CARACTERIZACIÓN DE *RAFTS* LIPÍDICOS EN ESPERMATOZOIDE OVINO. ANÁLISIS DE MARCADORES PROTEICOS Y LIPÍDICOS

C. Colás-Esteban; M. Gallego; M. Ollero; J.A. Cebrián-Pérez y T. Muiño-Blanco.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

Los *rafts* lipídicos son microdominios de membrana, enriquecidos en colesterol y esfingolípidos con un alto grado de compactación, haciendo que tengan un alto punto de fusión, y un fuerte carácter de insolubilidad a detergentes no iónicos a bajas temperaturas. Es por ello que se les conoce como DRMs (membranas resistentes a detergentes). Cada vez hay más evidencias de que el microambiente lipídico de los *rafts* participa en procesos de señalización celular, cambiando de composición y tamaño en respuesta a estímulos intra y extracelulares [1,2]. Estudios realizados en muy diversos tipos celulares han mostrado que los *rafts* están enriquecidos en proteínas de diferentes clases, tales como proteínas ancladas a membrana por GPI, proteínas citoplasmáticas aciladas, tales como kinasas de la familia Src, proteínas G heterotriméricas, y proteínas transmembrana [3]. Los *rafts* de membrana se han identificado en espermatozoides de varias especies [4, 5, 6, 7], y se han visto implicados en fenómenos relacionados con la capacitación [7].

El presente trabajo consistió en el aislamiento de *rafts* lipídicos en base a su insolubilidad en Triton X-100 a 4 ºC, así como en la identificación de marcadores de rafts descritos en otras especies y tipos celulares.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen utilizado fue una mezcla de los segundos eyaculados de 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) y su posterior evaluación, fue la descrita previamente por Pérez-Pé y cols [8].

El aislamiento de rafts lipídicos se basó en la insolubilidad de los componentes de los rafts lipídicos al Triton X-100 a 4 ºC (comunicación personal del Dr. Ollero). Brevemente, espermatozoides de swim-up se sometieron a electroporación seguida de sonicación, con objeto de fragmentar las membranas. El lisado (2 ml) se mezcló con 2 ml de de sacarosa al 80%. Esta mezcla se depositó en el fondo de un tubo de ultracentrífuga. Encima se depositó sacarosa 30% (6 ml), y para completar el gradiente, sacarosa 5% (2 ml). La ultracentrifugación se realizó a 100.000 xg, 20 horas, a 4 ºC y se recogieron 12 fracciones de 1 ml. Tras la precipitación de proteínas mediante el método combinado de ácido tricloroacético-acetona, la concentración proteica se determinó mediante BCA. El análisis de marcadores proteicos se realizó mediante la técnica de Western Blotting y Dot Blot [8]. La detección de proteínas sobre el esperma mediante inmunocitoquímica según la técnica descrita en el artículo de Barrios y cols [9].

Para la identificación del gangliósido GM1 sobre espermatozoides adheridos a portas polilisinados, se utilizó la subunidad B de la toxina del cólera conjugada con fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a su baja densidad, los componentes de rafts lipídicos se pueden separar de la fracción no raft mediante ultracentrifugación de lisados celulares en gradientes de densidad de sacarosa. El aislamiento, mediante esta técnica, de *rafts* de membrana de espermatozoides ovinos, mostró que las proteínas se distribuyeron de manera diferencial en las doce fracciones recogidas tras la centrifugación (Figura 1).

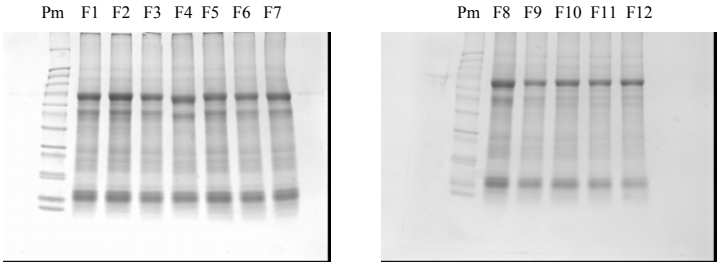


Figura 1: Separación de proteínas totales de esperma ovino mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Se aislaron 12 fracciones que de la parte superior al fondo del tubo se designaron Fr1 a Fr12.

Se analizó la presencia de 3 proteínas presentes en los *rafts* descritas en la literatura: flotilina-1, flotilina-2 [10], y caveolina-1 [11]. Estas proteínas se han usado como marcadores en diversos tipos celulares, y también se han descrito en espermatozoides de otras especies: caveolina-1, en ratón y cobaya [4]; flotilina-2 en humano [5]; flotilina-1, en ovino [6]. Se determinó su presencia o ausencia en esperma ovino mediante Dot Blot y Western Blotting. La técnica del Dot Blot se descartó dado que los controles sin anticuerpo primario también mostraban señal. Por su parte, el Western Blotting permitió identificar la presencia de *rafts* de las fracciones arriba mencionadas. Con el anticuerpo anti-caveolina-1 se identificaron bandas en varias fracciones, principalmente en las fracciones 5, 7, 8, y muy débilmente en las últimas. Se encontraron tres bandas en torno a los 40-45 kDa. De acuerdo al peso molecular descrito para esta proteína, 22 kDa, las bandas observadas podrían corresponder a homodímeros. También se pudo observar otra banda de alto peso molecular en torno a los 100 kDa. El Ac anti-flotilina-2 detectó bandas en las fracciones 10, 11, y 12, situadas entre 36 y 45 kDa. El peso molecular de esta proteína es de 36 kDa. Dichas bandas podrían corresponder a diferentes isoformas de dicha proteína. El último anticuerpo ensayado, anti-flotilina-1, no dio resultado, por lo cual se descartó para este estudio. Hasta el momento sólo se ha descrito un marcador proteico de rafts lipídicos en esperma ovino, tratándose de flotilina-1 [6], resultado opuesto al del presente trabajo. Por ello, se intentó ratificar estos resultados mediante inmunocitoquímica, y se pudo confirmar la ausencia de flotilina-1, ya que no se obtuvo marcaje alguno. Sin embargo, la caveolina-1 ofreció un marcaje en acrosoma y flagelo.

Otro marcador utilizado en este estudio fue la subunidad B de la toxina del cólera, que se une gangliósido GM1, lípido muy abundante en rafts. Dado que la toxina estaba conjugada con un fluorocromo, la identificación del gangliósido pudo realizarse mediante microscopía de fluorescencia. Se observó marcaje postacrosomal.

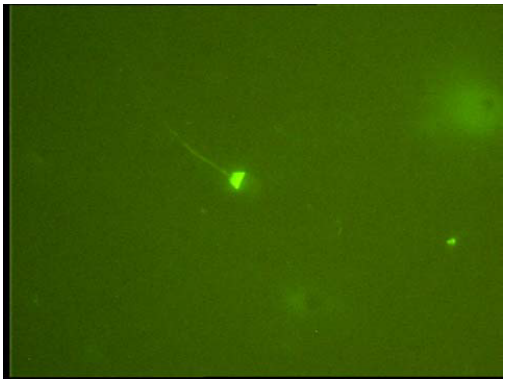


Figura 2.- Presencia de gangliósido GM1 en espermatozoides ovinos.

Los resultados del presente trabajo asientan las bases de un estudio más profundo que abarcará el análisis bioquímico de los cambios que los *rafts* lipídicos experimentan durante la capacitación y la reacción acrosómica. Asimismo, se analizará el efecto que el proceso de congelación puede tener sobre estos microdominios. Como interés particular, analizaremos si las proteínas del plasma seminal con efecto protector y reparador frente al frío descritas por nuestro grupo [9] interaccionan con los *rafts* lipídicos, y en el caso de que así sea, cómo es dicha interacción y su influencia en la funcionalidad del espermatozoide.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Simons, K., Ikonen, E.; Nature 387 (6633): 569-72; 1997
2. Brown, D. A., London, E.; Annu Rev Cell Dev Biol 14: 111-36; 1998
3. Dráber, P., Dráverová, L.; Molecular Immunology 38: 1247-52; 2001
4. Travis, A.J., Merdiushev, T., Vargas, L.A., Jones, B.H., Purdon, M.A., Nipper, R.W., Galatioto, J., Moss, S.B., Hunnicutt, G.R., Kopf, G.S.; Dev Biol 240: 599-610; 2001
5. Cross, N.L.; Biol Reprod; 2004
6. Ecroyd, H., Sarradin, P., Dacheux, J. L., Gatti, J. L. ; Biol Reprod 71 (3): 993-1001; 2004
7. Shadan, S., James, P.P., Howes, E.A., Jones, R.; Biol Reprod 71: 253-65; 2004
8. Pérez-Pé, R, Grasa, P, Fernández-Juan, M, Peleato, ML, Cebrián-Pérez, JA, Muiño-Blanco, MT; Mol Reprod Dev 61 (2): 226-33; 2002
9. Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A.; Biol Reprod 63: 1531-1537; 2000
10. Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P., Lodish, H.F.; J Biol Chem 272 (21): 13793-802; 1997
11. Volonte, D., Galbiati, F., Li, S., Nishiyama, K., Okamoto, T., Lisanti, M. P.; J Biol Chem 274 (18): 12702-9; 1999

Este trabajo ha sido financiado por las ayudas CICYT-FEDER AGL 2002-00097, INIA RZ-03-035 y CICYT-FEDER AGL 2004-02882