

Efecto de la Suplementación del Medio de Incubación con Extracto de *Berberis microphylla* (Calafate) sobre la Funcionalidad Espermática en Semen Bovino Descongelado

Effect of Supplementation of Incubation Medium with *Berberis microphylla* (Calafate) Extract on Sperm Functionality in Thawed Bovine Semen

Mariana Deppe^{1,2}; Ana Belén Jara¹; Marjorie Reyes-Díaz³ & Jennie Risopatrón^{1,2}

DEPPE, M.; JARA, A. B.; REYES-DÍAZ, M. & RISOPATRÓN, J. Efecto de la suplementación del medio de incubación con extracto de *Berberis microphylla* (Calafate) sobre la funcionalidad espermática en semen bovino descongelado. *Int. J. Morphol.*, 39(1):25-31, 2021.

RESUMEN: En el semen criopreservado, los procesos de congelación/descongelación y posterior manipulación, dañan las células espermáticas provocando disminución de la capacidad fecundante de los espermatozoides descongelados. Estos procesos han sido asociados con el estado de estrés oxidativo (EO) inducido por altos niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS), causando daño a la función y estructura espermática. Los espermatozoides descongelados pueden ser protegidos de este daño, con la adición de antioxidantes (AO) al medio de incubación. El fruto de Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.) posee una alta capacidad antioxidante, lo que hace interesante investigar el efecto de sus componentes antioxidantes en estos procesos biotecnológicos especialmente postdescongelación. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la suplementación de extracto liofilizado de fruto de Calafate (ELC), sobre la calidad espermática post-descongelación. Previamente se caracterizó el ELC, determinando la actividad antioxidante y metabolitos como fenoles y antocianinas; posteriormente, espermatozoides de bovino descongelados fueron incubados en un medio base suplementado con diferentes concentraciones de ELC. Post-incubación se evaluó la motilidad progresiva; la viabilidad e integridad de la membrana plasmática (SYBR14- PI) y acrosomal (FITC-PNA/PI) y la peroxidación lipídica (BODIPY) por citometría de flujo. La caracterización de ELC demostró que tanto la actividad antioxidante como los fenoles y antocianinas incrementan concomitante con el aumento de la concentración de ELC. La adición de ELC al medio de incubación, dependiendo de la concentración y tiempo de incubación, sería eficaz en proteger la motilidad, viabilidad e integridad de la membrana plasmática y disminuir la lipoperoxidación en los espermatozoides de bovino descongelados.

PALABRAS CLAVE: Calafate, espermatozoide, bovino, antioxidante.

INTRODUCCIÓN

Es conocido que el proceso de criocongelación, que implica enfriamiento, congelación y descongelación de los espermatozoides produce daño en la función espermática (Colás *et al.*, 2009), observándose un deterioro de los parámetros espermáticos en relación al semen fresco. Estos procesos hacen que las células sean más susceptibles al daño inducido por especies reactivas de oxígeno (EROS), con pérdida de la calidad espermática, disminuyendo la motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma y ADN, aumentando la peroxidación lipídica de la membrana plasmática, y consecuentemente la deficiencia en la fusión

y penetración del espermatozoide-ovocito, es decir pérdida del potencial fecundante del espermatozoide (Gadea *et al.*, 2004; Forero Gonzalez, 2004) y la capacidad para generar un embrión normal (Simões *et al.*, 2013). Similarmente, cuando los espermatozoides se manipulan *in vitro* durante las técnicas reproductivas (TR), son sometidos a diversos procedimientos (eliminación del plasma seminal, repetidas centrifugaciones, exposición a presiones de oxígeno e incubaciones *in vitro*), que provocan niveles suprafsiológicos de EROS (du Plessis *et al.*, 2008), induciendo deterioro de la morfofunción espermática.

¹Centro de Excelencia de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR-BIOREN), Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

²Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

³Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Center of Plant, Soil Interaction and Natural Resources Biotechnology-BIOREN, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Financiamiento: Proyectos DI18-0071 y PIA-UFRO N°16-0006 de la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

En espermatozoides descongelados y sometidos a incubaciones posteriores (que se realiza como preparación para TR) se ha observado una disminución de la motilidad, viabilidad, integridad de la membrana plasmática y acrosomal y potencial mitocondrial a través de los tiempos de incubación (Gonçalves *et al.*, 2010; Cheuquemán *et al.*, 2015). Al respecto, se reportan altos niveles de EROS en espermatozoides de bovino después de la criopreservación (Chatterjee & Gagnon, 2001) y un aumento durante incubaciones postdescongelación (Gürler *et al.*, 2016). Por estas razones, en condiciones *in vitro* debe suplementarse la ausencia de plasma seminal para proporcionar espermatozoides competentes funcionalmente. La resistencia a la peroxidación de los espermatozoides bovinos ha sido atribuida a componentes en el plasma seminal (Dawra *et al.*, 1984; Dawra & Sharma, 1985), que podrían protegerlos durante los procesos de manipulación *in vitro* contra el estrés oxidativo.

Previos estudios en bovino, han revelado que el uso de antioxidantes durante la manipulación *in vitro* espermática permitiría minimizar los efectos dañinos del EO y/o reducir su producción, mejorando la calidad espermática del semen descongelado, previamente a ser utilizado en TR, como ser una fecundación *in vitro* (Gualtieri *et al.*, 2014).

Contrariamente, otros estudios revelan que la incubación con AO serían dañinos, debido a que la integridad de la membrana plasmática y acrosomal y la función mitocondrial se verían afectadas (Gonçalves *et al.*), o bien los AO no tendrían efecto sobre la funcionalidad espermática, como la motilidad, por el contrario, aumentarían la fragmentación y oxidación del ADN y dosis elevadas perjudicarían la viabilidad de los espermatozoides con acrosoma intacto (Cheuquemán *et al.*).

No obstante, no es amplia la información respecto al efecto que poseen los extractos naturales que contienen antioxidantes, sobre parámetros morfofuncionales espermáticos, y el efecto que podrían tener al ser adicionados al medio de incubación una vez descongelados. Por otra parte, en la actualidad existe interés creciente respecto a los antioxidantes naturales de origen vegetal debido a los problemas de seguridad y toxicidad que puedan presentar los antioxidantes sintéticos (Lourenço *et al.*, 2019).

En bovinos, estudios realizados con compuestos vegetales con actividad AO, han revelado que serían eficaces en mejorar la calidad espermática al adicionarlos al medio de incubación (Sapanidou *et al.*, 2015, 2016). Adicionalmente compuestos vegetales que exhiben AO pueden prevenir alteraciones espermáticas causadas por el EO que ocurre por las incubaciones o bien inducido, preservan-

do la funcionalidad de los espermatozoides (Tvrdá *et al.*, 2016), ejerciendo un eficaz rol antioxidante (Sapanidou *et al.*, 2014).

El Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst.) es una especie nativa que crece en la Patagonia de Chile y Argentina en condiciones silvestres, y sus frutos son consumidos principalmente como producto fresco o preparados como jaleas, mermeladas y licores. Este fruto tiene propiedades farmacológicas, incluyendo antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes, siendo hoy una alternativa interesante para el rubro frutícola del sur de Chile (Mariangel *et al.*, 2013; Fuentes *et al.*, 2019). El Calafate posee un alto contenido de polifenoles y capacidad antioxidante, superando significativamente a especies cultivadas tales como el arándano y frutilla, y berries nativos como la murtila (Mariangel *et al.*), por lo que representa un importante recurso para la investigación. Considerando que, el proceso de congelación/descongelación y preparación (manipulación *in vitro*) de semen pueden afectar adversamente la integridad funcional de los espermatozoides, el propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de extractos liofilizados de fruto de Calafate (ELC) al medio de incubación de espermatozoides de bovino descongelados, evaluando parámetros morfofuncionales postincubación. Adicionalmente se caracterizó los extractos liofilizados de frutos de Calafate en cuanto a su actividad antioxidante.

MATERIAL Y MÉTODO

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile (Acta N° 020-18, folio N°007-18).

Lugar del estudio. Los extractos liofilizados de fruto de Calafate, fueron obtenidos en el Laboratorio de Ecofisiología Molecular y Funcional de Plantas del Centro de Interacción Suelo Planta y Biotecnología de Recursos Naturales (BIOREN-UFRO) de la Universidad de La Frontera. Los ensayos experimentales de incubación de espermatozoides de bovino se realizaron en el Centro de Biotecnología en Reproducción (CEBIOR-BIOREN), perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera.

Obtención de extractos de liofilizado de fruto de Calafate (ELC). Los extractos totales liofilizados fueron obtenidos macerando 10 gramos de frutos de Calafate con etanol p.a. al 80 % v/v con un mortero frío (4°C). Luego, los extractos fueron centrifugados a 5000 rpm durante 5 min, recuperándose el sobrenadante. El pellet fue sometido a 3 extracciones secuenciales, usando etanol p.a. al 80 % v/v. Fi-

nalmente, el extracto fue filtrado y el solvente rotaevaporado utilizando un equipo Heidolph VV2020 para obtener el extracto total seco. Los extractos secos fueron guardados a 4 °C en oscuridad hasta su uso.

Caracterización del extracto. Se determinó la actividad antioxidante total a través del ensayo del radical DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) siguiendo la metodología de Chinnicci *et al.* (2004). Se midió la absorbancia 517 nm usando un detector multimodal (Synergy™ HT, Scientific and Technological Bioresource Nucleus, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile) y utilizando Trolox como estándar.

Los fenoles totales se determinaron utilizando el método Folin-Ciocalteu (Slinkard & Singleton, 1977), midiendo la absorbancia a 765 nm con un detector multimodal (Synergy™ HT, Scientific and Technological Bioresource Nucleus, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile), usando ácido clorogénico como estándar.

Las antocianinas totales fueron determinadas mediante el método de pH diferencial (Cheng & Breen, 1991). La absorbancia fue medida en un detector multimodal (Synergy™ HT, Scientific and Technological Bioresource Nucleus, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile) a 530 y 657 nm, expresando los datos en mg de cianidin-3-glucosido por g de peso seco. Por otro lado, el perfil de antocianidinas se determinó siguiendo el protocolo de Ribera *et al.* (2010) usando un sistema de HPLC (high-performance liquid chromatography) marca Jasco (LC-Net II/ADC) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD) (Jasco MD 2015 Plus), usando una columna Kromasil de fase reserva (RP)-18 (250 x 4.6 mm i.d.). La delfinidina, malvidina, petunidina, cianidina y peonidina fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y utilizadas como estándar.

Obtención de semen bovino. Se utilizó semen bovino congelado (pajuelas) de 4 toros disponible comercialmente (Alta Genetics, Canadá y Masterrind, Alemania) con fertilidad probada in vivo. En cada experimento (n=12), pajuelas de semen de diferentes toros fueron descongeladas, combinadas para producir un pool y eliminar la variabilidad entre las muestras a evaluar; posteriormente los espermatozoides fueron seleccionados por gradiente de Percoll (45:90), de acuerdo a (Parrish *et al.*, 1995). La concentración espermática fue determinada utilizando un fotómetro SDM1 (SpermaCue, Minitüb, Tiefenbach, Germany) y ajustada a 1×10^6 células/mL. Luego los espermatozoides fueron lavados con el medio Sp-TALP (sperm-Tyrode's albumin lactate pyruvate) por centrifugación a 200 g por 5 min, para ser posteriormente incubados con los diferentes tratamientos de ELC.

Incubación de espermatozoides de bovino con diferentes concentraciones de ELC. Para evaluar el efecto del ELC sobre los parámetros de funcionalidad espermática en los espermatozoides de bovino, se adicionó a alícuotas con suspensiones espermáticas en forma separada diferentes concentraciones del ELC, obteniendo así muestras espermáticas con 50 µg/mL ELC, 100 µg/mL ELC, 150 µg/mL ELC y sin ELC (control). Las alícuotas fueron evaluadas al inicio (T0) y una vez incubadas a 38,5°C y 5 % de CO2 en atmósfera húmeda por 2 horas (T2) y 4 horas (T4).

Evaluación de la función espermática de espermatozoides incubados con diferentes concentraciones de ELC. Los espermatozoides descongelados e incubados con y sin ELC, fueron analizados con respecto a la motilidad progresiva (MOTP), viabilidad e integridad de la membrana plasmática (VIMP); integridad de la membrana acrosomal (IMA) y lipoperoxidación (LPO) de acuerdo a los siguientes protocolos:

Motilidad Progresiva (MOTP). La motilidad fue determinada subjetivamente por microscopía óptica, utilizando un microscopio de luz (Carl Zeiss, Jena, Germany) con un aumento de 400x. El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue determinado por observación en un mínimo de 300 células, en seis campos diferentes. El promedio de las seis estimaciones sucesivas fue registrado como porcentaje de motilidad (Risopatrón *et al.*, 2002). Previamente el material utilizado para evaluar la motilidad fue temperado a 37°C. En cada ensayo se realizaron 3 réplicas.

Viabilidad e integridad de la membrana plasmática (VIMP). Este parámetro fue evaluado por citometría de flujo con la sonda fluorescente SYBR-14 y contrastada con yoduro de propidio (PI) utilizando el kit comercial LIVE/DEAD Sperm viability kit L7011- Invitrogen Molecular Probes, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. A un volumen de 400 µL de suspensión espermática (1×10^6 espermatozoides/mL) en DPBS (dulbecco's phosphate buffered saline) se le adicionó SYBR-14 (1 nM) y PI (18 µM final). Incubando por 5 a 10 minutos a 38,5 °C. La viabilidad fue considerada como el porcentaje de espermatozoides vivos con membrana plasmática intacta. Los espermatozoides fueron clasificados como vivos con membrana plasmática intacta (PI-/SYBR-14+), vivos con membrana plasmática dañada (PI+/SYBR-14-) y células con membrana plasmática parcialmente dañada (PI+/SYBR-14+). En cada ensayo se realizaron 3 réplicas.

Integridad del acrosoma (IA). La integridad del acrosoma fue evaluada utilizando la técnica de tinción fluorescente de fluoresceína conjugada con Lectina de *Arachis hypogaea* (peanut, PNA-FITC, L-7381, Sigma-Aldrich, Co. St. Louis

MO, USA) y PI. A alícuotas de 400 μL de suspensión espermática (1×10^6 espermatozoides/mL) se le adicionaron 0,3 mg/mL de PNA-FITC y 18 mM de PI. Luego de incubar a 38,5°C por 10 minutos en oscuridad, se adicionó DPBS para su lavado por centrifugación y análisis inmediato por citometría de flujo. Los espermatozoides fueron clasificados como vivos con acrosoma intacto (PNA-FITC- /PI-) y vivos con acrosoma dañado (PNA-FITC+/PI-). En cada ensayo se realizaron 3 réplicas.

Lipoperoxidación (LPO). La lipoperoxidación fue evaluada a través de la sonda BODIPY 581/591 C11 (D3861, Invitrogen) de acuerdo al protocolo de (Gürler *et al.*, 2015) con algunas modificaciones. A 200 μL de solución espermática se añadió BODIPY 581/591 C11 a una concentración final de 5 μM incubando durante 30 minutos a 38,5°C. El PI fue añadido a las suspensiones espermáticas (a una concentración final de 2,99 μM) 15 min antes de ser analizado. Los espermatozoides fueron clasificados como vivos no peroxidados y muertos peroxidados. En cada ensayo se realizaron 3 réplicas.

Citometría de Flujo. Todas las evaluaciones se realizaron mediante un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Cada análisis consistió en la evaluación de un mínimo de 10.000 eventos (espermatozoides teñidos), analizados en el software FACSDiva versión 6.1.3 (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

Análisis estadístico. Las determinaciones se basaron en al menos 5 repeticiones en el caso de los análisis de antioxidantes del extracto liofilizado de Calafate y 12 repeticiones para los ensayos espermáticos. El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico Prisma® versión 5.0. La normalidad de los datos se verificó con la prueba de D'Agostino y Pearson. Se analizaron los datos de cada parámetro de función espermática entre los tratamientos utilizando la prueba de análisis de varianza ANOVA de una vía, y la prueba de comparación múltiple Tukey para establecer diferencias significativas entre los diferentes grupos para cada uno de los parámetros espermáticos evaluados, considerando un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los datos son presentados como el promedio más la desviación estándar (DE).

RESULTADOS

Caracterización del ELC. La actividad antioxidante del ELC incrementó desde 465 a 780 μg de equivalentes Trolox g-1PS en la concentración de 50 y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectiva-

mente. Un incremento del 25 % fue observado en los fenoles totales con la concentración de 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del ELC. Respecto a las antocianinas totales, ésta aumentó 2.6 veces en la misma concentración, llegando a una concentración de 12 mg de cianidina 3-O-glicosido por g⁻¹PS. La antocianidina mayoritaria en el ELC fue la delfinidina, llegando a una concentración de 62 mg g⁻¹PS a la mayor concentración del extracto utilizada en el estudio.

Efecto de la adición de ELC sobre la motilidad progresiva (MOTP). La evaluación post-descongelación de la MOTP en los espermatozoides de bovino incubados con las diferentes concentraciones de ELC se muestran en la Tabla I. Durante el transcurso de los tiempos de incubación (T0, T2 y T4) fue observada una disminución progresiva de los porcentajes de MOTP tanto en el control como en los diferentes tratamientos de ELC. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en la MOTP en ninguna de las concentraciones de ELC utilizadas con respecto al control, al inicio de las incubaciones (T0) y a las 2 horas (T2). Sin embargo, a las 4 horas de incubación, se observó una MOTP significativamente mayor respecto al control sin ELC (20,3 %), con todas las concentraciones de ELC (29,7 %, 35,4 % y 35,6 %, respectivamente, $p < 0,05$).

Efecto de la adición de ELC sobre la viabilidad e integridad de la membrana plasmática (VIMP). El efecto de la incubación con las diferentes concentraciones de ELC sobre la VIMP en los espermatozoides de bovino post-descongelación se muestra en la Tabla II. Durante la incubación inicial (T0) y de 2 horas (T2) no se observaron diferencias significativas sobre la VIMP en los espermatozoides bovinos incubados con las diferentes concentraciones de ELC, respecto al control. Por el contrario, a las 4 horas de incubación, la concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ de ELC fue eficaz en mejorar significativamente este parámetro respecto al control (28,4 % vs. 18,3 %, $p < 0,05$).

Efecto de la adición de ELC sobre la integridad acrosomal (IA). Los resultados del efecto de la incubación de espermatozoides bovinos con las diferentes concentraciones de ELC sobre la IA son presentados en la Tabla III. No se observaron diferencias significativas sobre la IA, en los espermatozoides bovinos incubados con el ELC respecto al control sin ELC, independiente de las concentraciones del ELC utilizadas y de los tiempos de incubación utilizados.

Efecto de la adición de ELC sobre la lipoperoxidación (LPO). El efecto de la adición de las diferentes concentraciones de ELC al medio de incubación de los espermatozoides de bovino descongelados sobre LPO es presentado en la Tabla IV. En las incubaciones iniciales (T0) y de 2 horas (T2), no fue observado un efecto significativo

respecto al control con ninguna de las concentraciones de ELC utilizadas. Sin embargo, a las 4 horas de incubación la concentración de 50 µg/mL y 150 µg/mL de ELC presentaron diferencias significativas respecto al control sobre este parámetro (26,9 %, 25,1 % y 20,7 %, respectivamente, $p < 0,05$).

Tabla I. Motilidad progresiva (%) en espermatozoides de bovino descongelados e incubados con diferentes concentraciones de ELC y sin ELC a diferentes tiempos.

Tiempo de incubación	Control	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL
T0	80,9±3,5 ^a	79,8±4,1 ^a	81,4±2,1 ^a	82,1±1,9 ^a
T2	47,3±8,3 ^a	55,7±9,7 ^a	61,2±13,5 ^a	58,6±13,1 ^a
T4	20,3±7,4 ^a	29,7±9,1 ^b	35,4±9,5 ^b	35,6±8,5 ^b

Los resultados se presentan como la media ± DE. T0: Tiempo de incubación inicial, T2: Tiempo de incubación de 2 horas, T4: Tiempo de incubación de 4 horas. Diferentes letras de superíndice dentro de las filas indican diferencias significativas, $p < 0,05$. ELC (extracto liofilizado de Calafate).

Tabla II. Viabilidad e integridad de la membrana plasmática (%) en espermatozoides de bovino descongelados e incubados con diferentes concentraciones de ELC y sin ELC a diferentes tiempos.

Tiempo de incubación	Control	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL
T0	75,5±5,6 ^a	75,4±8,7 ^a	77,4±7,8 ^a	73,4±9,1 ^a
T2	52,6±10,4 ^a	39,7±10,9 ^a	54,2±10,9 ^a	46,6±10,6 ^a
T4	18,3±9,9 ^a	24,6±10,2 ^a	21,0±11,2 ^a	28,4±9,6 ^b

Los resultados se presentan como la media ± DE. T0: Tiempo de incubación inicial, T2: Tiempo de incubación de 2 horas, T4: Tiempo de incubación de 4 horas. Diferentes letras de superíndice dentro de las filas indican diferencias significativas, $p < 0,05$. ELC: extracto liofilizado de Calafate y

Tabla III. Integridad acrosomal (%) en espermatozoides de bovino descongelados e incubados con diferentes concentraciones de ELC y sin ELC a diferentes tiempos.

Tiempo de incubación	Control	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL
T0	73,9±6,9 ^a	73,1±6,3 ^a	73,5±6,5 ^a	72,7±6,9 ^a
T2	47,7±13,5 ^a	38,8±14,6 ^a	53,9±14,1 ^a	41,0±14,4 ^a
T4	19,7±10,6 ^a	24,2±10,8 ^a	23,7±14,1 ^a	26,3±9,2 ^a

Los resultados se presentan como la media ± DE. T0: Tiempo de incubación inicial, T2: Tiempo de incubación de 2 horas, T4: Tiempo de incubación de 4 horas. Diferentes letras de superíndice dentro de las filas indican diferencias significativas, $p < 0,05$. ELC (extracto liofilizado de Calafate).

Tabla IV. Lipoperoxidación (%) en espermatozoides de bovino descongelados e incubados con diferentes concentraciones de ELC y sin ELC a diferentes tiempos.

Tiempo de incubación	Control	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL
T0	76,9±4,0 ^a	74,9±4,2 ^a	71,7±5,5 ^a	72,4±4,3 ^a
T2	34,9±5,1 ^a	36,0±5,6 ^a	32,2±7,1 ^a	37,9±3,3 ^a
T4	20,7±1,5 ^a	26,9±2,4 ^b	23,6±1,5 ^a	25,1±0,7 ^b

Los resultados se presentan como la media ± DE. Los valores corresponden a los espermatozoides vivos no peroxidados. T0: Tiempo de incubación inicial, T2: Tiempo de incubación de 2 horas, T4: Tiempo de incubación de 4 horas. Diferentes letras de superíndice dentro de las filas indican diferencias significativas, $p < 0,05$. ELC (extracto liofilizado de Calafate).

DISCUSIÓN

El fruto de Calafate ha sido reconocido como una importante fuente de compuestos con actividad antioxidante. No es amplia la información respecto al efecto que podrían tener los extractos naturales que contiene antioxidantes,

sobre parámetros morfofuncionales espermáticos. En la actualidad, a nuestro conocimiento no existe información con respecto al efecto de la adición de extracto liofilizado de Calafate al medio de incubación de espermatozoides de bovino descongelados, sobre la funcionalidad espermática, en este contexto este estudio es pionero en analizar estos efectos.

Dentro de los tiempos de incubación utilizados en este estudio, fueron observados efectos benéficos del ELC a las 4 horas. Durante las incubaciones a menores tiempos el ELC no tendría efecto. Dentro de las concentraciones de ELC utilizadas en las incubaciones, la concentración que ejercería mayor impacto sería la concentración mayor, excepto en el parámetro de LPO donde la menor concentración también sería benéfica y en la integridad del acrosoma donde ninguna de las concentraciones ejercería efecto.

Respecto a la motilidad progresiva, en nuestro estudio fue observado que todas las concentraciones de ELC ejercerían un efecto benéfico significativo con tiempos de incubación mayores (4 horas), respecto al control (Tabla I). Estos resultados concuerdan con estudios realizados en esta misma especie con antioxidantes de origen vegetal, donde crocina (*Crocus sativus* L.) tendría un efecto positivo sobre la motilidad progresiva con tiempos de incubaciones mayores (Sapanidou *et al.*, 2016). Al contrario, otro estudio revela que crocina no tendría efecto significativo sobre la motilidad progresiva independiente de los tiempos de incubación, sin embargo, sería eficaz en mantener este parámetro (Sapanidou *et al.*, 2015). Del mismo modo en bovino, el extracto de orujo de uva rico en polifenoles (*Vitis Vinifera*) con un rol antioxidante potente, no presentaría efecto significativo sobre la motilidad progresiva independiente de los tiempos de incubación (Sapanidou *et al.*, 2014). La motilidad es uno de los principales indicadores de la capacidad de fecundación de los espermatozoides

(Sapanidou *et al.*, 2016). Se ha demostrado que estos pierden motilidad durante incubaciones a través del tiempo, cuando no hay un agente protector adicionado (Sapanidou *et al.*, 2014, 2015, 2016; Tvrdá *et al.*). La utilización del ELC reveló que a las 4 horas de incubación, con el extracto se observan porcentajes de motilidad más altos que en el control, lo cual puede indicar que el ELC pudiera estar contrarrestando el efecto del estrés oxidativo, el cual predispone a efectos nocivos sobre la fluidez, integridad y flexibilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Amidi *et al.*, 2016).

Según lo observado en nuestro estudio, este efecto antioxidante también tendría influencia en la viabilidad e integridad de membrana plasmática de los espermatozoides de bovino, donde se aprecia un efecto positivo significativo de este parámetro con la mayor concentración del ELC a las 4 horas de incubación (Tabla II). Estudios realizados en bovino con crocina, donde se evaluó la viabilidad en los espermatozoides vivos con acrosoma intacto (EVAI), revelan que, con los mayores tiempos de incubación fue observado un aumento significativo de este parámetro (Sapanidou *et al.*, 2015, 2016). Adicionalmente, en bovino, el extracto de orujo de uva ha revelado ser eficaz en mejorar significativamente la viabilidad espermática a las 2 horas de incubación y mantener este parámetro a las 4 horas (Sapanidou *et al.*, 2014).

Respecto a la integridad de la membrana acrosomal (AI), evaluada como EVAI, no fueron observados efectos significativos con ninguna de las concentraciones de ELC utilizadas, independiente de los tiempos de incubación (Tabla III). Esto concuerda con lo observado con crocina y orujo de uva en bovino, donde estos no tendrían efecto sobre la integridad acrosomal (Sapanidou *et al.*, 2014, 2015, 2016).

Respecto a la LPO, nuestros resultados revelan que el ELC fue eficaz en proteger significativamente a los espermatozoides en los tiempos de incubación mayor (4 horas) tanto con la menor y mayor concentración de ELC (Tabla IV). Esto es similar a lo observado con crocina y orujo de uva donde estos serían eficaces en proteger a la célula espermática contra la LPO a partir de las 2 h de incubación (Sapanidou *et al.*, 2014, 2015, 2016). La alteración en el estado redox producido durante los procedimientos de congelación/descongelación inducen EO, el cual causa efectos perjudiciales a través de la exacerbación de la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática, disminuyendo la motilidad, viabilidad e integridad del acrosoma entre otros parámetros espermáticos (Amidi *et al.*). Gadea *et al.* (2005) propusieron que la suplementación de los medios de incubación con antioxidantes, inmediatamente después de la descongelación, bloquea la producción de EROS

o contrarresta la toxicidad del oxígeno. En base a lo anteriormente expuesto y los resultados observados en el presente estudio, la incubación con el ELC permitiría neutralizar el estrés oxidativo por su alta capacidad antioxidante, disminuyendo la alteración de la membrana plasmática, protegiendo la motilidad y viabilidad y disminuyendo la peroxidación lipídica de los espermatozoides de bovino.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que dependiendo de la concentración y tiempos de incubación, la adición de ELC al medio espermático podría proteger a los espermatozoides de bovino congelados/descongelados del daño a las membranas, mejorando la motilidad espermática, viabilidad e integridad de la membrana plasmática y disminuyendo la lipoperoxidación durante la manipulación *in vitro* posterior.

DEPPE, M.; JARA, A. B.; REYES-DÍAZ, M. & RISOPATRÓN, J. Effect of supplementation of incubation medium with *Berberis microphylla* (Calafate) extract on sperm functionality in thawed bovine semen) *Int. J. Morphol.*, 39(1):25-31, 2020.

SUMMARY:In cryopreserved semen, the freezing/thawing process following of manipulation, damage the sperm cell, decreasing the fertilizing capacity of the thawed sperm; being one of the main factors of this damage the oxidative stress. The sperm once thawed can be protected from this damage, with the addition of antioxidants to the incubation medium. The Calafate fruit (*Berberis microphylla* G. Forst.) has a high antioxidant capacity, making it an interesting resource for investigating the effect of its antioxidant components on biotechnological processes. The objective of this study was to determine the effect of supplementation of Calafate fruit lyophilized extract (ELC) on sperm quality. The lyophilized extract of the Calafate fruit was characterized, determining the antioxidant activity and metabolites such as phenols and anthocyanins; subsequently, thawed bovine sperm were incubated in a medium supplemented with different concentrations of ELC. Post-incubation, progressive motility was evaluated. By flow cytometry, the viability and integrity of the plasma (SYBR14-PI), and acrosomal (FITC-PNA / PI), as well as lipid peroxidation (BODIPY), was determined. The characterization of Calafate fruits lyophilized extract indicated that antioxidant activity, phenols and anthocyanins increased concomitantly with the increase of dose extract used. The addition of ELC to the incubation medium, depending on the concentration and incubation time, would be effective to protect motility, viability and integrity of the plasma membrane and decreased lipid peroxidation in thawed bovine sperm.

KEY WORDS: Calafate; Bovine sperm; Antioxidant.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amidi, F.; Pazhohan, A.; Shabani Nashtaei, M.; Khodarahmian, M. & Nekoonam, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*, 17(4):745-56, 2016.
- Chatterjee, S. & Gagnon, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, 59(4):451-8, 2001.
- Cheng, G. W. & Breen, P. J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 116(5):865-9, 1991.
- Cheuquemán, C.; Arias, M. E.; Risopatrón, J.; Felmer, R.; Álvarez, J.; Mogas, T. & Sánchez, R. Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and *in vitro* produced bovine embryos. *Andrologia*, 47(6):604-15, 2015.
- Chinnici, F.; Bendini, A.; Gaiani, A. & Riponi, C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *J. Agric. Food Chem.*, 52(15):4684-9, 2004.
- Colás, C.; Junquera, C.; Pérez-Pé, R.; Cebrián-Pérez, J. A. & Mauño-Blanco, T. Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microsc. Res. Tech.*, 72(8):566-72, 2009.
- Dawra, R. K. & Sharma, O. P. Effect of seminal plasma antioxidant on lipid peroxidation in spermatozoa, mitochondria and microsomes. *Biochem. Int.*, 11(3):333-9, 1985.
- Dawra, R. K.; Sharma, O. P. & Makkar, H. P. Evidence for a novel antioxidant in bovine seminal plasma. *Biochem. Int.*, 8(5):655-9, 1984.
- du Plessis, S. S.; Makker, K.; Desai, N. R. & Agarwal, A. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Rev. Obstet. Gynecol.*, 3(4):539-54, 2008.
- Forero Gonzalez, R. A. *Efeito da Criopreservação Usando Diferentes Técnicas de Congelamento e Crioprotetores sobre Parâmetros Espermáticos e a Integridade de Membranas do Espermatozóide Bovino*. Tesis de Doctorado en Medicina Veterinaria. Pirassununga, Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004.
- Fuentes, L.; Figueroa, C. R.; Valdenegro, M. & Vinet, R. Patagonian berries: healthy potential and the path to becoming functional foods. *Foods*, 8(8):289, 2019.
- Gadea, J.; García-Vazquez, F.; Matás, C.; Gardón, J. C.; Cánovas, S. & Gumbao, D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J. Androl.*, 26(3):396-404, 2005.
- Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M. A.; Coy, P.; Matás, C.; Romar, R. & Ruiz, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, 62(3-4):690-701, 2004.
- Gonçalves, F. S.; Barretto, L. S. S.; Arruda, R. P.; Perri, S. H. V. & Mingoti, G. Z. Effect of antioxidants during bovine *in vitro* fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*, 45(1):129-35, 2010.
- Gualtieri, R.; Barbato, V.; Fiorentino, I.; Braun, S.; Rizos, D.; Longobardi, S. & Talevi, R. Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology*, 82(4):592-8, 2014.
- Gürler, H.; Calisici, O. & Bollwein, H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.*, 155:99-105, 2015.
- Gürler, H.; Malama, E.; Heppelmann, M.; Calisici, O.; Leiding, C.; Kastelic, J. P. & Bollwein, H. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2):562-71, 2016.
- Lourenço, S. C.; Moldão-Martins, M. & Alves, V. D. Antioxidants of natural plant origins: from sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22):4132, 2019.
- Mariangel, E.; Reyes-Díaz, M.; Lobos, W.; Bensch, E.; Schalchli, H. & Ibarra, P. The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Cienc. Inv. Agr.*, 40(1):161-70, 2013.
- Parrish, J. J.; Krogenaes, A. & Susko-Parrish, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Development*, 44(6):859-69, 1995.
- Ribera, A. E.; Reyes-Díaz, M.; Alberdi, M.; Zuñiga, G. E. & Mora, M. L. Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in southern Chile. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 10(4):509-36, 2010.
- Risopatrón, J.; Catalán, S.; Miska, W.; Schill, W. B. & Sánchez, R. Effect of albumin and polyvinyl alcohol on the vitality, motility and acrosomal integrity of canine spermatozoa incubated *in vitro*. *Reprod. Domest. Anim.*, 37(6):347-51, 2002.
- Sapanidou, V. G.; Margaritis, I.; Siahos, N.; Arsenopoulos, K.; Dragatidou, E.; Taitzoglou, I. A.; Zervos, I. A.; Theodoridis, A. & Tsantarliotou, M. P. Antioxidant effect of a polyphenol-rich grape pomace extract on motility, viability and lipid peroxidation of thawed bovine spermatozoa. *J. Biol. Res. (Thessalon)*, 21(1):19, 2014.
- Sapanidou, V.; Taitzoglou, I.; Tsakmakidis, I.; Kourtzelis, I.; Fletouris, D.; Theodoridis, A.; Lavrentiadou, S. & Tsantarliotou, M. Protective effect of crocetin on bovine spermatozoa against oxidative stress during *in vitro* fertilization. *Andrology*, 4(6):1138-49, 2016.
- Sapanidou, V.; Taitzoglou, I.; Tsakmakidis, I.; Kourtzelis, I.; Fletouris, D.; Theodoridis, A.; Zervos, I. & Tsantarliotou, M. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 84(8):1273-82, 2015.
- Simões, R.; Feitosa, W. B.; Siqueira, A. F. P.; Nichi, M.; Paula-Lopes, F. F.; Marques, M. G.; Peres, M. A.; Barnabe, V. H.; Visintin, J. A. & Assumpção, M. E. O. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. *Reproduction*, 146(5):433-41, 2013.
- Slinkard, K. & Singleton, V. L. Phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28:4955, 1997.
- Tvrđá, E.; Kováčik, A.; Tusimová, E.; Paál, D.; Mackovich, A.; Alimov, J. & Lukác, N. Antioxidant efficiency of lycopene on oxidative stress-induced damage in bovine spermatozoa. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 7(1):50, 2016.

Dirección de Correspondencia
Jennie Risopatrón G.
Departamento de Ciencias Básicas
Centro de Excelencia de Biotecnología en Reproducción
(CEBIOR-BIOREN)
Facultad de Medicina
Universidad de La Frontera
Avenida Francisco Salazar 01145
Temuco
CHILE

Email: jennie.risopatron@ufrontera.cl

Recibido :19-08-2020

Aceptado: 24-09-2020