

Inmunolocalización de acuaporinas 1, 7 y 11 en espermatozoides caninos epididimales

Imunolocalização das aquaporinas 1, 7 e 11 em espermatozoides epididimários caninos

Immunolocalization of aquaporins 1, 7 and 11 in canine epididymal spermatozoa

Claudia Rojas¹, Irmgard Paris², Alejandra Stornelli³, Javiera Tobar⁴, Sabrina Rojas⁴

¹Escuela Medicina Veterinaria- UST-Viña del Mar-Chile; Doctorado en Ciencias Veterinarias-FCV-UNLP-Argentina.²Facultad de Ciencias-Departamento de Ciencias Básicas-UST-Viña del Mar-Chile.³FCV-UNLP-Argentina

⁴Escuela Medicina Veterinaria- UST-Viña del Mar-Chile

Abstract

Las acuaporinas (AQPs) son una familia de pequeñas proteínas hidrofóbicas que permiten el transporte de agua y pequeños solutos como glicerol y urea a través de las membranas celulares. En las células de mamíferos han sido identificadas trece isoformas (AQP0 a AQP12), que se dividen en tres familias basadas en sus características de permeabilidad y secuencia de aminoácidos. Los tres grupos de AQPS son: acuaporinas ortodoxas, aguagliceroproteínas y súper acuaporinas. Las AQPS se han identificado en espermatozoides de hombre, ratón, jabalí, toro, perro y en peces. Se ha observado que el tipo de AQPs y su ubicación es especie-específica. En el caso de los espermatozoides caninos, hasta el momento, solo existe una comunicación sobre la expresión de RNAm de AQP1 en espermatozoides eyaculados, es así que el objetivo del presente trabajo es determinar la presencia y localización de las AQP1, AQP7 y AQP11 en espermatozoides epididimales caninos. Se incluyeron en el estudio caninos mestizos, de entre 8 meses y 7 años (n=7). Las muestras fueron extraídas por la técnica de cortes repetidos desde la cola del epididimo, posteriormente los espermatozoides fueron seleccionados mediante un gradiente de densidad de dos capas (Puresperm 80/40). Para la realización de la inmunocitoquímica, los espermatozoides fueron fijados con paraformaldehído al 4% (p:v), centrifugados a 3300 rpm por 5 minutos, lavados 3 veces por 3 minutos con TBS 1X a temperatura ambiente, permeabilizados y bloqueados con TBS 1X, 0,5% TRITON X100 y 6% BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron los anticuerpos primarios anti-AQP1 (SC-25287; 1:250), anti-AQP7 (NBPI-30862; 1:250) y anti-AQP11 (GTX-47926; 1:100) durante toda la noche a 4°C y se lavaron con buffer de bloqueo 3 veces por 3 minutos. Luego se realizó la incubación con anticuerpo secundario diluido en TBS 1X y 3% BSA conjugado con Alexa Fluor® 488 (1:1000) a temperatura ambiente por 1,5 h, las muestras se lavaron 3 veces con TBS 1X por 3 minutos, se incubaron con Hoerscht por 5 min (1:10000 en buffer TE=TRIS 10 nM/EDTA 1 mM, pH: 8,0), se lavaron 3 veces con TBS 1X por 3 minutos y se montaron con solución DAKO. El análisis de las imágenes de fluorescencia se realizó con microscopio fluorescencia Axio Observer Z1 utilizando el software Axiovision 4. Los resultados preliminares indican que la AQP1 está localizada en la región post acrosomal y pieza media de los espermatozoides analizados; la AQP7 tiene marcaje en la zona superior del acrosoma y de manera difusa en la región post acrosomal, lo que difiere de otras especies como el humano y el ratón donde se ha identificado solamente a nivel de la cola, o como en cerdos donde se ubicó en la pieza media y cola, sin embargo, su localización en caninos es similar a la encontrada en toros donde se identificó en la pieza media y región post acrosomal; finalmente la AQP11 se pudo observar en la cabeza, pieza media y cola, localización similar a lo observado en cerdos (cabeza, pieza media y más difuso en cola) y toros (cabeza y cola), resultados que difieren de lo encontrado en rata donde se sitúa en la parte distal de la cola. Se puede concluir que las acuaporinas 1, 7 y 11 están presentes en espermatozoides epididimales caninos, estableciéndose una primera comunicación sobre su inmunolocalización.

Asociación de técnicas de inseminación artificial intrauterina transcervical (TCI) y vaginal en perras

*Associação das técnicas de inseminação artificial intrauterina transcervical (TCI) e inseminação vaginal em cadelas
Association of transcervical intrauterine artificial insemination (TCI) and vaginal insemination in bitches*

Silvia Edelweiss Crusco¹, Cristina de Fátima Lucio², Antonio Carlos Dertinio Donato³

¹Universidade Paulista - UNIP - Grupo de Pesquisa em Reprodução Comparada - Brasil. ²Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES) - Brasil. ³Reprocanis - Clínica de Reprodução Cães - Cotia - SP

Abstract

A utilização da inseminação artificial no manejo reprodutivo de cães já é uma realidade. É um procedimento simples, rápido e de custo baixo. Dentre os vários os motivos que levam o tutor em optar pela utilização da inseminação estão a não aceitação da fêmea pelo macho, ou vice-versa, diferença de tamanho, diminuição de distâncias geográficas e opção de manejo do canil. O acompanhamento das fases do ciclo estral é feito com observação de comportamento reprodutivo, sintomas e sinais anatômicos e fisiológicos, citologia vaginal, dosagem do nível sérico de progesterona, vaginoscopia e ultrassonografia dos órgãos do sistema reprodutivo em especial dos ovários. Metodologia. Foram atendidas na rotina do centro de reprodução Reprocanis® 7 fêmeas com histórico de prenhez negativa das seguintes raças: 5 bulldogs, 1 braco alemão de pelo curto e 1 poodle gigante. A idade média das fêmeas era de 4 anos (2-6,5 anos). Para cada fêmea foi considerado o dia 1 do ciclo quando do início da visualização da presença de secreção sero-sanguinolenta na vulva e vagina, comportamento reprodutivo característico. A partir desta data se contou 7 dias para o início de citologia vaginal e ao ser diagnosticado estro citológico (acima de 70% de células superficiais queratinizadas) se iniciou dosagem de progesterona sérica com radioimunoensaio. O sêmen utilizado foi fresco (puro) proveniente dos machos escolhidos pelos tutores para as inseminações e colhido imediatamente antes das inseminações. Quando as fêmeas atingiram a média de 5,59 ng/ml (+/- 0,33 ng/ml) foi realizada a inseminação intrauterina (TCI) em 48 horas após. Para a TCI as fêmeas foram mantidas em estação, e com o auxílio do endoscópio visualizou-se a cérvix, e com uma sonda introduziu o sêmen no interior do útero pelo óstio cervical. O dia do cio correspondente a este procedimento foi em média dia 12 (+/- 2,19 dias). No momento de 24 horas após a TCI foi verificada a citologia vaginal e confirmado estro foi realizada a inseminação artificial via vaginal o que em média foi no dia 13 (+/- 2,36 dias). Na inseminação vaginal a pipeta é introduzida pela vulva na vagina da fêmea levemente colocada paralelo ao assoalho vaginal e introduzida até sentir mais um pouco de uma segunda resistência. O sêmen foi lentamente injetado. Imediatamente após a introdução do sêmen, a fêmea foi erguida pelos posteriores e ser mantida nesta posição por 15 minutos para facilitar a entrada do sêmen no útero de maneira gravitacional. Resultados. Todas as cadelas submetidas a associação destas duas metodologias de inseminação ficaram gestantes, portanto, este grupo teve taxa de 100% de gestação. Discussão e conclusão: a inseminação artificial vaginal é amplamente utilizada no manejo reprodutivo de cães, a inseminação artificial intrauterina com a utilização de endoscopia sempre foi reconhecida como metodologia para a inseminação com sêmen congelado/descongelado. Fatores a considerar: as fêmeas tiveram um controle rigoroso do seu ciclo estral e momento de serem inseminadas, a deposição do sêmen intrauterinamente (TCI) facilitou a maior aproximação dos espermatozoides e a segunda inseminação também aumentou a chance de fertilização. Este trabalho demonstrou que a TCI também pode e deve ser utilizada na rotina da inseminação com sêmen fresco e pode ser associada no mesmo protocolo com a inseminação artificial via vaginal.

Expresión de microRNA-7c y microRNA-34a en células foliculares caninas durante el ciclo estral

Expression of MicroRNA7c and MicroRNA34A in canine follicular cells during the estrous cycle

Expressão de MicroRNA7c e MicroRNA34A em células foliculares caninas durante o ciclo estral

Monica De Los Reyes¹, Phillip Dettleff², Jaime Palomino³

¹Laboratorio de Reproducción Animal Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile. Santiago, Chile. ²Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, P. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. ³Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Bernardo O'Higgins. Santiago, Chile

Abstract

Los micro-RNA (miRNA) son pequeñas secuencias de RNA no codificante que regulan la expresión génica a través de la desestabilización de RNA mensajeros específicos, alterando la traducción de estos. Las funciones de los microRNA están emergiendo como reguladores importantes de diversos procesos fisiológicos y patológicos. Los miRNA-7c y miRNA-34a se han predicho para los genes de los receptores de estrógeno (E2-r) y receptor de la hormona foliculo estimulante (FSH-r) respectivamente en perras; sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado su presencia en las células foliculares caninas. El objetivo de este estudio fue determinar la expresión de los miRNA miRNA-7c y miRNA-34a en células foliculares a través del ciclo estral de la perra. Los ovarios en las etapas de proestro (n=8), estro (n=9), anestro (n=12) y diestro (n=14), se recolectaron separadamente en PBS luego de una ovariectomía de rutina. Las células foliculares se recuperaron mecánicamente de los folículos antrales medianos (~0.4-5.9 mm). Luego de la extracción del RNA total se realizó y la evaluación de los niveles de expresión relativa de los miRNAs mediante análisis por q-PCR. Los resultados de expresión relativa en las diferentes etapas del ciclo se analizaron por ANOVA. La expresión de ambos miRNAs se observó en todos los estados del ciclo reproductivo, confirmando su presencia en las células foliculares caninas. Adicionalmente, se observaron diferencias ($P < 0.05$) en su expresión tanto para miRNA-7c como para miRNA-34a. En miRNA-7c hubo una disminución significativa en su expresión durante el estro, en comparación a las otras tres etapas donde la expresión fue similar. En miRNA-7c se observaron niveles más bajos ($P < 0.05$) de expresión en proestro y estro que, en anestro y diestro, encontrándose los mayores valores en diestro en relación a todas las otras etapas del ciclo. Es probable que la menor expresión de ambos miRNAs en las etapas foliculares más avanzadas del ciclo como proestro y estro, se relacione al efecto inhibitorio que cumplen los miRNA en la traducción de sus genes diana, ya que al ser reguladores negativos su función provocaría la disminución de los genes para E2-r y FSH-r. En conclusión estos miRNAs se expresan en las células foliculares caninas, los que tendrían una función dependiente del etapa del ciclo estral de la perra.

Comparación de medios de congelación de semen canino basados en yema de huevo y lecitina de soja

*Comparaçõ de meios de congelaçõ de sêmen canino a base de gema de ovo e lecitina de soja
Comparison of canine semen freezing media based on egg yolk and soy lecithin*

Rodrigues D.R.^{1*}, Freitas-Dell'Aqua C.P.¹, Dell'Aqua-Junior J.A.¹, Trinque C.M.¹; Pereira R.R.¹

¹Programa de Pós-graduação Biotecnologia Animal - Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ- UNESP Botucatu/SP

Abstract

La congelación de semen induce una serie de cambios físicos y bioquímicos que provocan daños en los espermatozoides. Este daño conduce a una caída en la motilidad de los espermatozoides después de la descongelación, cambios en la membrana plasmática y acrosomal, estrés oxidativo, entre otros, causando daños irreversibles en las células espermáticas. El uso de semen canino criopreservado está limitado por la ocurrencia de estos daños, tanto en la estructura como en la función de los espermatozoides, atribuidos al choque térmico durante la criopreservación, perjudicando su viabilidad, estos daños pueden ser reducidos con el uso de diluyentes adecuados para la crioconservación. Así, el objetivo del presente estudio es evaluar la efectividad de tres diluyentes comerciales para la congelación de semen canino a base de yema de huevo: BotuDog[®] Freezing (BotuPharma[®]), CaniPlus[®] Freeze (Minitube[®]) y lecitina de soja: DC-Crio[®] (Inpreha[®] Biotecnologia), sobre la calidad del semen después de la descongelación. Se utilizaron 10 perros de 2 a 5 años de edad con fertilidad comprobada, luego de la recolección del semen, cada eyaculado se dividió en 3 alícuotas iguales, se centrifugó a 600g por 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante y los pellets resuspendidos en el respectivos medios crioprotectores para congelar a una concentración de 100x10⁶ espermatozoides/mL, empacados en pajuelas de 0.5mL, y seguido de estabilización. La estabilización a 5°C siguió el criterio de cada fabricante, luego de la estabilización las muestras fueron acondicionadas en vapor de nitrógeno por 20 minutos luego sumergidas y almacenado en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó a 37°C durante 30 segundos. Se sometieron a un análisis computarizado de la cinética de los espermatozoides por CASA y la integridad de la membrana y el potencial mitocondrial por citometría de flujo después de la descongelación. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey. Los resultados muestran una diferencia significativa entre los medios, y los medios a base de yema de huevo mostraron mejores resultados que lo medio con lecitina de soja. El análisis de la cinética espermática mostró los siguientes resultados: % de motilidad total de 61,8±3,8, 50,6±3,1, 27,5±6,2, % de motilidad progresiva de 37,1±3,5, 32,1±3,1, 17,7±4,0, % de espermatozoides de movimiento rápido de 43,7±4,4, 38,2±3,8, 22,6±5,4, las tasas del análisis de citometría de flujo mostraron los siguientes resultados: % de integridad de la membrana acrosomal y del plasma de 54,5±4,6, 42,1±5,0, 19,2±5,7, estabilidad de la membrana plasmática de 42,8±6, 1, 33,13±3,4, 14,3±3,5, alto potencial mitocondrial de 36,4±8,4, 39,7±3,3, 16,8±4,5 para los diluyentes BotuDog[®], CaniPlus[®] y DC-Crio[®] respectivamente. A la vista de los resultados obtenidos, la explicación de que la lecitina de soja haya presentado resultados inferiores a la yema de huevo puede deberse a que las proteínas mejoran la interacción de las lipoproteínas de baja densidad con la membrana espermática, la yema de huevo contiene lípidos 12,14% y proteínas 11,15% en su composición y la lecitina de soja prácticamente solo contiene lípidos, otro hecho es que la motilidad de los espermatozoides está relacionada con la composición lipídica de la membrana plasmática, la lecitina de soja contiene una gran cantidad de ácidos grasos insaturados, los ácidos grasos insaturados mejoran la elasticidad de la membrana plasmática, pero también aumentan la acción de los radicales libres al aumentar la peroxidación lipídica. Con base en los datos, se puede concluir que la lecitina de soja no contribuyó a la protección espermática post-descongelación del semen canino, pero se necesitan más estudios para identificar qué componentes ayudan en la mejora y cuáles interfieren negativamente en la protección del semen congelado y descongelado.