



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

Efecto de la presencia de antioxidantes en el diluyente de refrigeración sobre la calidad seminal y la oxidación lipídica del plasma seminal en conejo

Trabajo Fin de Máster
Valencia, Septiembre 2017

Yolvi López Mendoza

Directora

María Pilar Viudes de Castro

Tutor

José Salvador Vicente Antón

RESUMEN

El semen de conejo puede ser conservado en refrigeración un corto periodo de tiempo antes de que se reduzca o pierda su capacidad fecundante, por lo que no suele utilizarse en inseminación artificial más allá de 36 horas desde su extracción. Por ello el objetivo del presente estudio fue estudiar el efecto de la suplementación de sustancias con actividad protectora de membrana, antioxidante y antiproteasa a un diluyente con EDTA sobre la calidad espermática y la oxidación lipídica del plasma seminal del semen refrigerado a 16°C durante 72 horas. En un primer experimento se evaluó el efecto de la inclusión de dos análogos hidrosolubles de la vitamina E (Trolox y α -tocoferol) y/o el dextrano sobre los parámetros de calidad seminal: motilidad, viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad de la membrana. En un segundo experimento se evaluó la inclusión de la bestatina en los diluyentes con Trolox y/o dextrano sobre la calidad seminal y la oxidación de lípidos.

La inclusión de α -tocoferol en el diluyente disminuyó significativamente los valores de todos los parámetros de calidad seminal a lo largo del tiempo, mientras que la presencia de Trolox y dextrano no afectó a las mismas. En el segundo experimento el diluyente utilizado no afectó significativamente ($P>0,05$) a los parámetros de calidad seminal ni a la oxidación lipídica del plasma seminal a las 72 horas de refrigeración. El tiempo de refrigeración afectó significativamente a la viabilidad y a la integridad del acrosoma ($P<0,05$), sin embargo no se observaron diferencias significativas en los parámetros cinéticos, de funcionalidad de membrana y de oxidación lipídica del plasma seminal, manteniéndose los valores de 72 horas similares a los de 0 horas. La inclusión de bestatina en todos los diluyentes tuvo un efecto positivo en la conservación del semen, manteniéndose a lo largo del tiempo las características seminales y el grado de lipoperoxidación, independientemente de que el diluyente estuviera

suplementado o no con dextrano o Trolox. En conclusión, la combinación del diluyente con EDTA y bestatina demostró ser una alternativa adecuada en los medios de semen refrigerado ya que evita la actividad antioxidante, mantiene la motilidad y funcionalidad de membrana durante 72 horas de refrigeración.

Palabras clave: Conejo, antioxidante, refrigeración, oxidación lipídica, plasma seminal.

ABSTRACT

Storage of rabbit semen for longer than 36 h causes deterioration of semen quality. Therefore, the aim of this study was to evaluate the addition of antioxidants, membrane protective and/or aminopeptidase activity substances to an EDTA supplemented extender on rabbit semen quality preserved at 16°C during 72 h. Experiment one was carried out to evaluate the effect of the inclusion of two water soluble analogs of vitamin E (Trolox and α -tocopherol) and / or dextran on spermatozoa motility, viability, acrosome status and membrane functionality. In a second experiment the inclusion of bestatin in the extenders with Trolox and / or dextran on seminal quality and lipid oxidation was evaluated.

The presence of α -tocopherol in the extender significantly decreased all seminal quality parameters over time, whereas the presence of Trolox and dextran did not affect them. In the second experiment, no significant differences among the experimental extenders were observed either for the seminal quality parameters or for the lipid oxidation of the seminal plasma at 72 hours of refrigeration. The cooling time significantly affected the viability and integrity of the acrosome ($P < 0.05$), however, no significant differences were observed in the kinetic parameters, membrane functionality and lipid oxidation of the seminal plasma, showing at 72 and 0 hours similar values. The inclusion of bestatin in all extenders had a positive effect on semen conservation, maintaining the semen characteristics and lipid oxidation over time, regardless of whether the extender was supplemented or not with dextran or Trolox. In conclusion, the combination of EDTA and bestatin proved to be a suitable alternative in the refrigerated semen extender since it avoids the antioxidant activity and maintains membrane motility and functionality over the cooling period studied.

Keywords: Rabbit, antioxidant, refrigeration, lipid oxidation, seminal plasma.

1. INTRODUCCION

España es uno de los principales productores mundiales de carne de conejo, y junto con Italia y Francia forman el grupo líder de países productores a nivel continental. La cunicultura ha experimentado una importante evolución, alcanzando una considerable relevancia y un creciente interés. El principal objetivo de la cunicultura es la producción de carne, si bien, aunque en menor medida, también se comercializa la piel y el pelo.

En los últimos años, el control reproductivo del conejo ha avanzado enormemente gracias al desarrollo y difusión de la inseminación artificial (IA) que permite la utilización de forma más sencilla de material genético valioso. La IA es una técnica ampliamente utilizada en España y muy extendida en la Unión Europea. De hecho, en torno al 80% de los conejos de cebo producidos en España en el año 2007 provenían de la inseminación artificial. A pesar del uso tan extendido de la inseminación artificial en esta especie, este procedimiento presenta algunas limitaciones, una de ellas es el corto periodo de tiempo que el semen puede ser conservado en refrigeración sin perder capacidad fecundante. De hecho, la mayor parte de las inseminaciones se realizan con semen refrigerado hasta 36 h tras la recogida de los eyaculados. Los centros especializados en inseminación y preparación de dosis seminales demandan avances e innovaciones que faciliten y simplifiquen la aplicación de esta técnica en las explotaciones cunícolas, y que permitan un uso más racional de la mano de obra y de los seminales que utilizan los centros de preparación de las dosis seminales.

Se han realizado algunos esfuerzos para el desarrollo de diluyentes o técnicas de conservación para extender el periodo de vida útil de los espermatozoides por encima de las 48 horas, observándose un empeoramiento de la calidad seminal a lo largo del tiempo que puede ser parcialmente compensado con el aumento del número de espermatozoides por

dosis en términos de fertilidad pero difícilmente en términos de prolificidad (Roca et al., 2000; López-Gatius et al., 2005; Aksoy et al., 2008).

Es habitual el uso de diferentes macromoléculas en la composición de los diluyentes de semen que debe de ser conservado a baja temperatura, así, la utilización de polivinilpirrolidona (PVP), el polivinilalcohol (PVA) o dextrano se han utilizado en diluyentes de crioconservación de semen. El dextrano, polímero de glucosa, altamente soluble, biocompatible y biodegradable, cuando se añade a la composición de un medio, cambia las propiedades físicas del mismo, aumentando su viscosidad, lo que permite formar un recubrimiento de las células que protege la membrana plasmática. Este polímero se ha utilizado en los diluyentes de crioconservación de semen y embriones (Kundu et al., 2002 en semen de caprino; Viudes-de-Castro et al., 2010 en embriones de conejo), observándose efectos de conservación de motilidad en el caso del semen y protectores de membrana en los embriones.

Por otra parte, los espermatozoides, como parte de su proceso metabólico, producen radicales libres y especies reactivas al oxígeno (ROS) (Lamirande et al., 1997). La vitamina E es probablemente el principal componente del sistema antioxidante de los espermatozoides (Surai et al., 1998) protegiendo la membrana de los espermatozoides contra los daños oxidativos (Akiyama, 1999). Por ello, son numerosos los trabajos en los que se han utilizados diferentes análogos de la vitamina E (Trolox y α -tocoferol) en diluyentes de refrigeración y congelación seminal en distintas especies con resultados muy variados (Maia et al., 2010; Zhu et al., 2015). A pesar de que el plasma seminal contiene sustancias con actividad antioxidante, a lo largo del tiempo se produce un desequilibrio entre la actividad oxidante y antioxidante, provocando una acumulación de especies reactivas que provocan la oxidación

de los lípidos y las proteínas de la membrana espermática (Johnson et al., 2000; Gadella et al., 2001; Patricio et al., 2016), alterando la función celular (Gallardo, 2007), lo que afectará a su potencial de fecundación y contribuirá a una disminución de la fertilidad y prolificidad durante el tiempo de conservación (Di Iorio et al., 2014).

Así, uno de los principales daños que produce la refrigeración es el aumento de la reacción acrosómica de las muestras, lo que afectará a los procesos de capacitación espermática, reacción acrosómica, hiperactivación y fusión espermatozoide-ovocito, (Armstrong et al., 1999; Bilodeau et al., 2002; Kasimanickam et al., 2006). Dado que el acrosoma es una estructura fundamental para la fecundación, es necesario preservar su integridad en cualquier tipo de conservación. Por ello, la adición de sustancias a los diluyentes que inhiban la capacitación durante el período de refrigeración y que mantengan la integridad de los acrosomas puede ser interesante para mejorar la capacidad fecundante de las dosis de semen refrigeradas. El EDTA, agente quelante, permite bloquear la acción del calcio como mediador de los procesos de capacitación y reacción acrosómica, (Johnson et al., 2000) y previene la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides (Salamon and Maxwell, 2000). De ahí que sea habitual la presencia de EDTA en los diluyentes de larga duración de porcino.

Otras sustancias ensayadas con el fin de proteger las membranas espermáticas y con ello la calidad seminal han sido entre otras: gelatina, albúmina sérica bovina, suero fetal bovino, estimuladores del AMPc, vitamina E, vitamina C, Taurina. Sin embargo, a pesar de ello los resultados tanto para el semen refrigerado (Foote et al., 2002; Vallorani et al., 2010; Shiva et al., 2011; Bucak et al., 2012; Mata-Campuzano et al., 2014) como para el semen congelado (Baumber et al., 2002; Bilodeau et al., 2002; Breininger et al., 2005; Nasiri et al., 2012; Olfati et al., 2014) han sido excesivamente variables, lo que ha hecho que su uso no

sea generalizado.

Por lo tanto, sería necesario poner a punto diluyentes para semen refrigerado de conejo que permitiesen mantener las características de calidad seminal hasta 72 horas después de la recogida del semen, lo que permitiría flexibilizar el trabajo tanto en los centros de producción de dosis seminales como en las granjas comerciales.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto que la adición al diluyente de sustancias con diferente actividad (protectora de membrana, antioxidante y antiproteasa) tenía sobre la calidad espermática y la oxidación de los lípidos del plasma seminal en semen refrigerado durante 72 horas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El desarrollo experimental fue llevado a cabo en las instalaciones del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV) y del Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA) del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA; Segorbe, Castellón). Los métodos y procedimiento utilizados en el manejo de los animales utilizados en el presente trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la UPV, de acuerdo a las directivas 98/58/EC y 2010/63/UE. Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad reactiva, de la empresa Sigma-Aldrich Química S.A. (Alcobendas, Madrid, España), mientras que los fluorocromos utilizados para los análisis de viabilidad fueron adquiridos de la empresa Life Technologies.

2.1. Recuperación del semen

El experimento se desarrolló entre los meses de Enero y Junio de 2017. Se utilizaron 20 machos que pertenecían a la línea R, línea paternal de aptitud cárnica seleccionados durante 25 generaciones para mejorar el IC a través de la velocidad de crecimiento, seleccionados por el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia (Estany et al., 1992). Todos los machos utilizados eran de fertilidad probada. La recuperación del semen se realizó mediante el método de vagina artificial, para simular la temperatura y presión adecuadas para estimular la eyaculación. La temperatura de la vagina en el momento de la recuperación era de unos 50°C. A cada macho se le recuperaron dos eyaculados con un intervalo de tiempo de 30 minutos aproximadamente. Tras la recogida de las muestras de semen, éstas fueron transportadas al laboratorio protegidas de cambios de temperaturas y de luz, y se llevaron a cabo mezclas heterospérmicas con todos aquellos

eyaculados que presentaron una coloración blanca y con valores superiores al 70% de motilidad y acrosomas intactos.

2.2. Diseño experimental.

El presente trabajo se ha desarrollado en dos experimentos, en el primero de ellos se valoró el efecto que la inclusión de diferentes análogos de la vitamina E (Trolox y α -Tocoferol) en un diluyente base (TCG) suplementado con EDTA como agente quelante, sobre los distintos parámetros de calidad seminal a las 0, 24, 48 y 72 horas. En un segundo experimento se evaluó la inclusión de un agente inhibidor de proteasas, la bestatina, en el diluyente, sobre las características seminales, utilizando aquellos diluyentes que en el primer experimento mostraron los mejores resultados, midiéndose el efecto de dichos diluyentes sobre la oxidación de lípidos del plasma seminal y sobre los distintos parámetros de calidad seminal a 0 y 72 horas.

2.2.1. Experimento 1:

Se utilizó como base el diluyente Tris-ácido cítrico-Glucosa (250 mM tris-hidroximetilaminometano, 83 mM de ácido cítrico, 47 mM de glucosa, pH 6,8, (Viudes de Castro et al., 1999) que fue suplementado con 20 mM de EDTA para estabilizar las membranas y antibióticos para evitar la proliferación bacteriana (diluyente control, MC). La composición de cada diluyente fue la siguiente:

MC: 250 mM tris-hidroximetilaminometano, 83 mM de ácido cítrico, 47 mM de glucosa, 20 mM de EDTA + antibióticos.

M2: MC + 3% Dextrano 70

M3: MC + 3% de α -Tocoferol

M4: MC + 3% de Dextrano 70 + 3% de α -Tocoferol

M5: MC + 200 μ M Trolox;

M6: MC + 3% Dextrano 70 + 200 μ M Trolox.

Se utilizaron seis mezclas heterospérmicas, cada una de las cuales se dividió en seis partes iguales y se diluyó con cada uno de los diluyentes experimentales, ajustándose la concentración a 40×10^6 espermatozoides/mL, tras lo cual se mantuvieron en un refrigerador programado a una temperatura de 16°C durante 72 h. De cada mezcla diluida se tomaron alícuotas a las 0, 24, 48 y 72 horas para evaluar las distintas características de calidad seminal (motilidad, viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad de la membrana).

2.2.2. Experimento 2.

Se utilizó como base el diluyente MC del experimento 1, que fue suplementado con bestatina, como inhibidor de proteasas. Por lo que la composición de los distintos diluyentes experimentales fue la siguiente:

DC: MC + 10 μ M de bestatina.

D2: DC + 3% Dextrano 70

D3: DC + 200 μ M Trolox

D4: DC + 3% Dextrano 70 + 200 μ M Trolox

Se utilizaron un total de 5 mezclas heteroespérmicas, cada una de las cuales se dividió en cuatro partes iguales y se diluyó con cada uno de los cuatro diluyentes, procediéndose de la misma forma que en el primer experimento (16°C durante 72 h). De cada mezcla diluida se tomaron alícuotas a las 0 y 72 horas para evaluar las características de calidad seminal (motilidad, viabilidad, estado del acrosoma y funcionalidad de la membrana) y el estado de oxidación de los lípidos del plasma seminal.

2.3. Parámetros seminales evaluados

Las mezclas heterospérmica fueron sometidas a diferentes evaluaciones de calidad seminal.

2.3.1. Análisis de la concentración espermática

La determinación del número de espermatozoides por mililitro se realizó en una cámara Thoma Zeiss (Marienfeld, Alemania), para lo cual, de cada mezcla heterospérmica se tomó una alícuota de 20 μL que se diluyó 1:50 en una solución de glutaraldehído al 0,25% para fijar las membranas. Se depositaba una gota de dicha dilución en la cámara Thoma y se procedió al recuento celular a 400 aumentos y en contraste de fases en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España).

2.3.2. Análisis de motilidad.

Las características cinéticas de las mezclas espermáticas (porcentaje total de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides progresivos) fueron evaluadas mediante un sistema computarizado de análisis de imagen (CASA, ISAS versión 1.0.17, Proiser, Valencia, España) con un set-up específico para semen de conejo. Una alícuota de cada muestra se diluyó con el diluyente base TCG (Tris-ácido cítrico-glucosa) suplementado con 2g/L de seroalbúmina bovina (BSA) ajustando la concentración a $7,5 \times 10^6$ espermatozoides, tras lo cual se depositaba 5 μL de la muestra diluida en una cámara Makler (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel). Las evaluaciones se llevaron a cabo a 37°C mediante contraste de fases negativa con un objetivo de 100X aumentos en un microscopio Nikon Eclipse E300 (Nikon Corporation Instrument Co., IZASA, Barcelona, España) que disponía de una cámara de video. De cada muestra se capturaron 5 videos (25 imágenes por segundo).

Las trayectorias individuales de todos los espermatozoides fueron visualizadas con posterioridad para eliminar trayectorias erróneas o posibles partículas. Se registraron un mínimo 200 espermatozoides por muestra. Se consideró como espermatozoide no móvil aquel cuya velocidad media en el trazado (VAP) era inferior a 10 $\mu\text{m/s}$ y como espermatozoide progresivo a aquel que presentaba una VAP superior a 50 $\mu\text{m/s}$ y un índice de rectitud (STR) superior o igual al 70 %.

2.3.3. Análisis de viabilidad

La viabilidad de los espermatozoides se determinó mediante citometría de flujo en un citómetro Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, IZASA, Barcelona, España); Las muestras fueron diluidas a temperatura ambiente con TCG suplementado con 2g/L de BSA, ajustando la concentración a 30×10^6 espermatozoides/mL. El porcentaje de espermatozoides viables se determinó utilizando una doble tinción con los fluorocromos SYBR Green y yoduro de propidio (Molecular Probes/labeling & detection by Life Technologies™) de acuerdo con la metodología descrita por (Viudes-de-Castro et al., 2014). Se evaluaron un mínimo de 10.000 eventos por muestra. Los datos recogidos por el citómetro fueron analizados mediante el software Expo32ADC (Beckman Coulter Inc.). En el cálculo del porcentaje de viabilidad se consideraron como vivos únicamente aquellos espermatozoides positivos para SYBR Green y negativos para yoduro de propidio (fluorescencia de color verde).

2.3.4. Análisis de la funcionalidad de la membrana espermática.

El análisis de la funcionalidad de las membranas de los espermatozoides se llevó a cabo mediante una prueba hipoosmótica o HOST (Hypo-Osmotic Swelling Test, HOST) para lo cual se utilizó una solución de 75 mOsm con fructosa y ácido cítrico. Se llevaba a cabo

una dilución 1:20 con la solución hipoosmótica de una alícuota de cada grupo experimental. Tras 30 minutos de incubación a 37°C se fijaba con 50 µl de una solución de glutaraldehído al 0,25% y se evaluaba a 400 aumentos en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) con contraste de fases, contándose un mínimo de 200 espermatozoides por muestra y calculándose así el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional (colas enrolladas).

2.3.5. Análisis del estado de la membrana del acrosoma

Para evaluar el estado del acrosoma, una alícuota de 20 µL de cada mezcla fue fijada con 180 µL de una solución al 0,25% de glutaraldehído en tampón fosfato, depositándose una gota en un porta y evaluándose un mínimo de 150 espermatozoides por muestra con contraste de fases en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon Corporation Instruments Co., IZASA, Barcelona, España) a 400x aumentos, determinándose el porcentaje de espermatozoides que presentaban el acrosoma intacto (%NAR).

2.3.6. Evaluación de la oxidación de lípidos del plasma seminal.

Para la obtención del plasma seminal, una alícuota de 800µL de la mezcla espermática diluida se centrifugó a 10500 rpm durante 10 minutos a 22°C, el sobrenadante resultante se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se almacenó a -80°C para su posterior análisis. La determinación de la peroxidación lipídica del plasma seminal fue estimada midiendo el nivel de malondialdehído (MDA), utilizando el método de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo con el procedimiento descrito por Ohkawa et al. (1979). Brevemente, a 200µl del plasma seminal de cada muestra se le añadieron 400µl de ácido tricloroacético al 20% y se centrifugó a 18000 g durante 15 minutos

a 15 °C, para precipitar la proteína. Tras lo cual se añadieron 400 µl de ácido tiobarbitúrico al 1% en hidróxido de sodio 0,05 N a 400µl del sobrenadante en tubos con tapón de rosca y se colocaron en un baño de agua hirviendo (100°C) durante 20 minutos, tras lo cual se enfrió inmediatamente en un baño de hielo durante 5 minutos para detener la reacción química, inmediatamente se cuantificaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) midiendo su absorbancia a 531nm longitud de onda. La concentración de MDA de cada muestra se determinó a partir de la recta de calibrado previamente obtenida con una solución estándar de malondialdehído. Los resultados se expresaron como nmol MDA/mL de plasma seminal.

2.4. Análisis estadístico

El efecto del tipo de diluyente y el tiempo de refrigeración y su interacción sobre la concentración, motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana, estado acrosomal y peroxidación lipídica fue analizado mediante un análisis de varianza, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion Profesional (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). Los datos se presentan como medias mínimo cuadráticas \pm error estándar de la media.

3. RESULTADOS

Experimento 1:

Los resultados obtenidos del efecto diluyente y del tiempo de refrigeración sobre las características seminales de conejo se muestran en la Tabla 1. Tanto el tipo de diluyente como el tiempo de refrigeración tuvieron un efecto significativo sobre los parámetros analizados, mientras que su interacción no fue significativa.

TABLA 1: Efecto del diluyente y efecto del tiempo (0h, 24h, 48h y 72h) sobre las características seminales de conejo.

Diluyentes	N	Parámetros Seminales				
		Viabilidad (%)	MT (%)	MP (%)	NAR (%)	HOST (%)
MC	24	71,6±2,48 ^a	63,1±2,62 ^a	28,4±1,78 ^a	68,5±1,88 ^a	71,4±2,61 ^a
M2	24	69,6±2,48 ^a	59,3±2,62 ^a	25,9±1,78 ^a	64,9±1,88 ^a	69,8±2,61 ^a
M3	24	48,9±2,48 ^b	35,2±2,62 ^b	13,0±1,78 ^b	53,9±1,88 ^b	43,4±2,61 ^b
M4	24	46,3±2,48 ^b	33,8±2,62 ^b	12,3±1,78 ^b	53,8±1,88 ^b	41,7±2,61 ^b
M5	24	72,3±2,48 ^a	62,3±2,62 ^a	27,0±1,78 ^a	67,6±1,88 ^a	71,2±2,61 ^a
M6	24	69,8±2,48 ^a	58,7±2,62 ^a	25,5±1,78 ^a	65,6±1,88 ^a	70,1±2,61 ^a
Tiempo (h)						
0	36	72,1±2,02 ^a	68,8±2,14 ^a	25,0±1,45 ^a	76,7±1,54 ^a	79,9±2,13 ^a
24	36	70,7±2,02 ^a	57,8±2,14 ^b	25,8±1,45 ^a	63,7±1,54 ^a	60,3±2,13 ^b
48	36	56,5±2,02 ^b	44,7±2,14 ^c	20,2±1,45 ^b	56,7±1,54 ^b	55,2±2,13 ^{bc}
72	36	53,0±2,02 ^b	36,9±2,14 ^d	17,1±1,45 ^b	52,4±1,54 ^b	49,6±2,13 ^c

MC: Tris–citrato–glucosa (TCG) + EDTA; M2: MC + Dextrano; M3: MC + α -Tocoferol; M4: MC + Dextrano+ α -Tocoferol; M5: MC + Trolox; M6: MC + Dextrano + Trolox. N: número de datos; MT (%): porcentaje de espermatozoides con motilidad total; MP (%): porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva; NAR (%): porcentaje de espermatozoides con el borde apical normal; HOST (%): porcentaje de espermatozoides con la funcionalidad de la membrana espermática. Letras distintas en la misma columna muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observa un efecto negativo de los medios que contenían α -Tocoferol (M3 y M4) en su composición, mostrando significativamente menores valores en todos los parámetros estudiados. Se observó una reducción de más del 30% en la viabilidad y unos valores de motilidad total y progresiva entre dos y tres veces por debajo de los observados con el resto de los diluyentes (48,9 y 46,3% de viabilidad; 35,2 y 33,8% de espermatozoides móviles y 13,0 y 12,3 % de espermatozoides progresivos en los medios M3 y M4, respectivamente, frente al 71,6; 69,6; 72,3 y 69,8 % de viabilidad. 63,1; 59,3, 62,3 y 58,7% de motilidad total y 28,4; 25,9; 27,0 y 25,5% de espermatozoides progresivos para MC, M2, M5 y M6, respectivamente, Tabla 1, $P < 0,05$).

Además, los diluyentes M3 y M4 también afectaron negativamente a la funcionalidad de la membrana espermática, observándose únicamente un 43,4% y 41,7% de espermatozoides con membranas funcionales, respectivamente, frente a unos valores de más del 69% de funcionalidad de membrana obtenidos con el resto de los diluyentes (Tabla 1, $P < 0,05$). En lo que se refiere a la integridad de la membrana acrosómica de los espermatozoides, el diluyente MC, suplementado exclusivamente con EDTA, presentó los mejores resultados, aunque sin diferencias significativas frente al M2, M5 y M6 mientras que los diluyentes M3 y M4 presentaron significativamente los menores resultados.

Por otra parte, el tiempo de refrigeración afectó significativamente a las características seminales, produciéndose un deterioro de las mismas a lo largo del tiempo (Tabla 1, $P < 0,05$). Entre 0 y 24 h no se observaron diferencias significativas en los parámetros de viabilidad, motilidad progresiva y normalidad acrosómica, pero sí se vio afectada la motilidad total y la funcionalidad de membrana, siendo menor a 24 h. A partir de las 48 h se observó un deterioro

generalizado de todos los parámetros seminales analizados, obteniéndose a 72 h valores significativamente inferiores de motilidad total y la funcionalidad de membrana.

Experimento 2:

Los resultados obtenidos en el experimento 2 se muestran en la Tabla 2. No se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) entre los distintos diluyentes experimentales, obteniéndose unos valores medios generales de 75,9% de viabilidad, 65,5% de motilidad total, 20,7% de motilidad progresiva, 54,2% de espermatozoides con el borde apical normal y 79,4% para los espermatozoides con la funcionalidad de la membrana espermática a 72 horas de refrigeración.

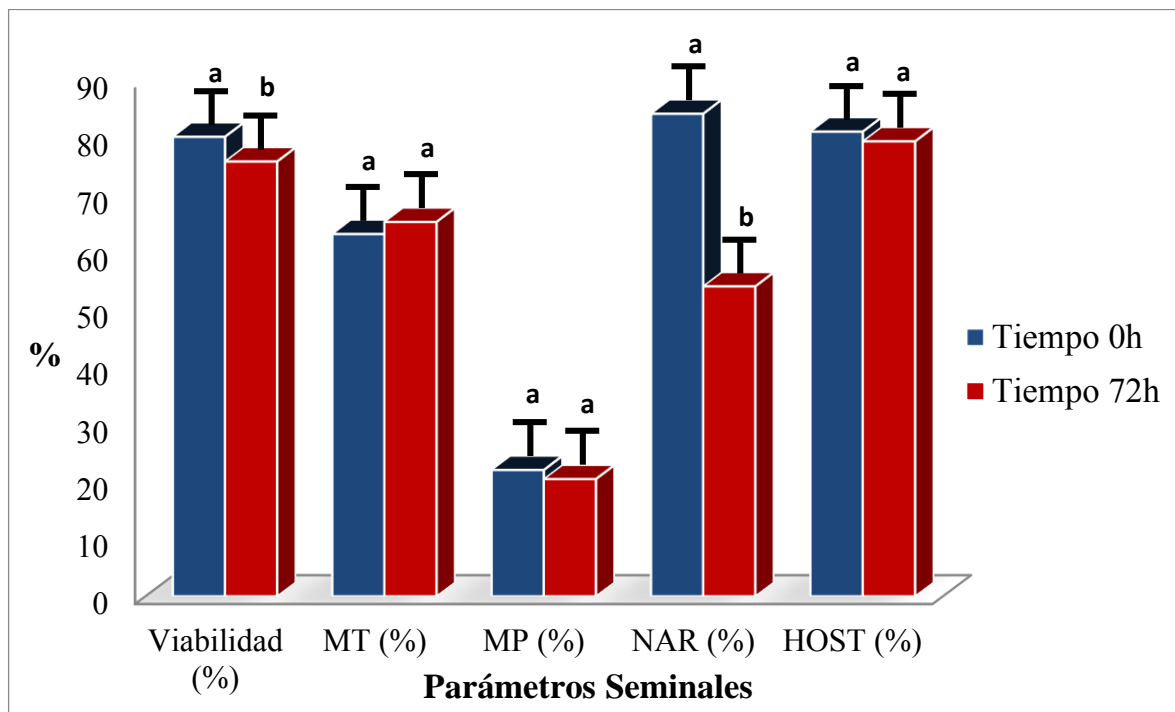
TABLA 2: Efecto del diluyente sobre los parámetros de calidad seminal a 72 horas.

Diluyentes	Parámetros Seminales					
	N	Viabilidad (%)	MT (%)	MP (%)	NAR (%)	HOST (%)
DC	20	78,3±2,30	67,6±4,37	19,6±2,59	59,9±3,73	78,2±2,67
D2	20	74,0±2,30	65,0±4,37	23,4±2,59	52,0±3,73	81,2±2,67
D3	20	78,1±2,30	68,2±4,37	20,2±2,59	53,2±3,73	82,6±2,67
D4	20	73,2±2,30	60,3±4,37	19,5±2,59	51,8±3,73	75,8±2,67

DC: MC (Tris–citrato–glucosa TCG + EDTA) + 10 μ M de bestatina; D2: DC + Dextrano; D3: DC + Trolox; D4: DC + Dextrano + Trolox; N: número de datos; MT (%): porcentaje de espermatozoides con motilidad total; MP (%): porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva; NAR (%): porcentaje de espermatozoides con el borde apical normal; HOST (%): porcentaje de espermatozoides con la funcionalidad de la membrana espermática.

En la gráfica 1 se muestran los resultados a tiempo 0 y 72 horas de los parámetros seminales estudiados.

GRÁFICA 1: Porcentaje del efecto del tiempo a 0h y 72h, sobre los parámetros seminales.



MT (%): porcentaje de espermatozoides con motilidad total; MP (%): porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva; NAR (%): porcentaje de espermatozoides con el borde apical normal; HOST (%): porcentaje de espermatozoides con la funcionalidad de la membrana espermática; Letras distintas en las mismas barras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando se utilizan diluyentes de refrigeración suplementados con bestatina (gráfica 1), se observó que el tiempo de refrigeración afectó significativamente a la viabilidad y a la integridad del acrosoma ($82,2 \pm 1,15\%$ vs $75,9 \pm 1,15\%$ de viabilidad y $84,2 \pm 1,41\%$ vs $54,2 \pm 1,41\%$ de NAR a 0h y 72h, respectivamente; $P < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los parámetros cinéticos y en la funcionalidad de la membrana espermática, obteniéndose valores medios de motilidad total superiores al 60% y con una

motilidad progresiva en torno al 20%. Manteniéndose los valores de funcionalidad de la membrana espermática a 72h similares a los de 0h.

TABLA 3: Efecto de los diferentes diluyentes sobre la oxidación de los lípidos del plasma seminal a 0 y 72 horas.

Diluyentes	N	Oxidación Lipídica (nmol MDA/mL)	
		0 horas	72 horas
DC	5	0,926 ± 0,247	1,028 ± 0,295
D2	5	1,068 ± 0,247	1,130 ± 0,295
D3	5	1,098 ± 0,247	1,244 ± 0,295
D4	5	1,072 ± 0,247	1,172 ± 0,295

N: número de datos; DC: MC (Tris–citrato–glucosa TCG + EDTA) + 10 µM de bestatina; D2: DC + Dextrano; D3: DC + Trolox; D4: DC + Dextrano + Trolox.; N: número de datos.

La tabla 3, muestra los resultados obtenidos del efecto diluyente y efecto del tiempo sobre la oxidación de los lípidos del plasma seminal del semen de conejo a 0 y 72 horas. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes diluyentes testados ni entre 0 horas y 72 horas (1,041 y 1,144 nmol MDA/mL para 0 y 72 horas, respectivamente).

4. DISCUSIÓN

Alargar la vida útil del semen de conejo durante un periodo superior a las 48 horas es sumamente útil en cunicultura, sin embargo las características de calidad descienden con el tiempo debido a la acumulación de sustancias del metabolismo celular y los radicales libres que surgen de los procesos oxidativos que tienen lugar.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de sustancias con diferente actividad (protección de membrana, antioxidante y antiproteasa) sobre las características de calidad seminal. Los resultados del primer experimento muestran que la calidad del semen durante el periodo de refrigeración se vio afectada por la composición del diluyente utilizado, produciéndose un deterioro de las características seminales a lo largo del tiempo, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores (Roca et al., 2000; López-Gatius et al., 2005; Rosato and Iaffaldano, 2011; Di Iorio et al., 2014). El empleo de dextrano, ya fuese sólo o en combinación con vitamina E, no contribuyó a una mejora de las características de calidad seminal tras 72 horas de refrigeración. Lo que contrasta con lo observado por Kundu et al. (2002) cuando utilizaba dextrano en el diluyente de congelación de semen caprino, ya que en su ausencia, todos los espermatozoides perdían su motilidad. Por lo que es posible que a nuestra temperatura de trabajo (16°C) y con el nivel de dextrano utilizado (3%), la viscosidad del medio no fuese suficiente para ejercer una protección efectiva de la membrana plasmática. Respecto a las sustancias antioxidantes probadas, de los dos análogos hidrosolubles de la vitamina E, el α -tocoferol afectó negativamente a todas las características seminales evaluadas, lo que coincidiría con los resultados obtenidos en ovino por Upreti et al. (1997) los cuales observaron que la adición de α -tocoferol al diluyente provocaba una disminución de la motilidad de los espermatozoides refrigerados a 15°C, mientras que

Cerolini et al. (2000) en porcino y Michael et al. (2009) en canino, observaron un efecto positivo sobre la viabilidad espermática a 72 h. Sin embargo, la utilización de Trolox no afectó a las características seminales, lo que coincide con los resultados obtenidos por Ball et al. (2001) en equino, los cuales observaron que la inclusión de 1,0; 2,0 y 4,0 mM de Trolox en el diluyente no afectaba a la motilidad de los espermatozoides conservados a 5°C. Por el contrario, en ovino, Mata-Campuzano et al. (2014) vieron que la adición de 0,2; 1,0 y 5mM de Trolox al diluyente afectaba negativamente a todas las características de calidad del semen refrigerado a 15°C. La vitamina E también se ha utilizado a través de la dieta, con resultados contradictorios. Así, utilizando vitamina E por vía oral en conejo, Gliozzi et al. (2009) no observaron ningún efecto sobre las características de calidad seminal, mientras que Yousef et al. (2003) obtuvieron un efecto beneficioso en las mismas, al igual que Hatamoto et al. (2006) en perros y Moslemi and Tavanbakhsh. (2011) en humanos.

En el segundo experimento, la inclusión de bestatina en todos los diluyentes tuvo un efecto positivo en la conservación de las características seminales, ya que, si bien la viabilidad e integridad del acrosoma fueron menores a 72 horas, los parámetros cinéticos, la funcionalidad de membrana y el grado de lipoperoxidación se mantuvieron a lo largo del tiempo, independientemente de que el diluyente estuviera suplementado o no con dextrano o Trolox. Otros autores han visto que la utilización de inhibidores de proteasas en los diluyentes de semen de conejo no afecta a la calidad seminal y contribuye a una disminución de la actividad aminopeptidasa del semen fresco (Casares-Crespo et al., 2015).

En los resultados del presente estudio se ha observado un efecto positivo de la combinación de EDTA y bestatina sobre la motilidad y funcionalidad de membrana, ya que para todos los diluyentes utilizados en el segundo experimento, los valores de motilidad y

HOST se mantuvieron a las 72h, mientras que en el primer experimento, en ausencia de bestatina pero con EDTA en su composición, todas las características seminales se vieron afectadas negativamente a medida que pasaba el tiempo. Esto puede deberse a que la combinación de ambas sustancias hace que aumente la inhibición de aminopeptidasas, ya que mientras el EDTA actúa únicamente como un inhibidor de metaloproteasas, el rango de actuación de la bestatina es más amplio.

Los valores de oxidación de lípidos del plasma seminal obtenidos en este trabajo son similares a los observados en semen de conejo fresco por Yousef et al. (2003). En diferentes trabajos, se ha demostrado que el Trolox es capaz de inhibir la peroxidación lipídica en el semen crioconservado (Beconi et al., 1993, en bovino; Jones and Mann 1976, en ovino y Breininger et al., 2005, en porcino), sin embargo, en los resultados de nuestro trabajo, la utilización de Trolox en el semen refrigerado no ha tenido efecto sobre la oxidación lipídica, ya que los valores son similares en todos los grupos estudiados. Posiblemente la actividad del EDTA y la bestatina sobre las proteasas presentes en el semen hayan bloqueado la actividad enzimática responsable de la oxidación lipídica. Sería necesario evaluar si concentraciones mayores de Trolox mejoran la viabilidad y el estado del acrosoma durante el periodo de refrigeración.

5. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio indican que la suplementación del diluyente con análogos hidrosolubles de la vitamina E no mejoraba las características de calidad seminal durante la refrigeración, la utilización de α -tocoferol afectaba negativamente a todos los parámetros seminales evaluados, mientras que el uso de 200mM de Trolox no tuvo ningún efecto. En segundo lugar, el uso de dextrano no contribuyó a la protección de la membrana a lo largo del periodo de refrigeración. Por último, la combinación de EDTA y bestatina demostró ser una alternativa adecuada en los medios de semen refrigerado ya que evita la actividad antioxidante, mantiene la motilidad y funcionalidad de membrana durante 72 horas de refrigeración.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo (PRONABEC) del estado Peruano por la beca brindada, quienes apuestan por la investigación e innovación de los conocimientos científicos. Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2013-00058-00-00 del INIA. Agradezco a la Dra. María Pilar Viudes de Castro, Investigadora del Centro de Investigación y Tecnología Animal del IVIA por permitirme trabajar en su equipo, por sus enseñanzas, su apoyo constante en los trabajos de laboratorio y en la redacción de este documento, al Departamento de Ciencia Animal, la cesión de las instalaciones experimentales para la realización del presente estudio. A mi familia, amigos y compañeros por todo su apoyo.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama M. 1999. "In Vivo Scavenging Effect of Ethylcysteine on Reactive Oxygen Species in Human Semen." *Japanese Journal of Urology* 90(3):421–28
- Aksoy M., Cankat Lehimcioğlu N., and Akman O. 2008. "Effect of Seminal Plasma on Functional Integrity of Rabbit Sperm Membranes during Storage at 4°C or Freezing." *World Rabbit Science* 16(1):1–6
- Armstrong J.S., Rajasekaran M., Chamulitrat W., Gatti P., Hellstrom WJ., and Sikka S.C. 1999. "Characterization of Reactive Oxygen Species Induced Effects on Human Spermatozoa Movement and Energy Metabolism *Free Radic Biol Med.* 26(7–8):869
- Ball BA., Medina V., Gravance CG., and Baumber J. 2001. "Effect of Antioxidants on Preservation of Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Equine Spermatozoa during Storage at 5°C." *Theriogenology* 56(4):577–89
- Baumber J., Vo A., Sabeur K., and Ball B.A. 2002. "Generation of Reactive Oxygen Species by Equine Neutrophils and Their Effect on Motility of Equine Spermatozoa." *Theriogenology* 57(3):1025–33
- Beconi MT., Francia CR., Mora NG., and Affranchino MA. 1993. "Effect of Natural Antioxidants on Frozen Bovine Semen Preservation." *Theriogenology* 40(4):841–51
- Bilodeau JF., Blanchette S., Cormier N., and Sirard MA. 2002. "Reactive Oxygen Species-Mediated Loss of Bovine Sperm Motility in Egg Yolk Tris Extender: Protection by Pyruvate, Metal Chelators and Bovine Liver or Oviductal Fluid Catalase." *Theriogenology* 57(3):1105–22
- Breining E., Beorlegui NB., O'Flaherty CM., and Beconi MT. 2005. "Alpha-Tocopherol Improves Biochemical and Dynamic Parameters in Cryopreserved Boar Semen." *Theriogenology* 63(8):2126–35
- Bucak MN., Çoyan K., Öztürk C., Güngör S., and Ömür AD. 2012. "Methionine Supplementation Improves Ram Sperm Parameters during Liquid Storage at 5°C." *Cryobiology* 65(3):335–37

- Casares-Crespo L., Talaván AM., and Viudes-de-Castro, MP. 2015. “Efecto de La Inhibición de La Actividad Aminopeptidasa Del Plasma Seminal Sobre Los Parámetros de Calidad Seminal En Conejo.” *AIDA XVI Jornadas sobre Producción Animal* 2:373–375
- Cerolini S., Maldjian A., Surai P., and Noble R. 2000. “Viability, Susceptibility to Peroxidation and Fatty Acid Composition of Boar Semen during Liquid Storage.” *Animal Reproduction Science* 58(1–2):99–111
- Estany J., Camacho J., Baselga M., and Blasco A. 1992. “Selection Response of Growth Rate in Rabbits for Meat Production.” *Genet Sel Evol* 24:527–537
- Foote RH., Brockett CC., and Kaproth MT., 2002. “Motility and Fertility of Bull Sperm in Whole Milk Extender Containing Antioxidants.” *Animal Reproduction Science* 71(1–2):13–23
- Gadella BM., Rathi R., Brouwers JFHM., Stout TAE., and Colenbrander B. 2001. “Capacitation and the Acrosome Reaction in Equine Sperm.” *Animal Reproduction Science* 68(3–4):249–65
- Gallardo JM. 2007. “Evaluación Del Sistema Antioxidante En El Semen Normal Evaluation of Antioxidant System in Normal Semen.” *Rev Invest Clin Revista de Investigación Clínica* 59(1):42–47
- Glozzi TM., Zaniboni L., Maldjian A., Luzi F., Maertens L. and Cerolini S. 2009. “Quality and Lipid Composition of Spermatozoa in Rabbits Fed DHA and Vitamin E Rich Diets.” *Theriogenology* 71(6):910–19.
- Hatamoto LK., Baptista Sobrinho CA., Nichi M., Barnabe VH., Barnabe RC., and Cortada CNM. 2006. “Effects of Dexamethasone Treatment (to Mimic Stress) and Vitamin E Oral Supplementation on the Spermogram and on Seminal Plasma Spontaneous Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Dogs” *Theriogenology* 66:1610–14
- Di Iorio M., Manchisi A., Rocco M., Chrenek P., and Iaffaldano N. 2014. “Comparison of Different Extenders on the Preservability of Rabbit Semen Stored at 5°C for 72 Hours.” *Italian Journal of Animal Science* 13(4):710–14.

- Johnson LA., Weitze KF., Fiser P., and Maxwell WMC. 2000. 'Storage of Boar Semen.' *Animal Reproduction Science* 62(2000):143–172.
- Jones R. and Mann T. 1976. "Lipid Peroxides in Spermatozoa; Formation, Role of Plasmalogen, and Physiological Significance." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 193(1113):317–333.
- Kasimanickam R., Pelzer KD., Kasimanickam V., Swecker WS., and Thatcher CD. 2006. "Association of Classical Semen Parameters, Sperm DNA Fragmentation Index, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymatic Activity of Semen in Ram-Lambs." *Theriogenology* 65(7):1407–21.
- Kundu CN., Chakrabarty J., Dutta P., Bhattacharyya D., Ghosh A., and Majunder GC. 2002. "Effect of Dextran on Cryopreservation of Goat Cauda Epididymal Spermatozoa Using a Chemically Defined Medium." *Reproduction* 123(6):907–913.
- Lamirande Ede., Jiang H., Zini A., Kodama H., and Gagnon C. 1997. "Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology." *Reviews of Reproduction*. 2(1997)48-54
- López-Gatius F., Sances G., Sancho M., Yániz J., Santolaria P., Gutiérrez R., Núñez M., Núñez J., and Soler C. 2005. "Effect of Solid Storage at 15°C on the Subsequent Motility and Fertility of Rabbit Semen." *Theriogenology* 64(2):252–260.
- Maia MS., Bicudo SD., Sicherle CC., Rodello L., and Saltaren Gallego IC. 2010. "Lipid Peroxidation and Generation of Hydrogen Peroxide in Frozen-Thawed Ram Semen Cryopreserved in Extenders with Antioxidants." *Animal Reproduction Science* 122(1–2):118–23
- Mata-Campuzano M., Álvarez-Rodríguez M., Tamayo-Canul J., López-Urueña E., de Paz P., Anel L., Martínez-Pastor F., and Álvarez M. 2014. "Refrigerated Storage of Ram Sperm in Presence of Trolox and GSH Antioxidants: Effect of Temperature, Extender and Storage Time." *Animal Reproduction Science* 151(3–4):137–47.
- Michael AJ., Alexopoulos C., Pontiki EA., Hadjipavlou-Litina DJ., Saratsis P., Ververidis HN., and Boscós CM. 2009. "Effect of Antioxidant Supplementation in Semen

- Extenders on Semen Quality and Reactive Oxygen Species of Chilled Canine Spermatozoa.” *Reproduction in Domestic Animals* 112(1):119–35.
- Moslemi MK., and Tavanbakhsh S. 2011. “Selenium-Vitamin E Supplementation in Infertile Men: Effects on Semen Parameters and Pregnancy Rate.” *International Journal of General Medicine* 4:99–104.
- Nasiri AH., Towhidi A., and Zeinoaldini S., 2012. “Combined Effect of DHA and α -Tocopherol Supplementation During Bull Semen Cryopreservation on Sperm Characteristics and Fatty Acid Composition.” *Andrologia* 44(SUPPL.1):550–55.
- Ohkawa H., Ohishi N., and Yagi K. 1979. “Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction.” *Analytical Biochemistry* 95(2):351–58.
- Olfati KR., Daghigh KH., and Ashrafi I. 2014. “Effects of in Combination Antioxidant Supplementation on Microscopic and Oxidative Parameters of Freeze-Thaw Bull Sperm.” *Cell and Tissue Banking* 15(3):461–70
- Patricio A., Filipe CD., Vieira SJ., Padrao A., Regadas CB., Korrodi-Gregório L., Ferreira R., Maia N., Almeida S., Laurencó J., Silva V., and Fardilha M. 2016. “Relation between Seminal Quality and Oxidative Balance in Sperm Cells.” *Acta Urológica Portuguesa* 33(1):6–15
- Roca J., Martínez S., Vázquez JM., Lucas X., Parrila I., and Martínez EA. 2000. “Viability and Fertility of Rabbit Spermatozoa Diluted in Tris-Buffer Extenders and Stored at 15°C.” *Animal Reproduction Science* 64(1–2):103–12.
- Rosato MP., and Iaffaldano N. 2011. “Effect of Chilling Temperature on the Long-Term Survival of Rabbit Spermatozoa Held Either in a Tris-Based or a Jellified Extender.” *Reproduction in Domestic Animals* 46(2):301–8.
- Salamon S., and Maxwell WMC. 2000. “Storage of Ram Semen.” *Animal Reproduction Science* 62(1–3):77–111.
- Shiva M., Gautam KA., Verma Y., Shivgotra V., Doshi H., and Kumar S. 2011. “Association between Sperm Quality, Oxidative Stress, and Seminal Antioxidant Activity.” *Clinical*

- Surai P., Kostjuk I., Wishart G., Macpherson A., Speake B., Noble R., Ionov I., and Kutz E. 1998. “Effect of Vitamin E and Selenium Supplementation of Cockerel Diets on Glutathione Peroxidase Activity and Lipid Peroxidation Susceptibility in Sperm, Testes, and Liver.” *Biological Trace Element Research* 64:119–32.
- Upreti GC., Jensen K., Oliver JE., Duganzich DM., Munday R., and Smith JF. 1997. “Motility of Ram Spermatozoa during Storage in a Chemically-Defined Diluent Containing Antioxidants.” *Animal Reproduction Science* 48(2–4):269–78.
- Vallorani C., Spinaci M., Bucci D., Tamanini C., and Galeati G. 2010. “Effects of Antioxidants on Boar Spermatozoa during Sorting and Storage.” *Animal Reproduction Science* 122(1–2):58–65
- Viudes-de-Castro MP., Mocé E., Lavara E., Marco-Jiménez F., and Vicente JS. 2014. “Aminopeptidase Activity in Seminal Plasma and Effect of Dilution Rate on Rabbit Reproductive Performance after Insemination with an Extender Supplemented with Buserelin Acetate.” *Theriogenology* 81(9):1223–28.
- Viudes De Castro MP., Cortell c., and Vicente JS. 2010. “Dextran Vitrification Media Prevents Mucin Coat and Zona Pellucida Damage in Rabbit Embryo.” *Theriogenology* 74(9):1623–28
- Viudes de Castro MP., Vicente JS., and Lavara R. 1999. “Effet Du Nombre de Spermatozoïdes Sur La Fertilité de La Semence Conservée 24 Heures Chez Le Lapin.” *Ann. Zootech* 48:407–12
- Yousef MI., Abdallah GA., and Kamel KI. 2003. “Effect of Ascorbic Acid and Vitamin E Supplementation on Semen Quality and Biochemical Parameters of Male Rabbits.” *Animal Reproduction Science* 76(1):99–111
- Zhu Z., Fan X., Lv Y., Zhang N., Fan C., Zhang P., and Zeng W. 2015. “Vitamin E Analogue Improves Rabbit Sperm Quality during the Process of Cryopreservation through Its Antioxidative Action” edited by P. McNeil. *PLOS ONE* 10(12):e0145383