# REVERSION DEL EFECTO DE AGENTES DESESTABILIZADORES DE LA MEMBRANA ESPERMATICA MEDIANTE LA ADSORCION DE PROTEINAS PLASMATICAS

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

## *INTRODUCCION*

La influencia del plasma seminal en la supervivencia y en la capacidad fecundante del espermatozoide constituye una cuestión aún sin resolver. Aunque existen datos contradictorios al respecto, parece aceptado que el plasma seminal contiene componentes estabilizadores de la membrana, que se han definido como agentes descapacitantes (1, 2). Estudios previos de distribución en contracorriente con centrifugación han demostrado la capacidad de los componentes de elevado peso molecular del plasma seminal para revertir, al menos parcialmente, los efectos negativos producidos sobre la superficie celular, tanto por el choque térmico por frío o *cold shock* (3) como por la extracción de componentes de membrana por concentraciones bajas de Tween-20 (4).

En este trabajo se ha analizado la relación del efecto reversor con la concentración de proteínas plasmáticas presentes en el medio, así como la naturaleza de dicho proceso de reversión y la influencia del método de lavado en su eficacia.

## *MATERIAL Y METODOS*

Se utilizó semen ovino procedente de tres moruecos de raza Salz, obtenido mediante vagina artificial. Las extracciones se realizaron cada dos días y se empleó en todos los casos semen procedente de mezclas de los segundos eyaculados. Las células se lavaron mediante la técnica de *swim-up* dextrano (5) o mediante filtración en filtros Millipore. En el primer caso, el medio mHTF se eliminó tras el proceso mediante filtración (4). La fracción proteica de plasma seminal se obtuvo por centrifugación a través de una membrana de 10 kDa de corte. El *cold shock* se realizó según el método citado por Watson y cols. (6), y el Tween-20 se aplicó según el descrito por Ollero y cols. (4). Sobre las muestras lavadas se realizaron cromatografías de reparto en una unidad de distribución en contracorriente con centrifugación (CCCD). El sistema bifásico utilizado estaba compuesto por Dextrano T-500 5,5% (p/p), PEG 6000 2% (p/p), Ficoll 400 10,5% (p/p), sacarosa 0,25 M, EGTA 0,1 mM, tampón fosfato sódico 4 mM (pH 7,5), 10% (v/v) 10x tampón Hepes (glucosa 50 mM, Hepes 100 mM, KOH 20 mM; pH 7,5). Las fracciones proteicas del plasma seminal se depositaron en las cámaras de carga de la CCCD y en las cuatro anteriores. En todos los casos se realizaron 29 transferencias. La viabilidad (integridad de membrana) se determinó según la tinción de fluorescencia descrita por Harrison y cols. (7).

## *RESULTADOS Y DISCUSION*

Las muestras se dividieron en dos alícuotas, a cada una de las cuales se aplicó un método diferente para eliminar el plasma seminal. Una vez lavadas, las células fueron sometidas a choque térmico o a la acción del Tween-20.

El *cold shock* provocó una disminución de la heterogeneidad poblacional y de la hidrofobicidad superficial de los espermatozoides, con desplazamiento del

perfil a la izquierda del diagrama, así como una reducción muy significativa de la proporción de células con la membrana íntegra (Fig. 1 a y b).

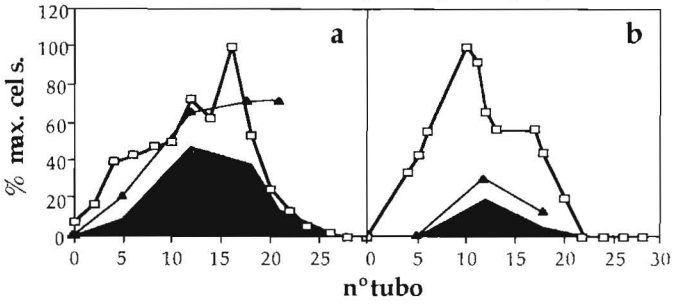



**Fig. 1**.- Perfil de CCCD de espermatozoides ovinos separados del plasma seminal por *swim-up*. (a) Control. (b) Sometido a choque térmico. (□) % de células en cada cámara respecto al máximo, (▲) % de células viables en cada cámara, ■ distribución de las células viables totales.

El resultado de la incorporación de concentraciones crecientes de proteínas plasmáticas sobre espermatozoides separados por *swim-up* se puede apreciar en la Figura 2, observándose un desplazamiento progresivo de la población principal a la derecha del diagrama y un incremento de la población de espermatozoides viables (Fig. 2 a, b, c y d). Este efecto dependiente de la concentración no se aprecia al analizar muestras desprovistas de plasma mediante filtración (Fig. 3).

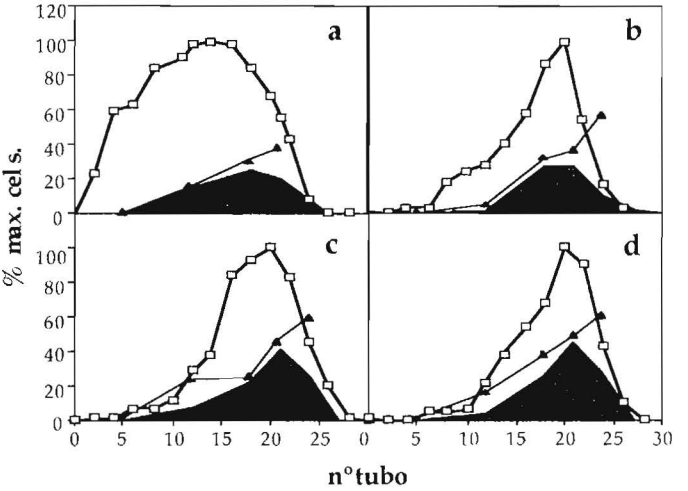



**Fig. 2**.-Efecto de (a) 37,5 μgr, (b) 112,5 μgr, (c) 150 μgr y (d) 225 μgr de proteínas de plasma seminal añadidas en la cámara de carga y en las cuatro anteriores, sobre el perfil de CCCD de espermatozoides ovinos separados del plasma seminal por *swim-up* y sometidos a choque térmico. (□) % de células en cada cámara respecto al máximo, (▲) % de células viables en cada cámara, ■ distribución de las células viables totales.

Los datos reflejados en la Tabla 1 muestran la recuperación de la viabilidad espermática como consecuencia de la adición de la fracción proteica del plasma seminal a células previamente dañadas mediante *cold shock* o Tween-20, correspondiendo a pruebas realizadas en tubo de ensayo. Así mismo, se puede observar el diferente efecto en función del método utilizado para eliminar el plasma seminal. Así, una proporción elevada de las células lavadas mediante *swim-up* recuperaron al cabo de 6 horas un alto porcentaje de la integridad de membrana

(53 y 62%). Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre la viabilidad del control y de las células sometidas a filtración.

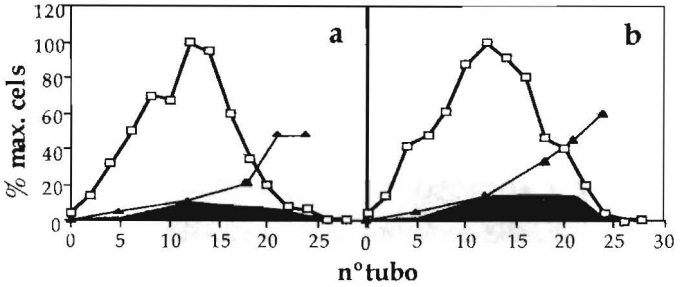



**Fig. 3**.-Efecto de (a) 90µgr y (b) 778 µgr de proteínas de plasma seminal añadidas en la cámara de carga y en las cuatro anteriores, sobre el perfil de CCCD de espermatozoides ovinos separados del plasma seminal por filtración y sometidos a choque térmico. (□) % de células en cada cámara respecto al máximo, (▲) % de células viables en cada cámara, ■ distribución de las células viables totales.

**Tabla 3.-** Efecto de las proteínas de plasma seminal sobre la supervivencia de los espermatozoides ovinos obtenidos por *swim-up* y sometidos a choque térmico (% espermatozoides con la membrana integra)

| | cold shock | | | | Tween | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | swim-up | | filtrado | | swim-up | | filtrado | |
| tiempo | control | +proteínas | control | +proteínas | contr+BSA | +proteínas | contr+BSA | +proteínas |
| 5 min | 20 | 24 | 23 | 10 | 37 | 76 | 2 | 0 |
| 20 min | 15 | 33 | 18 | 9 | 24 | 75 | 0 | 0 |
| 40 min | 11 | 50 | 18 | 4 | 36 | 77 | 3 | 0 |
| 60 min | 2 | 47 | 20 | 7 | 20 | 60 | 0 | 0 |
| 6 horas | 4 | 53 | 28 | 6 | 7 | 62 | 0 | 0 |

Estos resultados permiten concluir que la recuperación de la integridad de membrana es dependiente de la concentración de proteínas incorporada al medio. Esta reversión parece producirse mediante adsorción de componentes plasmáticos a la superficie del espermatozoide. La reproducción en tubo de ensayo del efecto detectado mediante CCCD demuestra que no se trata de un fenómeno asociado al reparto, sino que existe una recuperación de la integridad de membrana y una incorporación a ésta de componentes macromoleculares. Finalmente, el método de lavado por filtración provoca la pérdida o modificación de ciertos componentes de la membrana que impide la adsorción de dichas macromoléculas. Es necesario un fraccionamiento exhaustivo del plasma seminal para comprobar qué componente o componentes del mismo son responsables de este efecto, de inmediata aplicación desde el punto de vista del mantenimiento de la capacidad fecundante en dosis dirigidas a inseminación artificial.

## *BIBLIOGRAFIA*

1.Adeoyaosiguwa,S. A. y Fraser L. R. (1996). *Mol Reprod Dev* 44, 111-120
2.Cross N. L. (1996). *Biol Reprod* 54, 138-145.
3.García-López N., Ollero M., Cebrián-Pérez J.A. y Muiño-Blanco T (1996) *J Curom B* 680, 137-143.
4.Ollero M., García-López N., Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez J.A. y Muiño-Blanco T. (1997) *Reprod Fert Dev* 9, (en prensa).
5.García-López N.,Ollero M.,Muiño-Blanco T y Cebrián-Pérez J.A.(1996)*Theriogenology* 46,141-151.
6.Watson P.F. (1981) "The effects of cold shock on sperm cell membranes" en *Effects of low temperatures on biological membranes* (G.J. Morris y A. Clarke) 189-218. Academic Press London.
7 Harrison R.A.P. y Vickers,S.E. (1990) *J Reprod Fert* 88, 343-352.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del proyecto AGF 94-0614.