

31. Salud Animal

Calidad de semen y su relación con la composición del plasma seminal

García, María Florencia; Nuñez Favre, Romina; Stornelli, María Alejandra;

maflorenciagarcia87@gmail.com; rnfavre@fcv.unlp.edu.ar; astornel@fcv.unlp.edu.ar

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Resumen

Los objetivos fueron evaluar la relación de los parámetros seminales y: 1) la concentración de colesterol, triglicéridos y proteínas totales del plasma seminal, 2) el peso molecular de las proteínas del plasma seminal. Se utilizaron 13 gatos adultos, clínicamente sanos. Se obtuvieron 55 eyaculados mediante electroeyaculación. A cada muestra se le evaluó: cantidad de espermatozoides totales (ET), concentración espermática (CE), motilidad individual (MI), vigor (V) y morfología espermática (ME). Con el plasma seminal se determinó concentración de proteínas totales, colesterol y triglicéridos mediante colorimetría y los pesos moleculares de las proteínas mediante electroforesis. Los eyaculados se dividieron en eyaculados de buena calidad (G1; más de 5×10^6 ET, 50×10^6 /mL CE, 70% MI, 4 V y 55% ME) y eyaculados de mala calidad (G2; menos de 3×10^6 ET, 30×10^6 /mL CE, 45% MI, 3 V, 40% ME). Se observó que ET, CE, MI, V y ME fueron significativamente mayores en G1 comparado con G2 ($12,32 \pm 1,31$ vs. $1,15 \pm 1,66 \times 10^6$; $117,70 \pm 15,05$ vs. $11,50 \pm 19,04 \times 10^6$ /mL; $84,68 \pm 1,94$ vs. $25 \pm 2,38\%$; $4,54 \pm 0,11$ vs. $2,83 \pm 0,09$; $68,13 \pm 1,59$ vs. $37,19 \pm 2,41\%$; respectivamente; $p < 0,0001$). Asimismo el colesterol y los triglicéridos fueron significativamente mayores en G1 comparado con G2 ($18,47 \pm 1,11$ vs. $7,25 \pm 0,98$ mg/dL; $96,25 \pm 5,55$ vs. $19,67 \pm 4,88$ mg/dL, respectivamente; $p < 0,0001$). No se observaron diferencias en la concentración de proteínas totales ($37,08 \pm 6,62$ mg/dL). Los gatos G1 presentaron bandas proteicas de menor peso molecular (14.4 KDa) comparado con G2 (20.1 KDa). Las proteínas de bajo peso molecular junto con la concentración de colesterol y triglicéridos podrían ser indicadores de la calidad seminal en el gato doméstico.

Palabras clave: gato, colesterol, triglicéridos, proteínas, electroforesis

Introducción

El potencial de fertilización del semen felino depende no solo de la composición lipídica en la membrana de la célula espermática, sino también de la composición del plasma seminal. De esta forma, se ha propuesto la determinación de parámetros bioquímicos para evaluar la calidad del semen en animales y hombres (Meseguer et al., 2004 y Beer-Ljubić et al., 2009). En el bovino, la concentración de colesterol y otros lípidos se correlacionaron con la calidad de semen (Beer-Ljubić et al., 2009). Sin embargo en el felino doméstico la determinación de pruebas bioquímicas aún no ha sido estudiada en detalle. Por otra parte, en los últimos años, las características del plasma seminal han sido ampliamente estudiadas en varias especies con el fin de encontrar marcadores que puedan predecir la fertilidad. En bovinos, cuatro proteínas asociadas a la fertilidad han sido identificadas con electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), y pueden utilizarse como predictivas de fertilidad en toros. Dos de ellas (55 kDa y 26 kDa) fueron predominantes en el plasma seminal de toros de alta fertilidad, mientras que dos proteínas de 16 kDa fueron predominantes en plasma seminal de toros de baja fertilidad (Killian, Chapman y Rogowski, 1993). En equinos, una proteína de 72 kDa fue correlacionada positivamente a padrillos con buena calidad seminal, mientras que tres proteínas de 75 kDa, 18 kDa y 16 kDa

fueron correlacionadas negativamente con la fertilidad (Brandon et al., 1993). En caninos, recientemente se han identificado con SDS-PAGE 37 bandas proteicas en el plasma seminal, de las cuales dos proteínas de 67 kDa y 58,6 kDa, han sido positivamente correlacionadas con la fertilidad (De Souza, Barreto y Lopes, 2007). Sin embargo, en el gato doméstico, la caracterización proteica del plasma seminal aún no ha sido estudiada en detalle.

Existe en la actualidad solo un trabajo en el cual se determinó el perfil proteico del plasma seminal, la concentración de proteínas y zinc comparando dos métodos de recolección de semen (electroeyaculación o catéter uretral). El mismo describe que la concentración de Zinc y proteínas totales no varían con la técnica de recolección de semen y que la concentración de proteínas totales no se correlaciona con la calidad seminal. Se han podido identificar más de 30 bandas proteicas con SDS-PAGE, de las cuales 8 bandas de entre 5,5 y 200 kDa fueron encontradas en todas las muestras seminales. Una de ellas, de 66 kDa se cree podría actuar como ligando del colesterol durante la capacitación espermática (Zambelli, Raccagni, Cunto, Andreani y Isani, 2010)

Es así que el conocimiento de las concentraciones de colesterol, triglicéridos y proteínas totales del plasma seminal, así como su perfil proteico podrían aportar

información de relevancia en la capacidad fecundante del semen felino.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la relación entre los parámetros seminales y: 1) la concentración de colesterol, triglicéridos y proteínas totales del plasma seminal, 2) el peso molecular de las proteínas del plasma seminal.

Materiales y Métodos

Diseño experimental:

Se utilizaron trece gatos adultos, mestizos, sanos, de pelo corto, con edades comprendidas entre 2 y 5 años, y con un peso entre 3,5 y 5 kg. Los animales fueron sometidos a un régimen de luz artificial y alojados en jaulas individuales con agua y alimento *ad-libitum* (control de pH, Vitalcan, Buenos Aires, Argentina). Luego anestesiados los gatos con ketamina (25 mg/kg im) y xylazina (1mg/kg im) se realizó la recolección del semen mediante electroeyaculación según lo descrito por Nuñez Favre et al. (2012). Los animales recibieron un total de 80 estímulos divididos en 3 sets (30, 30 y 20) con 2-3 minutos de descanso entre los sets. El primer set consistió en 10 estímulos a 2V, 10 a 3V y 10 a 4V. El segundo set en 10 estímulos a 3V, 10 a 4V y 10 a 5V. El último set consistió en 10 estímulos a 4V y 10 a 5V.

Se obtuvieron 55 eyaculados los cuales fueron recolectados en un tubo de 1,5 ml

precalentado a 37°C y sometidos a las siguientes pruebas de contrastación seminal: Examen macroscópico: volumen, aspecto, color.

Examen microscópico: 1) Cantidad de espermatozoides totales (ET); 2) Concentración espermática (CE) se obtuvo realizando el conteo en cámara de Neubauer (Nuñez Favre et al., 2012); 3) Motilidad individual (MI), 10 µl de semen se colocaron en un portaobjetos a 37°C, se colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400X, se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (Nuñez Favre et al., 2012); 4) Vigor (V), escala de 1-5, se evaluó conjuntamente con la motilidad individual; 5) Morfología espermática (ME), % de espermatozoides morfológicamente normales, se observaron los espermatozoides por microscopía a 1000X utilizando tinción 15 Biopur® (Nuñez Favre et al., 2012).

Determinaciones Bioquímicas:

Luego de la realización de las evaluaciones macroscópica y microscópica del semen, el mismo fue centrifugado durante 10 minutos a 1500 x g a 20°C. Las muestras de plasma seminal fueron divididas en dos alícuotas y almacenadas a -20°C hasta su procesado. Se utilizó una alícuota del plasma seminal para la determinación de colesterol, triglicéridos y proteínas totales mediante colorimetría (cholesterol Wiener®; triglycerides BioSystem

Reagents & Instruments®; Proti 2 Wiener®). Para la lectura de las reacciones colorimétricas se utilizó un espectrofotómetro (Metrolab 1600). La otra alícuota se utilizó para la realización de las corridas electroforéticas.

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE):

El plasma seminal fue descongelado y 5 µl fueron sembrados en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones reductoras siguiendo el protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970). Cada gel fue corrido con un estándar proteico de pesos moleculares conocidos. Las proteínas del plasma seminal separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de PVDF y teñidas con tinta china para revelar el perfil proteico.

Análisis estadístico:

Los datos fueron evaluados mediante ANOVA, las variables categóricas con PROC CATMOD, las continuas con PROC GLM y las correlaciones con CORR del paquete estadístico SAS®

Resultados y Discusión

Los datos obtenidos en la evaluación microscópica del semen permitieron dividir a los eyaculados en dos grupos, uno de buena calidad seminal (G1) y el otro de mala calidad (G2). Grupo 1 eyaculados con más de 5×10^6 ET, 50×10^6 /mL CE, 70% MI, 4 V y 55% ME y grupo 2

eyaculados con menos de 3×10^6 ET, 30×10^6 /mL CE, 45% MI, 3 V, 40% ME.

El estudio permitió observar que los parámetros seminales de ET, CE, MI, V y ME fueron significativamente mayores en G1 comparado con G2 ($12,32 \pm 1,31$ vs. $1,15 \pm 1,66 \times 10^6$; $117,70 \pm 15,05$ vs. $11,50 \pm 19,04 \times 10^6$ /mL; $84,68 \pm 1,94$ vs. $25 \pm 2,38\%$; $4,54 \pm 0,11$ vs. $2,83 \pm 0,09$; $68,13 \pm 1,59$ vs. $37,19 \pm 2,41\%$; respectivamente; $p < 0,0001$; Figura 1). Asimismo el colesterol y los triglicéridos fueron significativamente mayores en G1 comparado con G2 ($18,47 \pm 1,11$ vs. $7,25 \pm 0,98$ mg/dL; $96,25 \pm 5,55$ vs. $19,67 \pm 4,88$ mg/dL, respectivamente; $p < 0,0001$). No se observaron diferencias en la concentración de proteínas totales ($37,08 \pm 6,62$ mg/dL; Figura 2). Se observó una correlación significativa y positiva entre el colesterol y la cantidad de espermatozoides totales, el colesterol y la concentración espermática, triglicéridos y la cantidad de espermatozoides totales y triglicéridos y la concentración espermática ($r = 0.59$, $r = 0.53$, $r = 0.68$, $r = 0.55$, respectivamente, $P < 0.001$).

En el estudio del perfil proteico del plasma seminal se pudieron evidenciar 5 bandas proteicas claramente definidas en todas las muestras del plasma seminal (20.1, 30.0, 45.0, 66.0 y 97.0 KDa). Además una banda de 14.4 KDa pudo evidenciarse solamente en las muestras provenientes de eyaculados de buena calidad seminal (G1). Estos resultados indican que ciertas proteínas de bajo peso molecular estarían

relacionadas con buena calidad seminal en el gato doméstico.

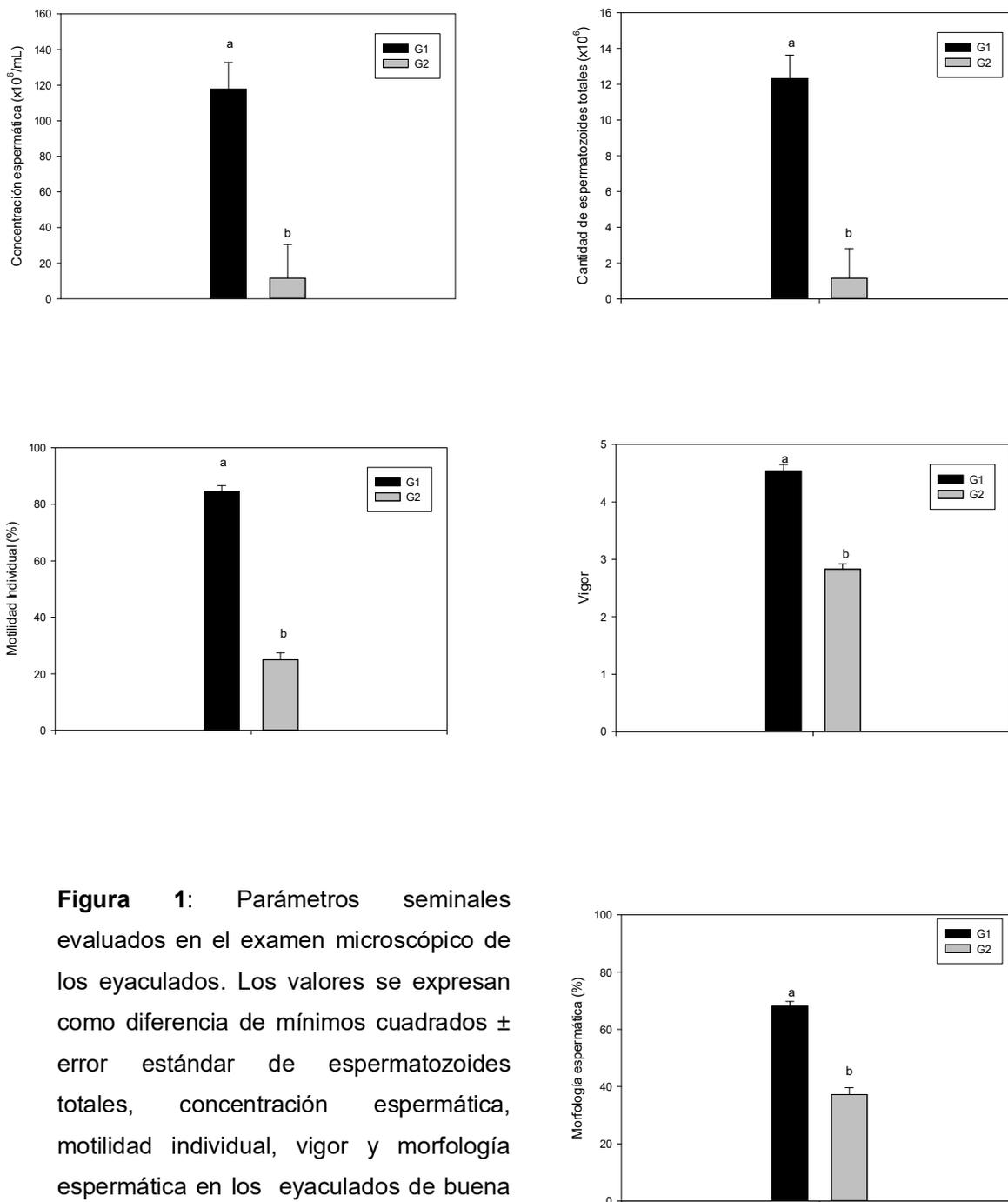


Figura 1: Parámetros seminales evaluados en el examen microscópico de los eyaculados. Los valores se expresan como diferencia de mínimos cuadrados \pm error estándar de espermatozoides totales, concentración espermática, motilidad individual, vigor y morfología espermática en los eyaculados de buena calidad (G1) y mala calidad (G2). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

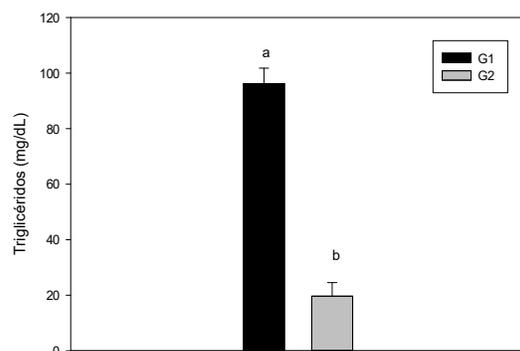
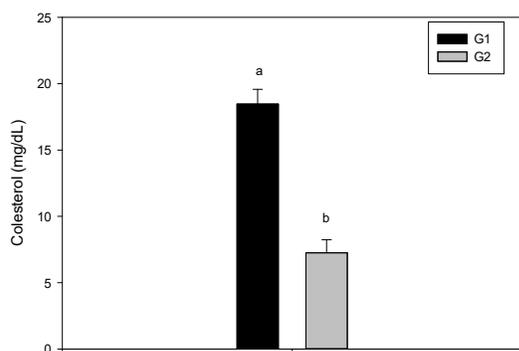
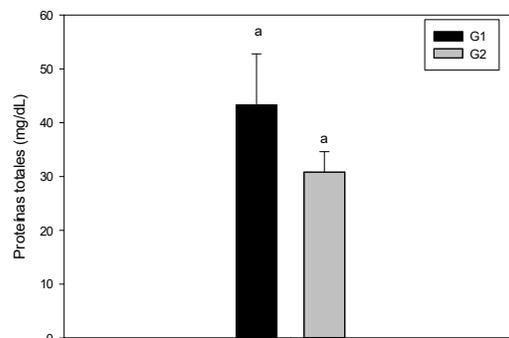


Figura 2: Determinaciones bioquímicas de los eyaculados evaluados. Los valores se expresan como diferencia de mínimos cuadrados \pm error estándar de la concentración de colesterol, triglicéridos y proteínas totales en los grupos de eyaculados de buena calidad (G1) y mala calidad (G2). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).



Nuestros resultados muestran diferencias significativas en la calidad seminal cuando se comparó el grupo G1 con el grupo G2. Asimismo, las concentraciones de colesterol, triglicéridos del plasma seminal fueron significativamente más altas en las muestras del G1 en comparación con el G2 ($p < 0.0001$). Estos hallazgos se correlacionan con lo observado previamente por Beer-Ljubic et al. (2009) en bovinos, quienes describieron que la concentración de colesterol y triglicéridos del plasma seminal se encuentran asociadas con la calidad de semen. Sin embargo la concentración de proteínas totales no mostró diferencias entre los eyaculados de buena calidad y los de mala calidad seminal, esta misma observación fue descrita previamente por Zambelli et al. (2010). En bovinos, equinos y caninos se han podido relacionar ciertas proteínas presentes en el plasma seminal con la calidad de semen y fertilidad de ese reproductor (Killian et al., 1993; Brandon et al., 1999 y De Souza et al., 2007). En el gato doméstico Zambelli et al. (2010) han descrito la presencia de 8 bandas proteicas en geles de bisacrilamida-tris al 12% pero no se han podido relacionar con la calidad de semen. Sin embargo nuestros resultados evidenciaron la presencia de 6 bandas proteicas de las cuales una (14.4 KDa) pudo correlacionarse con la concentración y la cantidad de espermatozoides totales del eyaculado.

Conclusiones

Podemos concluir que proteínas de bajo peso molecular junto con la concentración de colesterol y triglicéridos podrían ser utilizadas como indicadores de la calidad seminal en el gato doméstico. A su vez futuros estudios de identificación de estas proteínas podrían ser utilizados como marcadores de fertilidad en el gato.

Bibliografía

- Beer-Ljubić, B., Aladrović, J., Marenjak, T. S., Laškaj, R., Majić-Balić, I., & Milinković-Tur, S. (2009). Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. *Theriogenology*, 72(8), 1132-1140.
- Brandon, C. I., Heusner, G. L., Caudle, A. B., & Fayer-Hosken, R. A. (1999). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *theriogenology*, 52(5), 863-873.
- De Souza, F. F., Barreto, C. S., & Lopes, M. D. (2007). Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology*, 68(1), 100-106.
- Killian, G. J., Chapman, D. A., & Rogowski, L. A. (1993). Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of reproduction*, 49(6), 1202-1207.

- Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, 227, 680-5.
- Meseguer, M., Garrido, N., Martínez-Conejero, J. A., Simón, C., Pellicer, A., & Remohí, J. (2004). Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 21(12), 445-451.
- Núñez-Favre, R., Bonaura, M. C., Tittarelli, C. M., Mansilla-Hermann, D., la Sota, R. L., & Stornelli, M. A. (2012). Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s6), 232-234.
- Zambelli, D., Raccagni, R., Cunto, M., Andreani, G., & Isani, G. (2010). Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology*, 74(8), 1396-1402.

Agradecimientos

Para la realización de este trabajo se contó con la colaboración del Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Financiamiento

El presente trabajo se financió mediante los fondos adjudicados al Proyecto de Incentivos 11/V230, "Monitoreo de la salud animal y utilización de biotecnologías reproductivas para mejorar la eficiencia reproductiva en animales de interés productivo y de compañía". Proyecto dirigido por el MV. PhD de la Sota y codirigido por la MV. Dr.Cs. Vet. Stornelli María Alejandra. Así como por el PPID 11/V009, "Evaluación del plasma seminal felino y su relación con la calidad seminal e inducción de ovulación en la gata" adjudicado en la última convocatoria. Proyecto dirigido por Núñez Favre Romina. También se utilizaron fondos obtenidos a partir de los ingresos del Servicio Externo de Reproducción Animal.