ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 318-320

IMPLICACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL PROCESO DE CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE OVINO

P. Grasa; J.A. Cebrián-Pérez y T. Muiño-Blanco.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

La capacitación espermática se define como un complejo proceso que refleja los cambios fisiológicos, bioquímicos y biofísicos, que sufre el espermatozoide tras la maduración epididimal y que le confieren la capacidad fecundante. Durante los últimos años se ha establecido una clara correlación positiva entre el estado de capacitación y la fosforilación de residuos de tirosina de numerosas proteínas espermáticas, en distintas especies de mamíferos (1-4). La fosforilación de proteínas estructurales y reguladoras es uno de los principales mecanismos de control intracelular en eucariotas (5). El estado de fosforilación de una proteína es un proceso dinámico controlado por kinasas y fosfatasas (6). Algunas de estas kinasas y fosfatasas son específicas para residuos de serina, treonina o tirosina y otras tienen especificidad dual (5). El incremento de la fosforilación de residuos de tirosina ligado a la capacitación, parece estar regulado a través de la proteína kinasa A (PKA) de una forma dependiente de AMPc. Sin embargo, dado que la PKA es una kinasa específica para residuos de serina y treonina, se hipotetiza que la fosforilación de estos residuos conlleva la activación de una tirosin kinasa, responsable de la fosforilación de tirosinas (7). No obstante, aunque se sabe que kinasas como la PKA y la PKC están involucradas en el proceso de capacitación, poco se conoce a cerca de la fosforilación de residuos de serina y treonina. En este sentido, recientes estudios han puesto de manifiesto su implicación en el proceso de capacitación de espermatozoides humanos (8) y de hámster (7).

Trabajos previos de nuestro grupo demostraron la existencia de un incremento en la fosforilación de tirosinas de proteínas de membrana de espermatozoides ovinos, ligado al estado de capacitación (CA) (4). Por ello, el principal objetivo de este estudio fue investigar si este proceso está asociado con cambios en la fosforilación de residuos de serina y treonina de proteínas de la membrana espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen utilizado fue una mezcla de los segundos eyaculados de cinco moruecos, de raza Rasa aragonesa, 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), su posterior evaluación, la inducción y valoración de la CA, así como la inmunodetección de residuos de tirosina, serina y treonina mediante Western-blot, fue la descrita previamente por Pérez-Pé y cols. (4)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espermatozoides ovinos seleccionados mediante un proceso de swim-up-dextrano se incubaron 4 horas en condiciones de capacitación, analizando por western-blot la fosforilación de proteínas de membrana en residuos de tirosina,

serina y treonina. Paralelamente, se evaluó el estado de capacitación de estas muestras mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC), y su viabilidad.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de dos bandas de proteínas constitutivamente fosforiladas en tirosinas (40 y 45 kDa), así como el aumento en la fosforilación asociado al tiempo de incubación (Fig 1a).

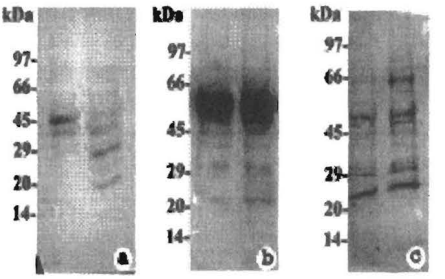


Figura 1: Inmunodetección de la fosforilación de residuos de tirosina (a), serina (b) y treonina (c) en muestras espermáticas a las 0 y 4 horas de incubación en condiciones capacitantes.

La detección por western-blot de residuos de serina fosforilados en muestras control (0 h), reveló la existencia de al menos cinco bandas de proteínas fosforiladas, una mayoritaria con un peso molecular en torno a 55 kDa y cuatro minoritarias correspondientes a los pesos moleculares 50, 45, 32 y 22 kDa (Fig 1b). Por su parte, la inmunodetección de fosfotreoninas puso de manifiesto la existencia de siete bandas fosforiladas en treonina; una de 66 kDa, tres bandas de proteínas en la región molecular de 45-55 KDa (con pesos moleculares de 55, 50 y 45) y tres menores de 32, 30 y 24 kDa (Fig 1c).

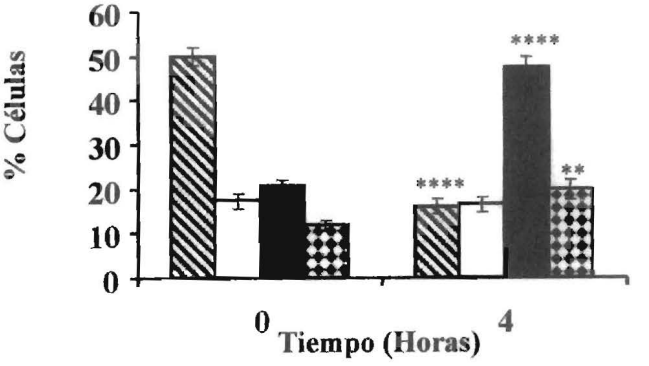


Fig. 2: Determinación del estado de capacitación espermática, mediante la tinción con clorotetraciclina de muestras a las 0 y 4 horas de incubación en condiciones capacitantes. Porcentaje de espermatozoides: ◥ no capacitados, □ capacitados con el acrosoma intacto, ■ capacitados, ◪ reaccionados acrosómicamente.

Medias ± Error Estándar, n=22. **** p<0,0001; ** p<0,01.

Como se aprecia en la Fig 2, la incubación de las muestras 4 horas en condiciones capacitantes indujo un incremento, muy significativo, en el porcentaje de espermatozoides capacitados (de un 20% a un 47% tras la incubación) y significativo, en el de reaccionados acrosómicamente (de un 11 a un 20%). Paralelamente, la evaluación de la viabilidad celular reveló una disminución significativa en el número de espermatozoides viables, pasando de un 71% inicial a un 37% tras las 4 horas de incubación.

En lo referente a la fosforilación de residuos de serina y treonina de proteínas de membrana, la incubación en condiciones capacitantes se tradujo en un aumento de la intensidad de las bandas inicialmente fosforiladas, correspondiente al aumento en el número de células capacitadas. Además, la capacitación indujo la aparición de tres nuevas bandas minoritarias conteniendo fosfoserinas (36, 18 y 16 kDa) y otras tres fosforiladas en treoninas (80, 36 y 14 kDa). El incremento cuantitativo en la fosforilación podría deberse a modificaciones conformacionales o a un aumento en el estado de activación de proteínas/enzimas involucradas en el proceso, a través de la adición o delección de subunidades o dominios en repuesta a segundos mensajeros implicados en la capacitación. Asimismo, estos resultados sugieren la posible existencia de proteínas fosforiladas en más de un residuo, en la región molecular de 55 a 30 kDa.

Finalmente, y con el objetivo de determinar si durante el proceso de swim-up (1 hora a 37ºC) se inicia la fosforilación de proteínas ligada a la capacitación, se realizó un estudio paralelo de espermatozoides seleccionadas por swim-up, lavados en tampón de sacarosa y filtrados. Del estudio comparativo se deduce que no existen diferencias en el patrón de fosforilación de los tres tipos de muestras (datos no presentados), por lo que las bandas aparecidas inicialmente no serían debidas a una capacitación prematura, que podría suceder durante el proceso de swim-up, y se corresponderían con proteínas constitutivamente fosforiladas en tirosina, serina o treonina.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren la implicación de la fosforilación de residuos de serina y treonina de proteínas de membrana en el proceso de capacitación del espermatozoide ovino, así como la posible existencia de kinasas específicas y de kinasas de especificidad dual (más de un residuo), lo que concordaría con lo obtenido en otras especies como humano (8) y hámster (7).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] H.L. Galantino-Homer, P.E. Visconti and G.Kopf. Biol. Reprod., 56, 707-719 (1997).

[2] J.E. Osheroff, P.E. Visconti, J.P. Valenzuela, A.J. Travis, J. Alvarez,G.S. Kopf. Mol Hum Reprod 5, 1017-1026 (1999).

[3] P.E. Visconti, J.L. Bailey, G.D. Moore, D.Y. Pan, P. Oldsclarke, G.S. Kopf. Dev., 121, 1129-1137 (1995).

[4] R. Pérez-Pé, P. Grasa, M. Fernández-Juan, M.L. Peleato, J.A. Cebrián-Pérez and T. Muiño-Blanco. Mol Reprod Dev, 61: 226-233 (2002).

[5] T. Hunter. Methods Enzymol. 200, 3-37 (1991).

[6] S. Wera, B.A. Hemmings. Biochem J. 311, 17-29 (1995).

[7] K.N. Jha, S. Shivaji. Mol Reprod Dev 63: 119-130 (2002).

[8] R.K. Naz. Biol Reprod, 60 1402-1409 (1999)

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