VARIACIÓN ESTACIONAL EN EL PERFIL PROTEICO DEL PLASMA SEMINAL DE DOS LÍNEAS DE CONEJOS

Casares-Crespo, L., Talaván, A.M. y Viudes-de-Castro, M.P.
CITA-IVIA. Polígono de la Esperanza, nº 100. 12400. Segorbe (Castellón).
viudes_mar@gva.es

INTRODUCCIÓN

Las diferencias de fertilidad tras la inseminación artificial entre razas o machos no siempre pueden ser explicadas mediante la evaluación de la motilidad y la morfología espermática. En conejo se ha observado que semen con parámetros morfológicos y cinéticos similares, proveniente de dos líneas de conejos (A y R), daba lugar a distinta fertilidad y tamaño de camada tras la inseminación con semen fresco o congelado (Vicente et al., 2000; Mocé et al., 2003). El plasma seminal contiene una gran diversidad de proteínas, originadas mayoritariamente por el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias (Arruda-Alencar et al., 2012). Estas proteínas participan en varios eventos relacionados con la función espermática, como la maduración y la capacitación espermática, la estabilización de la membrana espermática y la interacción con el oviducto y el ovocito (Topfer-Petersen et al., 1998; Gwathmey et al., 2006). La diversidad existente en la composición proteica del plasma seminal puede explicar la variación en la capacidad y función reproductiva de distintas especies de mamíferos (Druart et al., 2013). En especies de reproducción estacional se han identificado proteínas relacionadas con la fertilidad (Killian et al., 1993; Brandon et al., 1999; Ashrafzadeh et al., 2013), con la resistencia de la membrana espermática al choque frío (Barrios et al., 2000), con la tolerancia espermática a la congelación (Goularte et al., 2014) y con la calidad seminal (Cardozo et al., 2006; Nandre et al., 2012; Kiso et al., 2013). En conejos, el plasma seminal posee un efecto positivo en el mantenimiento de la motilidad y viabilidad espermática durante su almacenamiento *in vitro* (Castellini et al., 2000). Dicho efecto ha sido asociado con las propiedades antioxidantes del plasma seminal (Arruda-Alencar et al., 2012). En conejo, Viudes-de-Castro et al. (2004) estudiaron la composición proteica del plasma seminal en las líneas A y R y observaron dos bandas específicas de línea en el perfil proteico (41 kDa en la Línea A y 13 kDa en la línea R). Sin embargo, en otro estudio con esas mismas líneas, Safaa et al. (2008) no encontraron diferencias en el perfil proteico. Ambos trabajos se llevaron a cabo en estaciones distintas, el primero de ellos en invierno y el segundo en primavera, lo que podría indicar la posible existencia de variaciones estacionales en la composición proteica del plasma seminal en esta especie.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue el estudio del efecto de la estación sobre la composición proteica del plasma seminal de las líneas de conejo A y R.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron machos pertenecientes a dos líneas de distinto origen genético, 12 machos de la línea A, de aptitud maternal, y 12 machos de la línea R, de aptitud cárnica. Los machos fueron alojados en la granja experimental del Centro de Investigación y Tecnología Animal de Segorbe (CITA-IVIA, Castellón, España). Las muestras seminales se recuperaron semanalmente a lo largo del año 2014 mediante vagina artificial. Los eyaculados fueron evaluados individualmente, tomándose una alícuota para evaluar la motilidad, el estado del acrosoma y las formas anormales presentes. Sólo aquellos eyaculados con valores superiores al 70% de motilidad y con menos del 15% de formas anormales o acrosomas dañados, fueron utilizados para constituir la mezcla heterospérmica de cada una de las líneas genéticas, siendo el resto descartados. En total, se usaron 12 mezclas heteroespérmicas de la línea R y 12 de la línea A (3 mezclas por estación). El plasma seminal se obtuvo centrifugando las muestras a 10500 rpm durante 10 minutos a 22ºC. El sobrenadante resultante se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante de esta segunda centrifugación fue almacenado a -80ºC hasta su uso. La concentración proteica total del plasma seminal se cuantificó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), utilizando BSA como patrón de proteínas (Smith et al., 1985). Una vez determinada la proteína total, se ajustó la concentración de las muestras a 5 g/L, tras lo cual

se juntaron las tres mezclas correspondientes a cada estación y se prepararon las muestras para llevar a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (4-12%). Brevemente, las muestras fueron diluidas 1:1 con Tampón Laemmli 2x (Sigma-Aldrich), calentadas a 95ºC durante 5 minutos y tras dejarlas enfriar se cargaron en el gel. El peso molecular fue estimado utilizando el marcador de pesos ProtoMetrics (National Diagnostics). Las condiciones del SDS-PAGE fueron 250 voltios durante 3 horas. Tras completarse la electroforesis, las bandas proteicas del gel fueron visualizadas mediante la tinción con Azul de Coomassie Colloidal. El perfil proteico resultante fue analizado con el software Quantity One 1-D (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Las diferencias de cantidad relativa de cada banda en función de la línea genética y de la estación del año fueron analizadas mediante un análisis de varianza con el paquete estadístico Statgraphics®Plus5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA). Los datos se presentan como medias mínimo cuadráticas ± error estándar de la media.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El perfil electroforético del plasma seminal resultó en múltiples bandas de distinta intensidad que oscilaron entre los 8 y los 250 kDa. Para llevar a cabo el análisis con el software Quantity One 1-D se seleccionaron veintiocho bandas, comunes en todas las muestras (en las dos líneas genéticas y en las cuatro estaciones). Estas veintiocho bandas representaron en promedio el 83% de la intensidad total de cada carril. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la cantidad relativa de las bandas en función de la línea genética y la estación. Entre estas bandas proteicas, ocho bandas resultaron diferentes significativamente entre líneas genéticas, la intensidad o cantidad relativa de las bandas de 236, 228, 217, 188, 169, 124, 29 y 16 kDa fue significativamente distinta entre la línea A y la R. De esas ocho bandas proteicas, la línea A presentaba significativamente valores superiores para seis de ellas, únicamente la de 169 kDa y la de 29 KDa aparecían en mayor proporción en la línea R. En el caso de las estaciones, sólo en la banda de 169 kDa se observaron diferencias significativas, siendo su cantidad relativa significativamente superior en invierno. En caprino, ovino y bovino se han observado variaciones estacionales de proteínas (La Falci et al., 2002, Domínguez et al., 2008; Sharma et al., 2014), si bien, en estas especies las variaciones son más acusadas, ya que mientras algunas proteínas están presentes a lo largo de todo el año, se producen ausencias de determinadas proteínas en función de la estación. Sin embargo, dicha variación no parece afectar a la fertilidad del semen a lo largo del año. Nuestros resultados demuestran la existencia de diferencias en la cantidad relativa de un elevado número de proteínas del plasma seminal de machos pertenecientes a la línea genética A frente a los machos de la línea R a lo largo del año. La presencia diferencial de estas proteínas podría explicar las diferencias de fertilidad observadas entre las dos líneas en trabajos anteriores (Vicente et al., 2000; Safaa et al., 2008). Por otro lado, las variaciones de la cantidad proteica relativa entre estaciones observadas en el presente trabajo coinciden con las observaciones de Nandre et al. (2013) en búfalo, donde encontraron una producción diferencial en verano frente al invierno de cuatro proteínas del plasma seminal, relacionadas con la fisiología del espermatozoide (capacidad de proporcionar una fuente energética, de modular la motilidad, o la capacidad de protección del espermatozoide), que indicaban que en invierno las funciones espermáticas eran más favorables.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que, en el caso del conejo, la composición proteica del plasma seminal varía tanto en función de la línea genética del macho como de la estación, si bien parece que el origen genético tiene un mayor peso en la variación de la composición proteica que la estación del año. No obstante, se precisan más estudios para entender cómo las proteínas del plasma seminal regulan la funcionalidad espermática e identificar aquellas relacionadas con las variaciones de fertilidad en esta especie.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Arruda-Alencar et al., 2012. Proceedings 10th World Rabbit Congress – September 3 - 6, 2012– Sharm El- Sheikh –Egypt, 395 – 399. • Ashrafzadeh et al., 2013. Int. J. Mol. Sci. 14,

15860-15877. • Barrios et al., 2000. Biol. Reprod. 63, 1531-1537. • Brandon et al., 1999. Theriogenology, 52(5): 863-873. • Cardozo et al., 2006. Theriogenology 66: 841-50. • Castellini et al., 2000. Anim. Reprod. Sci. 63, 275-282. • Domínguez et al., 2008. Theriogenology, 69: 564-573. • Druart et al., 2013. J. Prot. 91: 13-22. • Estany et al., 1989. Livest. Prod. Sci. 21:67–75. • Estany et al., 1992. Genet. Sel. Evol. 24:527–37. • Goularte et al., 2014. Anim. Reprod. Sci. 146: 165-169. • Gwathmey et al., 2006. Biol. Reprod. 75, 501-507. • Killian et al., 1993. Biol. Reprod. 49, 1202-1207. • Kiso et al., 2013. Plos One, 8(8):e71033. • La Falci et al., 2002. Theriogenology, 57:1035–1048 • Mocé et al., 2003. Theriogenology 60:115-123. • Nandre et al., 2013. Iranian J. Vet. Research, 14(1): 1-8. • Safaa et al., 2008. World Rabbit Science 16:141-148. • Sharma et al., 2014. Reprod. Dom. Anim. 49, 387-391. • Smith et al., 1985. Anal. Biochem. 150:76-85. • Topfer-Petersen et al., 1998. Andrología, 30. 217-224. • Vicente et al., 2000. VII World Rabbit Congress. Valencia. Vol A:273-277. • Viudes-de-Castro et al., 2004. 8th Annual Conference of ESDAR. Reprod. Dom Anim. 39, 4, pp. 266 (Abstract P13). WARSAW Agricultural University, Polonia.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2013-00058-00-00 del INIA. L. Casares-Crespo ha sido financiada por una beca de formación del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) y el Fondo Social Europeo.

***Tabla 1**. Cantidad o intensidad relativa (%) de las bandas significativamente diferentes del perfil proteico del plasma seminal en conejo entre línea y estación.*

Tamaño Banda	Línea			Estación				
(kDa)	A	R	E E	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	E E
236	3,54^{a}	3,56^{b}	±0,25	2,49	2,38	3,11	2,23	±0,36
228	0,82^{a}	0,34^{b}	±0,07	0,47	0,59	0,64	0,62	±0,10
217	0,48^{a}	0,14^{b}	±0,07	0,29	0,22	0,43	0,30	±0,10
188	0,91^{a}	0,39^{b}	±0,09	0,46	0,57	0,78	0,79	±0,10
169	0,59^{a}	0,87^{b}	±0,02	0,63^{a}	0,62^{a}	0,63^{a}	1,02^{b}	±0,03
124	0,91^{a}	0,46^{b}	±0,09	0,52	0,66	0,81	0,73	±0,13
29	13,83^{a}	18,08^{b}	±0,70	16,65	15,75	14,87	16,56	±0,99
16	0,33^{a}	0,12^{b}	±0,02	0,24	0,26	0,21	0,19	±0,03

E E: error estándar; ^{a,b}: valores con distinto superíndice en la misma fila y factor (línea o estación) difieren significativamente al 95% (P<0,05).

SEASONAL VARIATIONS IN SEMINAL PLASMA PROTEIN PROFILE OF TWO RABBIT LINES

ABSTRACT: In rabbits, several authors have studied the protein composition of seminal plasma of lines A and R and the results suggested the existence of seasonal variations in the protein composition of seminal plasma in this species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of season on seminal plasma protein profile of rabbit lines A and R. Results showed that eight protein bands were significantly different between genetic lines and among these, only one band was significantly different between seasons. In the remaining protein bands no significant differences were found. These results demonstrate the existence of differences in the relative amount of certain bands of seminal plasma protein profile between A and R line along the year. The differential presence of these eight proteins could explain the differences observed in fertility between these two lines in earlier studies. From this study, it can be concluded that in rabbit, genetic male line affects the protein composition of seminal plasma in a greater extent than the season. However, more studies are needed to understand how proteins regulate seminal plasma and sperm function to identify each protein with its particular effect.

Keywords*:* protein profile, season, seminal plasma, rabbit.