

SUPLEMENTO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Chorroarín 280 (C1427CWO) Bs. As., Argentina. Tel.(54 11) 4524 8400.
www.fvet.uba.ar



INITRA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
Y TECNOLOGÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL
Facultad de Ciencias Veterinarias UBA

USO DE UN DERIVADO SINTÉTICO DE LA VITAMINA E COMO ANTIOXIDANTE PARA MEJORAR LA FUNCIONALIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN PORCINO REFRIGERADO

Camporino, A.^(1, 2), Madrid Gaviria, S.^(1, 2), Cetica, P.^(1, 2), Córdoba, M.^(1, 2)

La producción porcina es de gran importancia para la industria agropecuaria Argentina, siendo la misma la tercera en importancia en consumo per cápita en nuestro país. Según datos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, para enero de 2023 se ha reportado un incremento del 18,6% y del 19,4% en la faena y la producción porcina, respectivamente ⁽⁵⁾.

Siendo que la mejora en la eficiencia reproductiva en esta especie tiene importantes impactos positivos para el desarrollo de dicho sector productivo, las biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial y conservación de gametos constituyen estrategias destacadas para la producción animal. Hasta la fecha, la criopreservación se posiciona como el método más eficiente para almacenar gametos de mamíferos debido a sus múltiples ventajas: conservación durante largos períodos de tiempo, mejores condiciones de bioseguridad para las muestras almacenadas, constitución de un banco de germoplasma para distintas especies, entre otras. Sin embargo, debido a los daños generados en los espermatozoides y ovocitos porcinos, dicho método no es el de elección para esta especie. De manera particular, en los porcinos el 99% de las inseminaciones se realizan con semen refrigerado a una temperatura entre 15 y 17°C ⁽⁷⁾, puesto que los espermatozoides porcinos son mucho más sensibles al daño por frío en comparación a otras especies debido a la composición lipídica de su membrana plasmática ⁽²⁾.

Durante la conservación de los espermatozoides a bajas temperaturas se produce una serie de cambios, los lípidos de la membrana plasmática sufren una reorganización que aumenta su permeabilidad y se reduce la actividad enzimática, lo cual también aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), incluidos el anión superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (OH[·]) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que pueden derivar en estrés oxidativo y peroxidación lipídica de membranas. El metabolismo oxidativo es estimulado por su exposición a altas concentraciones de oxígeno durante la crioconservación, dando como resultado una mayor producción de EROS por parte de la cadena respiratoria mitocondrial.

Se informó que las EROS tienen un efecto dual en la función de los espermatozoides. A bajas concentraciones, las EROS pueden inducir la capacitación, la hiperactivación, ayudan a mantener la integridad del acrosoma y promueven la fusión del ovocito con el espermatozoide. En cambio, a altas

(1) Universidad de Buenos Aires - CONICET, Instituto de Investigaciones en Producción Animal (INPA), Buenos Aires, Argentina.

(2) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Buenos Aires, Argentina

concentraciones, las EROS producen graves daños en el ADN, inhiben la fusión de gametos y reducen la motilidad de los espermatozoides.

Cabe señalar que en los espermatozoides porcinos, la membrana plasmática es rica en fosfatidiletanolamina y esfingomiélin, presenta bajo contenido de fosfatidilcolina y también una baja concentración de colesterol distribuido asimétricamente, especialmente en la capa externa, haciendo más lábil la interna y determinando una baja relación colesterol/fosfolípidos. Esto hace que los espermatozoides porcinos sean más susceptibles a la peroxidación lipídica inducida por EROS generadas durante su almacenamiento a bajas temperaturas en comparación con otras especies. Se ha informado que los cambios degenerativos producidos por el almacenamiento también tienen efectos en las membranas mitocondriales y acrosomales, lo que resulta en un cambio del potencial de membrana mitocondrial y en espermatozoides con capacitación y reacción acrosomal prematuras, teniendo un impacto negativo en las tasas de fecundación y gestación. Por estas razones, para disminuir el daño inducido por el choque térmico, los espermatozoides porcinos se almacenan preferentemente a temperaturas superiores a 15°C.

Estudios recientes en la especie porcina han informado estrategias para mejorar las condiciones de almacenamiento, utilizando antioxidantes para disminuir las EROS o inhibir su generación. El antioxidante Trolox (ácido 6-hidroxi 2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) es un derivado sintético de la vitamina E de naturaleza hidrosoluble. Al igual que el α -tocoferol, la actividad antioxidante de Trolox surge de su capacidad para donar hidrógeno del grupo hidroxilo del anillo de cromanol a especies reactivas, cuyo efecto ha sido probado en múltiples modelos celulares como hepatocitos, miocitos, eritrocitos, timocitos y gametos de varias especies incluida el porcino ^(4, 6).

El trabajo de nuestro laboratorio tuvo como objetivo estudiar el impacto de la adición de Trolox 200 μ M al diluyente de refrigeración Modena modificado y a muestras ya diluidas con diluyente comercial proveniente de criaderos.

Dicho efecto fue evaluado mediante pruebas funcionales al día 0, 1, 2 y 5 de almacenamiento empleando un diluyente de mediano plazo (Modena modificado) preparado en nuestro laboratorio, y también en muestras previamente refrigeradas con un diluyente comercial de larga duración al día 0, 3 y 7 de conservación.

A través de dichas pruebas funcionales se analizó el porcentaje de espermatozoides móviles mediante microscopía óptica, espermatozoides viables con acrosoma intacto mediante la tinción de Azul Tripán y microscopía de contraste de interferencia diferencial, funcionalidad de la membrana plasmática espermática a través del Test Hipoosmótico, porcentaje de criocapitación mediante la tinción fluorescente de clortetraciclina y porcentaje de espermatozoides con elevado potencial de membrana mitocondrial interna a través de la tinción de JC-1 por microscopía de epifluorescencia.

En las muestras refrigeradas en medio Modena modificado suplementado con Trolox se observó que el Trolox no tuvo efecto sobre los cambios en el potencial de membrana mitocondrial experimentados durante la refrigeración, el cual disminuyó a lo largo de los días de conservación. Respecto a la funcionalidad de membrana plasmática, la adición de Trolox produjo efectos positivos en la misma al día 1 y 5 de refrigeración. En cuanto a la viabilidad y motilidad progresiva, ambos parámetros se mantuvieron en niveles aceptables, sin diferencias significativas con respecto al control, exceptuando la motilidad al día 1 en muestras tratadas, que fue mayor. Tampoco se observaron diferencias respecto al aumento en el porcentaje de criocapitación a lo largo de los días de refrigeración tanto en muestras tratadas como no tratadas con Trolox.

Respecto a las muestras previamente refrigeradas con un diluyente comercial de larga duración y posterior agregado de Trolox al llegar al laboratorio, se observó una disminución significativa a lo largo del tiempo de conservación independientemente del tratamiento en los parámetros de motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto, con funcionalidad de membrana plasmática y con alto potencial de membrana mitocondrial. Mientras que el porcentaje de espermatozoides criocapitados no se vio afectado por el tiempo de almacenamiento ni por la adición del antioxidante.

En conclusión, los espermatozoides porcinos son muy susceptibles al daño oxidativo debido a las características de sus membranas, por lo que el estudio del efecto Trolox sobre ellos es de suma importancia para optimizar las condiciones de almacenamiento seminal. En nuestro estudio, la adición de Trolox 200µM en el diluyente de semen porcino de mediano plazo aumentó la preservación de la funcionalidad de membrana plasmática y la motilidad progresiva al día 1, pero no modificó otro parámetro funcional. Al adicionar Trolox 200µM luego de la refrigeración de espermatozoides porcinos en un medio de refrigeración de largo plazo, en cambio, no se encontró una mejora en ninguno de los parámetros analizados.

Existen múltiples moléculas antioxidantes que pueden ejercer su efecto protector tanto dentro como fuera de la célula y pueden ser una alternativa eficaz para disminuir los daños causados por el estrés oxidativo en las principales organelas y macromoléculas de importancia biológica en los espermatozoides. El efecto protector del Trolox sobre las membranas plasmáticas y acrosomal fue evidenciado tras su agregado al medio de refrigeración de mediano plazo.

Para consultar el trabajo completo remitirse a Camporino y col. 2022, *InVet* 24⁽²⁾:1-10 y Madrid Gaviria y col. 2022, *InVet* 24⁽¹⁾:100.

Perspectivas

El ampliar nuestros conocimientos sobre los cambios funcionales de membrana y mitocondriales generados por los procesos de refrigeración de espermatozoides contribuye a desarrollar técnicas y protocolos más adecuados que garanticen el mantenimiento de la calidad espermática, lo que sin dudas tendrá un efecto positivo en la eficiencia reproductiva porcina, permitiendo mantener su continuo crecimiento económico.

Para esto, también es de gran importancia la integración entre el sector productivo y el sector académico, de manera que las investigaciones realizadas puedan generar el conocimiento necesario para solucionar las problemáticas reales encontradas en los sistemas productivos.

Bibliografía

1. Camporino, A.; Córdoba M. Effect of Trolox addition as antioxidant in refrigeration medium in porcine spermatozoa. *InVet*, 2022, 24(2):1-10.
2. Giaretta, Elisa. 2015. "Effect of Antioxidant Supplementation on Pig and Horse Gamete Storage." Università di Bologna.
3. Madrid Gaviria, S.; Cetica P.; Córdoba M. Estudio preliminar del efecto de la suplementación con Trolox sobre pool de semen porcino refrigerado. *InVet*, 2022, 24(1):100.
4. Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Rodriguez Martinez, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*, 2003, 78(1-2):85-98.
5. Secretaria de Agricultura Ganadería y Pesca, Ministerio de Economía. 2023. "La Faena y La Producción de Carne Porcina Fueron Récord En 2022." [https://www.argentina.gob.ar/noticias/la-faena-y-la-produccion-de-carne-porcina-fueron-record-en-2022#:~:text=La Secretaría de Agricultura%2C Ganadería,723.388 toneladas de carne producida](https://www.argentina.gob.ar/noticias/la-faena-y-la-produccion-de-carne-porcina-fueron-record-en-2022#:~:text=La%20Secretaría%20de%20Agricultura%20Ganadería,723.388%20toneladas%20de%20carne%20producida).
6. Silvestre, M.A.; Yániz, J.L.; Peña, F.J.; Santolaria, P.; Castelló-Ruiz, M. Role of Antioxidants in Cooled Liquid Storage of Mammal Spermatozoa. *Antioxidants*, 2021, 10, 1096.
7. Yeste, M. 2017. "State-of-the-Art of Boar Sperm Preservation in Liquid and Frozen State." *Animal Reproduction* 14(1): 69–81. [http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n1/p069-081\(AR895\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n1/p069-081(AR895).pdf).