

RESUMEN

Los objetivos generales de esta tesis fueron desarrollar nuevos diluyentes de inseminación artificial suplementados con un análogo de la GnRH para inducir la ovulación de la coneja y caracterizar el perfil proteómico del semen de conejo. En el capítulo I, se evaluó la inclusión de un cóctel de inhibidores de proteasas en el diluyente de inseminación para evitar parte de la actividad proteasa del plasma seminal de conejo. La calidad seminal y la tasa de fertilidad no se vieron afectadas por el cóctel, teniendo valores similares entre los grupos experimentales y el control. Sin embargo, la tasa de prolificidad fue significativamente menor en el grupo experimental en comparación con los grupos de control positivo y negativo ($8,2 \pm 0,22$ frente a $9,3 \pm 0,23$ y $9,2 \pm 0,26$ nacidos totales por camada, respectivamente). A partir de este capítulo, se puede concluir que la adición de una amplia variedad de inhibidores de proteasas en el diluyente de semen de conejo afecta negativamente la tasa de prolificidad y que en el futuro sería aconsejable probar inhibidores específicos de aminopeptidasas.

Por lo tanto, en el capítulo II, suplementamos el diluyente de inseminación con inhibidores específicos de aminopeptidasas (bestatina y EDTA), y estudiamos su efecto sobre la calidad seminal del conejo y el rendimiento reproductivo. Nuevamente, los valores de motilidad, integridad del acrosoma y la viabilidad del espermatozoide no fueron significativamente diferentes entre el grupo experimental y el control. Con respecto al desempeño reproductivo, la inclusión de bestatina y EDTA, no afectó la fertilidad (85,3 vs. 88,6%), ni la tasa de prolificidad (10,12 vs. 10,51 gazapos por parto) en comparación con el grupo control. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que la

bestatina y el EDTA se pueden usar en los diluyentes de inseminación de conejos para inhibir parte de la actividad aminopeptidasa del plasma seminal. A la luz de los resultados previos, en el capítulo III, probamos nuevos diluyentes de inseminación de conejo, los cuales contenían inhibidores de aminopeptidasas con o sin nanopartículas de quitosano (CS)-sulfato de dextrano (DS) que atrapan el análogo de la GnRH. Además, se probaron diferentes concentraciones de hormona en estos diluyentes, evaluando su efecto *in vivo* sobre el rendimiento reproductivo del conejo después de la inseminación artificial. Se estudiaron los siguientes diluyentes experimentales: grupo C4 (4 µg de buserelina/coneja en medio de control: tris-ácido cítrico-glucosa suplementado con 10 µM de bestatina y EDTA 20 mM), grupo C5 (5 µg de buserelina/coneja en medio de control), Grupo Q4 (4 µg de buserelina/coneja en nanopartículas CS-DS en medio de control) y grupo Q5 (5 µg de buserelina/coneja en nanopartículas CS-DS en medio de control). Los resultados mostraron que la fertilidad fue significativamente menor en el grupo C4 en comparación con los grupos C5, Q5 y Q4 (0,7 frente a 0,85, 0,85 y 0,82, respectivamente). Por el contrario, la prolificidad fue similar en los cuatro grupos experimentales estudiados ($P > 0,05$). Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que las nanopartículas de CS-DS preparadas mediante un proceso de coacervación como transportador de acetato de buserelina permiten reducir la concentración de hormona utilizada en diluyentes suplementados con bestatina y EDTA sin afectar la fertilidad y prolificidad de las hembras de conejo. Por ello, la nanoencapsulación parece ser un sistema prometedor para proteger el análogo de la GnRH a fin de disminuir la concentración de la hormona en los diluyentes de inseminación artificial de conejos.

Por otro lado, el objetivo de los últimos tres capítulos de esta tesis fue caracterizar el proteoma del plasma seminal y del espermatozoide de conejo. En los capítulos IV y V, caracterizamos las proteínas del plasma seminal del conejo centrándonos en la influencia del origen genético y la estacionalidad. Las muestras de semen se recuperaron de enero a diciembre de 2014 utilizando 6 machos pertenecientes al genotipo A y 6 del genotipo R. Para cada genotipo, se seleccionó una muestra heteroespérmica del comienzo, del medio y del final de cada estación para desarrollar el experimento. Se analizaron un total de 24 muestras (3 para cada estación y línea genética). En el capítulo IV, utilizamos un enfoque de electroforesis en gel de poliacrilamida 1D y observamos que siete bandas de proteínas eran significativamente diferentes entre las líneas genéticas y de éstas, tres bandas de proteínas eran significativamente diferentes entre las estaciones. Por el contrario, en el capítulo V, el plasma seminal se sometió a una digestión en solución, nano LC-MS/MS y análisis bioinformático. La biblioteca resultante incluía 402 proteínas identificadas y cuantificadas. Sólo 6 proteínas estuvieron específicamente implicadas en procesos reproductivos de acuerdo con la anotación funcional. Veintitrés proteínas se expresaron diferencialmente entre genotipos, 11 sobreexpresadas en el genotipo A y 12 en el genotipo R. Con respecto al efecto de la estación en el proteoma del plasma seminal del conejo, los resultados mostraron que no hubo un patrón claro de variación proteica a lo largo del año. Los resultados obtenidos en ambos capítulos evidencian que el genotipo está relacionado con una abundancia específica de proteínas del plasma seminal.

El último capítulo de la tesis se realizó para caracterizar las proteínas del espermatozoide de conejo a través de la técnica LC-MS/MS. Seis muestras se

recuperaron durante dos meses de cinco machos del genotipo A y cinco del genotipo R. Las proteínas del espermatozoide se extrajeron y se sometieron a digestión en gel, nano LC-MS / MS y análisis bioinformático. La biblioteca resultante incluyó 487 proteínas identificadas y cuantificadas. En cuanto a la comparación de la abundancia de proteínas del espermatozoide entre genotipos, cuarenta proteínas se expresaron diferencialmente. Entre ellas, 25 proteínas se sobreexpresaron en el genotipo A, mientras que 15 proteínas se sobreexpresaron en el genotipo R. En conclusión, este último capítulo caracteriza por primera vez las proteínas del espermatozoide del conejo y muestra que el genotipo también tiene un gran impacto en la abundancia de proteínas del espermatozoide de conejo. Además, la presencia diferencial de estas proteínas podría ser una de las causas que explican las diferencias observadas en la fertilidad y los parámetros seminales entre estas dos líneas genéticas en estudios anteriores. Finalmente, con los resultados obtenidos en los capítulos V y VI, se creó la primera base de datos de acceso público del proteoma del plasma seminal y del espermatozoide de conejo.