior a los registros de enzimas en el plasma seminal completo (5,44).

Se encontraron concentraciones menores de actividad de SOD y GPx en el semen suplementado con isoespintanol ($p < 0,05$) (tabla 3). Como una hipótesis, este efecto podría ser explicado por la competencia por los sustratos entre el isoespintanol y las enzimas evaluadas. En un estudio se observó que el isoespintanol tiene capacidad de captura del radical superóxido (sustrato para la SOD). No obstante, lo hace en una baja proporción (19). Otra posible explicación estaría en la inhibición no competitiva de la SOD o la GPx por parte del isoespintanol, o en una interferencia de este en las reacciones de detección de dichas enzimas. Sin embargo, no se tienen antecedentes al respecto, por lo cual serían necesarios estudios más detallados. Por otro lado, no se observó efecto del timol sobre ninguna de las enzimas evaluadas ($p > 0,05$) (tabla 3), lo cual coincide con Al-Malki (18), quien no encontró efecto del timol sobre la actividad de SOD y GPx en tejido hepático normal de ratones. Sin

embargo, en ratones intoxicados con cloruro de carbono (CCl_4) y previamente tratados con timol, mejoró la actividad de ambas enzimas antioxidantes, en comparación con los ratones no tratados, lo cual fue atribuido a la capacidad del timol para reducir la formación de radicales libres, y por ende la iniciación de la peroxidación lipídica. Es probable que bajo condiciones de mayor estrés oxidativo pueda observarse el efecto del timol sobre la actividad de SOD y GPx del semen equino.

CONCLUSIONES

El isoespintanol reduce la actividad de las enzimas SOD y GPx en el semen equino diluido con fines de congelación. No se observó efecto del timol y el isoespintanol sobre la capacidad antioxidante ORAC y FRAP del semen diluido.

REFERENCIAS

1. Ball B. Role of oxidative stress in normal and abnormal function of equine spermatozoa. *Rev Bras Reprod Anim.* 2009;33(6):20-4.
2. Ortega-Ferrusola C, García B, Gallardo-Bolaños J, González-Fernández L, Rodríguez-Martínez H, Tapia J, Peña F. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2009;114(4):393-403. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.10.005>
3. Macías-García B, González-Fernández L, Ortega-Ferrusola C, Morillo-Rodríguez A, Gallardo-Bolaños J, Rodríguez-Martínez H, et al. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post - thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 2011;75(5):811-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.021>
4. Härtlová H, Rajmon R, Krontorádová I, Mamica J, Zita L, Klabanová P, Černocký A. Semen quality, lipid peroxidation, and seminal plasma antioxidant status in horses with different intensities of physical exercise. *Acta Vet Brno.* 2013;82(1):31-5. doi: <https://doi.org/10.2754/avb201382010031>
5. Villa N, Castaño D, Duque P, Ceballos A. Actividad de la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa en sangre y plasma seminal en caballos colombianos. *Rev Colom Cienc Pecu.* 2012;25(1):64-70.
6. Koskinen E, Karlsson M, Reilas T, Sankari S, Esala A, Katila T. Catalase activity and total protein in fractionated stallion seminal plasma. *Theriogenology.* 2002;58(2):337-40.
7. Vasconcelos J, Chaveiro A, Góis A, Moreira da Silva F. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J Equine Vet Sci.* 2013;33(10):787-93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.12.012>
8. Waheed M, El-Bah, S, Al-haider A. Influence of seminal plasma antioxidants and osteopontin on fertility of the arabian horse. *J Equine Vet Sci.* 2013;33(9):705-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.11.006>
9. Moore A, Squires E, Graham J. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology.* 2005;63(9):2372-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.032>
10. Lozano D, Gil L, Álvarez C. Efecto de la adición de plasma seminal en el semen equino descongelado. *Sanid Mil.* 2011;67(3):284-90. doi: <https://doi.org/10.4321/S1887-85712011000400005>
11. Wnuk M, Lewinska B, Oklejewicz G, Bartosz M, Tischner M, Bugno-Poniewierska M. Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. *Theriogenology.* 2010;74(9):1677-84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.07.007>
12. Morrell J, Winblad C, Georgakas A, Stuhmann G, Humblot P, Johannisson A. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Anim Reprod Sci.* 2013;140(1-2):62-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.05.006>
13. Vasconcelos A, Santana M, Santos A, Santero M, Lagares M. Metabolic evaluation of cooled equine spermatozoa. *Andrología.* 2010;42(2):106-11. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.00963.x>
14. Bustamante I, Pederzoli C, Sgaravatti A, Gregory R, Dutra C, Jobim M, Mattos R. Skim milk-egg yolk based semen extender compensates for non-enzymatic

- antioxidant activity loss during equine semen cryopreservation. *Anim Reprod.* 2009;6(2):392-9.
15. Cocchia N, Pasolini M, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, et al. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 2011;75(7):1201-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.031>
 16. Gibb Z, Butler T, Morris L, Maxwell W, Grupen C. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology.* 2013;79(6):1001-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.032>
 17. Arcila-Lozano C, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe S, Gonzales E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch Latinoam Nutr.* 2004;54(1):100-11.
 18. Al-Malki A. Antioxidant properties of thymol and butylated hydroxytoluene in carbon tetrachloride – induced mice liver injury. *JKAU Sci.* 2010;22(1):239-48. doi: <https://doi.org/10.4197/Sci.22-1.16>
 19. Rojano B, Saez J, Schinella G, Quijano J, Vélez E, Gil A. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-Isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *J Mol Struct.* 2008;877(1-3):1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2007.07.010>
 20. Pizarro E, Restrepo G, Echeverry J, Rojano B. Efecto del plasma seminal sobre el estado redox del semen equino criopreservado. *Rev MVZ Córdoba.* 2013;18(Suppl 1):3672-80.
 21. Brito L, Greene L, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. *Theriogenology.* 2011;76(4):745-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.007>
 22. Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology.* 1999;51(4):721-7. doi: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00021-7)
 23. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 2001;49(10):4619-26. doi: <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
 24. Benzie I, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6. doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
 25. Tavilani H, Goodarzi M, Vaisi-Raygani A, Salami S, Hassanzadeh T. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *Int Braz J Urol.* 2008;34(4):485-91. doi: <https://doi.org/10.1590/S1677-55382008000400011>
 26. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Meth Enzymol.* 1984;105:121-6. doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
 27. Mesa A. Efecto del colesterol y la dimetil formamida sobre la criosupervivencia del semen de caballos criollos colombianos [tesis de maestría]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2010.
 28. Ospitia P, Gonzales A. Efecto del medio extensor y de las curvas de enfriamiento y congelamiento en la célula espermática equina en caballos de la sabana de Bogotá. [tesis de pregrado]. Bogotá: Universidad de La Salle; 2011.
 29. Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini P. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26(8):563-7. doi: <https://doi.org/10.3109/09513591003686395>
 30. Restrepo G, Zapata A, Rojano B. Evaluación de la capacidad antioxidante total del plasma seminal equino. *Zoot Trop.* 2015;31(1):79-87.
 31. Yildiz S, Öztürkler Y, Ari U, Lehimcioğlu N, Atakişi E, Kulaksiz R. The effects of L-ergothioneine, N-acetylcystein and cystein on freezing of ram semen. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2015;21(1):81-6.
 32. Kusano C, Ferrari B. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *J Cell Mol Biol.* 2008;7(1):1-15.
 33. Aitken R. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(4):659-68. doi: <https://doi.org/10.1071/RD9950659>
 34. Burnaugh L, Sabeur K, Ball B. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by

- dihydroethidium. *Theriogenology*. 2007;67(3):580-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.021>
35. Baumber J, Ball B, Linfor J, Meyers S. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine Spermatozoa. *J Androl*. 2003;24(4):621-8. doi: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x>
36. El-Bahr S. Biochemistry of free radicals and oxidative stress. *Science International*. 2013;1(5):111-7. doi: <https://doi.org/10.5567/sciintl.2013.111.117>
37. Crippa A, Magli M, Ferraretti A, Pipitò A, Pescatori E, Gianaroli L. Oxidative stress evaluation in sperm samples from fertile and infertile men. *Andrology*. 2015;S1(1):1-6. doi: <https://doi.org/10.4172/2167-0250.1000s1-002>
38. Wang C, Chu C, Chu K, Choy K, Khaw K, Rogers M, Pang C. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin Chem*. 2004;50(5):952-4. doi: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.031526>
39. Pahune P, Choudhari A, Muley P. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(6):991-5. doi: <https://doi.org/10.7860/jcdr/2013/4974.3040>
40. Aman S, Moin S, Owais M, Siddiqui M. Antioxidant activity of thymol: protective role in AAPH-induced hemolysis in diabetic erythrocytes. *Int J Pharm Sci Invention*. 2013;2(3):55-60.
41. Rojano B, Gaviria C, Gil M, Saez J, Schinella G, Tournier H. Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae*. 2008;15(1):169-76.
42. Rojano B, Gaviria C, Sáez J. Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol. *Vitae*. 2008;15(2):212-8.
43. Prior R, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J Agric Food Chem*. 2003;51(11):3273-9. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0262256>
44. Ball B, Gravance C, Medina V, Baumber J, Liu I. Catalase activity in equine semen. *Am J Vet Res*. 2000;61(9):1026-30. doi: <https://doi.org/10.2460/ajvr.2000.61.1026>