IDENTIFICACIÓN DE CALMODULINA E IMPLICACIÓN EN LA CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OVINOS

Colás, C., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T.
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

La calmodulina (CaM) es la proteína intracelular mayoritaria de unión a calcio, mediando la regulación de una gran variedad de enzimas. Se ha propuesto que la calmodulina modula la captación de Ca^{2+} (Trejo y Mujica, 1990; Camatini *et al.,* 1991), y se ha localizado en la cabeza del espermatozoide, lo cual sugiere su participación en la capacitación y reacción acrosómica (Fraser *et al.,* 1995; Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1996). La modificación de la CaM durante la capacitación también apoya su implicación en el proceso de capacitación (Trejo y Mujica, 1990).

Los complejos de Ca/CaM tienen gran importancia en la motilidad espermática (Brokaw y Nagayama, 1985). Está descrito que la fosforilación de proteínas es un proceso implicado en la regulación de la motilidad espermática, y diferentes fosfoproteínas han sido asociadas con el inicio y mantenimiento de la motilidad (Nakajima, 2005). Los complejos Ca/CaM pueden regular el estado de fosforilación a través de la activación de la proteín fosfatasa de tipo 2A (calcineurina) dependiente de Ca/CaM (Tash, 1988). Hay diversos trabajos que demuestran la importancia de las proteín fosfatasas en el control de la motilidad espermática. Además, las proteínas implicadas en la motilidad son sustrato de la ruta de fosforilación de PKA, otro proceso que puede ser afectado por la CaM. Este modulador puede reducir la concentración intracelular de cAMP mediante la activación de fosfodiesterasas (Wasco y Orr, 1984) o incrementar los niveles de cAMP vía la activación de la adenilato ciclasa (Kopf y Vacquier, 1984).

Por otro lado, la CaM también está implicada en la regulación de los flujos de Ca^{2+} a través de las membranas (Peterson, 1983). La CaM ejerce su acción a través de la activación de la ATPasa de Ca^{2+} (Adeoya-Osiguwa y Fraser, 1996), enzima localizada en la región postacrosomal de la cabeza. El papel de esta enzima es mantener bajos los niveles intracelulares de Calcio mediante el bombeo de este catión al interior del acrosoma. La pérdida de afinidad de esta enzima por la CaM llevaría a una menor actividad de la misma, dando lugar a un aumento en la concentración intracelular del catión, lo cual se produce durante la capacitación.

El objetivo del presente trabajo fue identificar la CaM en el espermatozoide ovino, así como estudiar su implicación en el proceso de capacitación mediante el uso de inhibidores de la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen utilizado fue una mezcla de los segundos eyaculados de cinco moruecos, de raza Rasa Aragonesa, pertenecientes a ANGRA, estabulados en la Facultad de Veterinaria bajo condiciones nutricionales uniformes. Los animales se mantuvieron 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 capacitación, y la inmunodetección de residuos de tirosina, serina y treonina mediante western blot, fue la descrita previamente por Pérez-Pé *et al.* (2002).

La identificación de dicha proteína mediante western blotting se hizo a partir de extractos proteicos obtenidos de lisados de espermatozoides seleccionados en swim-up con un tampón de extracción de Triton X-100. Tras la incubación en dicho tampón, el lisado se centrifugó y el sobrenadante y el sedimento se separaron. Las proteínas se

analizaron por electroforesis en condiciones no desnaturalizantes. La identificación de calmodulina se hizo mediante western blotting con un anticuerpo comercial (clones 6D4 + 1F11 + 2D1; Sigma).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calmodulina se identificó mediante western blotting en el sedimento y en el sobrenadante de extractos proteicos obtenidos tras la lisis con el detergente Triton X-100. En sobrenadante (fracción citosólica) se identificó una banda de menos de 30 kDa, correspondiente a la calmodulina (17 kDa) así como una banda de 30-35 kDa, que podría corresponder a un agregado de dos moléculas de calmodulina. El sedimento del lisado, conteniendo la fracción no citosólica, contenía sólo la banda de más alto peso molecular (30-35 kDa).

Con objeto de conocer la participación de la calmodulina en la capacitación, se estudió la influencia de dos inhibidores de la calmodulina, W7 y calmidazolium (CZ) en la capacitación. Se determinó el estado de capacitación mediante la tinción CTC y la inmunodetección de proteínas fosforiladas en tirosina, serina, y treonina en extractos proteicos obtenidos por SDS/calor. La incubación de espermatozoides ovinos en presencia de concentraciones crecientes de W7 y CZ dio lugar a un incremento de capacitados (patrón B) y reaccionados (patrón AR) analizado por CTC, si bien las diferencias significativas se observaron a las concentraciones más altas en ambos casos (Fig. 1).

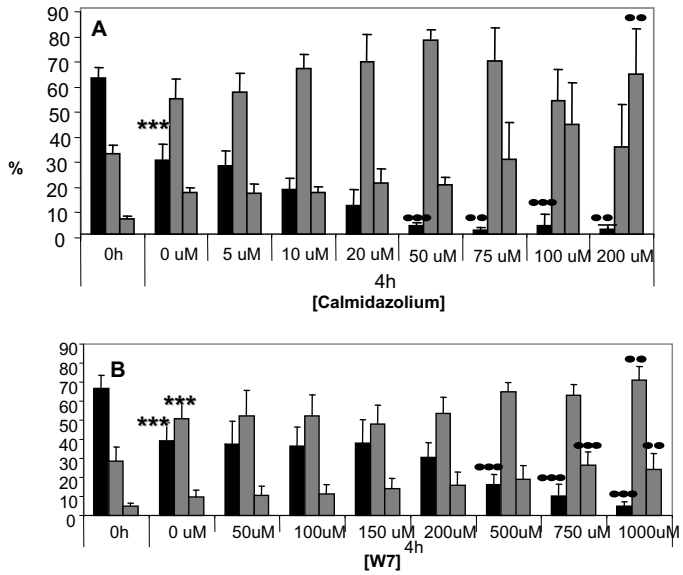


Fig. 1.- Valoración con CTC del estado de capacitación de espermatozoides ovinos. Porcentaje de no capacitados (■), capacitados (▩) y reaccionados (▩) en presencia de concentraciones crecientes de calmidazolium (A) y W7 (B). Valores medios (% ± DS, n=5). *** P<0,001 respecto a muestras control (0 µM) a 0 h; ●●● P <0,001 respecto a muestras control (0 µM) a 4h; ●● P<0,01 respecto a muestras control (0 µM) a 4h; ● P<0,05 respecto a muestras control (0 µM) a 4h.

W7 es un inhibidor de la fosfodiesterasa activada por Ca/CaM. El fenómeno observado se podría explicar del siguiente modo: la inhibición de una fosfodiesterasa activada por calcio/caM tendría como consecuencia un incremento en los niveles de

cAMP intracelulares, y en consecuencia, una mayor actividad PKA. Esto se reflejaría en cambios en la tinción de CTC, aumentando los porcentajes de los patrones B (capacitados) y AR (reaccionados). La arquitectura lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación está controlada por fosforilación de una proteína vía PKA y desfosforilada por una proteín fosfatasa tipo 1 (Harrison y Miller, 2000). El aumento de los niveles de cAMP activaría la PKA, y se incrementaría la fluidez de la membrana plasmática, característica de la capacitación. La evaluación mediante CTC refleja la localización de calcio asociado a la membrana, lo cual es a su vez dependiente de las características de fosfolípidos de la bicapa (Fournier *et al.,* 2003). CZ es un bloqueante de canales de Ca^{2+} regulados por calmodulina. La consecuencia de este efecto sería una concentración de Ca^{2+} menor de la necesaria para el proceso de capacitación, lo cual se refleja en los patrones de CTC obtenidos con altas concentraciones de CZ.

Respecto a los patrones de fosforilación, la presencia de dichos inhibidores en el medio de capacitación indujo un incremento en la fosforilación en residuos de tirosinas de una proteína de aproximadamente 30 kDa. Los patrones de fosforilación de proteínas en residuos de treoninas no se modificaron. Sin embargo, se pudo apreciar un ligero incremento de la señal de fosforilación de proteínas en residuos de serina en muestras capacitadas en presencia de inhibidores de calmodulina (Fig. 2).

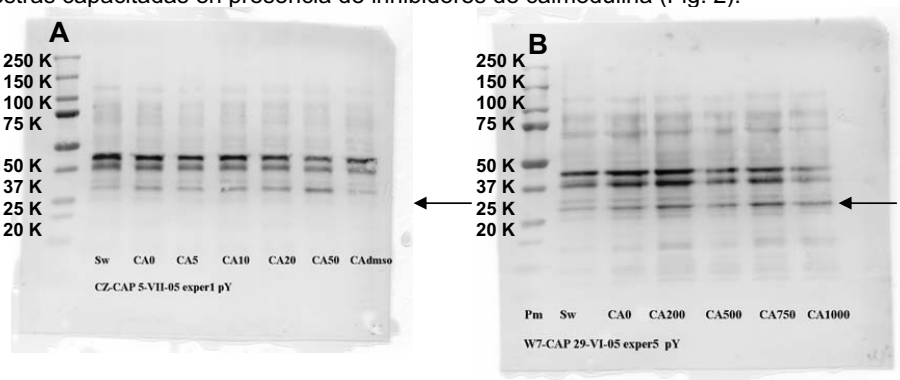


Fig. 2.- Patrón de fosforilación de tirosinas de espermatozoides ovinos incubados en condiciones capacitantes en presencia de concentraciones crecientes de inhibidores de calmodulina: (A) CZ, y (B) W7. La flecha señala la banda de 30 K cuya intensidad se incrementa en presencia del inhibidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adeoya-Osiguwa SA and Fraser LR. 1996. Mol Rep dev 44 (1): 111-20.
- Brokaw CJ and Nagayama SM. 1985. J Cell Biol 100 (6): 1875-83.
- Camatini M et al. 1991. Mol Rep Dev 28 (1): 62-9.
- Fournier et al. 2003. J Androl 24 (1): 104-12.
- Fraser LR et al. 1995. Mol Rep Dev 40 (2): 233-41.
- Harrison DA and Miller NG. 2000. Mol Rep Dev 55 (2): 220-8.
- Kopf GS and Vacquier VD 1984. J Biol Chem 259 (12): 7590-6.
- Nakajima A. 2005. J Exp Biol 208: 4411-8.
- Perez-Pé et al. 2002. Mol Reprod Dev 61: 226-233.
- Peterson RN et al. 1983. Biochem Biophys Res Commun 114 (1): 28-33.
- Tash JS. 1988. J Cell Biol 106 (5): 1625-33.
- Trejo R and Mujica A. 1990. Mol Rep Dev 26 (4): 366-77.
- Wasco WM and Orr GA. 1984. Biochem Biophys Res Commun 118 (2): 636-42.

Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas **CICYT-FEDER AGL 2004-02882, INIA RZ03-035, DGA GC-2005-027 and CICYT-FEDER AGL 2005-02614**.