

EFFECTO DE L-CARNITINA Y PIRUVATO EN ESPERMATOZOIDES EQUINOS CONSERVADOS A 5 °C y 15 °C POR 24 HORAS: RESULTADOS PRELIMINARES

Effect of L-carnitine and pyruvate on equine sperm maintained at 5 °C and 15 °C during 24 h:
preliminary results

Guillermo Avila^{1,2}, Alejandro Ferrante^{1,3}, Marcelo Miragaya^{1,4}, Deborah Neild^{1,5}

1 Cátedra de
Teriogenología, Instituto
de Investigación y
Tecnología en
Reproducción Animal
(INITRA), Facultad de
Ciencias Veterinarias,
Universidad de Buenos
Aires, Argentina.
2 Médico Veterinario.,
3 Veterinario.,
4 Médico Veterinario, MSc,
PhD.,
5 Médica Veterinaria, PhD.

E-mail:
deborah.neild@gmail.com

RESUMEN

En este estudio se propuso evaluar si la adición del antioxidante L-carnitina y piruvato a dos diluyentes de transporte (Kenney y Kenney modificado por Tyrodes), logra mantener durante 24 horas los parámetros seminales a 5 °C y a 15 °C. Se obtuvo semen de 3 padrillos (n=3; r=2) y a tiempo 0 y 24 h se evaluaron: movilidad espermática total y progresiva (CASA), viabilidad y estado del acrosoma (FITC -PNA-PI), funcionalidad de membrana (HOS), y ADN con Azul de Toluidina (AT) y la prueba del halo (SCD). Para cada temperatura por separado, se realizó el análisis utilizando un diseño factorial, con un nivel de significancia del 5%. No se presentaron interacciones entre los factores. Hasta el momento se observó un mejor desempeño del diluyente Kenney con el agregado de carnitina y piruvato para preservar la mayoría de los parámetros en espermatozoides conservados 24 h a 5 °C y 15 °C.

Palabras clave: Equino, espermatozoide, refrigeración, L-carnitina, piruvato

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate if the addition of L-carnitine and pyruvate to two semen transport extenders (Kenney and Kenney modified by Tyrodes) is able to maintain sperm parameters for 24 h at 5 °C and 15 °C. Semen was obtained from 3 stallions (n=3; r=2) and at time 0 and after 24 h of cooling, the following parameters evaluated: total and progressive motility (CASA), viability and acrosome status (FITC-PNA-PI), membrane function (HOS), and DNA with Toluidine Blue stain (TB) and the Sperm Chromatin Dispersion assay (SCD). Each temperature was individually analyzed using a factorial design with a 5% significance level. No interactions were observed. For the moment, the Kenney extender with the addition of L-carnitine and pyruvate showed the best results for maintaining most sperm parameters for 24 h at both 5 °C and 15 °C.

Keywords: Equine, sperm, refrigeration, L-carnitine, pyruvate

INTRODUCTION

Para la inseminación artificial (IA) a distancia, usualmente el semen equino se maneja diluido y se transporta refrigerado (a 5 °C) en un intento de mantener sus valores similares a los del semen fresco durante 24 horas, pero esto sólo se logra en animales con muy buena calidad seminal. En general los parámetros seminales empiezan a disminuir con los primeros cambios de temperatura, siendo mayor el daño sufrido por las células a partir de los 5 °C al estar sometidos a diferentes tipos de estrés, entre ellos el oxidativo (Betancur *et al.*, 2012). El estrés oxidativo es causado por el desbalance entre la producción de las Especies Reactivas del Oxígeno (ERO o ROS) y la acción protectora del sistema antioxidante con que cuentan las células, responsable de su neutralización y eliminación para evitar el daño de células y tejidos. Los espermatozoides de mamíferos son especialmente susceptibles a los efectos dañinos de las ERO no solo porque su membrana citoplasmática contiene altas cantidades de ácidos grasos insaturados que pueden ser oxidados, sino porque además su citoplasma tiene muy bajas concentraciones de enzimas capaces de neutralizar las ERO (Walczak *et al.*, 2012).

Por otro lado, es sabido que los espermatozoides epididimarios son más resistentes al shock por frío y se ha observado la presencia de antioxidantes tales como la carnitina en el fluido epididimario del equino (Magistrini *et al.*, 1996). La carnitina y la acetil-carnitina modulan varias funciones metabólicas espermáticas, entre ellas la β -oxidación de los ácidos grasos y el incremento de la utilización de piruvato y lactato como sustratos energéticos durante la maduración de los espermatozoides (Jeulin *et al.*, 1988). Es así que el piruvato ha sido añadido a diluyentes de semen en diferentes especies como sustrato energético para ser metabolizado por los espermatozoides.

Un gran número de padrillos evidencian una alta susceptibilidad al descenso de temperatura y a la peroxidación que se produce durante la misma, factores que afectan negativamente su transporte a 5 °C. Por esta razón, se propuso seleccionar un protocolo de transporte y conservación de semen equino que mantenga las características espermáticas y/o minimice los cambios deletéreos que produce el descenso de la temperatura. Para ello se evaluó si la adición de L-carnitina y piruvato a dos diluyentes actuales de transporte (Kenney y Kenney modificado por Tirodes), logra mantener durante 24 horas los parámetros seminales de espermatozoides equinos conservados a dos temperaturas diferentes: 15 °C y 5 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo semen de 3 padrillos (n=3; r=2) mediante vagina artificial modelo Missouri. Los padrillos se encontraban en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, en corrales individuales con sombra y alimentados con fardos de alfalfa y agua ad libitum.

Una vez obtenidas las muestras seminales, se realizó la evaluación macro y microscópica de rutina y luego se subdividió a la muestra en los diluyentes a ensayar: 1) diluyente Kenney (K); 2) diluyente K con el agregado de L-carnitina 6 mM y piruvato 6 mM (K+); 3) diluyente Kenney

modificado (KMT); 4) diluyente KMT con el agregado de L-carnitina 6 mM y piruvato 6 mM (KMT+). Luego de la dilución, las muestras se colocaron en un Equitainer y en un Botubox, donde se produjo una curva controlada de descenso de temperatura a 5 °C y 15 °C respectivamente. A tiempo cero y luego de 24 h de refrigeración, se evaluaron los siguientes parámetros espermáticos: movilidad total y progresiva, viabilidad y estado acrosomal, funcionalidad de membrana y por último estado del ADN.

La movilidad total y progresiva se evaluó en forma subjetiva entre porta y cubreobjetos sobre platina térmica a 37 °C, empleando microscopio de contraste de fases y en forma objetiva, con el sistema computarizado de análisis espermático (Computer Assisted Sperm Analysis, CASA, Proiser versión 2.1) contabilizando un mínimo de 200 células en por lo menos 5 campos evaluados. La viabilidad y estado del acrosoma se evaluaron conjuntamente según el protocolo de Petrunkina *et al.* (2005). Brevemente, las muestras de semen fueron teñidas con iodo de propidio (PI; concentración final: 5 μ g/ml) y FITC-PNA (concentración final: 10 μ g/ml) e incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos, evaluando posteriormente un mínimo de 200 espermatozoides con microscopía de epifluorescencia. La funcionalidad de membrana (prueba HOS) se realizó según Neild *et al.* (1999). Brevemente, se incubó 100 μ l de muestra seminal en 1 ml de solución de lactosa 50 mOsm durante 30 min a 37 °C, evaluando un mínimo de 200 espermatozoides con microscopio de contraste de fases (400x). Para el ADN se evaluó la condensación de la cromatina con la tinción de Azul de Toluidina (AT) según Sardoy *et al.* (2008). Brevemente, se realizó un frotis con la muestra y se fijó con etanol al 70% durante un minuto. Posteriormente se tiñó con AT al 10% durante 15 minutos, se lavó y se dejó secar a temperatura ambiente. Se evaluaron un mínimo de 200 espermatozoides con microscopio de campo claro (400x). Por otro lado, la susceptibilidad a la fragmentación del ADN se evaluó con la Técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática según protocolo de Carretero *et al.* (2010). Brevemente se expusieron a las muestras de semen a soluciones de lisis y luego se tiñeron con Giemsa para evidenciar el grado de fragmentación según la formación o no de halos de ADN. El análisis de los datos se realizó para cada temperatura por separado, utilizando un diseño factorial, con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

No se presentaron interacciones entre los factores para ninguna de las temperaturas ensayadas. A las 24 h, se observó un efecto significativo tanto del tiempo como del tratamiento sobre las muestras de semen equino, siendo las muestras diluidas en K+ las que preservaron mejor la movilidad progresiva a las 24 h en ambas temperaturas (p= 0,0094 y p=0,0270). Además, a 5 y a 15 °C se observó una disminución significativa (p<0,05) del porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma intacto, siendo el diluyente K+ el único que no difirió significativamente del tiempo 0 (p= 0,6980 y p=0,7435 respectivamente). Los datos se pueden observar en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Porcentajes de espermatozoides equinos con movilidad progresiva luego de ser mantenidos durante 24 h a 5 °C y a 15 °C en dos diluyentes con y sin el agregado de L-carnitina y piruvato (n=3; r=2).

Tratam.	Movilidad Progresiva 5 °C		Movilidad Progresiva 15 °C	
	0 h	24 h	0 h	24h
K	36,9 ± 24,2 ^{ab}	13,6 ± 16,8 ^{ab}	41,3±23,0 ^{ab}	3,1±3,1 ^c
K+	45,1 ± 10,4 ^a	25,9 ± 20,9 ^{ab}	48,1±11,0 ^a	10,4±4,0 ^{abc}
KMT	19,9 ± 6,0 ^{ab}	3,4± 3,0 ^b	24,5±12,0 ^{abc}	5,1±6,1 ^c
KMT+	14,4 ± 11,1 ^{ab}	5,7 ± 6,2 ^b	19,6±15,0 ^{abc}	6,1±5,6 ^{bc}

K: diluyente Kenney; K+: diluyente Kenney con el agregado de L-carnitina y piruvato; KMT: diluyente Kenney modificado; KMT+: diluyente KMT con el agregado de L-carnitina y piruvato.

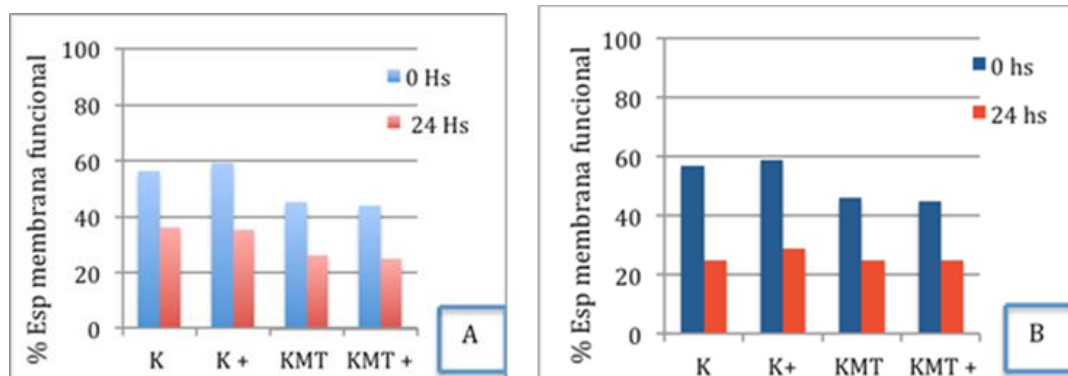
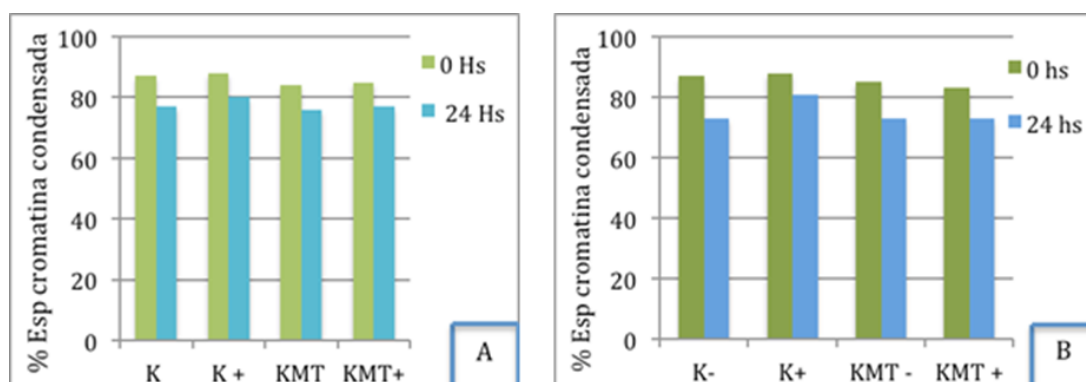
^{ab}letras diferentes indican diferencias entre tiempos y tratamientos para cada temperatura por separado (p<0,05)

Tabla 2: Porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma intacto luego de ser mantenidos a 5 °C y 15 °C durante 24 horas (n=3; r=2).

Tratam.	Vivos con acrosoma intacto 5 °C		Vivos con acrosoma intacto 15 °C	
	0 h	24 h	0 h	24h
K	79,2 ± 3,4 ^{ab}	54,2 ± 11,0 ^c	80,0 ± 3,3 ^{ab}	60,5 ± 14,4 ^{bc}
K+	81,2 ± 7,0 ^a	66,8 ± 10,9 ^{bc}	84,2 ± 2,0 ^a	69,0 ± 16,3 ^{abc}
KMT	77,8 ± 10,4 ^{ab}	49,8 ± 15,6 ^c	77,0 ± 11,8 ^{ab}	56,7 ± 14,5 ^c
KMT+	84,2 ± 4,5 ^{ab}	48,8 ± 16,3 ^c	83,7 ± 5,1 ^a	58,7 ± 11,1 ^{bc}

K: diluyente Kenney; K+: diluyente Kenney con el agregado de L-carnitina y piruvato; KMT: diluyente Kenney modificado; KMT+: diluyente KMT con el agregado de L-carnitina y piruvato.

^{ab}letras diferentes indican diferencias entre tiempos y tratamientos para cada temperatura por separado (p<0,05)

**Figura 1.** Porcentaje de espermatozoides con membrana funcional (HOS positivos) mantenidos en los diluyentes en estudio. K: diluyente de Kenney; K+: diluyente Kenney con el agregado de L-carnitina y piruvato; KMT: diluyente Kenney modificado por Tirodes; KMT+: diluyente KMT con el agregado de L-carnitina y piruvato. A) Muestras mantenidas a 5 °C; B) muestras mantenidas a 15 °C.

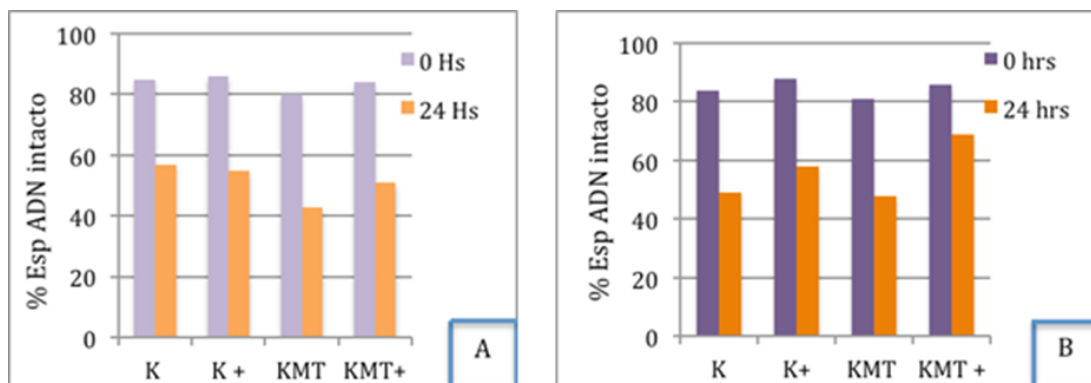


Figura 2. Evaluación del ADN espermático en muestras mantenidas en los diluyentes en estudio. K: diluyente de Kenney; K+: diluyente Kenney con el agregado de L-carnitina y piruvato; KMT: diluyente Kenney modificado por Tirodes; KMT+: diluyente KMT con el agregado de L-carnitina y piruvato. A) Muestras mantenidas a 5 °C; B) muestras mantenidas a 15 °C.

La funcionalidad de membranas (prueba HOS) disminuyó a las 24 h, no observando diferencias significativas entre los tratamientos ensayados ($p > 0,05$) (Figura 1). En cuanto al ADN, no se observó una disminución significativa en la condensación de la cromatina en el tiempo, ni entre los tratamientos ensayados ($p > 0,05$). Sin embargo, a las 24 h se observó un aumento de la fragmentación de ADN, siendo los diluyentes que mejor preservaron la integridad del ADN el Kenney a 5 °C y el Kenney y KMT, ambos con carnitina y piruvato (K+ y KMT+), a 15 °C ($p < 0,05$) (Figura 2).

DISCUSIÓN

Los resultados preliminares obtenidos en este estudio se asemejan a los reportados por Lisboa *et al.* (2012) quienes, a las 24 h de conservación de semen equino a 5 °C en un diluyente a base de leche descremada con el agregado de diferentes concentraciones de L-carnitina y acetil-L-carnitina, no encontraron diferencias significativas entre los grupos; sin embargo a las 48 h sí observaron movilidad espermática total y progresiva mayor que las muestras control. Ellos concluyeron que la combinación de L-carnitina y acetil-L-carnitina mejoraba la movilidad espermática y ofrecía una mejor protección a la membrana plasmática luego de 48 h de conservación a 5 °C.

El diluyente KMT no conservó los valores espermáticos según lo reportado por Padilla y Foote (1991) pero este resultado pudo deberse a la presencia de plasma seminal junto con los espermatozoides. Las muestras no se centrifugaron en nuestro estudio para simplificar el envío del semen para aquellos establecimientos que no cuenten con centrifuga y para equiparar con el protocolo de envío utilizado con el diluyente Kenney. Asimismo en un estudio similar sobre conservación de semen equino se reportó una tendencia a mejorar la movilidad espermática (total y progresiva) y la integridad de las membranas plasmática y acrosomal cuando se agregaba carnitina y piruvato a dos diluyentes de semen equino (Kenney e INRA 96) y se conservaba hasta 48 h a 4 °C (Potter, 2015). Este autor observó además un efecto deletéreo de la centrifugación sobre los espermatozoides de algunos de los padrillos y también una influencia del diluyente utilizado observando un efecto positivo del agregado de carnitina y piruvato solo en el diluyente Kenney. Otro resultado relevante fue el elevado nivel de fragmentación de ADN a las 24 horas en las muestras

conservadas a ambas temperaturas. Dado que se podría considerar que las células espermáticas no estuvieron sometidas a temperaturas extremas que podrían causar este tipo de daño a nivel de la cromatina, no se puede explicar certeramente hasta el momento este efecto, requiriendo ampliar los estudios a tal fin.

CONCLUSION

Hasta el momento se observó un mejor desempeño del diluyente Kenney con el agregado de L-carnitina y piruvato para preservar la mayoría de los parámetros en espermatozoides conservados 24 h a 5 °C y 15 °C. Se está evaluando la conservación a 22 °C como alternativa de transporte de semen equino.

REFERENCIAS

- Betancur GR, López EP, Rojano BA. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. Revista Lasallista de Investigación Caldas (Antioquia, Colombia). 2012; 9: 128-136.
- Carretero MI, Arraztoa C, Caldevilla M, Ferrante A, Lombardo D, Neild D. Chromatin dispersion test in equine spermatozoa. *Invet.* 2010; 12: 249
- Jeulin C, Soufir JC, Marson J, Paquignon M, Dacheux JL. Acetylcarnitine et spermatozoides: relation avec la maturation e'pididymaire et la mobilite' chez le verrat et l'homme. *Reprod. Nutr. Dev.* 1988; 28: 1317-27.
- Lisboa FL, Hartwig FP, Mazeiro RRD, Monteiro GA, Papa FO, Dell'Aqua Jr. JA. Use of L-carnitine and acetyl-L-carnitine in cooled-stored stallion semen. *Journal of Equine Veterinary Science.* 2012; 32:493-494.
- Magistrini M, Vidament M, Clement F, Palmer E. Fertility prediction in stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 1996; 42: 181-8.
- Neild D, Chaves M, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology.* 1999; 51: 721-727.
- Padilla AW, Foote RH. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 1991; 69: 3308-3313.

- Petrunkina AM, Gröpper B, Töper- Petersen E, Günsel Apel R. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology*. 2005; 63: 1390-1406.
- Potter DS. L-Carnitine and Pyruvate Inclusion in Diluents For Cold-Stored Stallion Spermatozoa. Thesis. BearWorks Institutional Repository, Missouri State University, 2015.
- Sardoy MC, Carretero MI, Neild DM. Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. *J. Anim. Reprod. Sci.* 2008; 5: 125-126.
- Walczak R, Jedrzejowska KJ, Wolski S, Hilczer J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European Journal of Urology*. 2012; 66(1): 60–67.