

P-21 Diferencias en los contenidos de fructosa, ácido cítrico y proteínas en el plasma seminal de toros de razas criollas colombianas

F. Rueda, B. Abadía, J. Cardozo

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

frueda@corpoica.org.co

Resumen

Los índices productivos del hato bovino se encuentran ligados a la fertilidad del toro y ésta a su vez se relaciona en gran medida con los componentes bioquímicos contenidos en el semen y el plasma seminal. Entre los componentes bioquímicos del plasma seminal esta la fructosa, la cual es el sustrato energético principal empleado por el espermatozoide para su motilidad y sobrevivencia, el ácido cítrico juega un papel importante en el equilibrio osmótico mientras las proteínas tienen funciones específicas relacionadas con sobrevivencia, motilidad y resistencia a la criopreservación de las células espermáticas. En este estudio se determinaron las concentraciones de fructosa, ácido cítrico y proteínas en plasma seminal de toros de las razas criollas colombianas Sanmartinero, Costeño con Cuernos, Romosinuano y Blanco Orejinegro, y se evaluó el efecto de la época climática (lluvia y sequía) en las concentraciones de estos tres componentes del plasma seminal. Se colectaron muestras seminales de diez toros de cada raza, bajo condiciones de alimentación y manejo propias de cada zona. Las concentraciones de fructosa, ácido cítrico y proteínas se determinaron por métodos espectrofotométricos. Los resultados evidenciaron que el semen de los toros de la raza Sanmartinero posee las mayores concentraciones de los tres componentes analizados (563,41 mg/dl, 782,81 mg/dl y 74,47 mg/ml respectivamente), lo cual pone de manifiesto que el semen de esta raza tiene las condiciones necesarias para alcanzar mejores tasas de fertilización de oocitos que el semen de las otras razas evaluadas. El semen de los toros BON presentó los menores valores (283,67 mg/dl, 421,73 mg/dl y 47,43 mg/ml respectivamente). Se evidenció una disminución del 30,81% en las concentraciones de fructosa en el plasma seminal de toros de la raza Romosinuano por efecto de la época climática y un aumento en las concentraciones de proteína en plasma seminal del 16,95% en los toros de la raza Sanmartinero y del 27,7% en los toros de la raza Costeño con cuernos. En conclusión, este trabajo evidenció que existen diferencias en las concentraciones de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en el plasma seminal de los toros de las razas evaluadas y un marcado efecto de la época seca en las concentraciones de los elementos del plasma seminal. Este trabajo introdujo en análisis de variables bioquímicas del semen para evaluar la fertilidad del reproductor en condiciones tropicales y encamina los estudios de la fisiología del espermatozoide

hacia el empleo de herramientas mas precisas como la genómica y la proteómica, con el fin hallar marcadores moleculares de fertilidad.

Palabras clave: Fertilidad, Variación Estacional, Análisis Bioquímico, Marcadores Moleculares.

Introducción

En Colombia, la reproducción bovina ocupa un lugar importante en lo que se refiere al ámbito productivo (Asocriollo, 2003). Los indicadores de producción del hato bovino se encuentran ligados con la fertilidad que pueda tener el Toro, fertilidad que se encuentra relacionada con las sustancias contenidas en el plasma seminal y el semen total (plasma y espermatozoides). Dichas sustancias tienen un papel importante en la sobrevivencia, motilidad y metabolismo de las células espermáticas, lo que genera características bioquímicas específicas para cada raza bovina. La variación de estas características se hace evidente entre razas, de las condiciones climáticas, e incluso puede llegar a ser significativa entre ejemplares de la misma raza. Las secreciones de las glándulas accesorias masculinas tales como proteínas, fructosa, ácido cítrico, proteínas y iones, dan características especiales al eyaculado que inciden sobre su potencial fertilizante (Whitfield y col., 1992; Manjunath y col., 1993; Bellin y col., 1994; Thérien y col., 1995; Thérien y col., 1997; Thérien y col., 1998). La fructosa es el sustrato energético principal empleado por el espermatozoide para su motilidad y sobrevivencia, el ácido cítrico juega un papel importante en el equilibrio osmótico mientras las proteínas tienen funciones específicas relacionadas con sobrevivencia, motilidad y resistencia a la criopreservación de las células. De otro lado, trabajos *in vitro* adelantados en el programa nacional de fisiología y nutrición animal de CORPOICA, con el propósito de evaluar la capacidad fertilizante del espermatozoide bovino, han reportado que las razas criollas alcanzan mayores porcentajes de oocitos penetrados que las razas Holstein y Cebú; y mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado que la raza Cebú (Martínez y Luque, 1996; Bedoya, 1999; Alza y Jiménez, 2000). Estos resultados han orientado la investigación a evaluar los factores bioquímicos en el eyaculado, relacionados con el comportamiento reproductivo del toro. El objetivo de este trabajo fue determinar las concentraciones de fructosa, ácido cítrico y proteínas en plasma seminal de toros de las razas criollas colombianas Sanmartinero, Costeño con Cuernos, Romosinuano y Blanco Orejinegro, y evaluar el efecto de la época climática (lluvia y sequía) en las concentraciones de estos tres componentes del plasma seminal, a fin de relacionarla con su capacidad fecundante evaluada a través de las pruebas convencionales de calidad seminal (viabilidad, motilidad y concentración espermática).

Materiales y metodos

3 Congreso Internacional de Microbiología

"LA BIOTECNOLOGIA COMO EJE DE INNOVACION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA"

Pamplona, 24 al 26 de Septiembre de 2008

En esta investigación se empleó semen de toros de cuatro razas criollas colombianas: Sanmartinero, Romosinuano, Costeño con Cuernos y Blanco Orejinegro, localizadas en tres centros de investigación de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria –Corpoica–. El semen de toros de la raza Sanmartinero se colectó en el Centro de Investigaciones (CI) La Libertad (Villavicencio, Meta), el de toros Romosinuano y Costeño con Cuernos en el CI Turipaná (Montería, Córdoba) y el semen de toros Blanco Orejinegro en la Estación Experimental El Nus (San Roque, Antioquia). Así mismo se evaluó el efecto de la época climática (lluvia o sequía) en las concentraciones de fructosa, ácido cítrico y proteínas en el plasma seminal. Para realizar estos análisis se usó semen de diez toros de cada una de las razas mencionadas, los cuales permanecieron bajo condiciones de alimentación y manejo propias de cada zona.

En todas las muestras seminales se separó el plasma seminal de los espermatozoides mediante centrifugación a 1400 g durante 10 min. Para las determinaciones de fructosa y ácido cítrico, el sobrenadante (plasma seminal) se sometió a desproteinización efectuada mediante la adición de sulfato de zinc ($ZnSO_4$) al 5% en medio básico para precipitar las proteínas. El precipitado se descartó y en el sobrenadante se determinaron las concentraciones de fructosa mediante el método espectrofotométrico basado en la reacción de Seliwanoff, adaptado para cuantificación en plasma seminal; y las concentraciones de ácido cítrico mediante el método colorimétrico basado en la reacción de Furth Herrman (Borque, C.; Vasquez I. 1989). Para la determinación de proteínas en semen se utilizó una modificación del método espectrofotométrico de Folin-Cicolteau el cual se basa en la relación de la proteína con los iones cúpricos en medio alcalino y la reducción de fosfomolibdato-fosfotungstato del reactivo por residuos de tirosina y triptofano de la proteína. Los datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 4x2. La comparación se realizó mediante un análisis de varianza ANAVA para determinar si existió interacción entre las razas y las épocas climáticas y una prueba de comparación de Tukey. El análisis de varianza se realizó mediante el programa estadístico SAS.

Resultados y Discusión

La media general de la concentración de fructosa en los toros de las razas criollas estudiadas fue de $397.7 \pm 94,3$ mg/dl, 20.5 % más bajo que los valores reportados (Mann., 1961; Holy., 1989) para semen de toros de razas extranjeras los cuales son en promedio 500 mg/dl. El plasma seminal de los toros de la raza Sanmartinero presentó las concentraciones mayores de fructosa ($563,41 \pm 112,3$ mg/dl), mientras las menores concentraciones de fructosa se presentaron en los toros de la raza Blanco Orejinegro ($283,67 \pm 88,54$ mg/dl). No hubo diferencias significativas en las concentraciones de fructosa de las razas Romosinuano y Costeño con Cuernos. Esto probablemente se debe a que las muestras seminales de estas dos últimas razas provienen del mismo centro de investigación y se encuentran bajo las mismas

condiciones de alimentación y manejo reproductivo. En el presente trabajo no se encontró ninguna correlación entre los niveles de fructosa y la concentración espermática o la viabilidad del semen. El ácido cítrico tuvo una media general de $616.6 \pm 163,6$ mg/dl, muy cercano a los valores reportados para semen bovino en razas foráneas, 620-700 mg/dl (Mann., 1961; Holy., 1989). De igual forma que en la fructosa, la concentración de ácido cítrico fue mayor en el semen de los toros de la raza Sanmartinero ($782,81 \pm 72,8$ mg/dl), lo que demuestra cierta superioridad en lo que respecta a las secreciones de las vesículas seminales de los toros de esta raza frente a las demás razas evaluadas. El análisis del plasma seminal de los toros de la raza Sanmartinero presentó una alta correlación entre el ácido cítrico y la viabilidad de los espermatozoides ($r = 0.94$; $p < 0.05$), tal relación se manifestó posiblemente porque el estado de las membranas está relacionado con el equilibrio osmótico y este a su vez depende en gran medida de los niveles de ácido cítrico. Así mismo, teniendo en cuenta que el ácido cítrico es un marcador de la actividad secretora de la próstata (Borque, C.; Vasquez I. 1989), este resultado indica una actividad superior de la glándula en los animales de esta raza con respecto a los de las demás razas. El plasma seminal de los toros Blanco Oreginegro presentó los mas bajos niveles de ácido cítrico ($421,73 \pm 91,2$ mg/dl)

El promedio de la concentración de proteína para el total de muestras de semen analizadas fue $61.51 \pm 18,6$ mg/ml. Como en el caso de la fructosa y el ácido cítrico, los toros de la raza Sanmartinero presentaron las mayores concentraciones de proteína en plasma seminal $74,47 \pm 22,3$ mg/ml. No hubo diferencias significativas entre la concentración de proteínas en plasma seminal de los toros de la raza Sanmartinero y Romosinuano, pero si se observan diferencias significativas entre las concentraciones de proteína de toros de las razas Romosinuano y Costeño Con Cuernos, este resultado evidencia una vez más la superioridad de la raza Romosinuano frente a Costeño con cuernos. Los toros de la raza Blanco Orejinegro, presentan las menores concentraciones de proteína seminal ($47,43$ mg/ml $\pm 13,4$ mg/ml). Las proteínas que componen el plasma seminal pueden inhibir o activar la motilidad y la capacitación del espermatozoide, es fuente de aminoácidos necesarios para los procesos metabólicos del espermatozoide y actúan como defensores del mismo frente a patógenos que pueden afectarlo en su funcionamiento, de tal manera que mayores concentraciones de proteína indican mayores condiciones energéticas y de sobrevivencia para la célula. Los resultados de las comparaciones estadísticas mostraron que a pesar de que son secreciones de diferentes, existen correlaciones positivas y altamente significativas en los niveles de fructosa, ácido cítrico y proteínas en plasma seminal. De esta manera es posible sugerir que, a través de la determinación de la concentración de uno de estos componentes, se pueda tener una idea de la concentración de los otros. Es posible que muestras seminales que presentan niveles altos de fructosa, también tengan niveles altos de ácido cítrico y de proteínas. Dado que la concentración de fructosa se encuentra estrechamente relacionada con la motilidad del espermatozoide, las proteínas ejercen funciones

importantes para el correcto funcionamiento del espermatozoide además de proveer aminoácidos necesarios para el metabolismo del mismo; y que el ácido cítrico mantiene el de equilibrio osmótico e integridad de la célula espermática, es posible sugerir que las mayores concentraciones de estas tres variables, encontradas en semen de toros de la raza Sanmartinero, proporcionan mejores condiciones a los espermatozoides, lo que otorga a los toros de esta raza, ciertas ventajas reproductivas para lograr mejores porcentajes de fertilización.

En la comparación entre épocas climáticas (lluvias y sequía) época de sequía no se evidenció diferencias estadísticas en las concentraciones de fructosa y ácido cítrico. Esto indica que la producción de fructosa y ácido cítrico de las glándulas accesorias no se ve afectada por el estrés calórico. En el análisis fructosa en cada raza se determino que hubo diferencias significativas ($p < 0.001$) en los toros de la raza Romosinuano, siendo mayores las concentraciones de fructosa en la época de lluvias. Es posible que esto sea debido a la disminución de la calidad nutricional de los forrajes en la época de sequía.

No hubo diferencias significativas en la concentración de ácido cítrico de las dos épocas estudiadas en ninguna de las razas. Esto indica que los contenidos de ácido cítrico en el semen de los toros de las razas criollas no se ven afectados por la estación de lluvias o de sequía, las cuales inciden sobre la calidad nutricional de los forrajes consumidos por los animales. Así mismo, se puede sugerir que es posible que a nivel fisiológico, no existe efecto en la producción de ácido cítrico por parte de las vesículas seminales debidas a cambios en las condiciones climáticas ambientales. Esto ultimo indica que los toros de las razas criollas mantienen un buen equilibrio osmótico en el plasma seminal, lo que evita que la célula espermática se vea afectada por el estrés calórico.

La comparación de las concentraciones de proteínas en muestras seminales de los toros de razas criollas indicó que hay diferencias entre la época climática ($p < 0.001$) para dos de las razas analizadas. El contenido de proteínas en plasma seminal presentó un aumento significativo en los toros de las razas Sanmartinero y Costeño con Cuernos. Es posible que este aumento sea debido a la pérdida de agua ocasionada por las altas temperaturas.

En conclusión, la evaluación de factores bioquímicos relacionados con calidad seminal puede llegar a ser una herramienta útil para determinar el potencial fertilizante de un macho reproductor en los sistemas de producción bovina. Estimar las concentraciones sustratos como fructosa y proteínas, podría convertirse en una alternativa de mejoramiento genético por medio de la selección de machos reproductores de alto rendimiento, evaluados desde un punto de vista molecular.

Agradecimientos

3 Congreso Internacional de Microbiología

"LA BIOTECNOLOGIA COMO EJE DE INNOVACION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA"

Pamplona, 24 al 26 de Septiembre de 2008

Este trabajo fue posible gracias a la intervención del programa de Fisiología y Nutrición Animal del C.I. Tibaitatá, del Programa Nacional de Recursos Genéticos y Mejoramiento Animal de Corpoica, además de la asesoría del Dr. Rolando Barahona (Universidad Nacional, sede Medellín), de Rocío Herrera y de Samuel Correa.

	Raza							
	Sanmartinero		Ramosinuano		Costeño con Cuernos		Blanco Oreginegro	
	lluvias	sequía	lluvias	sequía	lluvias	sequía	lluvias	sequía
Fructosa (mg/dl)	563,4 ± 112,3	485,23 ± 63,8	489.7 ± 52.3	338.78 ± 48,7 **	389.8 ± 26.8	341.93 ± 28.6	320.6 ± 25.4	278.7 ± 23.4
Acido Cítrico (mg/dl)	782,81 ± 72,8	704.8± 33.8	642.6 ± 87.72	727.8 ± 82.15	585.7 ± 76.8	576.6 ±89.38	420.83 ± 34.73	418.4 ± 32.9
Proteínas (mg/ml)	74,47 ± 22,3	58,7 ± 12,5 *	65,3 ± 8,5	63,2 ± 12,6	73,2 ± 18,1	51,8 ± 9,3*	56,8 ± 12,3	49,5 ± 9,8

3

Congreso Internacional de Microbiología

"LA BIOTECNOLOGIA COMO EJE DE
INNOVACION CIENTIFICA Y TECNOLOGICA"

Pamplona, 24 al 26 de Septiembre de 2008