

ADICIÓN DE N- ACETILCISTEÍNA AL MEDIO DE CONGELACIÓN SEMINAL DE SEMENTALES PURA SANGRE LUSITANO

Matilla E¹, González-Fernández L², Antunes L³, Bettencourt E³ Macías-García B¹.

¹Centro de Cirugía de Mínima Invasión Jesús Usón Ctra N 521 Km 41,8. Cáceres. España
E-mail del autor responsable ematilla@ccmijesususon.com

²Grupo de Investigación Señalización Intracelular y Tecnología de la Reproducción (SINTREP) Universidad de Extremadura, Cáceres. España

³Instituto de Investigação e Formação Avançada da Universidade de Évora, Portugal

INTRODUCCIÓN

Debido al alto contenido de ácidos grasos insaturados, los espermatozoides equinos son propensos a la oxidación (Macías-García et al, 2011). El desequilibrio en el balance oxidativo se traduce en la producción en exceso de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Gavella y Lipovac, 1992) que dañan la membrana plasmática, disminuyendo la motilidad y la capacidad de fecundante del espermatozoide (Aitken y baker, 2004). Estudios anteriores han probado que la adición de antioxidantes como el ácido ascórbico o la catalasa han mantenido la integridad de la membrana y la motilidad de los espermatozoides (Aurich et al., 1997; Bruemmer et al., 2002). El antioxidante n-acetil cisteína disminuye las eros formadas por el estrés oxidativo pudiendo prevenir el daño en la membrana plasmática (Bilodeau et al., 2001; Baker et al., 1996). El objetivo del estudio fue evaluar los efectos de distintas concentraciones de N-acetilcisteína añadidas al medio de congelación de semen equino de baja calidad en la motilidad total y progresiva así como en la producción de eros post-descongelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 4 caballos pura raza Lusitano con menos de un 50% de motilidad antes de la congelación fueron utilizados en el estudio. El semen se extrajo utilizando una vagina artificial. El eyaculado se centrifugó a 600 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la eliminación de sobrenadante, se adicionó INRA 96® calculando la concentración mediante cámara Neubauer. Tras una segunda centrifugación a 600g durante 10 minutos, se añadió el medio de congelación (2,5% (v/v) dimetilformamida (DMF), 2,5% glicerol (v/v) y 2% de yema de huevo en INRA 96®) hasta alcanzar una concentración de 200×10^6 spz/ml. Se establecieron tres grupos de estudio: grupo control sin adición de NAC y dos grupos de tratamiento (1mM o 2,5 mM de NAC). Las pajuelas utilizadas fueron de 0,5 ml selladas mediante bolas de cristal. Tras 1 hora de refrigeración a 4°C y 20 minutos en vapores de nitrógeno, el semen fue almacenado en tanques de nitrógeno líquido un mínimo de 7 días antes de su análisis. La descongelación se realizó a 37°C durante 1 minuto. Todas las muestras fueron examinadas utilizando un sistema computerizado de análisis de semen. El análisis se basó en el examen de imágenes consecutivas digitalizadas valorando la motilidad total y progresiva. Los espermatozoides marcados por la sonda de fluorescencia mitosox se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados fueron expresados mediante el porcentaje positivo de espermatozoides produciendo ros. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Sigma Plot versión 12.3 para windows (Systat software, Chicago, IL, EE.UU.) los datos se sometieron a prueba de normalidad usando un test de Shapiro-Wilk y los resultados obtenidos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Los grupos se compararon utilizando un Anova de una vía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se observa una leve tendencia de mejora de motilidad total, progresiva y disminución de ros tras la adición del antioxidante, aunque las diferencias no fueron significativas. La suplementación a concentración 1 mM obtuvo mejores resultados que 2,5 mM para todos los resultados analizados (Tabla 1). Los efectos positivos de los antioxidantes dependen del medio de congelación utilizado, del antioxidante y la concentración utilizada. El alto valor genético de algunos ejemplares conlleva a la necesidad de congelación de sus eyaculados aunque la motilidad inicial no sea elevada. Son

necesarios más estudios sobre la suplementación del antioxidante NAC al medio de congelación de semen de sementales lusitanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Salazar-Sandoval C, Rodríguez AM, Martínez HR, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ. *Reprod Domest Anim.* 2011 Feb;46(1):141-8.
- Kodama, H., Y. Kurbayashi, and C. Gagnon, 1996. *J. Androl.* 17, 151–157.
- Gavella, M., and V. Lipovac, 1992. *Arch. Androl.* 28, 135–141.
- Aitken, R. J., and M. A. Baker, 2004. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 581–588.
- Aurich, J. E., U. Schonherr, H. Hoppe, and C. Aurich, 1997. *Theriogenology* 48, 185–192.
- Bruemmer, J. E., R. C. Coy, E. L. Squires, and J. K. Graham, 2002. *J. Anim. Sci.* 80, 12–18.
- Baker HWG, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. *Fertil Steril* 1996;65: 411–9.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, Sirard MA. *Theriogenology* 2001;56:275–86.

Agradecimientos: Agradecemos a todo el equipo de Alter Real (Portugal) su disponibilidad y trabajo desinteresado.

Tabla 1. Motilidad total y progresiva de semen descongelado de caballo Lusitano. Los valores representan las medias \pm SEM para motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP) y porcentaje de producción de ROS (ROS+).

TRATAMIENTO	N	MT	MP	ROS+
0 mM	4	19,3 \pm 8,6	3,4 \pm 1,7	77,7 \pm 6,6
1 mM	4	24,7 \pm 7,9	6,6 \pm 3,3	72,6 \pm 8,3
2,5 mM	4	21,7 \pm 8,5	4,6 \pm 2,3	74,8 \pm 6,7

EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE ADDITION TO PURO SANGUE LUSITANO STALLION SPERM FREEZING EXTENDER

ABSTRACT

Loss of sperm motility and fertilizing ability in frozen equine sperm has been partially attributed to lipid peroxidation of the plasma membrane due to reactive oxygen species (ROS) overproduction. In the horse, addition of anti-oxidants to freezing extenders has resulted in improved maintenance of membrane integrity and motility post-thaw. In this study, we have determined the effect of the addition of N-acetylcysteine or NAC (a ROS scavenger) at different concentrations (0 mM, 1 mM or 2.5 mM) to a semi-defined sperm freezing extender (INRA 96® added with 2.5% (v/v) dimethylformamide, 2.5% (v/v) glycerol and 2% egg yolk (v/v)). Ejaculates of 4 Puro Sangue Lusitano stallions with less than 50% motile sperm before freezing were selected. Total motility and ROS production were evaluated. Our results shows a slight improvement of progressive (3.4 \pm 1.7, 6.6 \pm 3.3 and 4.6 \pm 2.3; control, 1 mM and 2 mM NAC respectively) and total motility (19.3 \pm 8.6, 24.7 \pm 7.9 and 21.7 \pm 8.5 control, 1 mM and 2 mM NAC respectively) and less ROS production (77.7 \pm 6.6 vs. 72.6 \pm 8.3 and 74.8 \pm 6.7 control, 1 mM and 2 mM NAC respectively) when NAC was added but differences were not statistically significant. Besides, supplementation of the freezing extender with 1 mM NAC seems to yield better results than 2.5 mM. More studies are need to fully elucidate the effect of NAC addition to equine sperm freezing media.

Keywords: Antioxidant, freezing extender, N-acetylcysteine, stallion