

Estudio de algunos parámetros bioquímicos en semen congelado

R. DURAND Y A. BIDOT

*Dpto. de Reproducción, Centro Nacional de Salud Animal,
La Habana, Cuba*

Recibido: 26 de diciembre de 1975

Recibido: 14 de abril de 1977

ABSTRACT. The protein content of seminal plasma after ejaculation, undergoes sudden changes due to enzyme action. There are evidences of rupture and redistribution and proteins due to standing periods longer than 48 hours. The objective of the present paper was to study whether there are some variations in the chemical content of semen compare to different storing periods. The periods programmed were 24 hours, 30 days and 60 days after extraction; just after semen collection the sample was frozen to -79°C . It was determined RNA, DNA, proteins, ammonia, acid phosphatase and alkaline phosphatase. We also carried out protein fractionation using polyacrylamide gel electrophoresis. It was detected variations during the different storing periods significant ($p < 0,01$) for RNA between 6 hours 60 days and ($p < 0,05$) between 30 and 60 days. Alkaline phosphatase varies between 6 hours and 30 days ($p < 0,01$) and DNA between 30 and 60 days ($p < 0,05$) and 6 hours, 30 days and 60 days ($p < 0,05$). The electrophoresis showed 8 to 10 bands in semen, 10 to 14 in diluted semen and 10 to 12 in diluent.

RESUMEN. El contenido proteico del plasma seminal no permanece constante después de la eyaculación, sino que sufre rápidos cambios producidos enzimáticamente. Hay evidencias de ruptura y redistribución de proteínas con el almacenaje después de las 48 horas de conservación. Nuestro objetivo fue el de encontrar si existen algunas variaciones en el contenido químico del semen a diferentes tiempos de almacenamiento. La concentración de estos parámetros se determinó a las 24 horas, 30 y 60 días de la extracción. En el momento de la recogida, la muestra se congeló a -79°C . Se determinó RNA, DNA, proteínas, amoníaco, fosfatasa ácida y alcalina. Además, se realizó fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida. Se encontraron variaciones en el almacenamiento para el RNA ($p < 0,01$) entre las 6 horas y 60 días y de ($p < 0,05$) entre los 30 y 60 días. La fosfatasa alcalina varió ($p < 0,01$) entre las 6 horas y los 30 días y el

DNA ($p < 0,01$) entre los 30 y 60 días, así como ($p < 0,05$) entre las 6 horas y los 30 y 60 días. Electroforéticamente se encontraron entre 8 a 10 bandas en el semen puro; 10 a 14 bandas en semen diluido y entre 10 y 12 en menstuo.

INTRODUCCION

El contenido protéico del plasma seminal no permanece constante después de la eyaculación, sino que sufre rápidos cambios producidos enzimáticamente y que se manifiestan en una disminución progresiva en la concentración de nitrógeno protéico no dializable y una acumulación simultánea de nitrógeno no protéico y aminoácidos libres que culmina con la formación de amoníaco libre (*Mann, 1964*). El factor principal que determina la proporción de ruptura de las proteínas a proteosomas y aminoácidos, es el grado de actividad mostrado en las enzimas proteolíticas y que está dado por el intervalo que transcurrió desde el momento de la eyaculación y la temperatura de almacenaje.

En el toro, verraco y carnero, el progreso de la proteólisis, en el semen conservado o el plasma seminal, es mucho más lento que en el hombre y a veces no puede detectarse.

Según Szumowski en 1963, el contenido de proteínas de una muestra promedio de plasma seminal bovino está distribuido en cuatro fracciones principales: albúmina, 2.52%; α -globulina, 66.5%; β -globulina, 19.6% y γ -globulina, 10.4%.

En toros de fertilidad normal, la albúmina es generalmente la fracción protéica más pequeña, mientras que en animales con espermatogénesis defectuosa se encuentra elevada.

El semen debe su poderosa actividad fosfatasa principalmente al plasma seminal en que abundan diferentes enzimas desfosforilantes derivadas de los órganos accesorios masculinos de la reproducción. También se ha sugerido que el contenido de DNA en el semen de toro disminuye con el almacenamiento, y que esto puede explicar la disminución en la proporción del % de fertilidad y el aumento en la mortalidad embrionaria del ganado, lo que resulta del uso de esperma de toro almacenado o "viejo" para la inseminación artificial. Salisbury, en 1964, expresó que el semen de toro almacenado en diluyente de yema de huevo-citrato, después de un período de 5 días a 5°C, el porcentaje de DNA disminuyó en un 30%.

Durante el envejecimiento del semen in vitro, el DNA baja progresivamente hasta un 61% durante 21 días de conservación.

Nuestro estudio está encaminado a detectar si existen o no variaciones de los valores de los distintos parámetros estudiados con la congelación.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 8 sementales de la raza Holstein bajo régimen de Inseminación Artificial en buen estado de salud.

La recogida del esperma se hizo por el método de la vagina artificial y su conservación fue inmediata a una temperatura de -79°C . Las muestras fueron trabajadas a distintos intervalos: a las 6 horas, 30 y 60 días de la extracción, determinándose distintos parámetros: proteínas totales, RNA, DNA, fosfatasa ácida y alcalina y amoníaco.

El método utilizado para la obtención de la concentración de proteínas totales fue el Biuret.

Para la determinación del RNA, se realizó la técnica de Schmidt y Thannhauser descrita en 1945 y modificada por Ceriotti, (1968) y para el DNA, se usó el método de Ceriotti.

La fosfatasa ácida y alcalina se determinó por el método de King, (1959).

Para la electroforesis se empleó la técnica de poliacrilamida; para amoníaco se usó la técnica de microdifusión de Conway.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se determinaron los estadígrafos de cada parámetro, realizándose el análisis estadístico de los mismos. (Tabla I).

Se aplicaron los test de análisis de varianza por bloques al azar, superposición de intervalos de confianza y comparación de t de datos apareados, obteniéndose los siguientes resultados: para el RNA existen diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los 60 días y las 6 horas y de ($p < 0.05$) entre los 30 y 60 días y 60 días y 6 horas.

TABLA I

Tiempo	RNA mg/100	DNA mg/ml	Prot. mg/ml	Fosf. Acida (U.I.)	Fosf. Alcalina (U.I.)	Amoníaco mg/100
6 horas	20.1 ± 5.5	6.8 ± 0.9	30.4 ± 9.1	13.5 ± 9.1	4.8 ± 3.7	0
30 días	16.4 ± 5.1	6.9 ± 2.4	34.5 ± 7.2	9.4 ± 2.6	22.3 ± 10.8	1.4 ± 0.4
60 días	7.0 ± 4.2	4.6 ± 1.2	31.1 ± 6.6	10.7 ± 5.5	12.0 ± 5.8	1.9 ± 0.5

El contenido de proteínas, amoníaco y fosfatasa ácida no presentaron diferencias significativas.

En la fosfatasa alcalina se apreciaron diferencias ($p < 0.01$) entre las 6 horas y 30 días.

Hemos encontrado que existe un aumento significativo ($p < 0.01$) entre las 6 horas y 30 días de almacenamiento.

Se sabe que existen cantidades apreciables de esta enzima en los órganos accesorios masculinos del toro. Con la congelación, se produce la ruptura y muerte de gran número de células espermáticas con el consiguiente paso de enzimas intracelulares al medio circundante, además del aporte enzimático que proporciona el diluyente (*Bidot y Durand 1974*).

Al realizar un análisis de los resultados obtenidos en el contenido protéico, nuestros resultados concuerdan con los observados en otros trabajos (*Bidot y Durand, 1974; Wales y cols., 1961*) los cuales expresan que en el toro, la proteólisis del semen conservado se produce lentamente y a veces es difícil su observación cuando el tiempo transcurrido no ha sido muy largo, a pesar de que sabemos que cuando el semen se incubaba a 37°C la proporción de ruptura de las proteínas es generalmente rápida, lo que demuestra que la actividad enzimática en el eyuculado se encuentran deprimida.

En nuestros resultados hemos encontrado que las concentraciones de RNA y de DNA disminuyen con el almacenamiento de forma significativa.

Esto ha sido comprobado por varios autores (*Salisbury, 1964; Bidot, 1975*).

Algunos autores afirman que el semen de toro almacenado en diluentes a base de yema de huevo, después de un almacenaje de 5 días a 5°C, el porcentaje de DNA disminuyó en un 30%.

Se ha sugerido que esta baja del contenido de DNA en el semen de toro con el almacenamiento, puede explicar una disminución en el porcentaje de la fertilidad y un aumento en la mortalidad embrionaria del ganado.

Esto ha sido también señalado por otros autores (*Holy, 1968; De Vuyst, 1970*).

Szumowski, en 1963, afirmaba que un promedio de lo que puede esperarse en la esperma después de un almacenaje de 48 horas, pueden proponerse los siguientes valores: 6.3% para la albúmina, 15.9% para los α -globulinas; 41.1% de β -globulina y 23.2% de γ -globulina, existiendo un 13.7% del contenido protéico que es electroforéticamente inmóvil.

En toros de fertilidad normal, la albúmina es generalmente la fracción

REFERENCIAS

- BIDOT A. Y DURAND R. Variaciones que se producen en el contenido de proteínas totales de la esperma de bovinos con el almacenamiento. presentado Jornada Endocrinología, 1974.
- BIDOT A. Influencia de algunos indicadores bioquímicos de la esperma, sobre el valor biológico de los eyaculados y la fertilidad. Presentado V Seminario CNIC, 1975.
- DE VUYST A. AND HENRIET L. Estudios sobre la variación de las cantidades de ácidos desoxirribonucleicos contenidos en el espermatozoide de toro. *Zootec. e Vet.*, 25, 5, 133, 1970.
- HOLY L. Biología de la Reproducción bovina, 1968.
- KICHEV G. K., BIDOT A. AND CORVALÁN P. A. Electrophoretic-Chemical Characteristic of the biocomplexes in bulls semen dilimited to varying degrees with yolk diluent. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, Tomo 29, 7, 1976.
- KING E. J. Microanalysis in medical Biochemistry London, 1959.
- MANN T. Biochemistry of semen and of the male reproductive tract. London, 1964.
- SALISBURY G. W. AND VAN DEMARK V. L. Fis. de la Rep. e Insem. Artf., Zaragoza, 1964.
- SCHMIDT G. AND THANNHAUSER S. J. Un método para la determinación de ácidos nucleicos. *Acta Bioq. y Biof.*, 166, 48, 1968.