INMUNOLOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN DIFERENTES ESTADOS FUNCIONALES DE ESPERMATOZOIDES OVINOS

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 (CA) se define como un complejo proceso caracterizado por una serie de transformaciones bioquímicas y fisiológicas que sufre el espermatozoide tras la maduración epididimal y que le confieren la capacidad fecundante (1). Los procesos moleculares asociados a la capacitación están implicados en el desarrollo de la capacidad de experimentar la reacción acrosómica en respuesta a estímulos fisiológicos (1-2). Se ha descrito que tanto la capacitación como la reacción acrosómica se caracterizan por incrementos en la fosforilación de proteínas (3). La localización de proteínas fosforiladas en compartimentos específicos del espermatozoide, durante los distintos estadios funcionales conducentes a la fertilización, parece estar asociada a distintas funciones de estas proteínas (4). Trabajos previos de nuestro grupo demostraron la existencia de un incremento en la fosforilación de proteínas, ligado al estado de capacitación de espermatozoides ovinos (5). Por ello, el principal objetivo de este trabajo fue iniciar el estudio del patrón de fosforilación de espermatozoides reaccionados acrosómicamente, así como la puesta a punto de un método de inmunofluorescencia indirecta para el estudio de la distribución de las proteínas fosforiladas en función del estado funcional de espermatozoides ovinos (tras el proceso de swim-up, capacitados y reaccionados acrosómicamente).

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 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 col. (6). La inducción de la reacción acrosómica (RA) in vitro se realizó acorde a lo descrito por Martí y col. (7). La inmunolocalización de fosfoproteínas se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta en espermatozoides permeabilizados con metanol sobre portas polilisinados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se indujo la CA y la RA *in vitro* en espermatozoides ovinos seleccionados mediante un proceso de swim-up-dextrano, evaluando el estado acrosomal de estas muestras mediante la tinción con clorotetraciclina (CTC). La fosforilación de proteínas de membrana en residuos de tirosina, serina y treonina se analizó mediante western-blot. En concordancia con resultados previos (5) y paralelamente al incremento en el número de células capacitadas, la capacitación se asoció con un aumento en la señal de fosforilación para los tres residuos. En contraste, el patrón de fosforilación de espermatozoides reaccionados acrosómicamente (Fig.1) se caracterizó por una disminución en la proporción de proteínas fosforiladas de alto (55-120 kDa) y bajo peso molecular (14-30 kDa), que se correspondió con el

aumento en el porcentaje de células con el acrosoma reaccionado ($p<0,01$). La variación en el patrón de fosforilación observado tras la inducción de la reacción acrosómica, podría deberse a la pérdida de algunas fosfoproteínas y/o a procesos de defosforilación asociados con el flujo de calcio producido durante este proceso (8).

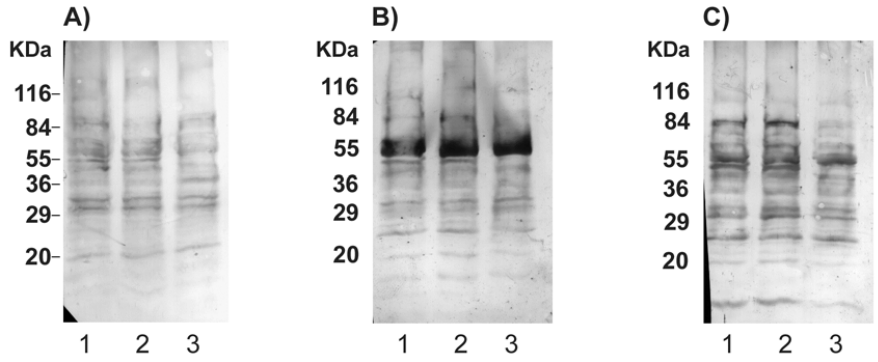


Figura 1: Inmunodetección de la fosforilación de residuos de tirosina (A), serina (B) y treonina (C) en muestras espermáticas control (1), capacitadas (2) y reaccionadas (3).

La localización subcelular de proteínas fosforiladas en tirosina, serina y treonina y sus modificaciones en función del estado funcional de los espermatozoides se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Los resultados obtenidos hasta el momento revelan que diferentes compartimentos del espermatozoide experimentan una secuencia específica de fosforilación durante los procesos de capacitación y reacción acrosómica (Fig.2). Muestras control (tras el proceso de swim-up) y capacitadas se caracterizaron por una distribución preferencial en distintos dominios de la cabeza (regiones acrosomal, ecuatorial y postacrosomal). A pesar de que ambas muestras presentaron patrones de distribución similares, los espermatozoides capacitados se caracterizaron por una localización más específica de las fosfoproteínas en la parte anterior del acrosoma y región postacrosomal (Fig.2). Además, presentaron un incremento significativo ($p<0,01$) en la distribución ecuatorial de proteínas fosforiladas en tirosina, región que parece desempeñar una función clave en la interacción espermatozoide-ovocito (1). La inducción de la reacción acrosómica se tradujo en la pérdida de la señal acrosomal y en la redistribución de las fosfoproteínas hacia la región postacrosomal y pieza intermedia del flagelo (Fig. 2 C,F,I). La localización de proteínas fosforiladas en el acrosoma junto con su posterior pérdida tras la reacción acrosómica sugiere su implicación en el proceso de capacitación. Asimismo, la redistribución de proteínas fosforiladas observada en espermatozoides con el acrosoma reaccionado podría jugar una importante función en posteriores estadios de la interacción espermatozoide-ovocito.

Estos resultados necesitan ser confirmados analizando un número suficientemente representativo de muestras. De momento, se puede sugerir que procesos de fosforilación de proteínas están implicados en la funcionalidad de espermatozoides ovinos en compartimentos específicos de la célula. En este sentido, el cambio subcelular de las fosfoproteínas observado durante la reacción acrosómica, podría tener una significación fisiológica en la consolidación de algunas proteínas fosforiladas a regiones específicas del espermatozoide implicadas en la exocitosis acrosomal y el reconocimiento, unión y penetración de la zona pelúcida.

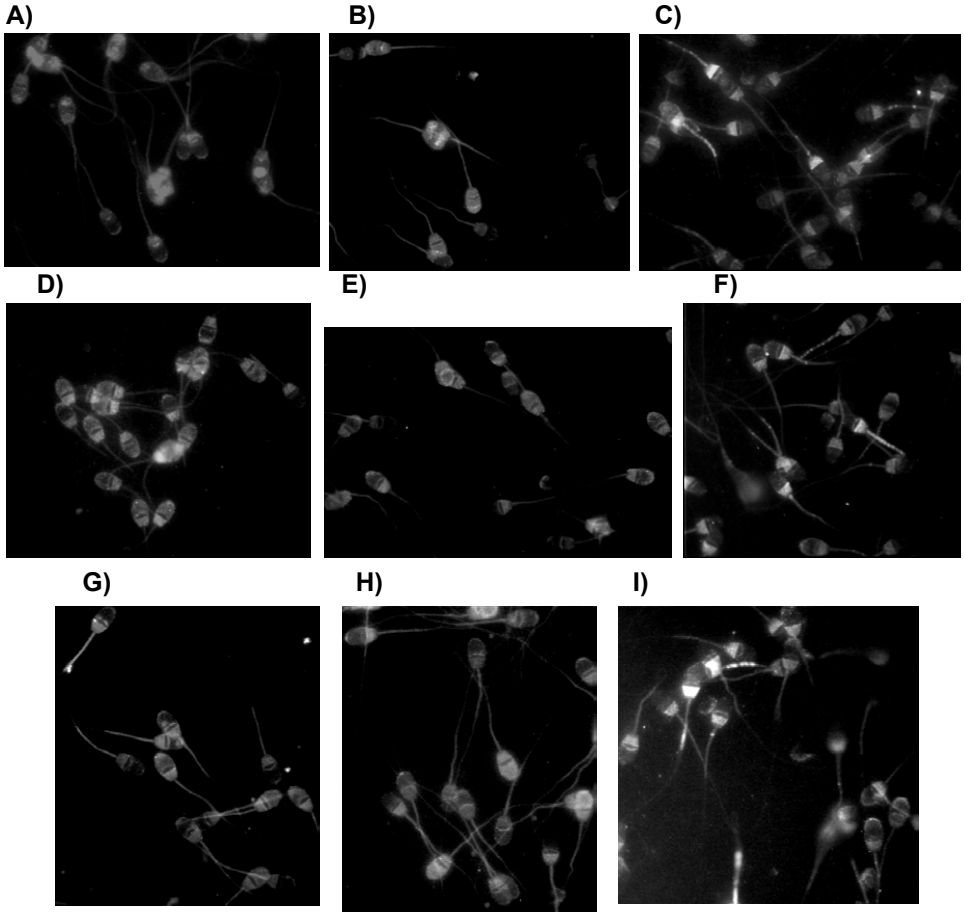


Fig 2. Inmunolocalización de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (A-C), serina (D-F) y treonina (G-H) en muestras espermáticas control (A, D, G), capacitadas (B, E, H) y reaccionadas acrosómicamente (C, F, I).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] R. Yanagimachi. Mammalian Fertilization. The Physiology of Reproduction. 189-317 (1994).

[2] P. E, Visconti, V.A. Westbrook, O. Chertihin, I. Demarco, S. Sleight and A. B. Diekman. J Reprod Immunol 53, 133-50 (2002).

[3] P.E. Visconti, P. Olds-Clarke, S.B. Moss, P. Kalab, A.J. Travis, M. de las Heras and M. Kopf. Reprod Dev, 43, 82-93 (1996)

[4] F. Urner and D. Sakkas. Reproduction,125, 17-26 (2003).

[5] P. Grasa, J.A. Cebrián-Pérez and T. Muiño-Blanco. ITEA, 24, 318-320 (2003).

[6] 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).

[7] J.I. Martí, J.A. Cebrián-Pérez and T. Muiño-Blanco. J Androl, 21, 541-8 (2000)

[8] M. A. Baker, L. Hetherington, H. Ecroyd, S.D. Roman and R.J. Aitken, (2004). J Cell Sci, 117, 211-22 (2004).

*** Este trabajo ha sido financiado por las ayudas CICYT-FEDER AGL 2002-00097, INIA RZ03-035 y CICYT-FEDER AGL 2004-02882.**