3 Congreso Internacional de Microbiología
"LA BIOTECNOLOGIA COMO EJE DE INNOVACION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA"
Pamplona, 24 al 26 de Septiembre de 2008

P22- HERRAMIENTAS BIOTECNOLOGICAS Y MOLECULARES PARA EVALUAR LA FERTILIDAD DEL SEMEN DE TOROS DE LAS RAZAS SANMARTINERO Y CEBU EN EL TROPICO COLOMBIANO.

*A. Coral, A. Niño, B. Abadía, **F. Rueda**, J. Cardozo

Centro de Biotecnología y Bioindustria CBB. Laboratorio de Microbiología Molecular CORPOICA

Los investigadores han generado herramientas biotecnológicas para predecir el omportamiento reproductivo del toro. Tradicionalmente, estas herramientas involucran el examen de salud física del animal, su aptitud para la monta y el examen de calidad seminal. El macho participa con un 50% en la eficiencia reproductiva del hato, de tal forma que es factible suponer como podrían afectarse los índices productivos del hato al usar un reproductor de baja fertilidad. Los resultados de la evaluación de calidad seminal, no siempre predicen eficientemente la fertilidad de un toro, dado que no tiene en cuenta la habilidad del espermatozoide para llevar a cabo procesos esenciales como la capacitación espermática, la reacción del acrosoma y la fertilización misma. En este trabajo se determinaron los valores de motilidad, viabilidad y concentración espermática del semen de toros de la raza criolla Colombiana Sanmartinero y Cebú, y se correlacionaron con el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado, como indicador de su capacidad fertilizante. Se determinó igualmente, el perfil electroforético de las proteínas del plasma seminal. Se analizaron un total de 45 muestras de semen criopreservado procedentes de 7 toros San Martinero y 8 toros cebú. La inducción de la reacción del acrosoma se realizo con calcio ionóforo y la determinación de los perfiles electroforéticos de las proteínas del plasma seminal se realizó mediante electroforesis degradante en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. El incremento en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado fue superior ($p<0.05$) en toros Sanmartinero que en toros Cebú (228.4 vs. 180.1), lo que evidencia una mayor capacidad fertilizante de sus espermatozoides. Se encontraron correlaciones significativas ($p<0.05$) entre los valores de viabilidad y motilidad espermática con el valor de incremento en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado. Los estudios proteómicos, evidenciaron la presencia de 17 bandas de proteína en el plasma seminal de toros Sanmartinero y 13 en toros cebú, este resultado posiblemente se relacione con la mayor eficiencia reproductiva del toro sanmartinero reportada en anteriores investigaciones. Este estudio evidencio una superior capacidad fertilizante de los toros Sanmartinero, e introdujo el empleo de herramientas moleculares como la poteómica, en el estudio de la fisiología del espermatozoide y la evaluación de su capacidad fertilizante. Palabras claves: Reacción acrosómica, fertilidad, perfiles electroforéticos de proteínas, plasma seminal.

INTRODUCCION

Los índices reproductivos del bovino explotado en condiciones tropicales son inferiores a los registrados en países de estaciones. En condiciones tropicales, la temperatura, la baja calidad de los forrajes y la presencia de enfermedades parasitarias, virales y bacterianas afectan la eficiencia reproductiva del animal. En este sentido procurar condiciones de confort y buena alimentación, se convierten en alternativas tecnológicas que permiten incrementar dichos índices. Se estima que la participación del macho en la eficiencia reproductiva del hato es del 50% (Álvarez, 2003), de tal forma que la selección del toro reproductor garantizará el éxito de la empresa, expresado a través de las tasas de natalidad del hato. Estas últimas son reflejo de las tasas de concepción, las cuales están determinadas en gran parte por la fertilidad del semen del reproductor. Los parámetros que evalúan la calidad del semen, no siempre predicen eficientemente la fertilidad del mismo (Millar et al., 1990; Blottner et al., 1990; Whitfield and Parkinson., 1992; Manjunath et al., 1993; Bellin et al., 1994), dado que no tienen en cuenta la habilidad del espermatozoide, para adelantar funciones esenciales como el proceso de capacitación, la reacción del acrosoma y la fertilización misma. El avance de la ciencia en búsqueda de herramientas biotecnológicas, que permitieran predecir con mayor exactitud la fertilidad del semen de un reproductor, hizo posible la aparición de la fertilización in Vitro y con ella el desarrollo de dos pruebas: la penetración espermática de óvulos y la inducción de la reacción del acrosoma del espermatozoide. En las últimas décadas, el desarrollo de la biología molecular ha permitido comprender en mejor forma, algunos aspectos relacionados con la fisiología del espermatozoide. Indudablemente el descubrimiento del ADN, marco el comienzo de la era genómica y posteriormente de la proteómica, como la ciencia encargada del estudio de los productos de expresión génica, o dicho de otra forma del estudio de las proteínas de una célula, tejido o fluido. La proteómica incluye la caracterización de la expresión de las proteínas codificadas por un genoma y el establecimiento de sus propiedades funcionales y estructurales (Anderson, NL y Col. 1998) El masivo empleo de la inseminación artificial, ha encaminado las investigaciones hacia el desarrollo de técnicas que hagan posible la rápida, confiable y económica evaluación de la fertilidad de machos mediante el análisis en laboratorio de las muestras seminales criopreservadas. El objeto del presente trabajo fue relacionar los valores de las variables de calidad seminal y del incremento en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado, con los perfiles electroforéticos (SDS – PAGE) de las proteínas del plasma seminal de toros Cebú y de la raza criolla colombiana Sanmartinera.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo y para la prueba de reacción acrosomica se evaluaron 135 muestras de semen criopreservado procedentes de 7 toros Sanmartinero y 8 toros Cebú Brahman. Los toros Sanmartinero, se encontraban en las instalaciones del centro de investigación de La Libertad de CORPOICA. Los toros Cebú se encontraban en la hacienda Villa Dana del municipio de Villanueva. Los animales de esta experimentación tenían edades comprendidas entre 2 y 4 años. Las muestras seminales se colectaron en la época de lluvias mediante electroeyaculación, y se les determinó los parámetros de calidad seminal

(morfología, concentración, viabilidad y motilidad espermática), para luego ser congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido.

Prueba de Reacción acrosómica

La inducción de la reacción del acrosoma del espermatozoide se realizo según el procedimiento de Parrish y col., (1988), usándose calcio ionóforo A23187 como inductor. Previo a la inducción in Vitro de la reacción del acrosoma, los espermatozoides se seleccionaron mediante la técnica de Swim-up (Parrish y col 1988), para lo cual 0.5 ml de muestra seminal criopreservada es incubada con 1 ml de medio TALP SPERM modificado (Christensen y col, 1996), durante una hora a 39ºC en atmósfera húmeda al 5% de CO2. Posteriormente la muestra se centrifuga a 2500 rpm por 10 minutos, finalmente el precipitado de espermatozoides es resuspendido en TALP SPERM hasta una concentración de 20 millones de espermatozoides por ml. Posterior a la resuspensión de los espermatozoides, se adicionó el calcio ionóforo A23187, para inducir la reacción del acrosoma. La solución de espermatozoides es llevada nuevamente a incubación durante 1 hora a 39ºC y 5% de CO2 en atmósfera húmeda. Terminado el tiempo de incubación los espermatozoides se fijaron con formalina al 10%. Seguidamente se realiza el extendido de la muestra sobre láminas portaobjeto, utilizándose 5 microlitros de la misma. Para la técnica de tinción de los espermatozoides con eosina-Nigrosina/giemsa se mezcla una alícuota de la muestra con la solución de tinción de eosina-nigrosina/giemsa (E.N.G.), en una proporción de 1:3 (Tamuli y Watson, 1994). Determinación de los porcentajes de incremento de espermatozoides con acrosoma reaccionado. Para determinar el incremento en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado se evaluaron 200 espermatozoides por lámina en un microscopio de contraste de fases con objetivo de 100X. Obtención del plasma seminal y determinación de la concentración de proteína.
Para la evaluación del perfil electroforético de proteínas se trabajaron 45 muestras de semen de toros Sanmartinero y Cebú Brahman. El plasma seminal se obtuvo por doble centrifugación del semen a 12.000 x g en micro centrífuga a 4°C por 5 minutos (Jean y Col., 1995). El segundo sobrenadante es filtrado, y las muestras son filtradas, rotuladas y congeladas a - 20ºC hasta su utilización. La concentración de proteína de la muestra de plasma seminal se determinó por espectrofotometría (NanoDrop). Separación de las proteínas del plasma seminal por electroforesis unidimensional (SDS –PAGE). La Electroforesis desnaturalizante unidimensional (SDS-PAGE) se realizó según el protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970), en equipo Mini Proteam II (Bio-Rad). La cantidad de proteína depositada fue de 30 µg. Se empleó marcador de peso molecular con rango de 6,5 kDa a 205 kDa., en geles discontinuos de poliacrilamida. La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie al 0,0025%.Las imágenes se captaron en un documentador de imágenes modelo Gel Doc 1000 (Bio-Rad). Y se analizaron con el programa Quantity-one (Bio-Rad).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los toros Sanmartinero presentaron incrementos en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado superiores ($p<0.05$) a los presentados por los toros Cebú (228.4 vs. 180.1), lo que evidencia una mayor capacidad fertilizante de sus

espermatozoides. Este resultado concuerda con los datos reportados por Bedoya (1999) en estudios anteriores. Los estudios electroforéticos adelantados en esta investigación evidenciaron la presencia de 17 bandas de proteína en el plasma seminal de los toros Sanmartinero, con pesos moleculares que oscilan entre 4.6 y 64.5 kDa. Las bandas de mayor concentración son las de 23.9, 16.2 y 14.6 KDa, y representan el 38% del total de las proteínas presentes en el plasma. De otra parte, en el plasma de los toros Cebú seencontraron 13 bandas de proteína con pesos moleculares que oscilan entre 8.2 y 67.5 KDa. Las bandas de mayor concentración son las de 23.1, 16.9 y 14.6 KDa, y representan un 34,8 % del total de las proteínas presentes en el plasma seminal. Es posible que la presencia de un mayor número de bandas de proteína en el plasma seminal de toros Sanmartinero, se relacione con sus mayores porcentajes de fertilidad.

Proteínas del plasma seminal raza Sanmartinero

De las 17 bandas de proteína detectadas en el plasma seminal de los toros Samartinero, 16 se detectaron en todos los animales objeto de estudio. La banda con peso molecular de 4.6 kDa, apareció únicamente en dos toros de esta raza. Con respecto a la correlación entre la concentración de estas bandas de proteína y las variables de calidad seminal, se evidencio que las bandas de 57.0, 37.4 y 13.0 kDa correlacionaron ($p<0.05$; $r = 0.38$, $p<0.001$; $r = 0.41$ y $p<0.05$; $r = 0.38$ respectivamente) con la viabilidad espermática, lo que sugiere que estas bandas de proteína pueden estar actuando como factores de decapacitación. Por otra parte, se evidencio que las bandas de 23.9 y 22.08 kDa correlacionaron ($p<0.05$; $r = 0.27$ y $r= 0.26$ respectivamente) con los porcentajes de motilidad espermática, de tal forma que puede sugerirse su participación en el desarrollo del movimiento de la célula espermática y podría explicar los elevados valores de motilidad espermática del semen de esta raza y por consiguiente una mejor capacidad fertilizante del mismo, en razón a la posibilidad de que un mayor número de espermatozoides pueden llegar ante el óvulo. Las bandas de 13.0 y 8.3 kDa correlacionaron ($p<0.05$; $r = 0.3$ y $p<0.05$; $r = 0.27$ respectivamente) significativamente con los valores de concentración espermática, es posible que estas proteínas influyan en los niveles de gonadotropina plasmática, e influir en la alta concentración espermática de esta raza. Es importante resaltar que las bandas de proteína de 57.0, 51.3, 20.2 y 13.0 kDa, correlacionaron significativamente ($p<0.05$; $r = 0.27$, $r = 0.43$, $r = 0.40$ y $r = 0.35$), respectivamente con los valores de incremento porcentual de espermatozoides con acrosoma reaccionado. Este resultado sugiere la posibilidad de que estas proteínas estén relacionadas directamente con la habilidad de los espermatozoides de esta raza para fecundar óvulos. Por último se debe destacar que la proteína de 49.4 KDa presenta Correlaciones negativas con viabilidad ($p<0.001$; $r = -0.48$) y motilidad ($p<0.05$; $r = -0.25$) espermáticas. Este resultado sugiere que esta banda de proteína puede actuar de una parte como un factor de capacitación del espermatozoide, y por otro lado actuar como un factor de antimotilidad, con el fin de evitar el gasto energético por el espermatozoide y mantener reservas energéticas para su viaje al encuentro con el óvulo.

Proteínas del plasma seminal raza Cebú Brahman

En los toros de la raza Cebú Brahman, se evidencio que las bandas de 63.5 y 55.0 kDa correlacionaron con viabilidad espermática ($p<0.05$; $r = 0.38$ y $p<0.001$; $r = -0.25$ respectivamente), resultados que implican funciones antagónicas de las dos bandas de proteína en la viabilidad del espermatozoide. De otra parte, las bandas de proteína de 67.5 y 55.0 kDa correlacionaron negativamente con la motilidad ($p<0.05$; $r = -0.25$ y $r= -0.28$ respectivamente) espermática del semen, este resultado sugiere que la motilidad de los espermatozoides de esta raza es baja, y explicaría en parte una baja capacidad fecundante del espermatozoide de esta raza, al disminuirse el número de espermatozoides que llegarían al encuentro con el óvulo. De otra parte, la banda de 58.1 kDa correlacionó inversamente con los valores de concentración espermática ($p<0.05$; $r = -0.26$). Este resultado sugiere que esta banda de proteína, podría inhibir los receptores de gonadotropina a nivel de testículo y ocasionar una disminución en la concentración de espermatozoides del eyaculado y de esta forma una disminución de la capacidad fecundante del semen de esta raza. Es importante resaltar que cuatro bandas de proteínas de plasma seminal de 48.7, 43.9, 23.1 y 14.6 Kda correlacionaron significativamente ($p<0.05$ $r = 0.32$, $r = 0.32$, $r = 0.28$ y $r = 0.25$) respectivamente con la reacción del acrosoma. Este estudio evidencio una superior capacidad fertilizante de los toros Sanmartinero, e introdujo el empleo de herramientas moleculares como la poteómica, en el estudio de la fisiología del espermatozoide y la evaluación de su capacidad fertilizante.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

• ALZA, J. JIMENEZ, A. Evaluación de la fertilidad de semen congelado de toros de la raza Cebú, Blanco orejinegro y Costeño con cuernos mediante las pruebas de penetración espermáticas en ositos bovinos y reacción acrosomica in Vitro. Tesis de grado, facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogota 2000

• BEDOYA, D. Inducción de la reacción acrosomica in Vitro para la evaluación de la capacidad fertilizante de espermatozoides criopeservados en toros de las razas Sanmartinero y Cebú. Tesis de grado, facultad de Zootecnia, Universidad de la Salle, Bogota 1999.

• BLOTTNER, S NEHRING, H and TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility. Theriogenology. Vol. 34 619-628, 1990

• CHRISTENSEN, P WITHFIELD, C and PARKINSON, T. The use of brightfield microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. Theriogenology. Vol. 42 665-6662. 1994

• EDDY, E. OBRIEN, A. The spermatozoon. In: Knobil Neil, JD the physiology of reproduction. Charpter 2, second edition. Vol. 2 1994.

• HERRERA, R. Inducción in vitro de la reacción acrosomica del espermatozoide de toros Sanmartinero, como indicador de su capacidad fertilizante. Tesis de grado, facultad de

ciencias agropecuarias. Corporación Universitaria de ciencias aplicadas y ambientales. Bogota, 2003

• LENZ, R. and MARTIN, J. Prediciting fertility of dairy bulls by inducing acrosome reaction in sperm with chondroitin sulfates. Journal of Dairy science. Vol 71: 1073-1077, 1988.

• LUQUE,O. y MARTINEZ, R. Evaluación de la fertilidad del semen congelado de bovino criollo Sanmartinero y Cebú brahman mediante la prueba de penetración espermática de ositos bovinos in Vitro. Tesis de grado., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, 1996.

• MARTINEZ, G. CHAVEZ, G. Ganado criollo Sanmartinero. En: Ganado criollo Sanmaartinero. Alternativa genética sustentable para la producción bovina en la Orino quía. Villavicencio, 2001.