EVIDENCIAS DE LA RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO EN EL ESPERMATOZOIDE OVINO

Luna-Valiente, C., Serrano-Blesa, E., Pérez-Pé, R., Domingo-Sanz, J., Arruga, D., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.A. y Muiño-Blanco, T.
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Zaragoza. España.
caroluna@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El metabolismo energético juega un papel clave en la funcionalidad espermática. Los espermatozoides de mamíferos requieren energía, en forma de ATP, para mantener la motilidad, realizar modificaciones proteicas y todo el conjunto de cambios bioquímicos y biofísicos que permiten su capacitación y la fecundación del ovocito. El ATP puede obtenerse a través de la glucólisis o mediante la cadena de transporte electrónico en la fosforilación oxidativa mitocondrial. Ambas rutas metabólicas son capaces de proporcionar esta energía de forma independiente, y los espermatozoides, en función de la especie, utilizarán preferiblemente una u otra. Así, mientras la glucólisis parece ser el principal mecanismo de obtención de energía en espermatozoides de ratón, la fosforilación oxidativa sería la vía predominante en el toro, y los espermatozoides ovinos parecen mantener su motilidad utilizando paralelamente los dos mecanismos de obtención de energía (Storey, 2008). Además, para cada evento específico se requiere un sustrato y una ruta metabólica diferente. Así, la reacción acrosómica necesita lactato o piruvato para la producción de ATP por fosforilación oxidativa, mientras que la fusión de gametos requiere glucosa para producir NADPH a través de la ruta de las pentosas fosfato (RPP) (Miki, 2007).

En la RPP, la glucosa-6-fosfato (G6P) se oxida a 6-fosfogluconato (6PG) por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), produciendo NADPH en una relación estequiométrica 1:1. Seguidamente, el 6PG se transforma a ribulosa-5-fosfato por acción de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH). Se obtiene así la segunda molécula de NADPH, además de la liberación de una molécula de CO_2 debido a la descarboxilación oxidativa del ácido libre. La ribulosa-5-fosfato resultante puede posteriormente convertirse en ribosa-5-fosfato y ser así usada para la síntesis de nucleótidos. El NADPH producido proporciona poder reductor y tiene gran importancia en muchos sistemas celulares, incluyendo sistemas antioxidantes.

La relación entre la producción de NADPH (vía RPP) y la capacitación (Miraglia, 2011) y fecundación (Urner, 2005) se ha descrito en espermatozoides de algunas especies, lo cual podría implicar la existencia de una enzima dependiente de NADPH reguladora de los procesos redox en esta célula. La generación de una cantidad controlada de especies reactivas de oxígeno (ROS) es esencial para la viabilidad y la funcionalidad espermática, incluido el proceso de capacitación. Sin embargo, cuando el nivel de ROS excede las defensas antioxidantes de la célula, se produce estrés oxidativo que puede causar daño en el DNA y alterar las funciones celulares. De ahí que la RPP no sea únicamente una vía de metabolismo de la glucosa, sino que juega un papel crítico en el balance de ROS y la supervivencia celular (Riganti, 2012). La RPP ha sido evidenciada en espermatozoides de diferentes especies (humano, conejo, ratón y búfalo, entre otras), pero por el momento no hay referencias de la existencia de una vía RPP funcional en la especie ovina.

El objetivo del presente estudio se centra en confirmar la presencia y localización de las dos principales enzimas de la RPP (G6PDH y 6PGDH) en espermatozoides ovinos. El NADPH generado en la RPP y su poder antioxidante, así como las evidencias de la participación de esta ruta en los procesos de fecundación y capacitación en espermatozoides de diferentes especies, sugieren que esta vía podría tener también un papel clave en la capacitación de espermatozoides en el morueco.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen utilizado se obtuvo mediante vagina artificial a partir de moruecos pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA), estabulados en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza en condiciones nutricionales uniformes. Con el objetivo de eliminar las diferencias individuales, se utilizó una mezcla de los segundos eyaculados de cuatro moruecos. Los experimentos se realizaron manteniendo los animales con un periodo de abstinencia de dos días, de acuerdo con

estudios previos (Ollero et al., 1996). Se utilizaron muestras de espermatozoides libres de plasma seminal mediante la técnica de *swim-up*/dextrano con un medio sin $CaCl_2$ y $NaHCO_3^-$ (Pérez-Pé et al., 2002).
Posteriormente las células se cavitaron a una presión de 1000 PSI de N_2 durante 20 min. El contenido resultante de la cavitación se centrifugó a 16800 x g durante 5 min y el sobrenadante obtenido fue la muestra utilizada en análisis de *western blotting*.
Para la inmunofluoresencia indirecta, alícuotas de $2x10^6$ células/ml del *swim-up* se fijaron con paraformaldehído (0,25%, v/v) durante 20 min a temperatura ambiente (TA). Tras el lavado de las células con PBS se pipetearon 40 µl sobre portaobjetos poli-lisinados (*Superfrost Plus,* Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% y se realizó una segunda fijación de 5 min. con paraformaldehído al 12,2%. Los sitios de unión del anticuerpo no específicos se bloquearon incubando con 5% BSA en PBS (p/v) toda la noche a 4ºC. Posteriormente se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo anti-glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH) o anti-6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) (Prestige Antibodies ®, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.) diluidos ambos 1/20 como anticuerpos primarios, y un anticuerpo anti-conejo sintetizado en pollo conjugado con el fluorocromo Alexa-Fluor488 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE.UU.) a una dilución 1/600, como anticuerpo secundario. Finalmente, a la preparación se le añadió DABCO para preservar la fluorescencia celular y se visualizó en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Tokio, Japón) con el objetivo 100x y un filtro B-2A.
Para la detección de las enzimas por western blotting, se realizó una electroforesis SDS-PAGE de las proteínas en geles del 10% de acrilamida y las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF utilizando el sistema de transferencia *TransBlot Turbo* (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.; 2,5 A, 25 V, 10 min). La inmunodetección de las enzimas se llevó a cabo incubando las membranas con los mismos anticuerpos primarios utilizados para la inmunocitoquímica (durante toda la noche a 4 ºC, dilución 1/500), seguido de 1 h de incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo sintetizado en burro, conjugado con el fluorocromo IRDye® 800-CW (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, EE.UU.). En la misma membrana se incluyó además un lisado de células hepáticas como control positivo y la proteína recombinante *Fur*, reguladora de la captación de hierro, aislada de un extracto de *E. coli* BL21-Gold DE3, como control negativo (Hernández et al., 2002). Finalmente, las membranas se escanearon con el sistema de detección de fluorescencia Odyssey® (Li-Cor Biosciences).
La PCR se realizó sobre 1µl de cDNA obtenido por transcripción reversa (RT) con el kit SuperScript III de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.) usando como muestra RNA aislado mediante homogenización en TriReagent (Sigma) según el método de Chomczynski y Sacchi (1997). Los cebadores para G6PDH fueron los descritos por Laliotis et al. (2006), G6PDH directo: 5'-TAC GAT GAC ACT GCC TCC TAC-3' y G6PDH inverso: 5'-CGA AGG GCT TCT CCA CAA TG-3'). Los cebadores para 6PGDH fueron 6PGDH directo: 5'-CAT CGC CGC CAT GGC CCA AG-3' y 6PGDH inverso: 5'-GAA CGC TGC CTC GGG CAG CTG-3'. Las condiciones de PCR fueron un ciclo a 94 ºC-3 min, 30 ciclos a 94 ºC-30 seg, 60 ºC-30 seg, 72 ºC-30 seg (1,5 min para 6PGDH) y una extensión final a 72 ºC-4 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inmunofluorescencia indirecta reveló la presencia de G6PDH en el flagelo y post-acrosoma de todos los espermatozoides, mientras que el marcaje para la enzima 6PGDH quedaba restringido a una estrecha e intensa banda de la región ecuatorial (Figura 1). Los análisis mediante *western blotting* confirmaron la presencia de ambas enzimas, con sendas bandas de 51 KDa y 56 KDa (Figura 2) compatibles con el peso molecular teórico supuesto para la G6PDH y el 6PGDH, respectivamente. En el control positivo (lisado de células hepáticas) se observó igualmente una banda del mismo peso molecular que la del lisado de espermatozoides, y además esta banda no apareció en el control negativo (proteína *Fur* de unión a DNA, reguladora de la transcripción). La expresión de ambas enzimas también se evidenció mediante retrotranscripción y posterior PCR, mostrando los productos amplificados el peso molecular esperado en ambos casos (Figura 3). Con objeto de elucidar el papel de la RPP en la capacitación espermática ovina, actualmente se están realizando estudios cinéticos de ambas enzimas, para estandarizar y caracterizar sus actividades y

analizar posibles cambios relacionados con la capacitación *in vitro,* así como la importancia del NADPH generado en la RPP en el sistema de defensa antioxidante del espermatozoide ovino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chomczynski, P., 1993. *Biotechniques* 15(532-4, 536-7) • Hernández J.A., Bes M.T., Fillat M.F., Neira J.L., Peleato M.L., 2002. *Biochem. J.* 366:315-322 • Laliotis, G.P., Argyrokastritis, A., Bizelis, I., Rogdakis, E., 2007. *Gene* 388:93–101 • Miki, K., 2007. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65:309-25 • Miraglia E., Lussiana C., Viarisio D., Racca C., Cipriani A., Gazzano E., Bosia A., Revelli A., Ghigo D., 2010. *Fertil Steril.* 93(7):2437-40 • Ollero, M., Muiño-Blanco, T., Lopez-Perez, M.J., Cebrián-Pérez, J.A.1996. *Int J Androl* 19:287-292 • Pérez-Pé, R., Grasa, P., Fernández-Juan, M., Peleato, M.L., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2002. *Mol Reprod Dev* 61:226-33 • Riganti C., Gazzano E., Polimeni M., Aldieri E., Ghigo D., 2012. *Free Radic. Biol. Med.* 53(3):421-36 • Storey, B.T., 2008. *Int. J. Dev. Biol.* 52(5-6):427-37 • Urner F., Sakkas D., 2005. *Mol Reprod Dev.* 70(4):494-503.

Agradecimientos: CICYT-FEDER AGL2011-25850, DGA/A26-2010FSE y FPU 2009-1298. Los autores agradecen a ANGRA el suministro de sementales.

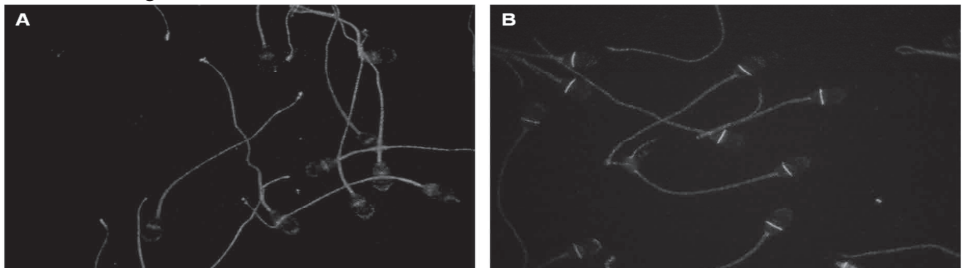


Figura 1. *Inmunolocalización de G6PDH (A) y 6PGDH (B) en espermatozoides ovinos. Magnificación 1000x.*

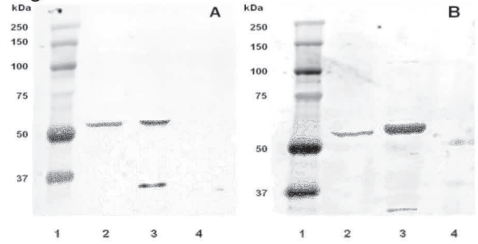


Figura 2*. Localización mediante western blotting de G6PDH (A) y 6PGDH (B). (1) Marcador de pesos moleculares. (2) Lisado de espermatozoides (3) Control positivo. (4) Control negativo.*

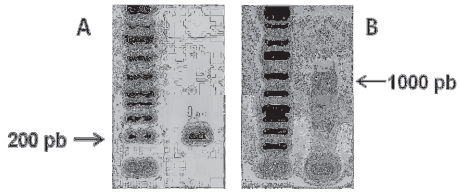


Figura 3. *Resultado de la amplificación por RT-PCR, correspondiente a la G6PDH (A) y al 6PGDH (B).*

EVIDENCES OF THE PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY OPERATING IN RAM SPERMATOZOA

ABSTRACT: The oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS) is one of the causes of sperm cryopreservation injury. It has been shown that *in vitro* capacitation results in increased ROS levels, which are dependent of the antioxidant defense system that can use the NADPH generated by the pentose phosphate pathway (PPP). However, the functioning of the PPP has not been demonstrated in ram spermatozoa, although its involvement in sperm capacitation has already been shown in mouse spermatozoa. The aim of this study was to investigate whether the PPP is operative in ram spermatozoa. We have evidenced the presence of G6PDH and 6PGDH in ram spermatozoa by western blotting, indirect immunofluorescence and RT-PCR. Additional assays to evaluate possible changes in the activity of these enzymes during in vitro capacitation are currently in progress.

Keywords: pentose phosphate pathway, capacitation.