EFECTO DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA SUPERFICIE DE ESPERMATOZOIDES OVINOS

N. García-López, M. Ollero, T. Muiño-Blanco y J.A. Cebrián-Pérez. Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Fac. Veterinaria.Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

Es un hecho aceptado que la funcionalidad del espermatozoide reside principalmente en su membrana. Por ello, todos los procesos que modifiquen la morfología o funcionalidad de la misma van a afectar la capacidad reproductiva de los espermatozoides. Al someter las células espermáticas ovinas a choque térmico, se produce una desorganización de la bicapa lipídica de la membrana plasmática y, como consecuencia, un descenso de la funcionalidad del espermatozoide. Dicho efecto se puede ver modificado por la presencia de distintos componentes del plasma seminal, tanto ovino como bovino, que se refleja en los valores de motilidad y viabilidad celular. Así mismo, las modificaciones producidas en la membrana se pueden estudiar mediante la técnica de distribución en contracorriente con centrifugación (CCCD), que posee una gran capacidad para detectar pequeños cambios en la superficie celular, y es capaz de separar fracciones de espermatozoides con distinta viabilidad [3].

MATERIAL Y MÉTODOS

Como material biológico se empleó semen ovino procedente de tres moruecos de raza "Rasa Aragonesa" obtenido mediante vagina artificial. Las extracciones se efectuaron cada dos días y se utilizó en todos los casos el semen procedente de las mezclas de los segundos eyaculados de los tres moruecos.

Las células se lavaron mediante un procedimiento de "swim-up" dextrano [2]. Este método es una modificación del descrito por Alvarez y cols. [1] para semen humano, y permite incrementar los valores de motilidad y viabilidad de la muestra inicial.

La concentración, motilidad y viabilidad de las muestras se determinó como se describe previamente [3]. El choque térmico por frío se efectuó según el procedimiento descrito por Watson y cols. [4]. El medio se eliminó por filtración en filtros Millipore de 5 μm de poro y las células se resuspendieron en medio de bifase. Sobre estas muestras se realizaron cromatografías de reparto en una unidad de distribución en contracorriente con centrifugación (CCCD). Para estudiar el efecto de los diferentes plasmas seminales y de sus correspondientes fracciones proteicas, éstos se depositaron tanto en las cámaras de carga de la CCCD como en las cuatro cámaras anteriores a ésta a las concentraciones indicadas en cada caso. En todos los casos se realizaron procesos de 29 transferencias.

RESULTADOS

La motilidad tras el choque térmico resultó practicamente inapreciable y la viabilidad descendió desde un 65% hasta un 18% después del choque térmico. En la unidad de CCCD se cargaron 1800 x 10^6 células.

Como se puede apreciar en la figura 1 el choque térmico desplaza el perfil de CCCD hacia la izquierda, como cabría esperar para valores de viabilidad más bajos, lo que indica la existencia de alteraciones importantes en la membrana.

Dada la gran discrepancia existente respecto a los posibles efectos beneficiosos o perjudiciales del plasma seminal y respecto a la fracción del mismo responsable de dicho efecto, se procedió al estudio del plasma completo y de las proteínas plasmáticas aisladas tanto de plasma seminal ovino (PSO) como bovino (PSB). Así mismo, se estudió el efecto de las proteínas plasmáticas ovinas y bovinas en presencia de la fracción libre de proteínas de la otra especie. Se ensayó la fracción libre de proteínas del plasma seminal bovino (PBLP) y las proteínas plasmáticas ovinas (PPO), (PLPB/PPO), y de manera análoga se ensayó la fracción libre de proteínas del plasma ovino (POLP) y las proteínas plasmáticas bovinas (PPB), (POLP/PPB).

La figura 1b muestra que al añadir un 1% de plasma seminal bovino a una población espermática sometida a choque térmico, aumenta la afinidad de los espermatozoides por la fase superior, desplazándo el perfil hacia la derecha. Sin embargo, en presencia de PSO (Fig.1.c) aumenta el porcentaje de espermatozoides afines por la fase inferior, es decir, desplaza el perfil hacia la izquierda, que corresponde a la zona de menor viabilidad celular.

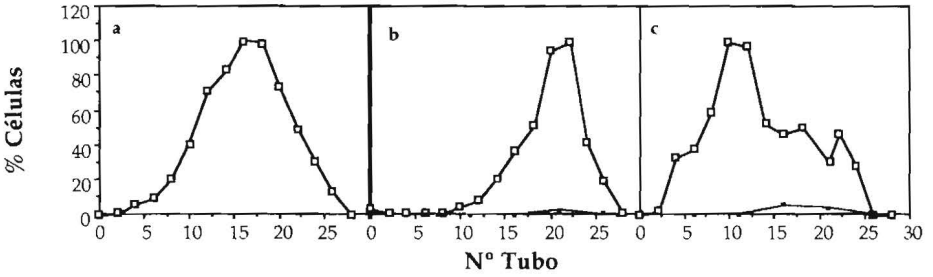


Fig 1.- Perfil de distribución en contracorriente con centrifugación de espermatozoides ovinos sometidos a choque térmico (a), en presencia de 1 % PSB (b) y 1 % PSO (c).

Se ha descrito que, una vez modificada la membrana mediante choque térmico, resulta imposible volver a establecer la integridad de la misma. Se abordó, por tanto, el estudio del efecto de la fracción libre de proteínas y de la fracción protéica de ambos plasmas seminales a fín de conocer si las modificaciones que pudieran aparecer se debían a un efecto específico de las proteínas plasmáticas. En todos los casos se cargaron 90 μg de proteínas en las cámaras indicadas. Los resultados obtenidos se exponen en la figura 2. Se puede observar que tanto con PPB (a) como con PPO (b), el perfil se desplaza hacia la derecha, resultando también incrementado el porcentaje de espematozoides viables obtenidos tras el proceso de CCCD, especialmente en el caso de PPO. Se observa también cómo el efecto beneficioso se debe a una acción específica de las proteínas seminales, ya que la BSA no ejerce ninguna acción positiva sobre el perfil obtenido, como tampoco la ejercen las PPO desnaturalizadas.

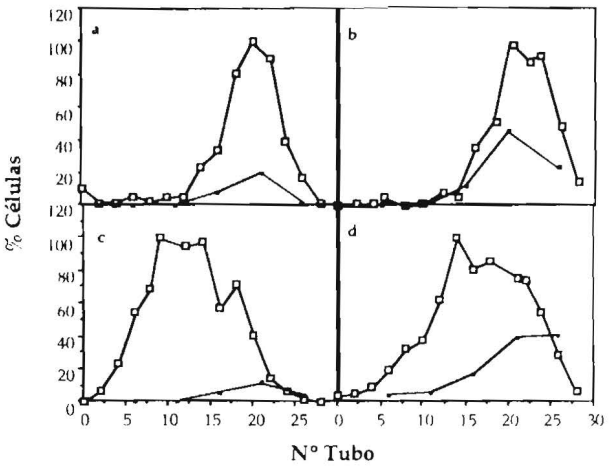


Fig 2. Perfil de CCCD de espermatozoides ovinos sometidos a choque térmico en presencia de PPB (a), PPO (b), BSA (c) y PPO desnaturalizadas (d).

Las fracciones libres de proteínas de ambos plasmas seminales no muestran modificaciones apreciables respecto al perfil obtenido tras choque térmico (resultados no mostrados). Sin embargo, el ensayo de los "plasmas cruzados" reveló que las PPO aumentaban la afinidad por la fase superior de los espermatozoides sometidos a choque térmico, en presencia de PBLP (Fig.3.a), mientras que las PPB perdían su efecto en presencia de POLP (Fig.3b).

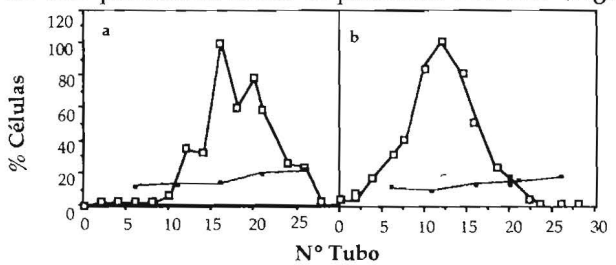


Fig 3. Perfil de CCCD de espermatozoides ovinos sometidos a choque térmico en presencia de PBLP/PPO (a) y POLP/PPB (b)

Como conclusión, las proteínas del plasma seminal ovino y bovino adsorbidas a la superficie celular incrementan la hidrofobicidad de los espermatozoides ovinos. Dicha adsorción se ve dificultada por algún compuesto existente en el plasma seminal ovino.

BIBLIOGRAFIA

1. Alvarez, J. G., J. L. Lasso, L. Blasco, R. C. Nuñez, S. Heyner, P. P. Caballero and B. T. Storey. Human Reprod. **8** (7): 1087-1092, 1993.

2. García-López, N., M. Ollero, T. Muiño-Blanco and J. A. Cebrian-Pérez. Vth Spanish-Portuguese Congress of Biochemistry. 1994.

3. Pascual, M. L., T. Muiño-Blanco, J. A. Cebrián-Pérez and M. J. López-Pérez. J. Chromatogr. **617**: 51-57, 1993.

4. Watson, P. F. "The effects of cold shock on sperm cell membranes." Effects of low temperatures on biological membranes. Morris and Clarke ed. 1981 Academic Press. London.