

ANÁLISIS MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE LAS PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL OVINO DE LA RAZA RASA ARAGONESA

Cardozo-Cerquera, J.A.; Vihas, L.; Cebrián-Pérez, J.A. y Muiño-Blanco, T.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Fac. de Veterinaria. Uni. de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

El plasma seminal es una mezcla de secreciones provenientes del testículo, epidídimo y glándulas sexuales accesorias [1], importante para el adecuado funcionamiento del espermatozoide, y constituye el medio natural de maduración y transporte del espermatozoide [2].

Las proteínas del plasma seminal actúan unas como factores descapacitantes [3], y otras están involucradas en la viabilidad del espermatozoide y la fertilización del oocito. Algunas proteínas del plasma seminal ovino se adsorben a la superficie del espermatozoide y ejercen un efecto reparador en la membrana lesionada al someter el espermatozoide a choque térmico por frío [4, 5]. Smith et al [6] observaron la ausencia de bandas específicas de proteínas entre 20 y 70 kDa en algunos moruecos durante la estación de no-apareamiento. En 1997, Smith et al [7] observaron también que los cambios estacionales en la concentración de proteínas y en la composición proteínica del plasma seminal estaban relacionados con el volumen del semen y su concentración espermática.

La electroforesis 2D-PAGE se ha utilizado para describir y caracterizar proteínas del plasma seminal de diversas especies. El objetivo de este estudio fue establecer mediante 2D-PAGE, los cambios en la concentración mensual de las proteínas del plasma seminal de ovinos de la raza Rasa Aragonesa y su relación con los porcentajes de viabilidad, motilidad y concentración espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se realizó con semen de nueve moruecos de raza Rasa Aragonesa pertenecientes a ANGRA y estabulados en las instalaciones del SAI de la Universidad de Zaragoza. El plasma seminal se obtuvo por centrifugación del semen. Posteriormente, se filtró y se guardó a -20°C hasta su uso. Se determinó la concentración, motilidad y viabilidad de la muestra. La concentración de proteínas del plasma se determinó por el método de Bradford. La 2D-PAGE se realizó de acuerdo al método descrito por O'Farrell et al [8]. La tinción del gel se realizó con Sypro Ruby y se analizó con el software PDQuest de Bio- Rad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron un total de 252 proteínas, con pesos moleculares entre 12,5 y 83,9 kDa, y puntos isoelectrónicos (pIs) entre 4,2 y 7,6, resultados similares a los descritos por Souza et al [9]. El 86,1% de las proteínas detectadas (217) muestran pIs por debajo de 7,0, lo que demuestra que la gran mayoría de ellas son ácidas.

Cuatro proteínas (4101, 2102, 6201 y 4102) de bajo peso molecular (15,1, 15,7, 21,0 y 15,9 kDa), y pIs ácidos (5,9, 5,3, 6,6 y 5,7), presentaron la mayor concentración (11,2, 9,3, 7,7 y 4,7%, respectivamente). Resultados similares han sido publicados por Souza et al [9], que describieron tres proteínas ácidas (14,2, 15,7 y 15,3 kDa; pIs 5,0, 5,1 y 5,4), en moruecos que presentaban una alta motilidad progresiva de sus espermatozoides.

Catorce proteínas presentaron variaciones mensuales significativas en su concentración (tabla 1).

Tabla 1. Ubicación en el mapa electroforético (SSP), peso molecular (Mr), punto isoeléctrico (pI) y porcentajes de concentración mensual de 14 proteínas que presentan variaciones mensuales significativas en su concentración.

SSP	Mr	PI	EN	FB	MR	AB	MY	JN	JL	AG	SP	OC	NV	DC
0601	46.7	4.5	0.20	0.40		0.30	0.50	0.85	0.57	0.30	0.15	0.20	0.10	0.15
0602	44.9	4.6	0.37	0.40	0.37	0.57	0.40	0.93	0.77	0.43	0.30	0.20	0.37	0.23
1002	13.9	4.7	0.83	0.20	1.15	0.40	0.20		0.20	0.35	0.70	1.35	0.35	
2505	41.3	4.9	0.90	0.55	0.23	0.50	2.43	1.23	0.23	0.30	0.13	0.20	0.10	0.20
2901	73.2	5.0	0.47	0.40	0.43	0.70	0.43	0.50	0.55	0.20	0.13	0.33	0.25	0.63
3301	24.4	5.4	2.27	2.23	4.53	2.50	1.40	0.30	1.77	1.97	3.20	2.93	2.03	1.73
3504	40.5	5.3	0.53	2.50	1.17	1.43	3.33	3.27	1.15	1.80	0.60	0.37	0.63	0.80
4102	15.9	5.7	4.13	2.57	1.93	1.80	7.70	5.60	5.47	6.13	3.80	5.20	6.20	5.83
4502	39.8	5.7	2.73	3.10	2.33	2.33	2.33	2.23	1.07	1.97	1.00	1.53	1.90	1.73
4803	69.3	5.7	0.25	0.27	0.10	0.10	0.23	0.15	0.10	0.15	0.70	0.65	1.00	0.57
5201	21.5	6.3	1.30	0.73	1.23	1.57	1.80	1.97	1.67	1.83	1.57	1.57	1.30	0.90
6101	16.1	6.5	0.30	0.30	0.50	0.43	0.63	0.67	0.67	0.83	0.83	0.95	0.77	0.87
7902	70.8	6.7			0.10	0.40	0.20	0.20			0.20	0.20		0.10
8301	24.7	6.9	0.67	0.60	0.80	1.30	1.50	1.13	1.60	1.37	0.67	1.07	0.8	1.00

Las proteínas 0601, 0602, 2505, 2901, 3504, 4502, 5201 y 8301 presentan un descenso en sus concentraciones ($p < 0.05$) a partir del mes de agosto, posiblemente en respuesta a las elevadas temperaturas durante los meses de verano. La concentración de la proteína 2901, presenta una correlación directa (40%, $p < 0.05$) con el porcentaje de espermatozoides viables del eyaculado. Lo fundamental de este hecho radica en que incide sobre uno de los factores que más importancia tiene en el inicio del proceso de fertilización, como es la integridad de membrana del espermatozoide. La membrana debe estar íntegra para que la reacción del acrosoma se lleve a efecto. Este hecho sugiere que esta proteína podría actuar como agente protector de membrana. Las proteínas 0601, 2505 y 3504 presentan correlación inversa (49, 46 y 54% respectivamente, $p < 0.05$) con el porcentaje de espermatozoides motiles del eyaculado, lo que podría explicar la razón del mantenimiento de la motilidad en valores aceptables, durante los meses de estrés calórico. Las proteínas 4102, 4803, 6101 y 7902 presentan mayor concentración ($p < 0.05$) en los meses del segundo semestre. Las concentraciones de las proteínas 4102 y 6101 presentan correlaciones inversas (34 y 37%, $P < 0.05$) con los porcentajes de espermatozoides viables del eyaculado, de tal forma que pueden estar actuando como factores desestabilizadores de la membrana en los meses de estrés calórico. Así mismo, la proteína 4102 muestra una correlación inversa (36%) con la concentración de espermatozoides del eyaculado, lo que sugiere que de alguna forma se relaciona con la producción de espermatozoides por el testículo.

Las proteínas 1002 y 3301 no presentan una tendencia definida en su comportamiento, aunque la concentración de la proteína 1002, presenta una correlación directa (49%, $p < 0.05$) con el porcentaje de espermatozoides motiles del eyaculado. Estos resultados permiten sugerir que en el plasma seminal de machos ovinos de la raza Rasa Aragonesa existen proteínas cuyas concentraciones se afectan significativamente durante los meses calurosos del verano, y respaldan los datos encontrados por Smith et al [6]. De otra parte, los diversos grados de

correlación encontrados entre los valores de concentración de algunas de estas proteínas y las variables que evalúan la calidad seminal, permiten sugerir que existen interacciones entre ellas, y que de su adecuada interacción dependerá el éxito en el funcionamiento del espermatozoide.

Diecisiete proteínas no presentaron variación mensual en sus concentraciones, pero correlacionaron en algún grado con los porcentajes de motilidad, viabilidad y concentración espermática del eyaculado, como se describe a continuación.

De nueve proteínas cuyas concentraciones se correlacionan con la motilidad individual progresiva, dos (5903 y 3503) lo hacen inversamente (38,5 y 38,2%, $p < 0,05$), lo que hace suponer que ejercen efectos negativos sobre esta función. Contrario a lo anterior, las otras siete proteínas (0401, 1001, 1404, 3001, 7202, 8202 y 9103) tienen una correlación directa, que explicaría en parte el hecho de encontrar buenos porcentajes de motilidad en los eyaculados analizados durante el estudio.

Las proteínas 3502, 3503, 8201 y 7101 correlacionan directamente con los porcentajes de espermatozoides viables (43,5, 36,9, 42,8 y 33,8% respectivamente), y sugiere su importancia en el mantenimiento de la integridad de la membrana.

De cinco proteínas que correlacionan con la concentración espermática del eyaculado, tres correlacionan inversamente, lo que sugiere que pueden estar relacionadas con el descenso en la producción de espermatozoides por el testículo.

En vista de estos resultados, se puede concluir que las proteínas cuya concentración correlaciona con la motilidad individual progresiva y aquellas que lo hacen con la concentración espermática del eyaculado, podrían interactuar entre ellas para tratar de establecer los correspondientes equilibrios que garanticen el éxito de la participación del espermatozoide en el proceso reproductivo. Por su parte, las proteínas que se correlacionan con los porcentajes de espermatozoides viables del eyaculado, parecen presentar un efecto beneficioso que garantiza el mantenimiento de la integridad de la membrana del espermatozoide.

Este trabajo ha sido financiado por las ayudas CICYT-FEDER AGL 2002-00097, INIA RZ-03-035 Y CICYT-FEDER AGL 2004-02882

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Manjunath, P., Chandonnet, L., Leblond, E., and Desnoyers, L. Biol Reprod, 1993, 49: 27-37.
- [2] Mortarino, M., Tedeschi, G., Negri, A., Cecilian, F., Gottardi, L., Maffeo, G., and Ronchi, Severino. Electrophoresis, 1998, 19: 797-801.
- [3] Brandon, C.I., Heusner, G.L., Caudle, A.B. and Fayrer-Hosken, R.A., Theriogenology, 1999, 52:863-873.
- [4] Barrios, B., Pérez, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T, et al. Biol Reprod, 2000, 63, 1531-1537.
- [5] Garcia-Lopez, N., Ollero, M., Cebrian-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. J Chromatograph B, 1996, 680:137-143.
- [6] Smith, J.F., Parr, J., Murray, G.R.M., McDonald, R.M. and Lee, R.S-F. Proc N Zealand Soc of Anim Product, 1999. 59:223-225.
- [7] Smith, J.F., Parr, J., Smith, J.K., Briggs, R.M., Duganzich, D.M. Proc N Zealand Soc of Anim Product, 1997. 57:259.
- [8] O'Farrel, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrel, P.H. Cell, 1977, 12:113-1142.
- [9] Souza, C.E., Moura, A., Oliveira, J.T., Radis-Baptista, G. Araujo, A. And Lima, A. J Androl, 2004, Supp: 91.