

Tesis y seminarios

Tesis Doctorales



Cellular Basis and Optimization of Cryopreservation Survival of Bull Sperm

Bases celulares y optimización de la supervivencia de la criopreservación de semen de toro

Autor: Amer Salman

Año: 2020

Directores: Dres. José Néstor Caamaño Galdoni (SERIDA) y Felipe Martínez-Pastor, Universidad de León

Lugar de presentación: Universidad de León

La inseminación artificial con semen congelado es una herramienta indispensable en el manejo del ganado en todo el mundo. Aunque los protocolos para la criopreservación de semen de toros están bien establecidos, se requieren más investigaciones y mejoras para resolver varios problemas que causan una disminución en la calidad del semen y en su fertilidad después de la descongelación.

El objetivo principal de esta tesis es mejorar los protocolos de criopreservación para el semen de toro. Se han realizado varios experimentos utilizando toros de Asturiana de los Valles, una raza de ganado autóctono español y también toros de la raza Holstein. En todos los experimentos de esta tesis el semen se evaluó directamente después de la descongelación y después de cinco horas de incubación por el sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) y por citometría de flujo (viabilidad, integridad del acrosoma, capacitación, apoptosis, determinación del potencial de membrana mitocondrial, producción de especies de oxígeno reactivo citoplasmático (ROS) y superóxido mitocondrial, e integridad del ADN).

En el primer experimento se evaluó el impacto de extender el tiempo de equilibrado de 4 h a 24 h utilizando los diluyentes BIOXcell y OPTIXcell sobre la calidad del semen de toro después de la descongelación. Además, se incluyó la adición de 2 mM de glutatión (GSH) al diluyente de congelación de semen. La extensión del tiempo de equilibrado en ambos diluyentes redujo la motilidad de los espermatozoides después de la descongelación, aunque mejoró su viabilidad. La adición de glutatión redujo ligeramente el superóxido mitocondrial.

En el segundo y tercer experimento se utilizaron antioxidantes no enzimáticos como: curcumina, crocina y glutatión y el crioprotector trehalosa en el diluyente de congelación BIOXcell con el objetivo de mejorar la calidad del semen después de la descongelación. Los resultados mostraron una reducción en la calidad del semen después de la descongelación cuando se suplementó con trehalosa a 50 mM y, especialmente,

100 mM. La trehalosa resultó en un ligero efecto antioxidante, reduciendo ROS. El glutatión disminuyó la producción del anión superóxido mitocondrial. Sin embargo, GSH no mejoró la calidad del esperma después de la descongelación. A su vez, la curcumina y la crocina tampoco mejoraron la calidad del semen.



El objetivo del cuarto experimento fue probar el efecto de la centrifugación en coloide de capa única (SLC) y de capa doble (DLC), durante la pre congelación en semen de toro para mejorar la calidad tras la descongelación. Se utilizó el coloide comercial BoviPure con este fin y el experimento se realizó con semen de toros de la raza Holstein-Friesian.

Los resultados confirmaron que tanto el SLC como el DLC mejoraron la motilidad y los parámetros fisiológicos de los espermatozoides después de la descongelación comparado con el grupo control. También redujeron la fragmentación del DNA espermático. Por lo tanto, podemos concluir que SLC podría ser adecuado para el uso práctico en centros de inseminación, siendo más barato y más fácil de realizar.

Mediante un enfoque integrador, combinando aproximaciones empíricas y participativas basadas en la teoría que vincula la biodiversidad con el funcionamiento ecosistémico y el marco de los servicios de los ecosistemas, los resultados de esta tesis sugieren que las aves insectívoras y los insectos polinizadores pueden promoverse simultáneamente si se aumentan los hábitats leñosos semi-naturales alrededor de las plantaciones y se favorece un dosel continuo y extenso de manzanos dentro de ellas. Ambas medidas están relacionadas con el suministro de diferentes recursos como lugares de nidificación, refugios contra depredadores y fuentes de alimento alternativas.

Finalmente, y a modo de resumen esta tesis ofrece, en primer lugar, una perspectiva integradora sobre el suministro de los servicios de control biológico de plagas y de polinización en cultivos de manzana por diferentes grupos de biodiversidad (aves insectívoras, parasitoides de carpocapsa e insectos polinizadores). En segundo lugar, prueba que esta biodiversidad está condicionada por el paisaje y factores a escala local, y por último, demuestra que los estudios participativos son esenciales para diseñar estrategias de gestión exitosas. Las plantaciones de manzana de sidra asturianas pueden ser un ejemplo de una agricultura basada en prácticas agrícolas sostenibles y en la biodiversidad, demostrando la existencia de otros modelos de producción que pueden satisfacer la demanda futura de alimentos y reducir al mismo tiempo los daños en el medio ambiente y la pérdida de biodiversidad.



Identificación de biomarcadores específicos para autenticar el origen y el sistema de alimentación del vacuno lechero

Autor: Senén de la Torre Santos

Año: 2021

Directores: Dres. Fernando Vicente Mainar y Luis Royo Martín (SERIDA)

Lugar de presentación: Universidad de Zaragoza

En la actualidad, una búsqueda constante por la optimización y sostenibilidad de los sistemas de producción lecheros pone de manifiesto el incremento en la demanda por parte de los consumidores de la distinción de las características nutricionales relacionadas con la calidad de la leche y los productos lácteos, aunado a un uso racional de los recursos, a una disminución en el impacto al medio ambiente y a una producción respetuosa con el bienestar animal. Los sistemas de alimentación basados en pastos y forrajes posibilitan alcanzar dichas propiedades y son un mecanismo clave para mejorar la rentabilidad de las ganaderías, ya que son económicamente competitivos y permiten alterar el perfil nutritivo de la leche y los productos lácteos. Ahora bien, es preciso establecer mecanismos de certificación de los productos que permitan relacionarlos con su sistema de producción.

En el presente trabajo se llevaron a cabo dos experimentos, desarrollados en la Unidad de Leche del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) de Asturias, con el objetivo principal de identificar biomarcadores específicos para autenticar el origen y el sistema de alimentación del vacuno lechero a partir de la leche.

El primero de los estudios tuvo como objetivo examinar el efecto del método de suministro del forraje: pastoreo, corte y acarreo o ensilado, sobre el rendimiento de la leche y los perfiles de ácidos grasos, antioxidantes y la expresión de microARN de la leche, con el fin de ser utilizados como biomarcadores del sistema de alimentación. Para ello se realizó un ensayo *in vivo* del 26 de abril al 26 de junio de 2017, siguiendo un diseño cross-over con 18 vacas Holstein en lactación distribuidas en tres grupos sobre los que se estudiaron tres tratamientos: 1) estabulación permanente y ensilado de hierba *ad libitum*, 2) estabulación permanente y aporte de hierba *ad libitum* en corte y acarreo, y 3) pastoreo permanente. Durante el ensayo se tomaron muestras de los alimentos ofertados, para determinar su valor nutritivo, y de la leche producida, para análisis de composición química, perfil de ácidos grasos, antioxidantes y expresión de microARN. Se observó que las vacas en pastoreo tuvieron más ingesta de materia seca que las vacas en estabulación con corte y acarreo o ensilado de hierba *ad libitum* (18,1 vs. 14,1 y 15,2 kg/día respectivamente, $p < 0,001$). El rendimiento en la producción de leche fue diferente entre los tratamientos experimentales, así como las proporciones de proteína, lactosa, sólidos no grasos y urea, con una mayor concentración en la leche de las vacas en pastoreo que en las estabuladas. Dentro del perfil de la materia grasa de las muestras de leche de los diferentes tratamientos, se encontraron diferencias significativas en la proporción de algunos ácidos

grasos, como el vaccénico, ruménico, y en la ratio C18:1 trans-11/ C18:1 trans-10 en los animales en pastoreo, lo cual, denota una dieta con un alto consumo de ácidos grasos poliinsaturados provenientes de la hierba fresca. En el contenido de antioxidantes liposolubles no se observaron diferencias significativas en la concentración de vitaminas A y E en la leche de acuerdo con el sistema de alimentación. La leche de las vacas en pastoreo tuvo una mayor proporción de luteína que la de las vacas alimentadas con ensilado de hierba ($p < 0,01$), con valores intermedios en el sistema de corte y acarreo. Sin embargo, no encontramos diferencias entre los tratamientos en la concentración de carotenos u otros antioxidantes debido, probablemente, a que toda la alimentación se realizó con pastos muy similares. La leche de vacas en pastoreo presentó una mayor proporción en ambas fracciones de bta-mir451 que la leche de vacas en estabulación que recibieron forraje verde de corte y acarreo o ensilado de hierba ($p < 0,01$).

El segundo experimento tenía como objetivo evaluar la influencia en la dieta, con y sin pastoreo, de leguminosas con creciente implantación en la cornisa cantábrica sobre la producción y composición de la leche, especialmente en el perfil de ácidos grasos, antioxidantes y expresión de microARN. Este ensayo se llevó a cabo del 6 de marzo al 7 de mayo de 2018, siguiendo, de igual manera que en el anterior, un diseño *cross-over* con 18 vacas en producción distribuidas en seis grupos sobre los cuales se estudiaron seis tratamientos: 1) estabulación permanente y ración completa mezclada de raigrás italiano, *ad libitum* 2) estabulación permanente y ración completa mezclada de habas forrajeras, *ad libitum* 3) estabulación permanente y ración completa mezclada de guisantes forrajeros, *ad libitum* 4) pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa

mezclada de raigrás italiano 5) pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa mezclada de habas forrajeras y 6) pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa mezclada de guisantes forrajeros. Durante el ensayo se tomaron muestras de los alimentos ofertados, para determinar su valor nutritivo, y de la leche producida, para análisis de composición química, perfil de ácidos grasos, antioxidantes y expresión de microARN, de modo similar al ensayo realizado en el 2017. En los resultados obtenidos de la materia grasa de las muestras de los diferentes tratamientos se observaron fuertes cambios relacionados con el consumo de diferentes tipos de ensilado en la dieta y al manejo con y sin pastoreo. Cuando se sustituye el ensilado de raigrás italiano por ensilado de leguminosas, la grasa de la leche tiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados, especialmente con la inclusión de ensilado de haba en la ración. La práctica del pastoreo en la alimentación de las vacas influye directamente en la composición de la leche, mejorando su calidad al disminuir la proporción de ácidos grasos saturados e incrementar el contenido en insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados y ácido linoleico conjugado, proporcionando de esta manera un perfil de ácidos grasos más saludable. En el contenido de antioxidantes liposolubles en la leche de acuerdo con la presencia o no de pastoreo, no se observaron diferencias significativas en la vitamina A, sin embargo, se observaron diferencias muy marcadas en la vitamina E, las xantofilas y -Carotenos. A nivel de dieta, la leche de las vacas estabuladas tuvo más proporción de -tocoferol, contrariamente, a la leche de vacas con pastoreo que mostró diferencias significativas en cuanto a luteína y -criptoxantina, con lo que podemos establecer que la presencia del pastoreo en la alimentación de las vacas influye directamente en el aumento de la proporción

de los antioxidantes. En la capacidad para diferenciar la influencia de la inclusión en la dieta, con o sin pastoreo, de diferentes tipos de ensilados (raigrás, haba forrajera y guisantes) de los microARN de la fracción grasa y de las células de la leche no se observó ningún efecto de diferenciación significativo de la dieta en ninguno de los microARN estudiados en la fracción de la grasa, sin embargo, en presencia o no de pastoreo, el bta-mir451 es capaz de diferenciar entre tratamientos en estabulación o pastoreo. De igual manera, diferencias significativas se observaron entre dietas y en las vacas en pastoreo, con una mayor proporción del bta-mir451 en los tratamientos con pastoreo y diferencias significativas del bta-mir103 y bta-mir155 al comparar la leche de las vacas en pastoreo con la leche de las vacas en estabulación ($p < 0,01$).

Mediante el presente trabajo, se ha demostrado que la modificación de la composición de la leche está asociada al sistema de alimentación y que el uso de leguminosas como el haba forrajera y los guisantes son alternativas viables al raigrás italiano, que resultan más sostenibles para el medio ambiente al reducir el uso de insumos, por su capacidad fijadora de nitrógeno, y como fuente proteica para la alimentación del ganado, al mismo tiempo que son capaces de modificar el perfil de ácidos grasos y antioxidantes liposolubles de la leche, haciendo de ésta un producto más saludable para los consumidores. A su vez, la presencia de la práctica de pastoreo en la alimentación influye directamente en la composición de la leche, mejorando su perfil de ácidos grasos y antioxidantes y aumentando la expresión del bta-mir451. ■