

INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD EN LA COMPOSICIÓN DEL PLASMA SEMINAL OVINO

B. Barrios, R. Pérez-Pé, T. Muiño-Blanco, y J.A. Cebrián Pérez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

INTRODUCCIÓN

El plasma seminal ovino realiza un importante papel en el mantenimiento del espermatozoide a través de procesos hormonales y enzimáticos, y de modificaciones de su superficie celular. Resultados previos demuestran que la adsorción de proteínas del plasma seminal sobre la superficie espermática, recupera parcialmente las características funcionales de espermatozoides dañados por frío, reproduciendo las de las células vivas (1), (2), (3).

En el presente trabajo se investiga la hipótesis de que las diferencias estacionales en el plasma seminal pueden afectar a su capacidad para recuperar la integridad de membrana de espermatozoides sometidos a choque térmico. Se analizó el efecto de las proteínas del plasma seminal ovino obtenidas en la época reproductiva (PPSER), y no reproductiva (PPSENR) sobre espermatozoides dañados por frío, mediante distribución en contracorriente con centrifugación (CCCD) en un sistema bifásico, en ambas estaciones. Asimismo, se estudió la variación del perfil obtenido tras cromatografía en filtración en gel de las proteínas del plasma seminal de cada uno de los meses del año, analizando la variación en el contenido de aquellas fracciones que demostraron capacidad reversora del daño por choque térmico. (4).

MATERIAL Y MÉTODOS

La obtención de las muestras de semen ovino, la eliminación del plasma seminal mediante Swim-up-Dx (5), el tratamiento de las células por choque térmico, la evaluación de la integridad de membrana, la obtención de las proteínas del plasma seminal, así como los análisis mediante CCCD y los estudios comparativos de composición proteica por geles PAGE-SDS, se llevaron a cabo según se indica en el artículo de Pérez-Pé et al.(6).

La separación de las fracciones proteicas mediante cromatografía de gel-filtración en Sephacryl-100, así como el posterior procesamiento de las mismas y los estudios de reversión del daño térmico, se realizaron tal y como se ha publicado recientemente (4).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El daño del choque térmico disminuyó en gran medida la viabilidad de los espermatozoides seleccionados por swim-up, en ambos periodos reproductivos, alcanzando valores de aproximadamente un 20%.

Se analizó mediante CCCD el efecto de las proteínas del plasma seminal sobre espermatozoides dañados por frío. Se adicionó PPSER, en época reproductiva para la especie ovina (fotoperíodo decreciente, meses de Septiembre a Enero) y PPSENR en la época no reproductiva (fotoperíodo creciente, meses de Febrero a Agosto). La pérdida de heterogeneidad y viabilidad que se observó en los experimentos de CCCD, revirtió al añadir cantidades crecientes de PPSER, ya que indujeron una restauración de las características de la superficie espermática, aumentando la proporción de espermatozoides con membrana íntegra. Sin embargo, este efecto restaurador fue mucho menos apreciable al añadir a los espermatozoides sometidos a daño térmico PPSENR, incluso utilizando una concentración 6 veces superior que en el caso anterior.

Los experimentos realizados en ambas épocas (reproductiva y no reproductiva) con ambas clases de proteínas (PPSER y PPSENR), mostraron que el

efecto recuperador está relacionado con el período estacional de las proteínas aisladas del plasma seminal, más que con la estación de la muestra espermática sobre la que se estudia su efecto.

En la Tabla 1 se muestra como la adición de PPSEER a células dañadas por choque térmico produjo cerca de un 50% de reversión del daño sobre la membrana en muestras de ambas estaciones reproductivas. Sin embargo, la recuperación obtenida al añadir PPSENR fue considerablemente menor, sobre espermatozoides de ambas épocas.

Tabla 1. Efecto de la adición de PPSEER y PPSENR sobre la integridad de la membrana espermática de eyaculados de ambas estaciones.

PPS (μ g)	% Reversión			
	Espermatozoides de época reproductiva		Espermatozoides de época no reproductiva	
	PPSEER	PPSENR	PPSEER	PPSENR
700	49.51 \pm 8.57 ^a (5)	18.28 \pm 6.85 ^b (4)	35.92 \pm 3.73 ^c (4)	18.01 \pm 2.47 ^d (4)
1400	46.67 \pm 9.25 ^a (6)	20.66 \pm 3.73 ^b (5)	52.27 \pm 15.9 ^a (7)	8.49 \pm 2.61 ^b (4)

Porcentaje de espermatozoides negativos al yoduro de propidio estimados como $[(Vp60 - Vc60) / (Vs - Vc60)] \times 100$, donde Vp es la viabilidad de la muestra sometida a choque térmico y posterior adición de proteínas; Vc es la viabilidad de la muestra sometida a choque térmico; Vs es la viabilidad de la muestra tras el swim-up; y 60 indica el tiempo de incubación (min) tras la adición de proteínas. Los datos son valores medios \pm E.M. del número de experimentos indicados entre paréntesis. Los diferentes superíndices en las columnas indican diferencias significativas: a,b: P<0.05; c,d: P<0.01

Esta diferencia en la capacidad reversora puede estar relacionada con diferencias en su composición proteica, según se deduce del análisis densitométrico de las bandas proteicas presentes en el plasma seminal de diferentes periodos del año. Se detectó una importante disminución de varias bandas en los meses correspondientes a la época no reproductiva, destacando como la más acusada, la disminución de una banda en torno a 21 kD, que disminuyó hasta un 14% en los meses de verano, en relación con los meses de septiembre-enero (Tabla 2).

Al analizar los perfiles cromatográficos (Fig. 1) obtenidos tras filtración en gel en Sephacryl-100 de proteínas de cada uno de los meses del año, se observó que aquellas fracciones que demostraron capacidad para revertir el daño producido por choque térmico, G3, G7, y especialmente G6, (Barrios et al, 2000), son más abundantes en los meses de Septiembre a Enero (Fig. 2), que corresponden precisamente a la época reproductiva. Además, al analizar su composición proteica mediante electroforesis en PAGE-SDS, se observó la coincidencia de una banda de unos 20-21 kD, en cantidad apreciable en tres fracciones (y mayoritaria en G6), que aparece disminuye o no existe en las demás fracciones. Así, esta banda debería ser la responsable del efecto reparador de la integridad de membrana. Este resultado concuerda con la disminución significativa de la banda de 21 kD en el plasma seminal de período no reproductivo, lo que sugiere que se trata de la misma proteína. La variación estacional explicaría la menor capacidad reversora de las PPSENR respecto a las PPSEER, dado el menor contenido de la banda de 21 kD supuestamente responsable de la mayor parte del efecto reparador.

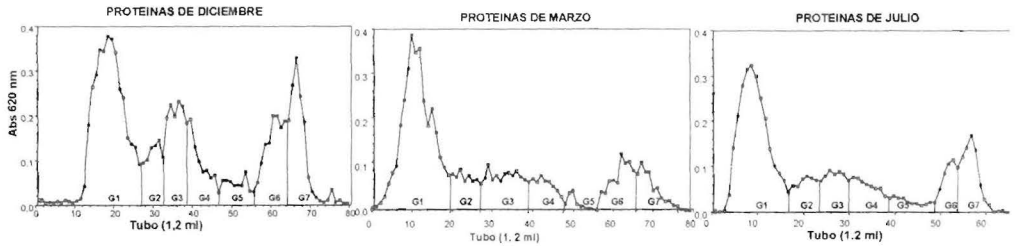


Fig. 1. Perfiles cromatográficos en matriz de Sepahcryl-100 de proteínas del plasma seminal ovino de diferentes estaciones.

Tabla 2. Cuantificación densitométrica de las áreas relativas (%) de las bandas proteicas de plasmas seminales de diferentes estaciones.

kDa	Sept- Diciembre	Enero- Mayo	Junio- Agosto
121.9	0.85	1.1	1.19
100.8	5.3	3.01	6.87
82.3	3.16	4.64	3.37
67.2	0.65	0.71	0.18
42.7	0.46	0.2	0.2
36	4.49	3.5	1.99
32.5	0.27	0.26	0.05
30.75	0.11	nd	nd
26.5	3.72	2.91	1.0
24	8.02	6.34	2.71
22.5	13.24	15.73	9.27
21.5	6.2	5.05	0.9
20.5	5.47	3.33	2.99

Nd, no detectada.

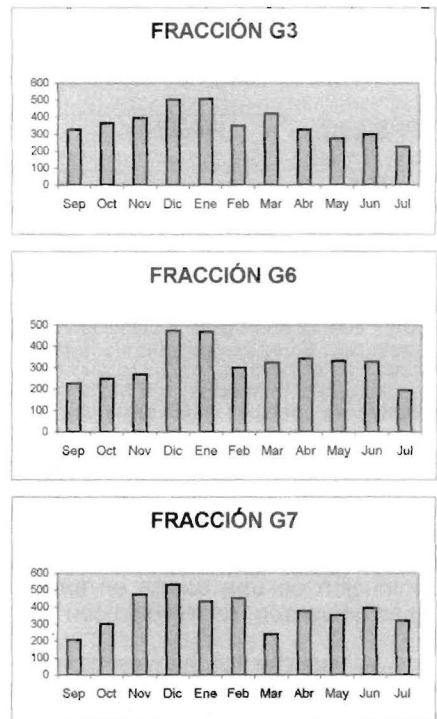


Fig. 2. Abundancia de las fracciones con efecto reversor en el plasma seminal de cada uno de los meses del año.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) N. García-López, M. Ollero, J.A. Cebrán Pérez y T. Muño-Blanco. J. Chromatogr. B, 680 (1996) 137.
- (2) M. Ollero, García López N., J.A. Cebrán Pérez y T. Muño-Blanco. Reprod. Fert. Dev., 9 (1997) 381.
- (3) Pascual M.L., Muño-Blanco T., Cebrán Pérez J.A. y López-Pérez M.J. Biol. Cell, 82 (1994) 287.
- (4) Barrios B., Pérez-Pé R., Gallego M., Tato A., Osada J., Muño Blanco T. y Cebrán-Pérez J.A. Biol. Reprod. 63 (2000) 1531.
- (5) N. García-López, M. Ollero, T. Muño-Blanco y J.A. Cebrán Pérez. Theriogenology, 46 (1996) 141.
- (6) Pérez-Pé R., Barrios B., Muño-Blanco T. y J.A. Cebrán Pérez. En prensa.

*Este trabajo ha sido financiado con las ayudas: DGA 48/99 AV y CICYT AGL 2000-1221.