

EFFECTO DE LA L-CARNITINA EN UN DILUYENTE A BASE DE LECHE DESNATADA EN LA PRESERVACIÓN DE MEMBRANAS Y DE LA ACTIVIDAD CINÉTICA DE ESPERMATOZOIDES DE MORUECO EN CONDICIONES DE REFRIGERACIÓN

Galarza^{1,2}, D.A., López-Sebastián², A., y Santiago-Moreno¹, J.

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca. Avd. 12 de Octubre y Menéndez y Pelayo. EC010201. Cuenca. Ecuador. ² Dpto. Reproducción Animal, INIA. Avd. Puerta de Hierro s/n. Km 5,9. 28040. Madrid. España. dgalarza@uclm.es

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) cervical en ovejas con semen refrigerado es la tecnología reproductiva más común usada actualmente en programas de mejora genética ovina. Estudios anteriores sugieren que los diluyentes a base de leche desnatada (UHT) y yema de huevo proporcionan una mejor protección y supervivencia espermática cuando el semen de morueco es almacenado en frío hasta por 72 h. Sin embargo, según se incrementa el tiempo de almacenamiento, disminuye el vigor cinético, la integridad de las membranas espermáticas (O'Hara et al., 2010) y la fertilidad (Gil et al., 2011). En este sentido, son requeridos nuevos aditivos para mejorar la supervivencia espermática y el vigor cinético en condiciones de refrigeración. La L-carnitina (LC) es un aminoácido que se encuentra concentrado dentro del epidídimo y espermatozoides, así como en el fluido seminal del eyaculado (Bøhmer et al., 1978). Varios estudios *in vitro* han evidenciado que la LC potencia la motilidad de espermatozoides humanos y además posee un efecto crioprotector. Por otro lado, reportes previos realizados en humanos y animales (por ejemplo, toro, caballo y cerdo) han sugerido que la LC desempeña un papel protector contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) al ejercer propiedades antioxidantes. Por lo tanto, esta investigación se centró en evaluar el efecto de diferentes concentraciones de LC sobre el vigor cinético e integridad de membranas de espermatozoides de morueco almacenados refrigeración por un largo período.

MATERIAL Y MÉTODOS

Un diluyente de base no sintética (UHT) fue elaborado añadiendo leche desnatada, antibióticos (100000 UI penicilina sódica y 100 mg de dihidroestreptomycin/100ml) y yema de huevo 6% (v/v) para la evaluación de semen de morueco almacenado en refrigeración. El diluyente UHT (289-310 mOsm/Kg y 7,2 pH) fue centrifugado a 4000 X g por 30 min y filtrado (tamaño poro 0,45 μ m). El diluyente UHT fue suplementado con 5 dosis crecientes de L-carnitina (8.40092, Sigma): 1mM (UHT-LC1), 2,5mM (UHT-LC2,5), 5mM (UHT-LC5), 7,5mM (UHT-LC7,5) y 10mM (UHT-LC10).

Este experimento incluyó doce carneros Merinos españoles (3 a 9 años de edad), alojados en el Departamento de Reproducción Animal (Madrid, España, 40°25'N) bajo las mismas condiciones de manejo y alimentación. Los animales fueron manipulados de acuerdo a los procedimientos aprobados por el comité de Ética de INIA y la política española de protección animal (RD53/2013). Treinta y seis eyaculaciones de semen (tres eyaculados por carnero, colectados semanalmente) fueron recogidos mediante vagina artificial y agrupados mezclando 3 eyaculados (pools) designados al azar. Después de su evaluación inicial, cada agrupación de eyaculado (n=12 cada una) fue dividido en 6 alícuotas suficientes para ser diluidas con UHT (control) y con las cinco dosis de LC a una concentración de 200×10^6 céls/ml. Las muestras fueron almacenadas a 5°C hasta por 96 h y evaluadas sus parámetros cinéticos mediante sistema CASA (SCA, Microptic S.L., Barcelona, España) e integridad de las membranas espermáticas (plasmática / acrosomal / mitocondrial) mediante la triple asociación de sondas fluorescentes (IP/FITC-PNA/Mitotracker Green). Los resultados fueron expresados como promedios y error estándar de la media y analizados mediante un ANOVA de una vía y la prueba Bonferroni de comparación múltiple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra que los valores obtenidos de motilidad total (MT,%), velocidad lineal (VSL, μ m/s) y el total espermatozoides con membranas plasmática y acrosomal íntegras y alta función mitocondrial (IPIAHM, %) fueron mayores (P<0,05) con todas las dosis LC (1mM a 10mM) que el grupo control. Se observó una disminución progresiva de las diferentes

variables espermáticas estudiadas según se incrementaba el tiempo de almacenamiento en refrigeración; no obstante, la suplementación de LC al diluyente UHT mostró valores más altos en esos parámetros a las 48 h ($P<0,01$) y 96 h ($P<0,001$) de almacenamiento con respecto al grupo control. Además, el grupo UHT-LC5 mostró un porcentaje de MT más alto ($P<0,05$) que el control y UHT-LC10 a las 96 h, y un porcentaje de MP más alto que el grupo control a las 48 y 96 h de almacenamiento. El grupo UHT-LC7,5 mostró una VSL superior ($P<0,05$) que el resto de grupos de LC a las 96 h de almacenamiento.

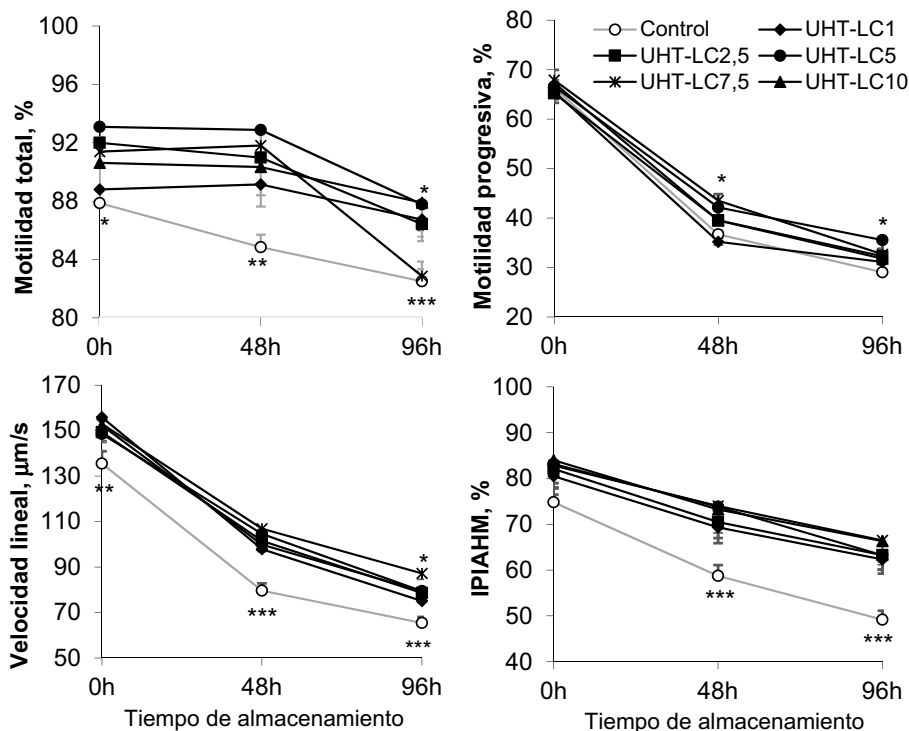


Figura 1. Motilidad total (%) y progresiva (%), velocidad lineal ($\mu\text{m/s}$) e integridad de las membranas plasmáticas / acrosomal / mitocondrial (IPIAHM,%) de espermatozoides de carnero diluidos en leche desnatada UHT (adicionada yema de huevo 6%) y suplementada con dosis de L-carnitina.

La L-carnitina desempeña un importante papel en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias para la β oxidación que produce la energía (ATP) necesaria para que las células funcionen correctamente. De esta manera la LC proporciona energía fácilmente disponible para su uso, que afecta positivamente la motilidad espermática, maduración y espermatogénesis. Reportes previos han demostrado que la LC provocó un aumento significativo en el porcentaje de motilidad en espermatozoides de ratón (Aliabad et al., 2010) y de toro (Hufana-Durán et al., 2017). Asimismo, la LC facilitó el almacenamiento de los espermatozoides de caballo a temperatura ambiente hasta por 72 h al apoyar la producción mitocondrial de ATP, al tiempo que minimiza el agotamiento de ATP y los efectos dañinos de los subproductos metabólicos como los radicales libres (Gibb et al., 2015). Los resultados del presente estudio sugieren que una suplementación de LC a una concentración de 5mM al diluyente a base de leche desnatada, proporciona un efecto sinérgico sobre la motilidad y velocidad rectilínea a las 96 h de almacenamiento, que podría estar determinado por una

mayor producción de ATP. Estas características son deseables y requeridas en una IA cervical para cruzar la barrera cervical.

El efecto antioxidante de la LC se atribuye a su acción contra la producción de ROS como resultado de un mecanismo de reparación mediante el cual se elimina la acetil-coenzima A (acetil-CoA) tóxica intracelular elevada y/o se reemplazan los ácidos grasos en los fosfolípidos de membrana (Vicari y Calogero, 2001). La suplementación con L-carnitina al diluyente de semen de búfalo mejoró significativamente sus características y protegió su membrana plasmática y la integridad funcional mitocondrial (El-Raey et al., 2016). Los resultados sugieren que la mayor integridad de las membranas plasmática, acrosomal y mitocondrial, cuando el semen es refrigerado por 48 y 96 h, podría ser determinado por el efecto antioxidante de la LC que disminuiría el proceso de peroxidación de membranas. En conclusión, la L-carnitina mejora el vigor cinético y proporciona un efecto protector antioxidante a las membranas de los espermatozoides de morueco almacenados en condiciones de refrigeración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliabadi, E., Soleimani, M., Borzoei, Z., Talaei-Khozani, T., Mirkhani, H. & Tabesh, H. 2012. Iran J Reprod Med. 10(2):77-82.
- Bøhmer, T., Hoel, P., Purvis, K. & Hansson, V. 1978. Archives of Andrology. 1(1):53-59.
- Gibb, Z., Lambourne, S.R., Quadrelli, J., Smith, N.D. & Aitken, R.J. 2015. Biology of Reproduction. 93(4):1-9.
- El-Raey, M., Badr, M.R., Assi, M.M. & Rawsah, Z.M. 2016. Assiut Vet. Med. J. 62(149):163-173.
- Gil, J., Fierro, S., Betancur, O. & Olivera-Muzante, J. 2011. Reprod Dom Anim. 46:503-507.
- Hufana-Duran, D., Duran, P.G., Monson, R. & Parrish, J. 2017. J. ISSAAS. 23(1):56-67.
- Maxwell, W.M.C. & Salamon, S. 1993. Reprod. Fertil. Dev. 5:613-638.
- O'Hara, L., Hanrahan, J.P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A.C. & Lonergan, P. 2010. Theriogenology. 74:541-549.
- Vicari, E. & Calogero, A.E. 2001. Hum Reprod. 16:2338-2342.

Agradecimientos: esta investigación fue financiada por el proyecto europeo 677353 IMAGE-HORIZON 2020 y la beca pre-doctoral ARSEQ-BEC-008856-2016 SENESCYT, Ecuador.

EFFECT OF L-CARNITINE ON A SKIMMED MILK BASED-DILUENT IN MEMBRANES PRESERVATION AND KINETIC ACTIVITY OF RAM SPERM UNDER CHILLED CONDITIONS.

ABSTRACT: The synergic effect of L-carnitine (LC) and skimmed milk base-extender (UHT) on the kinetic parameters and membranes integrity of cold-stored ram sperm was evaluated. For this purpose, twelve pools of thirty-six semen ejaculates that were collected with artificial vagina from twelve Merino rams were used. After initial evaluation, the semen was divided into 6 aliquots enough to diluted with UHT-extender (control) and 1mM (UHT-LC1), 2,5mM (UHT-LC2,5), 5mM (UHT-LC5), 7,5mM (UHT-LC7,5) and 10mM (UHT-LC10) of LC, respectively, at 200×10^6 cells/ml concentration. Semen samples were cold-stored (5°C) up to 96 h. Kinetic variables and membranes integrity were assessed by CASA system (SCA) and triple fluorescence association test (IP/PNA-FITC/Mitotracker green). An ANOVA-one way and Bonferroni's test were used to evaluated effects of LC doses. Overall, the total motility (TM, %), straight line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$) and total sperm with plasma and acrosome membranes integrity and high mitochondrial function (IPIAHM, %) were greater with all doses of LC (1 to 10 mM) than control group. Also, the UHT-LC5 group provided better values than others LC groups according to motilities. In conclusion, LC improves kinetic vigor and provides an antioxidant protective effect to sperm membranes of cold-stored ram when added to skimmed milk based-diluent.

Keywords: L-carnitine, Chilled, Skimmed milk, ram.