

INFLUENCIA DE LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OVINOS.

P. Grasa, R. Pérez-Pé, A. Marzo, J.A. Cebrián-Pérez y T. Muño-Blanco.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

La capacitación espermática incluye una serie de cambios morfológicos y moleculares que afectan a la estabilidad y permeabilidad de la membrana celular (2, 3, 8). Diversos estudios han establecido una correlación entre la capacitación espermática y la fosforilación de residuos de tirosina de numerosas proteínas, en distintas especies de mamíferos, aunque todavía no se ha confirmado en la especie ovina.

Resultados previos demuestran que la adsorción de proteínas del plasma seminal a la superficie de espermatozoides sometidos a choque térmico por frío, revierte parcialmente los daños derivados de las bajas temperaturas (1). En el presente trabajo, se ha investigado la relación entre la fosforilación de proteínas de membrana y la capacitación de espermatozoides ovinos. El principal objetivo fue determinar si el choque por frío puede modificar el nivel de tirosinas fosforiladas, y, la influencia de las proteínas del plasma seminal sobre esta fosforilación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la obtención del semen, mediante vagina artificial, se emplearon moruecos adultos entre 2 y 4 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa aragonesa (ANGRA), mantenidos en la facultad de Veterinaria bajo condiciones nutricionales uniformes. Se utilizó una mezcla de los segundos eyaculados de cuatro moruecos, manteniendo a los animales con un período de abstinencia de dos días (5).

La metodología utilizada tanto para la preparación de las muestras de semen (por un método de swim-up/dextrano y sometidas, en su caso, a un proceso de cold-shock), su posterior evaluación, la inducción de la capacitación, la obtención de proteínas del plasma seminal y su aislamiento, así como la inmunodetección mediante Western blotting, fue la descrita por Pérez-Pé y cols. (6).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espermatozoides ovinos seleccionados por un proceso de swim-up/dextrano, en ausencia o presencia de agentes capacitantes (swim-up – y +), poseen dos proteínas (p40,p45) que contienen residuos de tirosina fosforilados, como se pone de manifiesto en las figuras 1a y 1b (calle 1). La presencia en el medio de compuestos capacitantes (Ca_2Cl y NaHCO_3) no afectó significativamente al nivel de fosforilación, ya que ambas muestras espermáticas mostraron una señal de fosfotirosina muy similar.

Sin embargo, el choque térmico por frío sí afectó a la proporción de fosfotirosinas. El análisis comparativo de los dos tipos de muestras seleccionadas, reveló que la presencia en el medio de Ca_2Cl y NaHCO_3 produjo una modificación en la fosforilación tras el tratamiento por frío (Fig.1a y 1b: calle 2). Además de aparecer una nueva banda de proteínas fosforiladas en tirosinas (p30) en las muestras de swim-up +, también se observó un importante incremento, confirmado

por cuantificación densitométrica de las bandas p40 y p45 en estas muestras, respecto a las obtenidas en swim-up (-) (Tabla 1).

Tabla 1.- Cuantificación densitométrica* de la fosforilación de tirosinas de proteínas en muestras de esperma ovino.

Banda proteica	Control	Choque térmico	Choque térmico+PPS	Cong-descong.
Swim-up -/+				
P45	43.3/57.5	57.2/29.6	15.6/13.2	4.8/8.2
P40	16.7/18.7	18.5/34.3	16.6/8.9	63.8/56.1
P30	-/1.4	-/16.8	-/-	43.1/29.3

* Valores referidos al área (% total x mm). (P n°: referido a las proteínas fosforiladas en tirosina en función de su peso molecular relativo. PPS: proteínas del plasma seminal).

Con objeto de verificar si las proteínas del plasma seminal pueden prevenir los daños por el choque frío, se determinó el efecto de la adición de proteínas del plasma seminal (PPS) a espermatozoides libres de plasma por el método swim-up/dextrano (4), antes y después del choque térmico. Este tratamiento afectó considerablemente a la calidad de las muestras espermáticas, disminuyendo el porcentaje medio de células viables del 73,1 al 23,8%. Sin embargo la adición previa de proteínas del plasma seminal (>3kda) al medio, tuvo un considerable efecto beneficioso sobre la supervivencia espermática, dependiente de la concentración adicionada (Fig. 2).

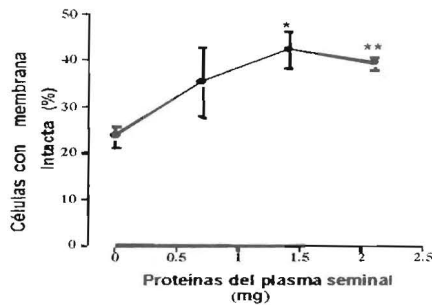


Fig.2.- Efecto de la adición de cantidades crecientes de proteínas del plasma seminal a espermatozoides ovinos sometidos a choque térmico. Resultados expresados como % de espermatozoides con la membrana intacta tras el choque térmico. Media±Error Estándar de 4 ensayos: *P<0,005; **P<0,0005.

Para valorar si el efecto de las proteínas del plasma seminal sobre los daños producidos por el frío está relacionada con la fosforilación de tirosinas, se determinó la fosforilación de proteínas aisladas de la membrana de espermatozoides sometidos a choque térmico en presencia de PPS. La desaparición de la banda p30 característica de las muestras sometidas al choque por frío (Fig. 1a y 1b: calle 3), así como el descenso cuantitativo de la señal de las proteínas p40 y p45 (Tabla 1), avalan esta hipótesis.

Para verificar si la presencia de BSA en el medio de selección utilizado tiene un efecto capacitante que pudiera afectar a los resultados, se estudió la inducción de la capacitación in vitro en muestras swim-up+, obtenidas usando un medio desprovisto de BSA. Como se muestra en la Fig. 3: calle 1, la ausencia de BSA en muestras mantenidas a temperatura ambiente no afectó a los resultados obteniendo la misma señal de fosforilación que en el control (Fig. 1a: calle 1). Por otra parte, cuando se indujo la capacitación (Fig 3: calle2), no sólo apareció una nueva banda inmunoreactiva (p70), sino que la misma banda de proteína aparecida en las

muestras sometidas a choque térmico (p30), ausente en las muestras control (Fig.3, calle1), se evidenció sensiblemente tras el tratamiento.

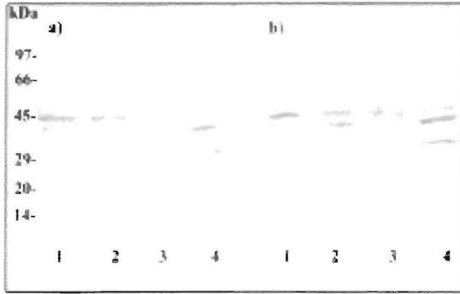


Fig. 1.- Inmunodetección de la fosforilación de tirosinas en muestras de espermatozoides ovinos. a) swim-up -; b) swim-up+; muestras control (1); sometidas a choque térmico (2); sometidas a choque térmico en presencia de 2mg de proteínas del plasma (3) y congeladas (4).

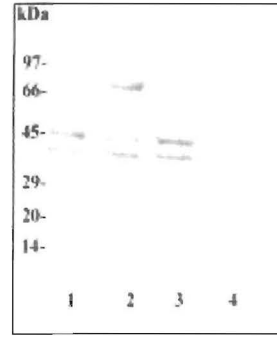


Fig. 3.- Inmunodetección del efecto de la capacitación y del choque térmico, con y sin adición de proteínas del plasma seminal, en la fosforilación de proteínas en un medio con componentes capacitantes pero desprovisto de BSA: muestra control (1), capacitada (2), sometida a choque térmico sin (3) y con adición de 2mg de PPS (4).

Estos resultados indican que la fosforilación de tirosinas de algunas proteínas observada en condiciones capacitantes, también tiene lugar durante el proceso de congelación. Además, la ausencia de BSA en el medio no afectó al efecto protector de las proteínas del plasma seminal, ya que cuando el choque térmico por frío se realizó en presencia de proteínas del plasma seminal, se encontró de nuevo una disminución en las proteínas fosforiladas (Fig. 3, calle 4).

En resumen, los resultados de este estudio ponen de manifiesto que los daños consecutivos a los tratamientos de congelación y choque térmico coinciden con la inducción de un estado de capacitación espermática prematura. Estos efectos, pueden ser prevenidos con la adición de proteínas del plasma seminal, capaces de inhibir la fosforilación de proteínas de membrana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2000. Biol Reprod 63: 1541-1547.
- 2.- Benoff S. 1993. Hum Reprod 8: 2001-.
- 3.- De Jonge CJ. 1999. J Androl 20: 463-473.
- 4.- García-López N, Ollero M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 1996. Theriogenology 46: 141-151.
- 5.- Ollero M, Muiño-Blanco T, López-Pérez M, Cebrián-Pérez JA. 1996. Int J Androl 19: 287-292.
- 6.- Pérez-Pé. 2001. Tesis Doctoral: 211-225.
- 7.- Watson, P.F. 1995. Reprod. Fert. Dev. 7: 871-891.
- 8.- Yeagle PL. 1991. Biochimie 73: 1303-1310

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