IDENTIFICACIÓN DE β-NGF EN EL PLASMA SEMINAL PURIFICADO DE CONEJO Y LOCALIZACIÓN DE SU RECEPTOR DE ALTA AFINIDAD (TRKA) EN EL TRACTO REPRODUCTOR MASCULINO

Sanchez-Rodriguez, A.[1], Masdeu, M.[1], Arias- Alvarez, M.[1], Lorenzo, P.L.[1], Bautista, J.M.[1], Rebollar, P.G.[2] y Garcia- Garcia, R.M.[1].
[1]Facultad de Veterinaria. UCM. [2]E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. UPM. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid. rosa.garcia@vet.ucm.es

INTRODUCCIÓN

En el plasma seminal (PS) de algunas especies, tanto de ovulación inducida como espontánea, se ha descrito la presencia de un factor inductor de la ovulación (FIO) (Adams y col., 2005). Recientemente se ha descubierto que se trata del factor de crecimiento nervioso (NGF) (Ratto y col., 2012), cuyo precursor es el pro-NGF que tiene un peso molecular ~60 kDa y varias isoformas en el rango entre 16-60 kDa (Paoletti y col., 2006). Además, se ha descrito la presencia del receptor de alta afinidad de esta proteína (TrkA) sólo en próstata, testículo y glándula seminal del tracto reproductor de conejo (Maranesi y col., 2015), pero no en otras importantes estructuras con un papel esencial en la producción de PS y en la espermatogénesis. El objetivo del presente trabajo fue localizar por inmunohistoquímica el receptor TrkA en la glándula bulbouretral y en el epidídimo e identificar por espectrometría de masas (MALDI-TOF) la presencia de esta proteína, en una fracción purificada del PS del conejo, que previamente había sido identificada por western blot (WB).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los tejidos y el PS se obtuvieron de conejos adultos reproductores de 8-9 meses de edad de raza Neozelandés x California.

Inmunohistoquímica: Para la técnica de inmunohistoquímica, se recogieron la glándula bulbouretral y el epidídimo de 4 conejos. Las muestras fueron desparafinadas y sometidas a un tratamiento con calor. Posteriormente, se trataron con suero de bloqueo caprino y se incubaron con el anticuerpo primario mouse anti-TrkA (ab86474, Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante la noche a 4ºC en cámara húmeda. Los controles negativos se incubaron sin anticuerpo primario. Después de los lavados, se añadió el anticuerpo secundario biotinilado anti-mouse (H+L) obtenido en cabra® (Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK) y se revelaron con el kit ABC Vector Elite (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU) y peroxidasa (Vector Nova RED substrate kit for Peroxidase, Vector Laboratories). Las muestras se contrastaron con hematoxilina.

Western blot y MALDI-TOF: El PS se obtuvo del eyaculado de 12 machos. El semen se diluyó 1:1 con PBS y se centrifugó a 3000 g, 30 minutos a 4ºC. Se almacenó a -20ºC hasta su utilización. La identificación de β-NGF en el PS entero se realizó mediante el análisis con WB: primeramente se realizó una electroforesis con SDS–PAGE de las muestras disueltas en la mezcla de buffer 5% 2-β-mercaptoetanol y Laemli (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Después se transfirió a membranas de nitrocelulosa, las cuales se incubaron overnight con anticuerpo monoclonal β-NGF murino (Promega, WI, USA) diluido en la solución de bloqueo. Finalmente se realizaron los lavados y se incubó con el anticuerpo secundario (donkey anti-mouse; Li.CorBiotechnology, Lincoln, Nebraska, USA). Se utilizó para su revelado el sistema Odissey Infrared (Li.CorBiotechnology). Para la separación de péptidos por la técnica de isoelectroenfoque en solución (OFFGEL-IEF) basado en punto isoeléctrico se empleó el kit 3100 OFFGEL pH 3–10 (Agilent Technologies Inc., Waldbron, Germany), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra se enfocó a 20°C a 50 µA a 20 KVh de máximo y las fracciones separadas se almacenaron de forma separada. Finalmente, se realizó el MALDI-TOF de las bandas de13-14 kDa del gel tras SDS PAGE y tinción con Coomassie. Las muestras se trataron según Sechi (2002) y se analizaron en el analizador 4800 Plus Proteomics MALDI-TOF/TOF mass

spectrometer (AppliedBiosystems, MDS Sciex, Toronto, Canada) del centro de Genómica y proteómica de la UCM. El voltaje empleado fue de 20000 V y las condiciones de 1 Kv en modo ión reflector y +/- 4 Da de precursor de masa. Para la identificación de la proteína se utilizó una base de datos hecha ad hoc y la secuencia de NGF (gi|655847230) del NCBInr utilizando la versión MASCOT v 2.3 (www.matrixscience.com) a través de Global Protein Server v 3.6 from ABSCIEX. En todas las proteínas identificadas, la probabilidad de coincidencia fijada por MASCOT fue de P< 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El receptor de TRKA se inmunolocalizó en ambos tejidos estudiados. En la glándula bulbouretral, la tinción se observó en las células glandulares (núcleo y citoplasma) y células musculares (citoplasma), mientras que en la cabeza y cola del epidídimo, el receptor aparecía en el tejido conjuntivo y en las células principales (núcleo y citoplasma) (Fig. 1). Estos resultados concuerdan con los encontrados en otras especies (glándula bulbouretral en ratas: Li y col., 2005; epidídimo en ratas y monos: Li y col., 2005, Jin y col., 2006), lo que indicaría un posible papel del NGF en estas estructuras que intervienen en la producción del PS y en la maduración del espermatozoide todavía por determinar en esta especie.

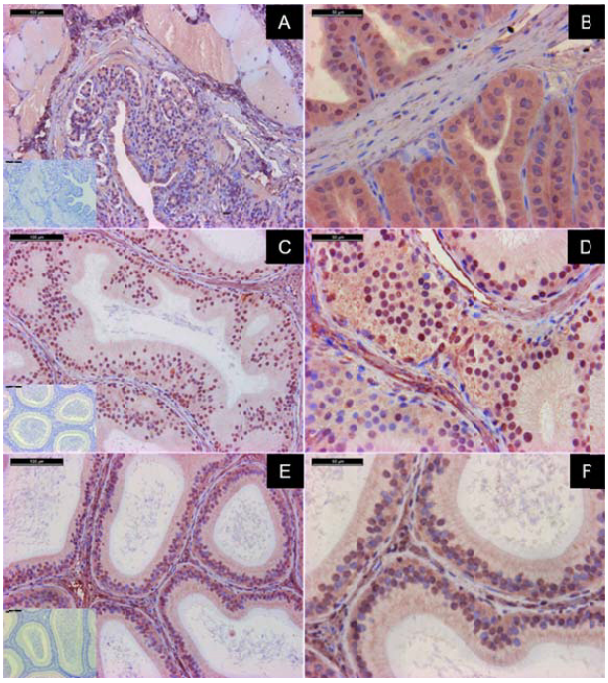


Figura 1*.Inmunolocalización del receptor TrkA (en rojo).Glándula bulbouretral (A: 20x; B: 40x: tinción en músculo liso y en núcleo y citoplasma de células glandulares). Cabeza (C: 20x; D: 40x) y cola del epidídimo (E: 20x; F: 40x)*: *señal en tejido conjuntivo y núcleo y citoplasma de células principales.*

Por otro lado, también identificamos β-NGF en PS. Primeramente, en el WB del PS entero sin purificar apareció una banda de ~60 kDa, que posiblemente podría corresponder a pro-NGF (Reinshagen y col., 2000), lo que coincide con lo descrito en el trabajo de Ratto y col. (2012). Sin embargo, en el WB de la fracción separada por OFFGEL-IEF detectamos una banda ~13-14 kDa en la fracción básica (pH=8,24-8,83),

que podría corresponder con la subunidad monomérica de β-NGF. El punto isoeléctrico de la proteína fue similar al descrito en el bovino (9,5-10) y ratón (9,3) (Harper y col., 1982). Las neurotrofinas como el NGF son sintetizadas habitualmente como precursores inactivos o pro-proteínas, que en condiciones desnaturalizantes o de pH extremos pueden madurar (Harper y col., 1982), separándose en monómeros de 13-14 kDa, que generalmente son la forma biológicamente activa. Los péptidos derivados de la banda purificada de ~13-14 kDa, analizados por huella peptídica combinada con espectrometría de masas reveló una alta homología (P< 0,05) con la secuencia de conejo registrada en la base de NCBInr. Estos resultados concuerdan con los de Crespo-Casares y col. (2016), que también detectaron la presencia de β-NGF en el PS entero de conejo de distintas líneas genéticas. En conclusión, en este trabajo se ha localizado el receptor de alta afinidad de NGF en la glándula bulbouretral y epidídimo de conejo, así como la proteína activa en la fracción básica del PS de conejo, indicando un posible efecto biológico de este factor en la fisiología reproductiva del macho y la hembra todavía por determinar en el conejo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams G.P. y col. Biol Reprod 73, 452–457 (2005) •Crespo-Casares I. y col. Reprod Dom Anim 51, 294–300 (2016) • Harper, G.P.J. Biol. Chem. 257, 8541-8548 (1982) •Jin y col. Endocrine, 29, 155–160 (2006) • Li y col. Zool Sci 22: 933–937 (2005) •Maranesi M. y col. Reprod Dom Anim 50, 918–925 (2015)•Paoletti, F. y col. Biochem Soc Trans. 34, 605-6 (2006)•Ratto M. y col. PNAS 109 (37): 15042-7 (2012) •Reinshagen, M. J. Neurochem. 74, 2127-2133 (2000)•Sechi, S. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 16, 1416-1424 (2002).

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL-201565572-C2-2-R. Los autores quieren agradecer la inestimable ayuda de P. Abad, L. Gutiérrez y M.J. Cavero. ASR disfruta de un contrato predoctoral UCM.

β-NGF IDENTIFICATION IN PURIFIED RABBIT SEMINAL PLASMA AND IMMUNOLOCATION OF ITS HIGH AFFINITY RECEPTOR (TRKA) IN MALE REPRODUCTIVE TRACT

ABSTRACT: Ovulating inductor factor (OIF) has been described in seminal plasma (SP) of both induced and spontaneously ovulating species (Adams et al., 2005) and recently, it has been identified as beta-nerve growth factor (β-NGF). This is a protein synthesized as a precursor (pro-NGF) with a molecular weight of ~60 kDa and some isoforms, ranging from 16-60 kDa (Paoletti et al., 2006). The high affinity receptor of this protein (TrkA) has been located in prostate, testicle and seminal vesicle of rabbit reproductive tract (Maranesi et al., 2015) but not in other male organs with an important role in SP production and spermatogenesis. Therefore, the objectives of this study were to immunolocalize by immunohistochemistry TrkA in the bulbouretral gland and the epididymis andto identify the presence of NGF in purified rabbit SP by mass spectrometry (MALDI-TOF). The high affinity receptor was detected in bulbouretral gland (nucleus and cytoplasm of glandular cells and cytoplasm of muscle cells) and in caput and cauda of epididymis (connective tissue and nucleus and cytoplasm of principal cells). NGF was identified in non-purified SP by western blot analysis with a molecular weight of ~60 kDa, presumably corresponding to pro-NGF (Ratto et al., 2012). After the peptide separation by OFFGEL-IEF technique, the beta fraction of NGF was identified by peptide mass fingerprinting with high homology with the rabbit sequence submit to NCBI. These findings indicate that NGF can play an important role in the male and female reproductive physiology in rabbits.

Key words: tracto reproductor masculino, TRKA, NGF, plasma seminal