IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA PROTEÍNA DEL PLASMA SEMINAL QUE PROTEGE A LOS ESPERMATOZOIDES FRENTE AL DAÑO DEL FRÍO

B. Barrios, M. Fernández-Juan, J.A. Cebrián-Pérez y T. Muiño-Blanco.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

El aumento de la sensibilidad espermática al choque térmico por frío o *cold-shock* de los espermatozoides ovinos eyaculados con respecto a los de epidídimo, se ha atribuido a la adsorción de proteínas plasmáticas (1, 2). Algunas proteínas plasmáticas tienen por función estabilizar la membrana hasta el momento adecuado, para que la CA tenga lugar en las inmediaciones del ovocito. Diversos trabajos relacionan los daños provocados por el frío y la baja tasa fertilizante con una prematura capacitación (CA) (3, 4). Resultados previos de nuestro equipo de investigación han demostrado que la adsorción de proteínas del plasma seminal (PPS) a la superficie de espermatozoides ovinos sometidos a *cold-shock*, repara los daños producidos por el frío (5). También hemos comprobado que la capacidad protectora de las PPS está relacionada con la inhibición de la fosforilación de proteínas de la membrana que ocurre durante la capacitación.

En el presente trabajo, se ha investigado si las PPS son también capaces de proteger frente a dicho daño, al ser añadidas previamente al *cold-shock*. Asimismo, se comprobó que dicha capacidad se debe a dos proteínas del plasma seminal de 14 y 20 kDa. Dado que el papel descapacitante se manifiesta en muchos casos en una liberación de las proteínas tras la CA (1), mientras que otras proteínas se liberarán posteriormente durante la reacción acrosómica (RA), se realizó un análisis de los cambios cuantitativos de las proteínas de 14 y 20 kDa debidos a la CA y RA .

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó una mezcla de los segundos eyaculados de cuatro moruecos, pertenecientes a ANGRA, mantenidos con un periodo de abstinencia de dos días.

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 y valoración de la CA y la RA, la obtención de proteínas del plasma seminal y su aislamiento, así como la inmunodetección mediante Western-blot, fue la descrita previamente (5, 6, 7). La inmunodetección de proteínas sobre la superficie espermática se hizo mediante inmunofluorescencia indirecta. Las células se fijaron con formaldehído sobre cubres pretratados con polilisina, y tras bloquear con BSA las posibles regiones de unión inespecífica, se incubaron con el anticuerpo primario policlonal, y, después de lavar, se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adición de PPS antes de someter a los espermatozoides al *cold-shock*, tuvo un efecto beneficioso inmediato sobre la supervivencia espermática, dependiente de la concentración de proteínas añadidas al medio. En presencia de 1.4 mg de PPS se obtuvo un 43.3±4,2 % de células viables frente a un 24.6±2,1 % en una muestra control que contenía 2,1 mg de BSA.

De todas las fracciones proteicas separadas del plasma seminal mediante cromatografía en gel filtración, la que presentó mayor efecto protector fue la G6, que

también habíamos descrito como capaz de reparar los daños del frío (5). A partir de esta fracción, se purificaron por electroforesis y posterior electroelución dos bandas de proteínas de 14 y 20 kDa, y se comprobó que ambas son capaces de proteger frente al daño producido por el cold-shock sobre la integridad de membrana, mostrando la de 14 kDa una capacidad algo superior (Fig. 1).

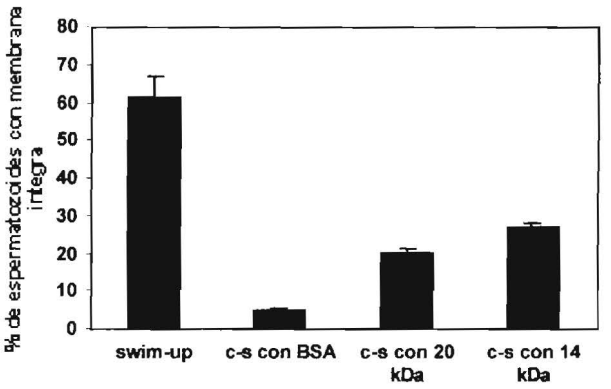


Fig. 1: Porcentaje de espermatozoides viables 30 min. después de someterlos a *cold-shock* con 1,4 mg de BSA (control), 1,4 mg de la banda de 20 kDa, y 1,4 mg de la banda de 14 kDa.

Mediante anticuerpos generados frente a ambas proteínas se analizó por Western-blot su contenido en la membrana espermática, y sus modificaciones debidas a los procesos de capacitación y reacción acrosómica. La cuantificación densitométrica de las áreas (Fig. 2) permitió deducir que tras 5 horas de incubación en condiciones capacitantes, la proteína de 14 kDa se libera parcialmente, permaneciendo todavía en la membrana cerca de un 60%. Sin embargo, las proteínas de 20 kDa se liberan ya durante las primeras horas de capacitación, permaneciendo sólo un 42% después de 5 horas. Este hecho podría sugerir un papel descapacitante para la proteína de 20 kDa, contribuyendo su pérdida parcial al inicio de la capacitación.

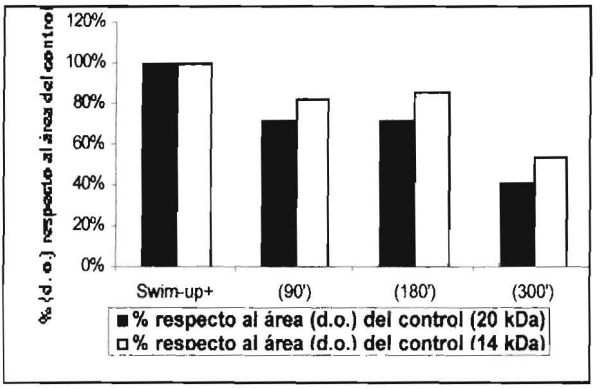


Figura 2: Cuantificación densitométrica de las áreas de las proteínas de 14 y 20 kDa en extractos de la membrana espermática de una muestra control sin capacitar y tras, 90, 180, y 300 minutos de incubación en condiciones capacitantes.

Después de la inducción de la RA sobre espermatozoides previamente capacitados, sólo un 35% de la proteína de 14 kDa permanece en la membrana (Fig.3). La banda de 20 kDa, se ve menos afectada por este proceso. El hecho de existir todavía una proporción apreciable de ambas proteínas en la membrana tras CA y RA, podría sugerir un papel en la unión entre gametos.

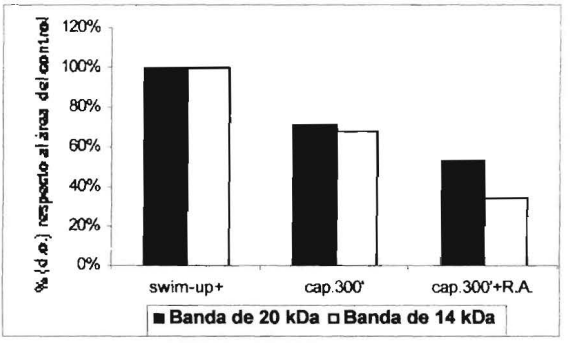


Figura 3: Cuantificación densitométrica de las áreas de las proteínas de 14 y 20 kDa en la membrana espermática de una muestra control, capacitada y reaccionada.

La inmunodetección de ambas proteínas sobre la superficie espermática reveló que tras la inducción de la CA y RA ambas proteínas permanecen en cierta medida en la membrana, aunque las alteraciones que ésta experimenta provocan su migración y redistribución. Por todo ello, parecen poseer, especialmente la proteína de 20 kDA, un papel descapacitante, coincidiendo su pérdida y migración con el inicio del proceso de capacitación, aunque también la migración hacia la región ecuatorial se ha relacionado con un papel en la unión entre gametos.

Con objeto de caracterizar estas proteínas, se procedió a su secuenciación aminoterminal. Se secuenciaron un total de 34 aminoácidos para la proteína de 14 kDa y 29 para la de 20,5 kDa. La comparación de su secuencia no deja entrever ninguna relación entre ambas. La búsqueda en las bases de datos no mostró ninguna homología reseñable para la proteína de 20,5 kDa, por lo que parece tratarse de una proteína nueva (***RSVP-20: Ram seminal vesicle protein***, 20 kDa). Para la ***RSVP-14*** sí se encontraron homologías importantes, especialmente con la proteína PDC-109, también llamada BSP-A1/A2, una de las proteínas mayoritarias del plasma seminal bovino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] L. Desnoyers and P. Manjunath. J. Biol. Chem., 267 (1992) 10149.
[2] K.W. Metz, T. Berger and E.D. Clegg. Theriogenology, 34 (1990) 691.
[3] P.J.C. Ashworth, R.A.P. Harrison, N.G.A. Miller, J.M. Plummer and P.F. Watson. Reprod. Fertil. Dev., 6 (1994) 173.
[4] P.F. Watson. Reprod Fertil Dev, 7 (1995) 871.
[5] B. Barrios, R. Pérez-Pé, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muiño-Blanco and J.A. Cebrián-Pérez. Biol. Reprod., 63 (2000) 1541.
[6] J.I. Marti, J.A. CebrianPerez and T. MuinoBlanco. Journal of Andrology, 21 (2000) 541.
[7] R. Perez-Pe, J.A. Cebrian-Perez and T. Muino-Blanco. Theriogenology, 56 (2001) 425.

*** Este trabajo ha sido financiado por las ayudas CICYT AGL 2000-1221 y CICYT-FEDER AGL 2002-00097.**