

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACIÓN DE CALMODULINA (CaM), CALRETICULINA
(CRT) Y DE PROTEÍNAS QUE SE ASOCIAN A CaM Y A CRT,
EN LA REACCIÓN ACROSOMAL
DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL COBAYO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

BIOL: ANA LILIA ROA ESPITIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE OTHÓN HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
CO-DIRECTORA: DRA. ADELA MÚJICA MIRANDA

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Nunca tanto como hoy en día, gracias al progreso de la ciencia, el universo manifiesta al hombre la grandeza y hermosura de Dios. Pero al hacerse hombre, el hijo de Dios ha colocado al ser humano por encima de toda la creación material y recalca la igualdad fundamental de todos

Salmo 8

Dedico este trabajo a el amor de mi vida, por que cuando te conocí supe lo que realmente es el amor, te doy gracias por tu comprensión, consejos, sugerencias y tu valiosa dirección en la realización de este trabajo; pero sobre todo le doy gracias a Dios por tu vida.

A tí Enrique

También dedico este trabajo a mi Mamá Chuy , quien ha sido el pilar de mi vida
te amo mamá

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a Dios por haberme permitido conocerlo y sentirlo. Por haberme dado cuenta que sin él, esto no tendría sentido. Gracias Señor te doy por mi vida y por estar siempre conmigo.

A mi familia:

Por lo que cada uno de ustedes ha aportado, para que lograra mis objetivos, por ser incondicionales, y estar siempre apoyándome, por ello les doy gracias.

Papá, Martha, Paty, Manuel, Fernando, Gloria, Ricardo, Ale, Paz Mary, Vero y Jaime

A mis sobrinos que los quiero muchísimo y que han alegrado mi vida. A mis cuñados y cuñadas por su apoyo y su amistad

A mis tutores:

A la Dra. Adela Mújica, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y por la revisión de esta tesis. Gracias.

A mis asesores:

Dr. Everardo Curiel Quesada, M en C. Juan Ocampo López y a la Dra. Lourdes Juárez Mosqueda, por sus valiosos comentarios en la revisión de este trabajo, por dedicarme su tiempo.

A Chepina por tu invaluable amistad, por apoyarme siempre y por compartir mis triunfos y momentos difíciles. Pero sobre todo por ser mi gran amiga incondicional.

A Meche gracias por alentarme siempre y darme las fuerzas para seguir adelante. Gracias por tus consejos.

A Jaime Escobar por tus sabios consejos en los momentos difíciles, por tu amistad y porque gracias a ellos pude levantarme muchas veces.

A Lucero por su invaluable amistad y por su ayuda en el trabajo administrativo.

A mis compañeras: Ma. Esther, Refugio Contreras, Ma. Luisa Labra, Lety Alemán, Samia y Blanca por su amistad y por sus bromas que siempre me han hecho reír.

A mis compañeros de laboratorio: Fernando y Violeta, por su amistad y su apoyo

A Mónica porque con ella compartí todos los esfuerzos de esta tesis, pero también la gran satisfacción de haber terminado, por tu amistad y tu cariño, gracias Moni.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 54 del departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN, el cual esta a cargo de la Dra. Adela Mújica Miranda.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos 34819-N y 29283-B del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgados al Dr. Enrique O. Hernández González y a la Dra. Adela Mújica Miranda, respectivamente.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPACITACIÓN.....	3
REACCIÓN ACROSOMAL.....	5
EI CALCIO EN LA CAPACITACIÓN Y EN LA REACCIÓN ACROSOMAL.....	7
LA CALMODULINA.....	10
LA CALMODULINA EN LOS ESPERMATOZOIDES DE LOS MAMÍFEROS.....	11
LA CALRETICULINA.....	12
FUNCIONES DE LA CALRETICULINA.....	14
CALRETICULINA EN LOS ESPERMATOZOIDES DE LOS MAMÍFEROS.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS	
PURIFICACIÓN DE CALRETICULINA.....	19
PURIFICACIÓN DE CALMODULINA.....	19
EXTRACCIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL COBAYO.....	20
DETECCIÓN DE CALRETICULINA, CALMODULINA, RECPTOR PARA EL IP ₃ Y SINAPSINA-I POR INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA.....	21
EXTRACTO COMPLETO DE ESPERMATOZOIDES	21

PERMEABILIZACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES CON ESTREPTOLISINA- O (SLO).....	21
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS.....	22
DETECCIÓN POR WESTERN BLOT DE CRT EN EL EXTRACTO COMPLETO DE LOS ESPERMATOZOIDES Y EN EL SOBRENADANTE DE LOS ESPERMATOZOIDES PERMEABILIZADOS.....	22
AISLAMIENTO DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS.....	22
ENSAYO DE INTERACCIÓN DE LA CALMODULINA CON LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS.....	23
DETECCIÓN POR OVERLAY DE LAS PROTEÍNAS DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS QUE SE UNEN A CRT.....	23
INMUNOPRECIPITACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS QUE SE UNEN A CaM.....	24
AISLAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS DE LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS QUE SE UNEN A CRT.....	24
OBTENCIÓN DE LAS VESÍCULAS MIXTAS DE LA REACCIÓN ACROSOMAL..	25
ENTRECruzAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS POR 1-ETIL-3-(3-DIMETIL-AMINO-PROPIL)-CARBODIMIDA (EDAC).....	25

RESULTADOS

DETECCIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CRT EN LOS ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFEROS DE DIFERENTES ESPECIES.....	27
EFEECTO DE LA PERMEABILIZACIÓN CON ESTREPTOLISINA O DE LOS ESPERMATOZOIDES, SOBRE LA LOCALIZACIÓN DE CRT.....	27
INTERACCIÓN DE LA CaM EXÓGENA CON LAS MEMBRANAS ESPERMÁTICAS.....	31
DETECCIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE ASOCIAN A CaM Y A CRT EN MEMBRANAS ESPERMÁTICAS AISLADAS.....	33
INMUNODETECCIÓN E INMUNOLocalIZACIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE ASOCIAN TANTO A CaM COMO A CRT.....	33

LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE CRT, CaM, IP ₃ R Y SNP-I.....	35
INTERACCIÓN DE CaM Y CRT CON LAS PROTEÍNAS IP ₃ R Y SNP-I.....	37
IP ₃ R Y CRT SE ENCUENTRAN EN CONTACTO MOLÉCULAR.....	42
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52

RESUMEN

La reacción acrosomal (RA) es un proceso de exocitosis que sufren los espermatozoides de los mamíferos y que es necesario para la fertilización, ya que los espermatozoides que aun no sufren RA no pueden penetrar la zona pelúcida ni fusionarse con el oolema. La RA involucra la fusión y la vesiculación de las membranas plasmática (MP) y acrosomal externa (MAE), es un proceso dependiente de calcio (Ca^{2+}), por lo que proteínas que unen Ca^{2+} podrían estar involucradas en los mecanismos moleculares de la RA. Dos proteínas que unen Ca^{2+} ; calmodulina (CaM) y calreticulina (CRT), son importantes mediadores del Ca^{2+} intracelular en células eucariotas. Es conocido que ambas proteínas regulan la actividad de otras proteínas asociándose a ellas, como el caso de PKC, CaM cinasa y del receptor para el inositol (1,4,5) trifosfato (InsP_3 R). CaM es un inhibidor endógeno de la función del InsP_3 R, mientras que CRT modula la actividad del InsP_3 R en ovocitos de *Xenopus*. En los espermatozoides de los mamíferos, CaM y CRT se han localizado en la región acrosomal y aunque se ha sugerido su participación en la RA, el mecanismo por el cual ambas proteínas regulan la RA, es pobremente entendido. Por lo que en el presente trabajo se propuso estudiar: 1) el efecto de CaM y CRT en la RA, 2) a que proteínas de las membranas espermática se asocian CaM y CRT, y 3) si CaM y CRT se encuentran asociadas a el InsP_3 R.

En un modelo de espermatozoides permeabilizados con estreptolisina O (sptz-SLO), e incubados en un medio Tyrode sin Ca^{2+} , CaM y CRT mostraron efectos antagónicos, CRT incrementa la RA de manera dependiente de concentración, mientras que CaM inhibe la RA también de manera dependiente de la concentración. Ambas proteínas tuvieron un efecto máximo a la concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para saber si las proteínas añadidas se asocian a los sptz-SLO, ellas fueron localizadas por inmunofluorescencia indirecta (IFI). En sptz-SLO, CRT no fue encontrada y CaM se encontró en la región acrosomal y a todo lo largo del flagelo. El análisis de los sptz-SLO tratados con CRT mostraron que la proteína se asocio a la región acrosomal. Un control realizado con espermatozoides no permeabilizados, mostró que CRT y CaM no

se asocian a la superficie externa de los espermatozoides. El análisis por western blot (Wb) del medio de incubación de los sptz-SLO reveló solo la presencia de CRT. Resultados similares fueron obtenidos en espermatozoides de otras especies: ratón, rata, hámster, conejo y jerbo.

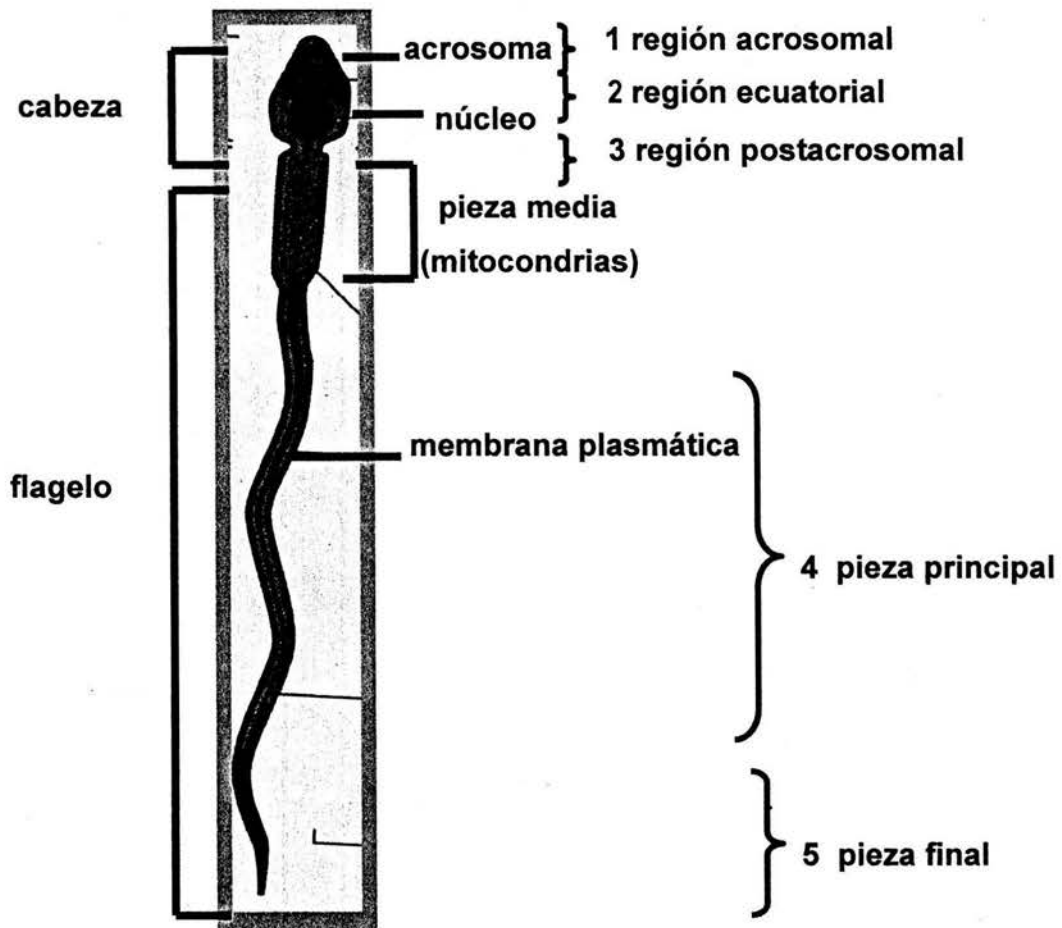
Con el fin de determinar a que proteínas de las membranas espermáticas se asocian CaM y CRT, se realizaron detecciones por overlay sobre membranas espermáticas, usando CaM o CRT biotiniladas. Los resultados muestran que ambas proteínas se asociaron a proteínas provenientes de las membranas espermáticas, las cuales mostraron movilidades relativas (Mrs) similares. El análisis por Wb de las proteínas inmunoprecipitadas con anticuerpos anti-CaM y proteínas aisladas usando sefarosa-CRT, mostraron que una de las proteínas que se asocia tanto a CaM como a CRT es el InsP₃R. Interesantemente otra proteína que fue coimmunoprecipitada con CaM fue sinapsina I. Por Wb se determinó la presencia del InsP₃R en la MAE y la de sinapsina I en la MP y MAE. Los resultados fueron confirmados por IFI en espermatozoides carentes de MP, donde el InsP₃R, sinapsina I, CaM y CRT fueron localizados sobre la MAE. Los resultados aquí mostrados sugieren una hipótesis para explicar el antagonismo de ambas proteínas durante la RA; es posible que CaM pudiera inactivar al InsP₃R presente en la región acrosomal de los espermatozoides del cobayo durante la capacitación, mientras que la apertura del InsP₃R es activada durante la RA por el InsP₃ y modulada por CRT. Por otro lado, se ha sugerido que el acrosoma es un almacén de Ca²⁺, aunque es desconocida la forma en que el Ca²⁺ es almacenado en el acrosoma, nosotros sugerimos que dada la alta capacidad de la CRT para asociar Ca²⁺ y su presencia en la MAE, ella es la principal proteína que almacena Ca²⁺ en el acrosoma. También sugerimos que la presencia de sinapsina I en la MAE pudiera estar asociando al citoesqueleto cortical con la MAE y que su función pudiera estar regulada por CaM.

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de los mamíferos son células altamente polarizadas que consisten de dos partes esencialmente, la cabeza y el flagelo. El espermatozoide está rodeada por la membrana plasmática, y esta ha sido diferenciada en cinco regiones especializadas: la región acrosomal, la región ecuatorial, la región postacrosomal, la pieza media y la pieza principal (Bedford y Hoskins, 1990) (esquema 1). A cada región de la membrana plasmática se le considera con una función especializada, así como con una composición de lípidos y proteínas específica para proveer un ambiente adecuado para cada función (Holt, 1984; Peterson y Russell, 1985). La cabeza espermática contiene al núcleo, al acrosoma y una baja cantidad de citosol, y está involucrada en la interacción con el óvulo. La pieza media que contiene a las mitocondrias, está involucrada en la producción de energía y en conjunto con la pieza principal, en la motilidad espermática.

CAPACITACIÓN

Los espermatozoides de los mamíferos no tienen la capacidad de fertilizar al óvulo inmediatamente después de la eyaculación, por lo que requieren de un periodo de incubación en el tracto reproductivo de la hembra para adquirir la capacidad de fertilizar. Durante este tiempo, los espermatozoides sufren un proceso de preparación no bien definido, conocido como capacitación. No está establecido un marcador que claramente demuestre la capacitación, sin embargo, se han observado varios cambios intracelulares que se conoce que ocurren durante este periodo, dentro de los que se incluyen; un incremento del metabolismo energético, incremento en la fluidez de la membrana, eflujo de colesterol, cambios intracelulares en las concentraciones de Ca^{2+} , HCO_3^- , AMPc, fosforilación de proteínas y cambios en los patrones de nado y motilidad quimiotáctica (Yanagimachi, 1994; Visconti y col., 2002). Estos eventos son llevados a cabo posiblemente por la activación de una o más vías de señalización, en las cuales el eflujo de colesterol de la membrana plasmática es muy importante, ya que incrementa la permeabilidad a los iones HCO_3^- y Ca^{2+} , conduciendo a la activación de



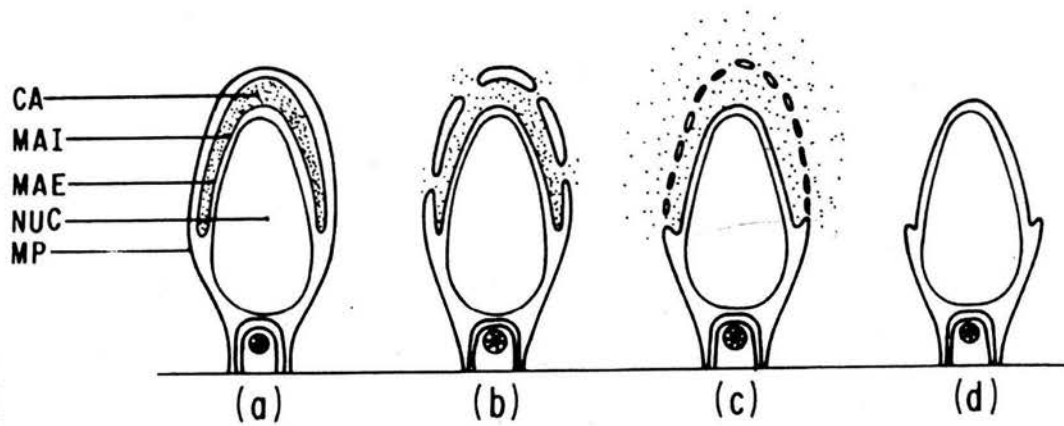
Esquema (1). Esquema general de los espermatozoides de los mamíferos. El espermatozoide está rodeado por una membrana plasmática y ésta ha sido diferenciada en cinco regiones especializadas: la región acrosomal, la región ecuatorial, la región postacrosomal, la pieza media y la pieza principal (Bedford y Hoskins, 1990).

la adenilato ciclasa (AC), a la subsecuente activación de la proteína cinasa A (PKA) por AMPc y a la consecuente fosforilación de proteínas en tirosina (Visconti y col., 2002). La fosforilación de proteínas en tirosina también puede ocurrir vía la activación de un receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), presente en la cabeza de los espermatozoides del bovino (Lax y col., 1994). La fosforilación está relacionada con la polimerización de actina-F y la migración de la fosfolípasa C (PLC) del citoplasma a la membrana plasmática (Breitbart, 2002). Una vez que los espermatozoides han sido capacitados, pueden interactuar con las envolturas del óvulo y entonces llevarse a cabo la reacción acrosomal (RA).

REACCIÓN ACROSOMAL

Los espermatozoides de los mamíferos poseen una estructura en forma de saco, llamada acrosoma, la cual se deriva del complejo de Golgi, que se encuentra sobre la región anterior del núcleo. El acrosoma está delimitado por una membrana que se le denomina como acrosomal externa (MAE) adyacente a la membrana plasmática y la acrosomal interna (MAI), cercana a la envoltura nuclear. En su interior, la matriz acrosomal contiene enzimas hidrolíticas que son necesarias para la degradación de las envolturas del óvulo (Yanagimachi, 1994). Las principales enzimas contenidas en el acrosoma son: la acrosina/proacrosina, la hialuronidasa, la neuraminidasa, las fosfolipasas A, C y D, la catepsina D y la acetilglucosaminidasa. Algunas de ellas participan en la degradación de las envolturas del óvulo durante la fertilización (Austin, 1982; Yanagimachi, 1988).

Morfológicamente la RA ocurre en varios pasos (Figura 2): (a) cabeza intacta del espermatozoide, (b) fusión de la membrana plasmática y la acrosomal externa en múltiples sitios y con el inicio de la dispersión del contenido acrosomal, (c) formación de vesículas mixtas y su liberación al medio extracelular y la completa liberación de las enzimas y otros componentes contenidos en la matriz acrosomal, con la consecuente pérdida del acrosoma, quedando así expuesta la MAI. (d) La integridad del espermatozoide se mantiene con la fusión de la MP y un residuo de la MAI, a nivel del segmento ecuatorial (Oura y Toshimori, 1990). Una vez que sucede la RA, los



Esquema (2). Pasos de la reacción acrosomal (RA). (a). Cabeza intacta del espermatozoide, (b) fusión de la MP y la MAE en múltiples sitios e inicio de la dispersión del contenido acrosomal c) formación de las vesículas mixtas y la completa dispersión del contenido acrosomal, (d) cabeza del espermatozoide después de la RA, donde parte de la MAE perteneciente al segmento ecuatorial permanece después de la RA. Cápsula acrosomal (CA), Membrana acrosomal externa (MAE), núcleo (NUC) y membrana plasmática (MP).

espermatozoides adquieren un nuevo dominio de fusión, en la MP sobre la región ecuatorial el cual puede ser reconocido por los receptores presentes en el oolema (Saling y col., 1980) (ver esquema 2).

La RA es un proceso de exocitosis regulada, ya que es inducida por dos moléculas que han sido reconocidas como efectoras naturales de la RA; la progesterona (P) que es secretada por la de las células de la granulosa que constituyen el cumulus oophorus, y la glicoproteína ZP_3 que es una molécula constitutiva de la zona pelúcida (Kirkman-Brown et al., 2002). Debido a que morfológicamente la RA involucra puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Allen y Green, 1997; Gur y col., 1998). La RA ha sido considerada un proceso de exocitosis, similar al de las células exocrinas somáticas. Ambos procesos son similares con respecto a su dependencia de un influjo de calcio y a la ausencia de partículas intramembranales en los sitios de exocitosis (Martín, 1997), así como a la presencia de algunas proteínas involucradas en la exocitosis, presentes en el espermatozoide y que podrían participar en la RA, tales como: la sinaptogamina, las anexinas, la calmodulina y las proteínas que se unen a calmodulina (CAPs). Sin embargo, la RA difiere de la exocitosis regulada de las células somáticas en que: 1) la RA involucra la pérdida de parte de su membrana plasmática y acrosomal externa, y 2) en la RA, los sitios de exocitosis son pobres en colesterol (Oura y Toshimori, 1990; Parks y Ehrenwal, 1990).

EL CALCIO EN LA CAPACITACIÓN Y EN LA REACCIÓN ACROSOMAL

Durante la capacitación de los espermatozoides de los mamíferos incluyendo al del ser humano (Baldi y col., 1991; García y Meizel, 1999) se incrementa la concentración del calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (Yanagimachi, 1994). El mecanismo que regula el influjo de Ca^{2+} durante la capacitación es desconocido, se ha sugerido que el Ca^{2+} entra a los espermatozoides de forma pasiva, como consecuencia del cambio de permeabilidad en la MP provocado por un eflujo de colesterol (Langlais y Roberts, 1985). También se ha propuesto que el influjo de Ca^{2+} es mediado por un canal de Ca^{2+} , el cual es regulado por la hiperpolarización de la membrana plasmática durante la

capacitación (ver Darszon y col., 1999). Por otro lado, entre los mecanismos que regulan la $[Ca^{2+}]_i$ en los espermatozoides y que están asociados a la MP, se encuentran: la Ca^{2+} -ATPasa, la cual actúa como una bomba de extrusión de Ca^{2+} (Fraser, 1992), un sistema intercambiador de Ca^{2+}/H^+ y un antiporter Na^+/Ca^{2+} (Fraser, 1995),

Por varios años se sugirió, que los espermatozoides no poseían almacenes de calcio intracelular, ya que carecen de retículo endoplásmico. Sin embargo recientemente se ha comunicado que durante la capacitación, el Ca^{2+} citosólico es activamente transportado del citoplasma a la matriz acrosomal, actividad que es realizada por una bomba de Ca^{2+} , dependiente de ATP presente en la membrana acrosomal externa (Dragivela y col., 1999; Dorval y col., 2002). La bomba es sensible a la tapsigardina, una droga que inhibe específicamente a la bomba de Ca^{2+} del retículo endoplásmico en otros tipos celulares (Thastrup y col., 1990). La inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa acrosomal, causa un incremento de Ca^{2+} citosólico, primero en la cabeza y después en la pieza media, esto solamente en presencia de Ca^{2+} extracelular. Tal incremento es capaz de inducir la RA en espermatozoides capacitados (Blackmore, 1993; Meizel y Turner, 1993; Spungin y Breitbart, 1996; Wiesner y col., 1998; Parrish y col., 1999). Los efectos antes señalados de la tapsigardina sobre el espermatozoide, dieron la primera indicación de la existencia de almacenes de Ca^{2+} intracelulares en los espermatozoides de los mamíferos. El Ca^{2+} almacenado en el acrosoma (Ca^{2+}_A) durante la capacitación parece tener un papel relevante en la RA, ya que se sugiere que durante este proceso el Ca^{2+}_A es liberado a través del receptor de IP_3 (IP_3R) presente en la MAE (Walensky y Snyder, 1995; Kuroda y col., 1999; Minelli y col., 2000; Naaby-Hansen y col., 2001). Se ha sugerido, que el Ca^{2+}_A una vez que se encuentra en el citoplasma, activa a los canales SOC (por sus siglas en inglés: store-operated Ca^{2+} channels), los cuales a su vez permiten el paso del Ca^{2+} extracelular (entrada de calcio de manera capacitativa), el cual es necesario para que la RA se lleve a cabo (O'toole y col., 2000; Darzon y col., 1999).

El IP_3R funciona como un canal de Ca^{2+} activado por IP_3 , el receptor está asociado a los almacenes intracelulares de Ca^{2+} como el retículo endoplásmico, el sarcolema y los calcisomas en otros tipos celulares. IP_3 induce la apertura del IP_3R , lo

que libera el Ca^{2+} almacenado, hacia el citoplasma (Thrower y col., 2001). En el mecanismo de regulación del IP_3R fuertes estudios soportan la hipótesis que están involucradas la calmodulina (CaM) y la calreticulina (CRT), dos proteínas que regulan la concentración del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La primera inactiva la apertura del canal no permitiendo la unión de IP_3 al IP_3R (Patel y col. 1997), mientras que de la segunda se ha sugerido que prolonga la apertura del IP_3R (Xu y col., 1994). Por otro lado, el IP_3R ha sido localizado en la MAE de espermatozoides de varias especies: humano, ratón, bovino y erizo de mar (Walensky y Snyder, 1995; Kuroda y col., 1999; Minelli y col., 2000; Naaby-Hansen y col., 2001; Zapata y col. 1997), aunque el mecanismo de regulación del IP_3R durante la capacitación y la reacción acrosomal es desconocido. Sin embargo, se sabe que el IP_3 es producido por las fosfolipasas $\text{C}\beta$ y $\text{C}\gamma$ justo antes de que la RA se lleve a cabo (ver Roldan, 1998; Breitbart y col., 2002). Ambas fosfolipasas son trasladadas a la MP durante la capacitación y activadas justo antes de la RA (Spungin y Breitbart, 1995; Spungin y col., 1996; Roldan, 1998). Lo anterior sugiere la posibilidad de que el IP_3R esté inactivo durante la capacitación.

Por otro lado, se ha sugerido que la unión de la glucoproteína ZP_3 a su receptor espermático, el cual a la fecha es desconocido, activa al menos dos diferentes tipos de receptores en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, uno de ellos es un receptor acoplado a proteína G_i que puede activar tanto a la $\text{PLC}\beta_1$ como a la adenilato ciclasa (AC) (Breitbart y col., 2002). El otro es un receptor con actividad de tirosina cinasa (TKR) que puede activar canales de Ca^{2+} y a la $\text{PLC}\gamma$ (revisado por Wassarman, 1999; Baldi y col., 2002). La activación de cada una de estas proteínas tiene un papel relevante en la RA; el incremento de AMPc activa a la PKA, la cual a su vez activa canales de Ca^{2+} en la MAE, los cuales en conjunto con los canales de Ca^{2+} tipo L o T, conllevan a un incremento transitorio de Ca^{2+} en el citoplasma (O'Toole y col., 2000), el cual posiblemente es requerido para la producción de IP_3 y DAG a través de la activación de las fosfolipasas C o D. Por otro lado, el IP_3 induce la apertura del IP_3R , que como se mencionó anteriormente, permite la liberación del Ca^{2+}_A y la activación de los canales SOC (O'Toole y col., 2000).

Después de que la RA ha sucedido, la membrana acrosomal interna queda expuesta, y se forma un nuevo dominio en la MP que cubre el segmento ecuatorial y la región postacrosomal, el cual, como indicamos anteriormente, es muy importante para la interacción de la MP del espermatozoide con el oolema (Glander y Haustein, 1987; Yanagimachi, 1994).

LA CALMODULINA

La calmodulina (CaM) es una proteína pequeña (17 kDa) que regula el Ca^{2+} intracelular, la cual fue descubierta en el tejido cerebral a finales de los años sesenta y es ubicua en las células eucariontes. Numerosas actividades se le han atribuido, por lo que se le ha considerado como una molécula importante en la mediación de múltiples eventos dependientes de Ca^{2+} en las células eucariontes. Una célula animal típica contiene más de 1×10^7 moléculas de CaM, lo cual constituye aproximadamente el 1% de la masa proteínica total de la célula. La CaM funciona como el principal receptor celular citosólico del Ca^{2+} , la proteína es un solo polipéptido altamente conservado que se compone de 150 aa, con 4 sitios de unión a Ca^{2+} de alta afinidad, la unión de uno o más iones Ca^{2+} a estos sitios, modifica la conformación de la proteína exponiendo sitios hidrofóbicos que le permiten a la CaM asociarse a enzimas, activando o incrementando la actividad de ellas, tal es el caso de algunas proteínas-cinasa, proteínas-fosfatasa y fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos. Un ejemplo claro es la activación de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática, la cual bombea Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular, de tal manera que si la concentración de Ca^{2+} se incrementa en el citoplasma, el complejo Ca^{2+} -CaM se asocia a la bomba y la activa, reestableciendo los niveles normales de Ca^{2+} . Lo anterior constituye un mecanismo autorregulador, para mantener baja la concentración de Ca^{2+} intracelular (Fraser y McDermott, 1992; Fraser, 1995). Otros de los efectos del complejo Ca^{2+} -CaM son indirectos y están mediados por proteínas-cinasa (Schulman, 1993). CaM también participa en la regulación del citoesqueleto, asociándose de manera dependiente o independiente de Ca^{2+} a diferentes proteínas que componen al citoesqueleto como: espectrina, miosina I, caldesmon, filamentos intermedios (Kakiuchi y Sobue, 1983) y

sinapsinas (Nicol y col. 1997) entre otros. Por otro lado, algunos datos sugieren que la regulación de las enzimas mediada por CaM es debida a la alteración en el flujo neto de Ca^{2+} o a su distribución, más que a los cambios en el contenido celular de CaM. Así mismo se conocen ejemplos donde CaM puede interactuar con diferentes proteínas de manera independiente de Ca^{2+} .

LA CALMODULINA EN LOS ESPERMATOZOIDE DE LOS MAMÍFEROS

La CaM ha sido ampliamente estudiada en los espermatozoides de diferentes especies de mamífero, aunque su función tanto en la capacitación como en la RA no ha sido del todo entendida. CaM es una proteína reguladora de Ca^{2+} localizada en varias regiones de la cabeza y del flagelo espermático. En el espermatozoide del cobayo (Trejo y Mújica, 1990), conejo (Jones y col., 1980), toro (Feinberg y col., 1981), rata (Lagace y col., 1981) y hámster (Moore y Dedman, 1984) fue detectada tanto en la región acrosomal como en la región postacrosomal así como en la parte distal y proximal del flagelo. Por microscopia electrónica se ha localizado a la CaM en el espermatozoide del cobayo en el citoplasma rodeando al acrosoma, pero no dentro de él (Yamamoto, 1985), a lo largo de las fibras densas (Gordon y col., 1983), en el axonema y en la vaina fibrosa del flagelo (Yamamoto, 1985). En comparación, en el espermatozoide del cerdo fue encontrada tanto dentro como fuera del acrosoma, en la región postacrosomal, el cuello y en varias estructuras de la pieza media del flagelo (Camatini y col., 1986). En el espermatozoide del toro y del carnero, CaM fue principalmente detectada en la región postacrosomal, a lo largo del axonema y la vaina fibrosa de la pieza principal del flagelo (Weinman y col., 1986a,b).

La función que se le ha atribuido a la CaM en el espermatozoide es en la regulación de la motilidad flagelar, la cual ha sido extensamente estudiada (Tash, 1989). Por otro lado, se ha sugerido la participación de esta proteína en otros mecanismos dependientes de calcio, tales como la capacitación (Leclerc y col., 1990), la reacción acrosomal y la fusión óvulo-espermatozoide (Jones y col., 1980; Moore y Dedman, 1984; Weinman y col., 1986a,b; Camatini y col., 1986; Aitken y col., 1988).

En los espermatozoides de los mamíferos CaM ha sido localizada en el acrosoma (Jones y col., 1980; Weinman y col., 1986; Camatini y col., 1986; Trejo y Mújica, 1990 y Camatini y col., 1991) lo cual sugiere la participación de esta proteína en los procesos de capacitación y la RA. Ha sido propuesto que CaM afecta la capacitación a través de la regulación de Ca^{2+} (Peterson y col., 1983; Fraser y col., 1995). También se han detectado varias proteínas que se unen a CaM en los espermatozoides de los mamíferos (Moore y Dedman, 1984; Noland y col., 1985; Olson y col., 1985; Leclerc y col., 1989; Leclerc y col., 1990; Wasco y col., 1989; Hernández-González y col., 1994), así como en el semen (Manjunath y col., 1993). Entre las proteínas que se unen a CaM, al menos de tres se conoce su participación en los procesos de capacitación y de la RA, éstas son la fosfolípasa A_2 que co-localiza con CaM (Weinman y col., 1986), la acrosina que se conoce que interactúa *in vitro* con ella (Frenette y col., 1990) y la ATPasa de Ca^{2+} , la cual regula la $[Ca^{2+}]_i$ (Frasser y col., 1995). Recientemente, se ha sugerido que CaM inhibe la RA en espermatozoides de ratón permeabilizados con estreptolisina-O (Hernández, 1996; Yunes y col., 2002), aunque el mecanismo por el cual realiza tal efecto es desconocido.

LA CALRETICULINA

La Calreticulina (CRT) es una proteína del lumen del RE que une Ca^{2+} . Por primera vez fue aislada por Ostwal y MacLennan en 1974, como una proteína del retículo sarcoplásmico. La calreticulina ha recibido diferentes nombres entre ellos calregulina o Erp60; posteriormente clonada en 1989 por Smith y Koch, Fligel y colaboradores, a la fecha su ADNc y el gene que codifica para la CRT ha sido aislado tanto de vertebrados como de invertebrados, así como de plantas superiores. La proteína es codificada por un solo gen y solamente una especie de RNAm de 1,9 kb que codifica para CRT ha sido identificado, no hay evidencia de splicing alternativo en el RNAm. El gen de CRT contiene 9 exones y extensiones de 3.6 o 4.6 kb de ADN genómico en el ser humano o en el ratón, respectivamente. En el ser humano y en el ratón la secuencia nucleotídica muestra una identidad muy grande del 70%, con

excepción de los intrones 3 y 6 lo cual indica que el gen ha sido altamente conservado durante la evolución (Michalak y col., 1999).

La CRT tiene un peso molecular de 46 kDa, aunque por PAGE-SDS ella muestra una M_r de entre 50,000 y 60,000 daltones. Estructuralmente, CRT tiene una organización tripartita (ver esquema 3) la cual contiene: un dominio N terminal cuya secuencia de aminoácidos es extremadamente conservada en todas las calreticulinas, este dominio une Zn^{2+} , también interactúa con el dominio de unión al ADN del receptor de glucocorticoides *in vitro*, con el ARN del virus de la rubéola, con α -integrina, con la proteína disulfuro isomerasa (PDI) y la proteína 57 del RE (Erp57). La interacción de esta región de CRT con la PDI inhibe su función de chaperona, pero incrementa la actividad de Erp57. Estas interacciones proteína-proteína son reguladas por la unión de Ca^{2+} al dominio C de la CRT. El dominio N de CRT también inhibe la proliferación de las células endoteliales y suprime la angiogénesis (Michalak y col., 1999).

El dominio P de CRT posee una secuencia rica en prolina con tres repetidos, cuya secuencia de aminoácidos es PXXIXDPDAXKPEDWDE (repetido A), seguida de tres repetidos con al siguiente secuencia GXWXPPIXNPXYX (repetido B), esta región une Ca^{2+} con alta afinidad y los repetidos pueden ser esenciales para la unión del Ca^{2+} . Los repetidos A y B de la molécula son importantes para su actividad de chaperona. CRT también interactúa con perforina, un componente de los gránulos de las células T-citotóxicas. El dominio P tiene actividad de lectina y una secuencia similar a la de otras chaperonas que unen Ca^{2+} , incluyendo calnexina, calmegina y CALNUC, proteínas que unen Ca^{2+} en el Golgi (Michalak y col., 1999).

El dominio de la región C-terminal de la proteína es altamente ácido y tiene una secuencia terminal de recuperación o regreso al RE llamada KDEL. Este dominio de la molécula une 25 moles de Ca^{2+} por mol de proteína y ella también se une a factores de coagulación sanguínea, e inhibe la restenosis inducida por daño. Este dominio de unión a Ca^{2+} de CRT juega un papel regulador en el control de la interacción de CRT y PDI, Erp57 y quizá otras chaperonas (Michalak y col., 1999).

FUNCIONES DE LA CALRETICULINA

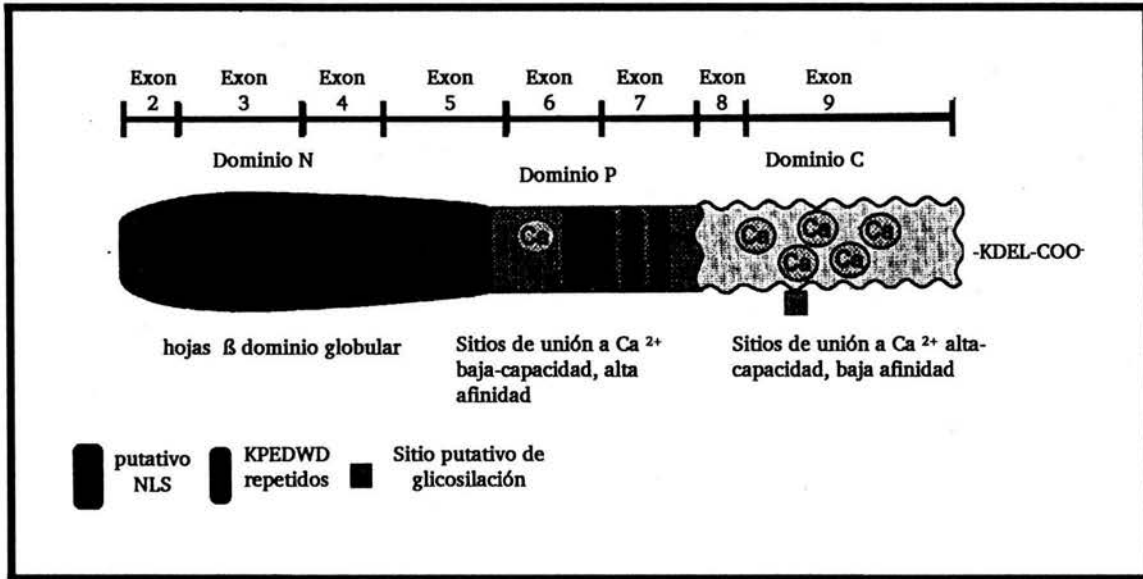
Por su localización celular a la CRT se le ha involucrado en cuatro procesos celulares importantes: dentro del lumen del retículo endoplásmico (1) como chaperona y (2) en el almacenamiento y la vía de señalización del almacenamiento del Ca^{2+} . Mientras que fuera del retículo endoplásmico ha sido involucrada en (1) la adhesión celular y (2) en la regulación de la expresión del genoma (Krause y Michalak, 1997).

En un trabajo previo en nuestro laboratorio, se aisló a una proteína de 50 kDa (sp50) a partir del testículo del cobayo. La proteína presentó la característica de unirse a biomembranas, y a las membranas del espermatozoide del cobayo, de manera reversible y dependiente de Ca^{2+} (Hernández-González y col 1996; Hernández-González y Mújica, 1997). Sp50 fue secuenciada, en sus 25 aminoácidos N-terminales y se le encontró una completa identidad con la secuencia N-terminal de la CRT de los linfocitos-T y LAK CRT (Dupuis y col., 1993). Los anticuerpos anti-CRT dirigidos contra la región C-terminal, reconocieron a Sp50 así como a la CRT pura. Además el anticuerpo cruzó con una sola banda proteica de 50 kDa de un extracto espermático obtenido con el detergente no iónico Brij 36T y con una banda proteica de 60 kDa en extractos de ovocitos del hámster (Muñoz-Gotera y col., 2001). Conjuntamente estos resultados demostraron que sp50 y CRT son la misma proteína. Más tarde esta proteína fue buscada en el ovocito del hámster y fue localizada en los gránulos corticales con una Mr de 60 kDa, además la CRT fue excitada durante la reacción cortical, asociándose a la superficie del óvulo, de manera tal que se sugirió que podría participar en el bloqueo a la poliespermia (Muñoz-Gotera, 2001).

CALRETICULINA EN LOS ESPERMATOZOIDES DE LOS MAMÍFEROS

La CRT ha sido localizada sólo en la región acrosomal de los espermatozoides, del ratón (Nakamura y col., 1992), rata (Nakamura y col., 1992), cobayo (Hernández-González y col., 1996; Muñoz-Gotera y col., 2001) y del ser humano (Naaby-Hansen y col., 2001), por lo que se ha sugerido su participación en la RA. Al respecto, nuestro grupo encontró que en un modelo de espermatozoides permeabilizados con estreptolisina-O, el tratamiento con CRT incrementó la RA de manera dependiente de

concentración, el mecanismo por el cual CRT realiza tal efecto se desconoce (Hernández-González, 1996).



Esquema 3. Molécula de calreticulina (Michalak, M y col. 1992).

JUSTIFICACIÓN

La calmodulina ha sido encontrada en la región acrosomal y en el flagelo de espermatozoides de los mamíferos, lo que podría implicar una función similar en estas células. La CRT se ha descrito en los espermatozoides del ratón (Nakamura y col., 1992), rata (Nakamura y col., 1992), del ser humano (Naaby-Hansen y col., 2001), y del cobayo (Hernández-González y col., 1996; Muñoz-Gotera et al., 2001), desconociéndose si la CRT está presente en espermatozoides de otras especies. Por otro lado, tanto la CaM como la CRT son proteínas reguladoras de la $[Ca^{2+}]_i$ y la relación CRT/CaM en la reacción acrosomal no ha sido aclarada. Sabemos que estas proteínas tienen una función antagónica en la RA; la CRT la favorece, mientras que CaM la inhibe (Hernández, 1996; Hernández-González y Mújica, 1997). Se desconoce el mecanismo de como ellas realizan esta función antagónica, tampoco se conoce si su interacción es directa con las membranas espermáticas o a través de otras proteínas presentes en las membranas espermáticas y si esto tiene relación con la RA. Es por ello que en el presente trabajo se han propuesto los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de CRT en espermatozoides de otras especies de mamíferos distintas al cobayo. Así como analizar la interacción de CRT y CaM en membranas espermáticas aisladas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar mediante inmunofluorescencia e inmunoblot, la presencia de CRT en los espermatozoides del conejo, hámster, jerbo, rata y ratón.
- 2.- Determinar la presencia de CRT en espermatozoides del cobayo, conejo, hámster, jerbo, rata y ratón, permeabilizados con estreptolisina-O.
- 3.- Determinar si la CaM interacciona con las membranas de los espermatozoides del cobayo y si esta interacción depende de calcio en comparación con lo comunicado para CRT.
- 4.- Analizar a las proteínas de las membranas espermáticas del cobayo, que interaccionan con CaM y CRT y determinar si estas se encuentran asociadas al receptor del IP_3 (IP_3R).

MATERIAL Y MÉTODOS

Purificación de calreticulina

La calreticulina fue purificada a partir del testículo del cobayo siguiendo la técnica descrita por Hernández-González y col. (1996). Cien gramos de testículo fueron homogeneizados a 0°C, en 200 ml de amortiguador A (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, EGTA 5 mM) adicionado de 7 inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, pHMB 2 mM, pAB 2 mM, benzamidina 2 mM, aprotinina 1µM, leupeptina 1µM. El homogeneizado fue filtrado a través de fibra de vidrio y centrifugado a 15,000 X g por 15 min. El sobrenadante fue centrifugado a 39,000 X g por 30 min. El sobrenadante colectado fue suplementado con 6.5 mM de CaCl₂ (concentración final) y mezclado suavemente por 30 min a 0°C y centrifugado a 39,000 X g por 30 min. Las proteínas precipitadas con calcio fueron lavadas con el amortiguador A, en el cual el EGTA fue reemplazado por CaCl₂ 1 mM, y la suspensión centrifugada a 39,000 X g por 30 min. La pastilla obtenida fue resuspendida en amortiguador A suplementado con 10 mM de EGTA e incubada por 30 min, la suspensión fue centrifugada a 10,000 X g por 30 min. El sobrenadante obtenido fue dializado contra 500 ml de amortiguador B (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 10 mM), con dos cambios, a intervalos de 4 h.

El sobrenadante dializado se pasó por una columna de mono Q. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas usando un gradiente discontinuo de NaCl (100, 200, 300, 400 y 500 mM) en amortiguador B. Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE (en acrilamida al 10%)(Laemmli, 1970).

Purificación de calmodulina

La proteína calmodulina fue purificada a partir de testículos de bovino siguiendo las técnicas descritas por Gopalakrishna y Anderson (1982) y Dedman y Kaetzel (1983). Quinientos gramos de tejido testicular de bovino, sin túnica albugínea ni epidídimo, se homogenizaron en amortiguador A (Tris 40 mM, NaCl 100 mM, EDTA 4 mM, 2-mercaptoetanol 0.5 ml/litro pH 7.4). La suspensión se centrifugó a 5,000 X g por 15 min. El sobrenadante fue colectado y filtrado a través de fibra de vidrio, la suspensión obtenida se calentó en baño María por 10-15 min o más, hasta que el color

mamey, que presentaba, cambió a un color café claro. La suspensión fue enfriada rápidamente en una mezcla de hielo seco-acetona y centrifugada a 5,000 X g por 30 min a 4°C. El sobrenadante fue dializado contra amortiguador B (Tris 40 mM, NaCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 0.5 ml/litro pH 7.4) a 4°C por toda la noche con 2 cambios de 1 litro cada vez. El dializado se centrifugó por 30 min a 5,000 X g, a temperatura ambiente y se colectó el sobrenadante, del cual se purificó a la CaM. Al sobrenadante ya dializado se le añadió CaCl_2 2 mM de (concentración final) y se aplicó a una columna de fenil-sefariosa. La columna había sido previamente equilibrada con el amortiguador B, sin 2, mercaptoetanol y suplementado con de CaCl_2 2 mM. Inmediatamente después de que el sobrenadante terminó de pasar, la columna se lavó con el amortiguador C (Tris 40 mM, NaCl 500 mM, CaCl_2 2.5 mM pH 7.4), hasta que la absorbencia a 280 nm registró una basal < 0.05. Enseguida se lavó con el amortiguador D (Tris 40 mM, NaCl 75 mM, CaCl_2 2 mM pH 7.4), y de la misma manera que el amortiguador B, hasta que la absorbencia a 280 nm registró una basal < 0.05. La CaM fue eluída de la columna con el amortiguador E (Tris 40 mM, NaCl 75 mM, EDTA 4 mM pH 7.4) colectando fracciones de 2 ml. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry y col., (1951) y la pureza determinada por SDS-PAGE (poliacrilamida al 15%) (Laemmli, 1970). Como último paso la CaM fue dializada contra el amortiguador F (NaB_4O_7 25 mM, H_2BO_3 , NaCl 75 mM pH 8.4) y se conservó a 4°C.

La columna fue regenerada tratándola con las siguientes soluciones: urea 6 M disuelta en amortiguador E (200 ml), agua destilada, etanol al 50% (200 ml) agua destilada, enseguida amortiguador D que contenía 0.05% de azida de sodio y se conservó a 4°C.

Extracción de espermatozoides del cobayo

Los gametos fueron colectados por perfusión de los conductos deferentes de cobayos adultos, aplicando una solución de NaCl 0.154 M, e inmediatamente las células fueron lavadas 2 veces por centrifugación-resuspensión (500 X g por 4 minutos), en la solución de NaCl. La concentración de espermatozoides fue cuantificada en una cámara de Neubauer.

Detección de calreticulina, CaM, IP₃R y sinapsina en los espermatozoides por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Los espermatozoides obtenidos de los conductos deferentes de las distintas especies, fueron lavados y fijados por una hora con formaldehído al 1.5% (concentración final) en PBS. Enseguida, los espermatozoides fueron incubados en NH₄Cl 50 mM (15 min), lavados en PBS, en agua destilada y se prepararon frotis. Las células se permeabilizaron con acetona por siete minutos a -20°C y se lavaron con PBS. Inmediatamente fueron tratadas con el anticuerpo específico contra cada una de las proteínas señaladas (anti-CRT, anti-CaM, anti-IP₃R y anti-Sinapsina-I) entre porta y cubreobjetos en cámara húmeda, durante una hora a 37° C. Las células se lavaron con PBS y se incubaron con un segundo anticuerpo, apropiado para cada caso, marcado con rodamina por una hora a 37°C. Las muestras fueron montadas entre porta y cubre, con glicerol-PBS y se sellaron con esmalte de uñas, para su análisis al microscopio de epifluorescencia.

Extracto completo de espermatozoides

Los espermatozoides lavados en NaCl (1,000 x 10⁶ células/ml) se resuspendieron en Tris 50 mM, pH 9 adicionando una mezcla de 7 inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, pHMB 2 mM, pAB 2 mM, benzamidina 2 mM, aprotinina 1µM, leupeptina 1µM y aprotinina 1µM), 2 mM de EDTA y 15% de SDS. La muestra se hirvió por 5 minutos, y se centrifugó a 600 X g por 10 min, recuperándose el sobrenadante.

Permeabilización de los espermatozoides con estreptolisina O (SLO)

Los espermatozoides lavados en NaCl, fueron incubados por 30 min a 37°C en medio Tyrode sin calcio; enseguida para permeabilizarlos, se le añadieron 400 unidades hemolíticas (UH) de estreptolisina-O (SLO). Después de 10 minutos de incubación, las muestras se centrifugaron a 600 X g por 5 minutos para separar a los espermatozoides. El medio libre de espermatozoides fue filtrado a través de membranas millipor de 0.22 µm y se liofilizaron.

Electroforesis de las proteínas espermáticas

Los extractos proteicos y los medios de capacitación liofilizados fueron analizados por electroforesis en SDS-PAGE al 10% y/o 13% (Laemmli, 1970). Las proteínas fueron reveladas por tinción con plata (Morrisey, 1981).

Detección por Western blot de CRT en el patrón proteico de los espermatozoides completos y en el sobrenadante liofilizado de los espermatozoides permeabilizados.

Las proteínas espermáticas separadas por electroforesis fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (MNC) (Towbin y col., 1979). Se bloquearon los sitios inespecíficos, tratando a las membranas con leche descremada al 5% disuelta en PBS-Tritón X-100 al 1% (PBS-T), durante una hora a 37°C. Para el revelado, las membranas se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-CRT, por 2 h a 37°C. Las membranas se lavaron con PBS-T e inmediatamente se incubaron por una hora a 37°C con un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa. El revelado de las bandas inmunoreactivas se realizó con diaminobenzidina (De Blas y Cherwinski, 1983) o mediante quimioluminiscencia (kit de ESL) en palcas de rayos X (X-Omat, Kodak).

Aislamiento de las membranas espermáticas

Muestras de espermatozoides no capacitados y de capacitados fueron colectados por centrifugación (2,500 X g por 3 min) y resuspendidos en Tris-HCl 50 mM pH 7.4, adicionado con EDTA 2 mM y con los inhibidores de proteasas (PMSF 2 mM, pHMB 2 mM, pAB 2 mM, benzamidina 2 mM, aprotinina 1µM, leupeptina 1µM y aprotinina 1µM). Los espermatozoides fueron sonicados (40w por 30s, a 4°C). La suspensión espermática fue centrifugada a 2,500 X g por 30 min para colectar a los espermatozoides desmembrados. El sobrenadante que contiene a las membranas en fragmentos, fue centrifugado a 100,000 X g por 2 h a 4°C, la pastilla resultante (membranas fragmentadas) fue resuspendida en Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4 en presencia de los inhibidores de proteasas antes mencionados y solubilizada con

SDS al 10% concentración final. Las muestras fueron hervidas por 5 min y las proteínas analizadas por SDS-PAGE, al 10 y/o 13% según fuera el caso (Laemmli,1970).

Ensayo de la interacción de calmodulina con las membranas plasmáticas

Se mezclaron 100 µg de proteínas de membrana (obtenidas a 100,000 X g y resuspendidas en Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4 en presencia de los inhibidores de proteasas) con 0, 5, 10, 20 y 40 µg de CaM, en presencia de calcio (1 mM) y ausencia de calcio (1 mM de EGTA), se incubaron por 15 minutos a 4°C. Las membranas se ultracentrifugaron a 100,000 x g durante 120 minutos. La pastilla obtenida fue resuspendida en el Tris-HCl 50 mM adicionado con 50 µl de complet (mezcla de inhibidores de proteasas) y lavadas dos veces con el mismo amortiguador. Enseguida fueron disueltas adicionando SDS (concentración final 10%) y hervidas por 10 min. En una muestra alícuota, las proteínas de membrana fueron cuantificadas por el método de Markwell y col. (1978) y una vez solubilizadas se analizaron por SDS-PAGE, se transfirieron a MNC y se revelaron con el anticuerpo anti-CaM.

Detección por overlay de las proteínas de las membranas espermáticas que se unen a CRT.

Las proteínas espermáticas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (MNC) (Towbin y col., 1979). Las MNC fueron bloqueadas con albúmina sérica de bovino al 3%, diluida en Tris-HCl 25 mM, NaCl 137 mM, pH 7.4 (TBS), adicionado con Tritón X-100 al 1% (TBS-T) por 2 h a 37°C en agitación constante, posteriormente se bloquearon con avidina no marcada, a una concentración de 100 µg/ml diluida en TBS-T. Las MNC fueron incubadas por una hora a 37°C, con CRT biotinilada diluida apropiadamente en la solución de bloqueo. Las MNC fueron lavados con TBS-T, por 3 veces por 10 min cada vez. Enseguida se incubaron por una hora a 37°C con estreptavidina conjugada con HRP. Finalmente las MNC fueron lavadas como antes se mencionó. Las bandas inmunoreactivas fueron reveladas por quimioluminiscencia y visualizadas en placas de rayos X (X-Omat de Kodak).

Inmunoprecipitación de las proteínas de las membranas espermáticas que se unen a CaM.

Los espermatozoides fueron colectados de los conductos deferentes del cobayo y lavados con NaCl 154 mM como lo describen Trejo y Mújica (1990). Los espermatozoides lavados fueron, ajustados a 35×10^6 células/ml en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4, que contenía a los siguientes inhibidores de proteasas: p-ABA 2 mM, pepstatina 1 μ M, benzamidina 2 mM, leupeptina 1 μ M, aprotinina 1 μ M, PHMB 2 mM, PMSF 2 mM. Los espermatozoides fueron desmembrados por tratamiento con Brij 36T al 2% (concentración final) (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). Los espermatozoides desmembrados fueron colectados por centrifugación a 600 X g por 15 min y los sobrenadantes (extractos Brij) recuperados. Los sobrenadantes fueron mezclados con el anticuerpo anti-CaM, e incubados por 2 h a 4°C en agitación constante. El complejo Ag-Ab fue precipitado adicionando al sobrenadante proteínas A/G unidas a esferas de sefarosa (sefarosa-A/G), la mezcla se incubó por una hora en agitación constante a 4°C. Posteriormente la resina se lavó por centrifugación-resuspensión con PBS-T por cinco veces. Las proteínas asociadas se eluyeron con glicina-HCl 0.1 M pH 2.5, inmediatamente el pH fue neutralizado con 50 μ l de Tris 1M. Se cuantificó la concentración de proteína de ambos inmunoprecipitados por absorbencia a 280/260. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot.

Aislamiento de las proteínas de las membranas espermáticas que se unen a CRT.

En el caso de las proteínas que se unen a CRT la metodología fue diferente. El extracto espermático Brij obtenido como se mencionó anteriormente, se pasó por una columna de afinidad sefarosa-CRT a 4°C. La resina se lavó por centrifugación-resuspensión cinco veces con PBS. Las proteínas asociadas a la sefarosa-CRT se eluyeron con NaCl 500 mM, se cuantificó la cantidad de proteína obtenida por absorbencia a 280/260 mM. Las proteínas eluidas se dializaron toda la noche contra el siguiente amortiguador: Tris-HCl 25 mM, EDTA 2 mM pH 7.4. Las proteínas obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot.

Obtención de vesículas mixtas de RA

Espermatozoides lavados previamente con NaCl fueron incubados en un medio mínimo de cultivo suplementado con piruvato y lactato a 37°C por 20 min (MCM-PL) pH 7.8 (Mújica y Valdes-Ruiz, 1983). Enseguida se les indujo la RA agregando el ionóforo de Ca^{2+} (A23187) a una concentración final de 1.3 μM . Después de siete minutos de tratamiento, más del 90% de los espermatozoides sufrieron la RA. Inmediatamente, a la suspensión espermática se le agregaron los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 4 mM, TLC 2 mM, PHMB 4 mM, pABA 4 mM, leupeptina 5 μM , aprotinina 2 μM y pepstatina 2 μM . Enseguida, los espermatozoides se separaron por centrifugación a 2,000 X g por 30 min a 4°C. El sobrenadante que contenía a las vesículas de RA fue obtenido y centrifugado a 100,000 X g por 1 h a 4°C. La pastilla obtenida fue resuspendida en EDTA 1 mM, Tris, pH 7.5, que contenía los inhibidores de proteasas señalados arriba y 1% de SDS concentración final. Las muestras fueron hervidas por 10 min y las proteínas separadas por SDS-PAGE, transferidas a PNC para su posterior análisis por Western blot.

Método de entrecruzamiento de proteínas por 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodimida (EDAC).

El entrecruzamiento de proteínas se realizó siguiendo los protocolos descritos por Taniuchi y col. (1986) y Gilles y col. (1990). Los espermatozoides lavados en NaCl (0.15 M) fueron ajustados a 50×10^6 de cel/ml en la misma solución de NaCl, se les agregaron los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF 4 mM, TLCK 2 mM, PHMB 4 mM, pABA 4 mM, leupeptina 2 μM , aprotinina 2 μM , pepstatina 2 μM y 100 μl de Complete. Inmediatamente se sonicaron por 30 segundos a 40 de amplitud de onda. Posteriormente los espermatozoides se separaron por centrifugación a 1,000 X g por 30 min a 4°C, al sobrenadante que contenía a las membranas espermáticas, se le agregó el entrecruzador 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)-carbodimida (EDAC) a una concentración final de 2.5 mM, y se incubó por 1 h a 4°C. La reacción fue parada adicionando Tris-HCl 50 mM (concentración final) a pH 7.6. La muestra se centrifugó a

100,000 X g por 1 h a 4°C. La pastilla fue obtenida y solubilizada con Brij 36T al 2.5%, concentración final. La pastilla solubilizada se dividió en dos partes : la primera se inmunoprecipitó con el anticuerpo anti-CRT y la otra con un anticuerpo anti-CaM, siguiendo el método antes descrito. A las proteínas inmunoprecipitadas se les agregó amortiguador de muestra (Laemmli, 1970) y se hirvieron por 7 min. Las muestras se corrieron por SDS-PAGE y se transfirieron a MNC. Western blots fueron realizados para las siguientes proteínas: CaM, CRT, IP₃R y SNP-I.

RESULTADOS

Detección y localización de CRT en espermatozoides de mamíferos de diferentes especies.

Como se había mencionado, CRT ha sido reportada en las espermáticas y en los espermatozoides de la rata (Nakamura y col., 1992, 1993), ratón (Nakamura y col. 1992), cobayo (Hernández-González y col, 1996; Muñoz-Gotera y col. 2001) y del ser humano (Naaby-Hansen y col., 2001). En todos ellos la CRT fue localizada en la región acrosomal. En este trabajo nosotros mostramos que la CRT también está presente en la región acrosomal de espermatozoides del hámster, del conejo y del jerbo (Fig. 1B, C, y D). Así mismo, se corroboró la presencia de CRT en la región acrosomal de los espermatozoides de la rata (Fig. 1E) y del ratón, éste último fue el único que mostró CRT en las regiones principal y terminal del flagelo (Fig. 1A). La inmunodetección de CRT por Wb en las 5 especies fue el siguiente paso en la investigación. El anticuerpo anti-CRT detectó en todos los extractos espermáticos una sola banda de peso molecular de 50 kDa (Fig. 2, líneas C-G), la banda mostró la misma movilidad relativa de la CRT de los espermatozoides del cobayo (Fig. 2, línea B).

Efecto de la permeabilización con estreptolisina O de los espermatozoides, sobre la localización de CRT

Datos de nuestro laboratorio han mostrado la posibilidad de que parte de la CRT se encuentre libre en el citoplasma de los espermatozoides del cobayo, ya que cuando éstos fueron permeabilizados con 400 unidades hemolíticas (UH) de SLO (sptz-SLO), la CRT sale al medio de incubación (Hernández-González y col., 1996). Para determinar si esto mismo sucede en los espermatozoides de otros mamífero, espermatozoides de la rata, ratón y hámster fueron incubados en medio Tyrode (carente de calcio) por 30 min y tratados con 400 UH de SLO por 15 min. La muestra fue centrifugada a 600 X g por 15 min y el sobrenadante filtrado por millipore (0.25µm). Las proteínas de los medios se concentraron por liofilización y fueron resueltas por electroforesis en SDS-PAGE, las proteínas transferidas a MNC. El análisis por Wb usando el anticuerpo anti-CRT, mostró la presencia de CRT en el medio de cultivo

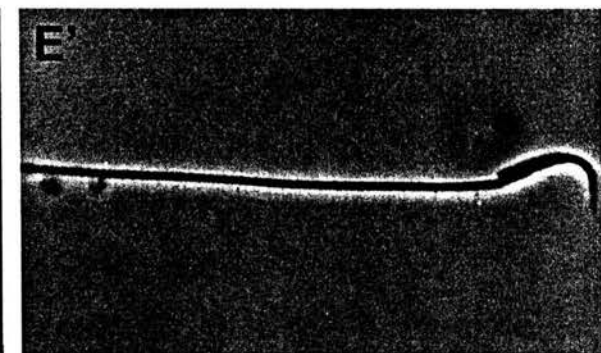
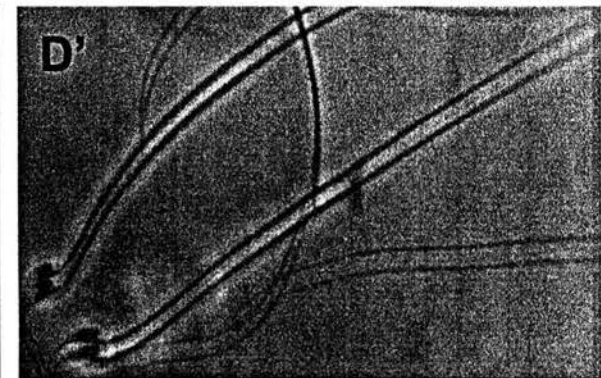
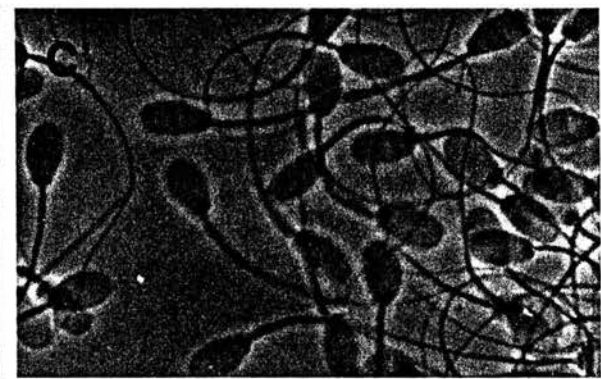
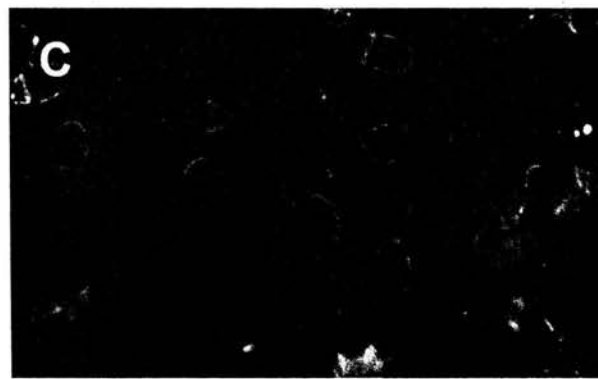
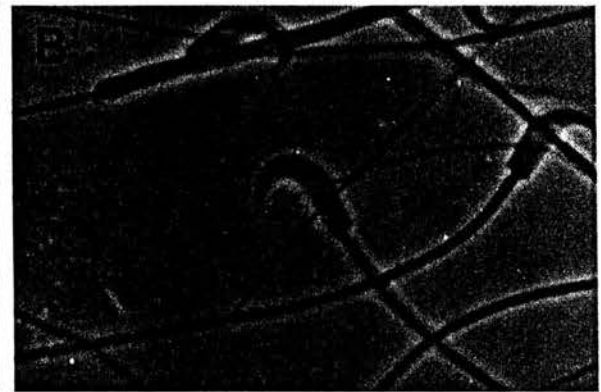
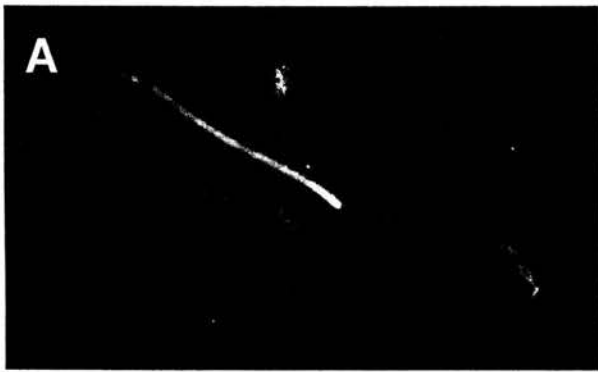


Figura 1. Localización por IFI de CRT en los espermatozoides del ratón, hámster, conejo, rata y jerbo. Espermatozoides de 5 especies diferentes fueron lavados y fijados con formaldehído (1.5% concentración final) y tratados para IFI (ver Materiales y Métodos). Los espermatozoides fueron teñidos con un anticuerpo anti-CRT y un segundo anticuerpo marcado con isotiocianato de rodamina (TRIC). **A)** ratón, **B)** hámster, **C)** conejo, **D)** jerbo y **E)** rata. **(A, B, C, D y E)** corresponden a las micrografías de epifluorescencia de CRT, revelada por IFI. **(A', B', C', D' y E')** micrografías de contraste de fase. La presencia de CRT en la región acrosomal es consistente en todos los espermatozoides, mientras que CRT sólo fue localizada en el flagelo de los espermatozoides del ratón y de la rata.

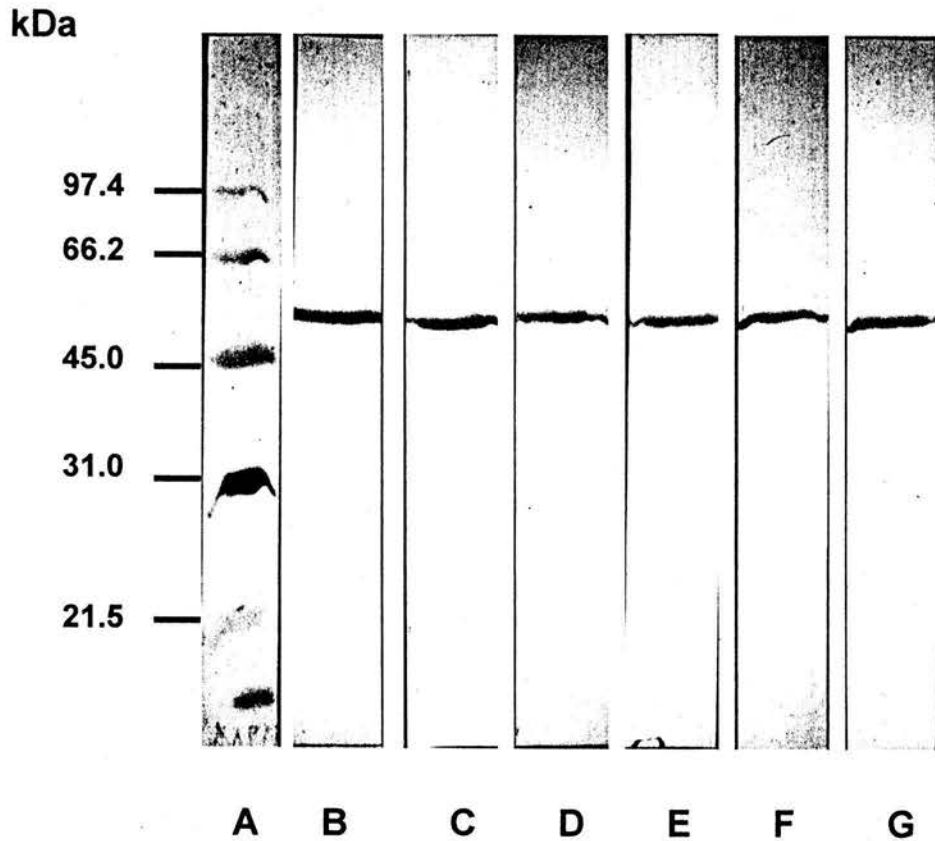


Figura 2. Detección de CRT en el patrón proteico de los extractos Brij de espermatozoides de 6 especies, por Western blotting. Las proteínas espermáticas fueron corridas en SDS-PAGE (Laemmli, 1970) y transferidas a membranas de nitrocelulosa y en ellas se reveló para calreticulina. **A)** Marcadores de peso molecular. **B-G)** Western blots revelados con el anticuerpo policlonal anti-CRT. **B)** cobayo, **C)** ratón, **D)** hámster, **E)** conejo, **F)** rata y **G)** jerbo

donde los espermatozoides fueron permeabilizados (Figura 3, líneas B-D), mientras que en el medio de capacitación de los espermatozoides sin permeabilizar, no se detectó a la CRT (Fig. 3, líneas E-G). Lo anterior indica que hay un goteo o fuga de CRT a través de los poros producidos por el tratamiento con la SLO. Además, corrobora la posibilidad de que parte de la CRT espermática se encuentre en el citoplasma, aunque no descarta la posibilidad de que también se encuentre asociada a la MAE. Para soportar los resultados antes mencionados se realizó la inmunodetección de CRT por IFI en los espermatozoides-SLO, los cuales mostraron poca o nula fluorescencia, comparados con los no permeabilizados con SLO (datos no mostrados). Sin embargo, cuando los espermatozoides-SLO, una vez fijados, fueron adicionalmente permeabilizados con acetona, se detectó marca fluorescente en la región acrosomal (datos no mostrados).

Interacción de CaM exógena con las membranas espermáticas

Hernández-González y col. (1996) han demostrado que CRT es capaz de asociarse a las membranas espermáticas de manera dependiente de Ca^{2+} , datos recientes también han mostrado que CaM exógena es capaz de asociarse a espermatozoides-SLO de manera independiente de Ca^{2+} (Hernández-González, comunicación personal). Para determinar si CaM interacciona con las membranas aisladas como lo hace CRT, membranas espermáticas fueron obtenidas por sonicación (ver Material y Métodos) e incubadas con diferentes concentraciones de CaM (0, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$), en presencia o ausencia de Ca^{2+} . Enseguida, las membranas fueron aisladas por ultracentrifugación y analizadas por Wb. Nuestros resultados muestran que el anti-CaM dio reacción positiva con varias proteínas de las membranas espermáticas tratadas y no tratadas con CaM, de las cuales cuatro son mayoritarias: 105, 63, 35 y 25 kDa, (Fig. 4, líneas C-F). Sorprendentemente, CaM libre no pudo ser detectada en estas muestras (Fig. 4 línea B-F). El análisis del sobrenadante donde se incubaron las membranas tampoco mostró la presencia de CaM (datos no mostrados). La tinción de las bandas incrementa conforme se aumentó la concentración de CaM en el tratamiento, saturándose la unión de CaM a estas proteínas a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, ya que CaM a esta concentración fue detectada en el sobrenadante (Fig. 4,

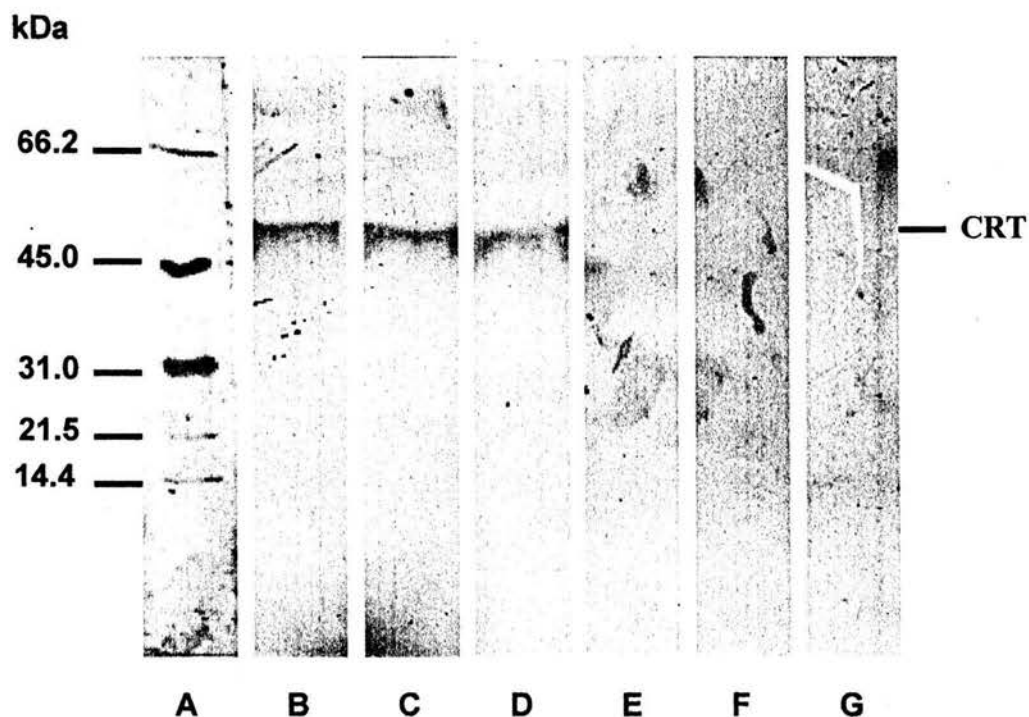


Figura. 3. Localización de CRT por Western blotting, en el medio de capacitación de los espermatozoides permeabilizados con SLO. Los espermatozoides lavados con NaCl fueron incubados en el medio de Tyrode por 30 min y permeabilizados con 400 UH de SLO por 15 min. Los espermatozoides fueron retirados y el medio de capacitación filtrado en millipore (0.25 μ m). El análisis por Wb muestra la presencia de CRT en el medio capacitación proveniente de los sptz-SLO (líneas B-D). Mientras que CRT no fue detectada en el medio de espermatozoides no permeabilizados (líneas D-G). A) Marcadores de peso molecular (teñidos con negro amido). B y E) medio de capacitación de los espermatozoides de la rata. C y F) medio de capacitación de los espermatozoides del jervo. D y G) medio de capacitación de los espermatozoides del hámster.

línea G). Por otro lado la interacción de CaM con las proteínas de membrana fue independiente de Ca^{2+} (datos no mostrados). Los resultados anteriores sugieren que CaM interacciona con diferentes proteínas de las membranas espermáticas, esto de manera independiente de Ca^{2+} y su interacción no fue inhibida por la presencia del catión.

Detección de proteínas que se asocian a CaM y CRT en membranas espermáticas aisladas

Con el fin de determinar si efectivamente CaM se asocia a diferentes proteínas de las membranas espermáticas, se realizó un análisis de unión de CaM-biotinilada a proteínas fijadas a membranas de nitrocelulosa. El overlay mostró que CaM se asocia a cuatro proteínas de 105, 63, 35 y 25 kDa (datos no mostrados), lo que confirmó los resultados de la incubación de las membranas con CaM. Por otro lado, cuando se realizó el mismo ensayo usando CRT-biotinilada, se encontró que la CRT se asocia a proteínas de movilidad relativa similar a las que se asocia CaM (datos no mostrados). Por lo anterior nos dimos a la tarea de tratar de identificar alguna(s) de las proteínas con capacidad de asociarse tanto a CaM como a CRT.

Inmunodetección e inmunolocalización de proteínas que se asocian tanto a CaM como a CRT

Los resultados anteriores son de interés para estudiar que tipo de proteínas son capaces de asociarse tanto a CaM como a CRT, así como su posible función en eventos espermáticos como son la capacitación y la RA. Por tal razón nos dimos a la tarea de investigar cuales eran las probables proteínas que podrían interaccionar tanto con CaM como CRT. En la literatura encontramos que el receptor para el 1, 4, 5, - inositol trifosfato (IP_3R) tipo I es una proteína que se asocia a CaM de manera independiente de Ca^{2+} en microsomas, y que la interacción inhibe a los IP_3R y por tanto previene la liberación de Ca^{2+} de los microsomas (Patel y col., 1997; Thrower y col., 2001). También es conocido que la actividad del IP_3R puede ser regulada por CRT (Camacho y Lachleiter, 1995; Xu y col., 1994). Por otro lado, se ha mostrado que CRT co-localiza con IP_3R en el espermatozoide del ser humano (Naaby-Hansen y col.,

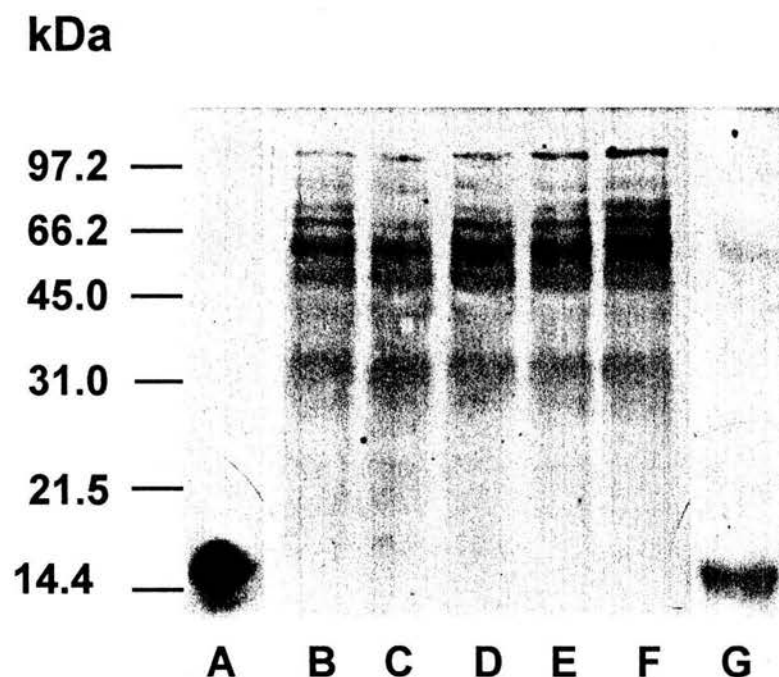


Figura 4. Efecto de la unión de CaM a las membranas espermáticas (ME). Para determinar la interacción de CaM con las ME, éstas fueron incubadas con diferentes concentraciones de CaM (0-40 $\mu\text{g/ml}$). Enseguida de la incubación, las ME fueron aisladas y CaM detectada por Wb. **A)** CaM pura aislada de testículo de bovino, **B)** membranas no tratadas con CaM exógena, **C)** 5 $\mu\text{g/ml}$ CaM. **D)** 10 $\mu\text{g/ml}$ de CaM, **E)** 20 $\mu\text{g/ml}$ de CaM, **F)** 40 $\mu\text{g/ml}$ de CaM y **G)** CaM detectada en el sobrenadante de las membranas tratadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de CaM.

2001). Otra proteína que se asocia a CaM es sinapsina-I (SNP-I), una fosfoproteína que actúa como mediador de la interacción del citoesqueleto con las vesículas sinápticas (Goold y col., 1995; Nicol y col., 1997), aunque no es conocido si ella interacciona con CRT. Por lo anterior nos dimos a la tarea de buscar estas proteínas en los espermatozoides del cobayo. Por IFI, tanto IP₃R como SNP-I fueron localizadas en la región acrosomal de los espermatozoides del cobayo (Fig. 5A.3 y 4, respectivamente), localización que fue similar a la encontrada para CRT (Fig. 5A.1) y CaM (Fig. 5A.2). De las proteínas ensayadas, sólo CaM fue detectada en el segmento ecuatorial (Fig. 5A.2) y en el flagelo (datos no mostrados). La presencia de estas proteínas las corroboramos por Wb en extractos de membranas plasmáticas enriquecidas, encontrando que el anticuerpo anti-IP₃R reconoció dos bandas proteicas (Fig. 5B, carril 2), una de aproximadamente 260 kDa que corresponde con el peso molecular reportado para el IP₃R en espermatozoides de mamíferos (Walensky y Snyder, 1995; Kuroda y col., 1999), y otra de 150 kDa que podría ser un producto de degradación del IP₃R. Por otro lado, el anticuerpo anti-sinapsina-I reconoció a una banda de aproximadamente 105 kDa (Fig. 5B, carriles 3), correspondiente con el peso molecular de sinapsina-I, asociada a una molécula de CaM (Goold y col., 1995).

Localización subcelular de CRT, CaM, IP₃R y SNP-I.

Con el fin de determinar a que tipo de membrana se encuentran asociadas las proteínas CRT, CaM, IP₃R y SNP-I, espermatozoides carentes de membrana plasmática fueron obtenidos por el método de Stojanoff y col. (1988) y por IFI las proteínas fueron inmunolocalizadas. Las cuatro proteínas (CRT, CaM, IP₃R y SNP-I) fueron localizadas asociadas a la membrana acrosomal externa de los espermatozoides (Fig. 6A.1-4, correspondientemente). Bajo este tratamiento, CaM también fue localizada en la región postacrosomal (Fig. 6A.2) y en el flagelo (datos no mostrados).

Para corroborar la localización de estas proteínas, se procedió a aislar tanto a la MP como a la MAE (Stojanoff y col. 1988) y por Wb se detectó a las proteínas de nuestro interés. En el caso de CRT e IP₃R, ambas se encontraron asociadas a la MAE y no fueron detectadas en la MP (Fig. 6B y D, respectivamente). Una gran cantidad de CRT fue detectada, con un peso molecular de entre 50-60 kDa (Fig. 6B). Mientras que

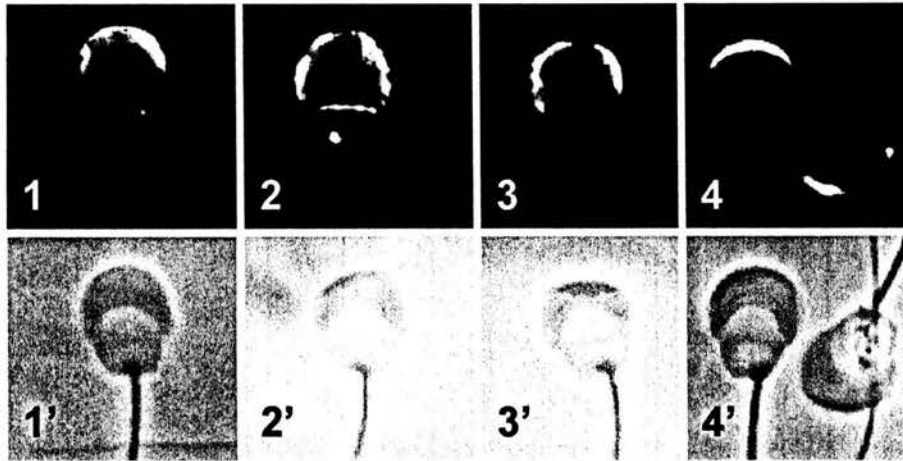
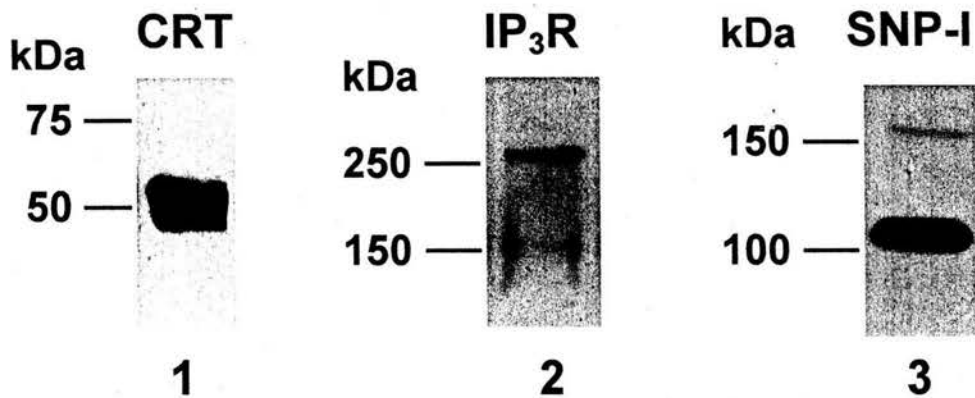
A**B**

Figura 5 . Detección de CRT, CaM, IP₃R y SNP-I en los espermatozoides del cobayo. (A) Las proteínas CRT (1), CaM (2), IP₃R (3) y SNP-I (4) fueron localizadas por IFI en la región acrosomal de los espermatozoides del cobayo. 1, 2, 3 y 4 corresponden a los patrones de IFI, mientras que 1', 2', 3' y 4' son los respectivos contrastes de fase. **(B)** Por Wb también es mostrada la presencia de CRT (1), IP₃R (2) y SNP-I (3) en extractos de membranas espermáticas.

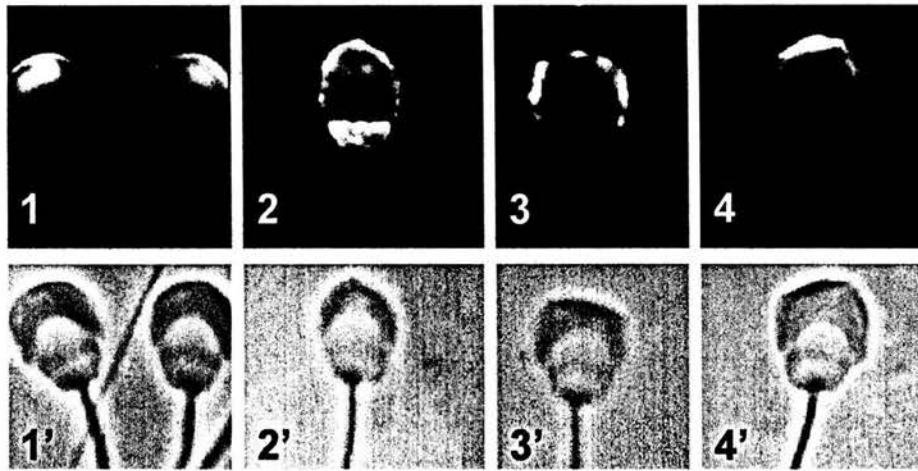
IP₃R de nuevo fue detectado como dos bandas una de 260 y otra de 150 kDa (Fig. 6D). Por otro lado, CaM y SNP-I fueron detectadas en ambas membranas (Fig. 6C y E). En la MP CaM se localizó formando dos complejos, uno de 125 y otro de 105 kDa, mientras que en la MAE, CaM se encontró asociada principalmente a una proteína de 105 kDa (Fig. 6C). SNP-I fue detectada en ambas membranas con una masa molecular de 105 kDa (Fig. 6E).

Interacción de CaM y CRT con las proteínas IP₃R y SNP-I

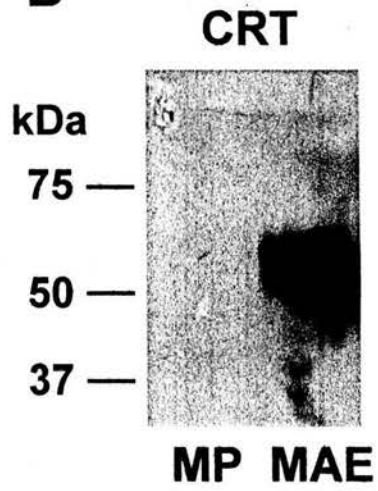
Para indagar si IP₃R y/o SNP-I se encuentran asociadas a CaM y/o CRT en las membranas de los espermatozoides del cobayo, se emplearon dos técnicas: a) una inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-CaM y b) se aislaron a las proteínas que se asocian a CRT mediante una columna de afinidad de sefarosa-CRT. El número de espermatozoides empleado para la obtención de las proteínas fue de 100 x10⁶ células, las cuales fueron tratadas con Brij-36T al 1.2% (concentración final). Las proteínas obtenidas de la inmunoprecipitación y de la columna sefarosa-CRT, fueron separadas en SDS-PAGE y transferidas a MNC. El análisis por Wb de las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo policlonal anti-CaM, reveló que tanto IP₃R como SNP-I coprecipitaron con CaM, lo que sugiere que ellas se encuentran asociadas a CaM (Figura 7 líneas A y A'). Mientras que, el análisis por Wb de las proteínas eluidas de la sefarosa-CRT, muestra que sólo IP₃R es capaz de asociarse a CRT (Figura 7, B).

Para definir si la interacción de IP₃R y SNP-I con CaM cambia durante la RA, vesículas mixtas (MP-MAE) que se forman durante la reacción acrosomal, fueron aisladas de las muestras de espermatozoides a los que se les indujo la RA, mediante el ionóforo A23187 (ver Material y Métodos). Las vesículas aisladas fueron solubilizadas con Brij-36T al 1.2% (concentración final) y el extracto utilizado para la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-CaM. En primer lugar, por Wb, las cuatro proteínas, CRT, CaM, IP₃R y SNP-I fueron detectadas entre las proteínas de las vesículas mixtas, donde una alta concentración de CRT fue observada con una Mr de 50-60 kDa (Fig. 8A, carril 1). Mientras que el anticuerpo anti-CaM, detectó una banda de 260 kDa (Fig. 8A, carril 2). La proteína IP₃R fue detectada con una Mr de 260 kDa (Fig. 8A, carril 3), lo que sugiere que IP₃R y CaM se encuentren asociadas. SNP-I fue

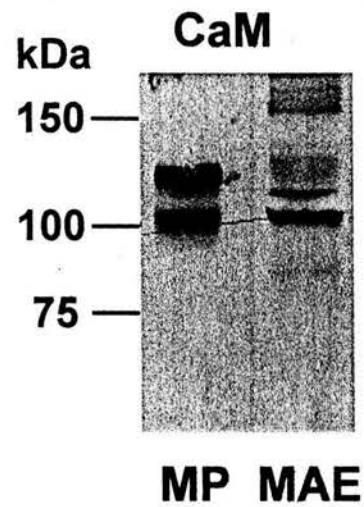
A



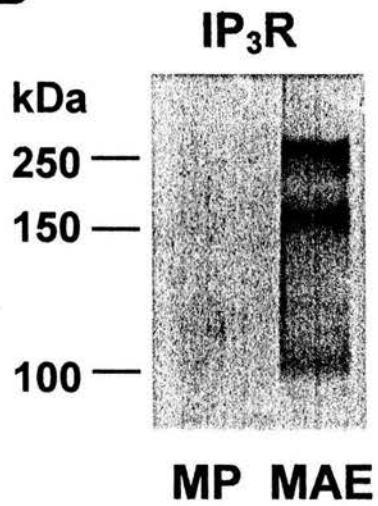
B



C



D



E

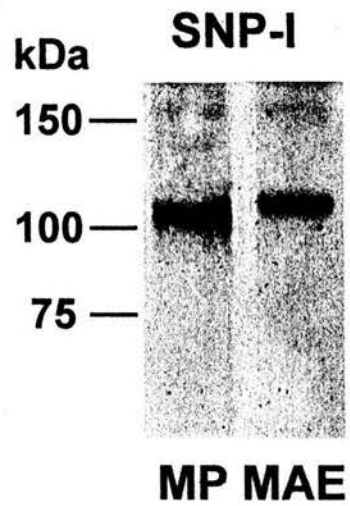


Figura 6. Detección por IFI de CRT, CaM, IP₃R y SNP-I, en los espermatozoides del cobayo carentes de MP y en extractos de membrana enriquecidos por Wb. La MP de los espermatozoides fue retirada por el método descrito por Stojanoff y col. (1988), lo cual deja expuesta a la MAE. (A) Por IFI las proteínas CRT, CaM, IP₃R y SNP-I fueron encontradas asociadas a la MAE de los espermatozoides (1, 2, 3 y 4, y sus contraste de fases 1', 2', 3' y 4' respectivamente). (B-E) La localización subcelular de las proteínas, realizada por Wb, muestra que CRT (B) e IP₃R (D) están asociadas solamente a la MAE, mientras que CaM (C) y SNP-I (E) se encuentran asociadas a ambas (membrana plasmática: MP y membrana acrosomal externa: MAE).

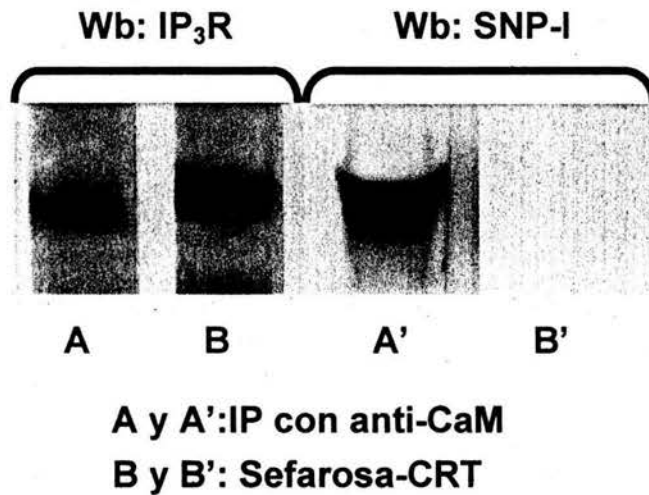


Figura 7. Determinación de la interacción de IP₃R y SNP-I con CRT y CaM. Las proteínas de las membranas espermáticas solubilizadas con Brij-36T (1.2%, concentración final), fueron coimmunoprecipitadas las proteínas IP₃R y SNP-I mediante un anticuerpo policlonal anti-CaM (**A y A'**, respectivamente). Por otro lado, el IP₃R fue aislado de las proteínas de las membranas espermáticas solubilizadas con Brij-36T, mediante Sefarosa-CRT (**B**). SNP-I no se asoció a la Sefarosa-CRT (**B'**).

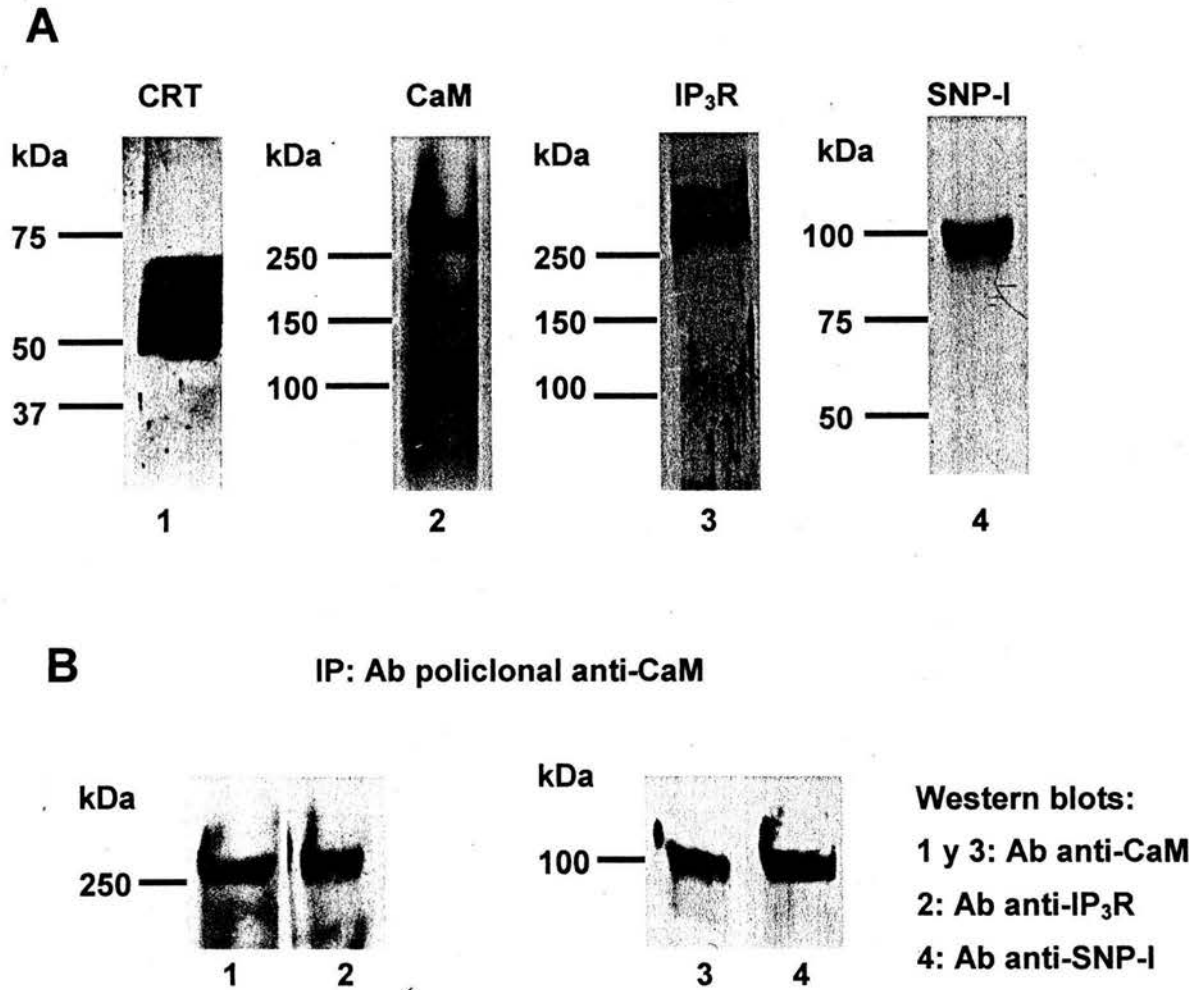


Figura 8. Detección de CRT, CaM, IP₃R y SNP-I en vesículas mixtas de RA. A espermatozoides capacitados por 30 min, se les indujo la RA con el ionóforo A23187 (1.3 μ M). Las vesículas mixtas fueron aisladas (ver Métodos) y solubilizadas con SDS (10%). Las proteínas fueron resueltas por SDS-PAGE y transferidas a MNC y detectadas por Wb. (A): 1) CRT, 2) CaM, 3) IP₃R y 4) SNP-I. (B) De un extracto Brij de vesículas mixtas se inmunoprecipitaron a las proteínas que se asocian a CaM, mediante el anticuerpo anti-CaM. Las proteínas fueron reveladas por Wb. 1) y 3) CaM, 2) IP₃R y 4) SNP-I.

detectada con una Mr de 105 kDa (Fig. 8A, carril 4). Por otro lado, el análisis de las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-CaM, mostró que tanto IP₃R como SNP-I, coprecipitaron con CaM (Fig. 8B, líneas 2 y 4, respectivamente). Además ellas se mantienen en complejo con CaM, ya que por Wb se reveló una banda de 260 kDa para IP₃R y para CaM (Fig. 8B, líneas 1 y 2), mientras que una banda de 105 kDa fue revelada tanto para SNP-I como para CaM (Fig. 8B, líneas 3 y 4).

El análisis por Wb de las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-CaM, no mostró la presencia de CRT (datos no mostrados), lo que sugiere que CRT no se encuentra asociada a CaM ni a SNP-I, y que su asociación con IP₃R es débil.

IP₃R y CRT se encuentran en contacto molecular.

Para definir si la CRT e IP₃R se encuentran en contacto molecular en la MAE, las membranas espermáticas aisladas fueron tratadas con un entrecruzador de longitud cero como es el EDAC, el cual estabiliza la interacción de proteínas espacialmente muy cercanas (Taniuchi y col., 1986; Gilles y col., 1990; Chaw-Long y col., 1997). Las membranas espermáticas una vez tratadas con el EDAC (membranas-EDAC) fueron solubilizadas con SDS y analizadas por Wb, usando los anticuerpos anti-IP₃R, anti-CRT y anti-CaM. El análisis de las membranas-EDAC mostró la presencia de una banda mayoritaria de Mr superior a 250 kDa, la cual fue reconocida por los anticuerpos anti-IP₃R, anti-CRT y anti-CaM (Fig. 9A, carriles 1-3, respectivamente). Para determinar si estas proteínas se encuentran asociadas entre si, membranas-EDAC fueron solubilizadas con Brij-36T y las proteínas que asocian a CaM y CRT fueron inmunoprecipitadas. El análisis por Wb de las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-CRT muestra una banda de Mr superior a 250 kDa que es reconocida por los anticuerpos anti-CRT y anti-IP₃R (Fig. 9B, carriles 1 y 2, respectivamente). Cuando se analizaron las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-CaM, ninguna banda proteica fue revelada por los anticuerpos anti-CaM y anti-IP₃R (Fig. 9B, carriles 3 y 4, respectivamente). El análisis del patrón proteico de las proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo anti-CaM, no mostró ninguna proteína mayor a 250 kDa, lo que sugiere que el anticuerpo no inmunoprecipitó a la proteína (datos no mostrados). Una posible explicación es que CaM e IP₃R están íntimamente asociadas,

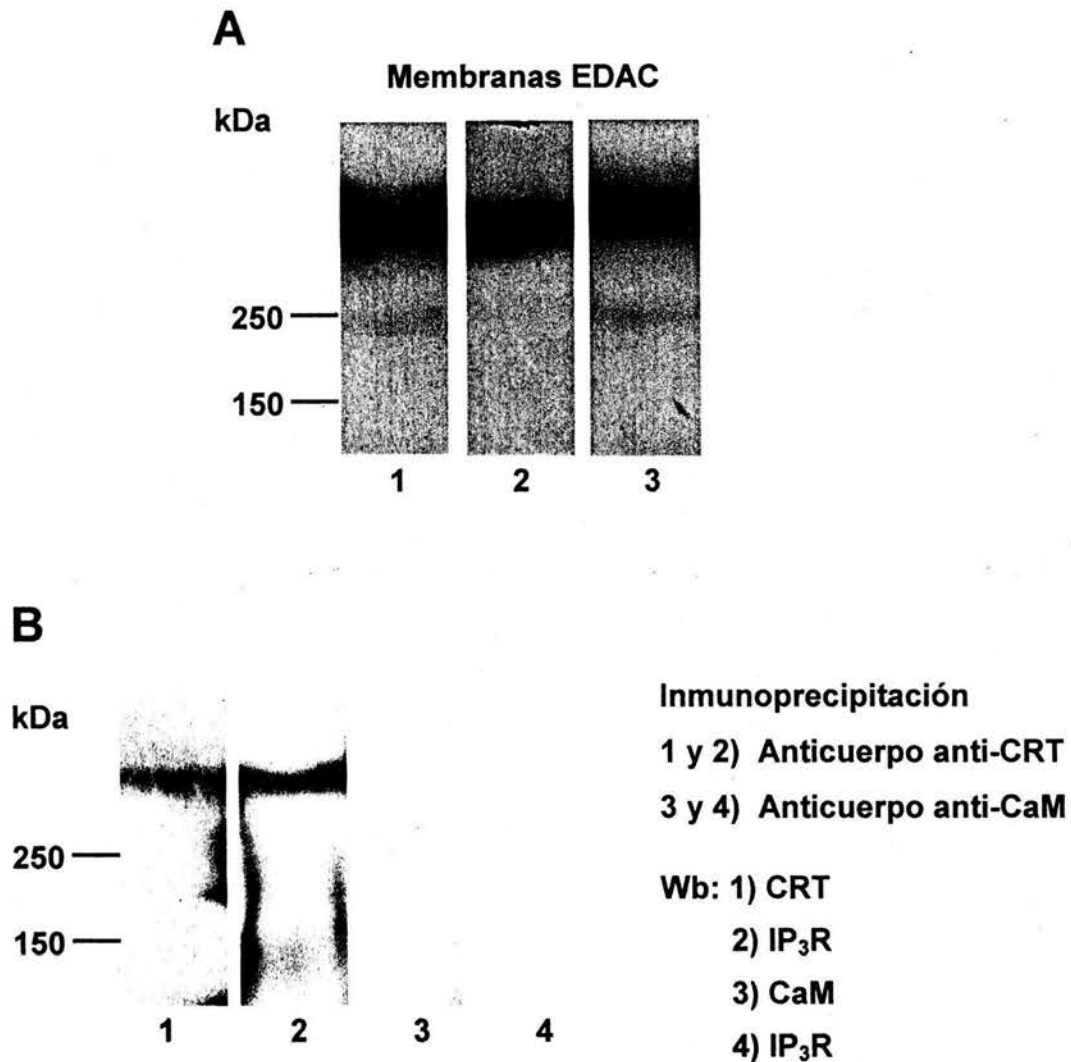


Figura 9. Inmunodetección de CRT, CaM e IP₃R en membranas EDAC. Membranas espermáticas aisladas y tratadas con el entrecruzador EDAC (ver Material y Métodos), fueron solubilizadas con SDS (10%) y las proteínas resueltas por SDS-PAGE y transferidas a MNC. **(A)** Western blots realizados para los siguientes proteínas: 1) IP₃R, 2) CRT y 3) CaM. Para determinar la interacción de CRT y CaM con el IP₃R, membranas espermáticas tratadas con EDAC fueron solubilizadas con Brij-36T (1.2% concentración final), e inmunoprecipitadas las proteínas usando los anticuerpos anti-CRT (1 y 2) y anti-CaM (3 y 4). **(B)** Western blot fue realizado para las proteínas: 1) CRT, 2 y 4) IP₃R y 3) CaM.

de tal manera que el entrecruzamiento realizado con EDAC asoció fuertemente a la CaM con el IP₃R, de tal manera que en estado nativo (membranas-EDAC solubilizadas con Brij) el anticuerpo anti-CaM no reconoció a CaM.

DISCUSIÓN

La capacitación y la reacción acrosomal son procesos espermáticos dependientes de calcio extracelular, en los cuales dos de las principales proteínas relacionadas con la homeostasis intracelular del calcio, la calmodulina y la calreticulina, han sido involucradas (Trejo y Mújica, 1990; Hernández-González y col., 1994, Muñoz-Gotera y col., 2001). Ambas proteínas han sido encontradas en la región acrosomal de los espermatozoides de los mamíferos, aunque su función tanto en la capacitación como en la reacción acrosomal, no ha sido del todo entendida. En el presente trabajo reportamos la presencia de CRT en la región acrosomal de los espermatozoides de la rata, ratón, hámster, jerbo y conejo (Fig. 1 y 2). Encontramos que la CRT mostró dos localizaciones subcelulares en los espermatozoides del cobayo: 1) en el citoplasma de la región acrosomal, como lo muestran los resultados de la permeabilización con SLO de los espermatozoides y 2) se encontró asociada a la cara interna de la MAE, ya que sólo fue detectada, en los espermatozoides carentes de MP, cuando fueron permeabilizados con acetona (Fig. 6A.1) y el Wb mostró la presencia de la CRT en la MAE (Fig. 6B).

Por otro lado, CaM se encontró asociada a diferentes estructuras espermáticas y es conocido que ella se asocia a diferentes proteínas espermáticas de manera independiente de Ca^{2+} (Hernández-González y col., 1994). Sorprendentemente, la CaM nunca pudo ser detectada por Wb, en su peso molecular (17 kDa), siempre se encontró asociada a proteínas de las membranas espermáticas de manera independiente de Ca^{2+} (Fig. 4). Además, CaM interaccionó con diferentes proteínas tanto en la MP (formando complejos de 125 y 105 kDa) como en la MAE (el complejo proteico revelado fue de 105 kDa) (Fig. 6C), lo que sugiere que CaM se asocia a ciertas proteínas y forma complejos fuertes muy estables. Un hecho relacionado es que CaM no se fuga de los espermatozoides-SLO, dado que ha sido detectada por IFI en los espermatozoides-SLO (Hernández-González y col., 1996), lo que contrasta con otros tipos celulares, en donde la permeabilización con SLO o digitonina provoca principalmente la fuga de CaM (Sarafian y col., 1987). Además, para separar a CaM de las membranas espermáticas se requiere de antagonistas de CaM, como el W7 o el calmidazolium (Hernández-González, 1996); así mismo, el tratamiento de los espermatozoides (no permeabilizado

o permeabilizados) con estas drogas, en presencia de Ca^{2+} , induce la RA (Hernández-González y col., 1996). Una posible explicación a esto, es el hallazgo en este trabajo de la interacción fuerte de CaM con IP_3R y SNP-I proteínas membranales ya que ambas coimmunoprecipitaron con CaM, además por SDS-PAGE no pudieron ser separadas (Fig. 7 y 8). Hasta donde conocemos este tipo de interacción fuerte de CaM con proteínas específicas no ha sido comunicado previamente.

Yunes y col. (2002) comunicaron que la adición de CaM inhibe la RA en espermatozoides-SLO. Al respecto, datos de nuestro grupo (Hernández, 1996) concuerdan con las observaciones de estos autores, la CaM inhibió la RA en los espermatozoides-SLO. Por el contrario, el tratamiento de los espermatozoides-SLO con CRT promovió la RA. Así nuestros datos señalan un efecto antagónico entre la CaM y la CRT. En ambos casos los efectos son dependientes de la concentración de las proteínas. La acción opuesta de CaM y CRT puede ser explicada por su asociación con una o varias proteínas reguladoras presentes en las membranas espermáticas. Al respecto en este trabajo se encontró que: 1) tanto CaM, como CRT y el receptor del ligando IP_3 (IP_3R) están presentes en la MAE, 2) es interesante que CaM y CRT se encuentran asociadas al IP_3R , como lo muestra la coprecipitación con CaM y su purificación mediante CRT-sefarosa, y 3) los resultados del entrecruzamiento e inmunoprecipitación sugieren una interacción molecular entre CRT e IP_3R .

Es conocido que el IP_3R , el cual funciona como un canal que libera Ca^{2+} de los almacenes intracelulares, es inhibido directamente por CaM (10-20 μM), y que la inhibición es revertida por la alta concentración de Ca^{2+} intracelular y del IP_3 (Patel y col., 1997; Thrower y col., 2001). Varias evidencias sugieren que la CRT está relacionada con la regulación del IP_3R : 1) CRT fue copurificada con el IP_3R , a partir de hepatocitos de rata (Enyidi y col., 1993), 2) en espermatozoides del ser humano la CRT colocaliza con el IP_3R en el segmento ecuatorial (Naaby-Hansen y col., 2001) y 3) en ovocitos del *Xenopus*, IP_3 en conjunto con CRT inducen la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (Camacho y Lechleiter, 1995). Por lo anterior, nosotros proponemos que los efectos antagónicos de CaM y CRT en la RA, pueden ser explicados por su interacción con el IP_3R presente en la MAE. El hecho de que CaM se asocia también a otras proteínas de las membranas espermáticas (Olson y col., 1985;

Aitken y col., 1988; Hernández-González y col., 1994), plantea la posibilidad de que el IP₃R no sea la única proteína relacionada con el efecto inhibitorio de CaM, y que posiblemente CaM actúe en diferentes etapas de la capacitación y la RA. Consideramos que CaM ejerce su efecto inhibitorio sobre la RA manteniendo inactivo al IP₃R durante la capacitación, proceso en el cual la concentración de Ca²⁺ citoplásmico es relativamente baja, aunque la concentración del catión aumenta gradualmente durante la capacitación (Coronel y Lardy, 1987), no alcanza el umbral requerido para la RA ya que el catión es almacenado en el acrosoma y/o extruido por la Ca²⁺-Mg²⁺-ATPasa presente en la MP (Walensky y Snyder, 1995; Dragivela y col., 1999; Dorval y co., 2002). Una vez que la capacitación se ha dado, los inductores de la RA como la ZP₃ y la progesterona promueven un influjo transitorio de Ca²⁺, con la consecuente producción de IP₃. Este en conjunto con el influjo transitorio de Ca²⁺ revierten la inhibición del IP₃R por CaM, permitiendo la liberación del Ca²⁺ del acrosoma al citoplasma, requisito para la activación de los canales de Ca²⁺ conocidos como SOCS (por sus siglas en inglés, store-operated Ca²⁺ channels) presentes en la MP, los cuales están relacionados con la conducción de la RA (Darszon y col., 1999; Florman y col., 1994; O'Toole y col., 2000). Es importante señalar, que a pesar de que durante la RA los receptores a IP₃R se activan (Walensky y Snyder, 1995), nosotros encontramos que CaM se mantiene asociada al IP₃R, como lo muestra el ensayo de inmunoprecipitación realizado en vesículas de RA aisladas (Fig. 9). Patel y col. (1997) sugirieron que CaM presenta un efecto de feedback sobre el IP₃R, que depende de las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, afectando la afinidad del IP₃R por IP₃. Posiblemente, el incremento de Ca²⁺ que ocurre al inicio de la RA produce un cambio conformacional de la CaM, que como consecuencia permita la unión del ligando IP₃ a su receptor, IP₃R (ver esquema 4).

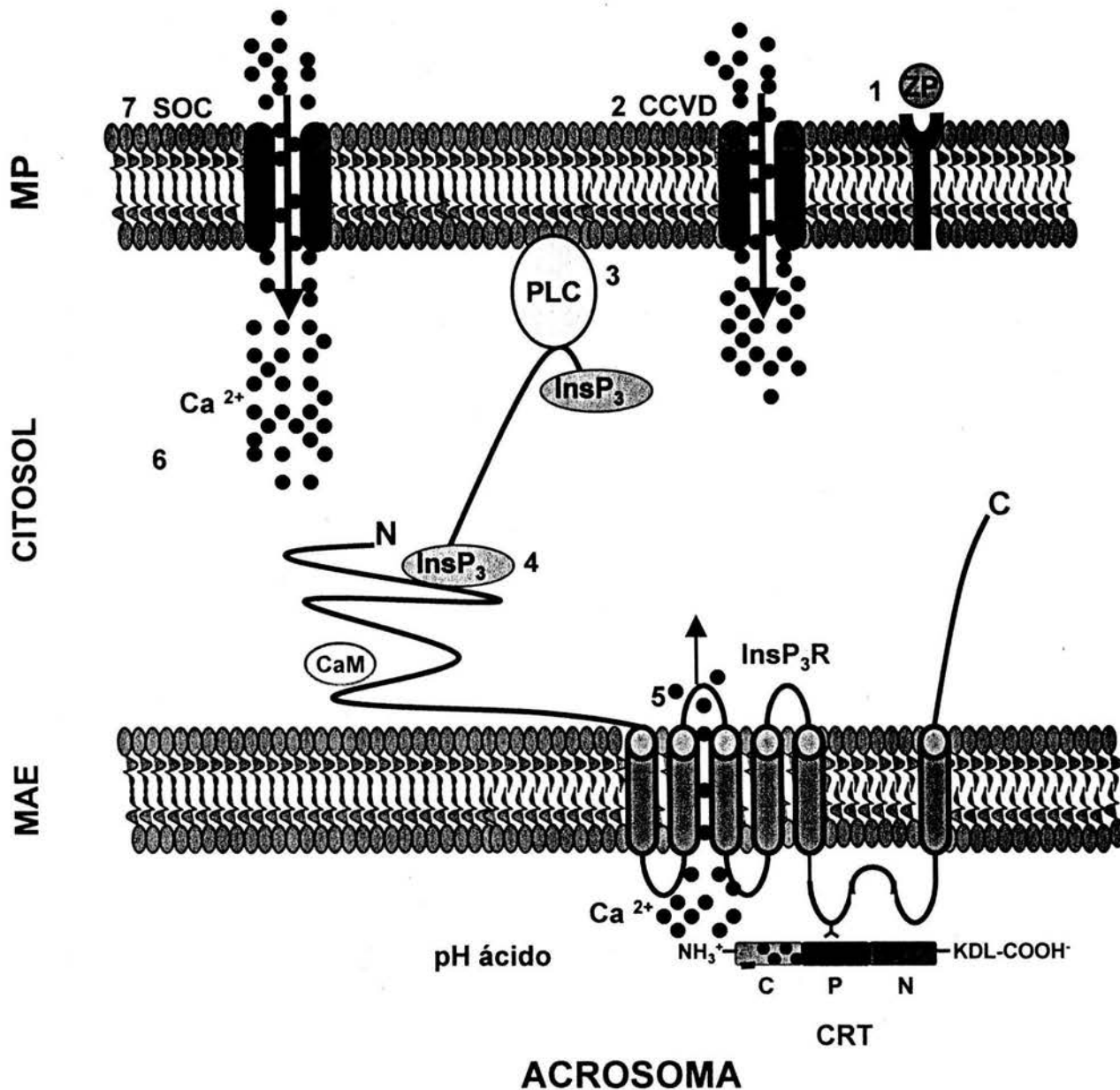
En los depósitos intracelulares de Ca²⁺ como el RE y el retículo sarcoplásmico, el catión es inmovilizado y/o almacenado por proteínas como CRT, calmegina y calnexina. Hay evidencias de que al menos existe un almacén de Ca²⁺ en los espermatozoides de los mamíferos, localizado en el acrosoma (ver Kirkman-Brown y col., 2002). El pH acrosomal es ácido (Working y Meizel, 1983), por lo que el Ca²⁺ deberá mantenerse secuestrado por proteínas, para no cristalizarse (Watson y col.,

1995) y ser fácilmente movilizado. De las proteínas almacenadoras señaladas, la CRT es la única presente en la región acrosomal de los espermatozoides de los mamíferos (Nakamura y col., 1992; Nakamura y col., 1993; Hernández-González y col., 1996; Muñoz-Gotera y col., 2001; Naaby-Hansen y col., 2001), ya que ni calmegina ni calnexina han sido encontradas (Ikawa y col., 1997). En este trabajo mostramos por primera vez que CRT se encuentra asociada a la cara interna de la MAE de los espermatozoides del cobayo. Naaby-Hansen y col. (2001) sugirieron que esta es la proteína que almacena el Ca^{2+} en el acrosoma. Nuestros resultados apoyan la propuesta de estos autores. Además, nuestros resultados son los primeros en mostrar que existe una interacción molecular de CRT con el IP_3R presente en la MAE (Fig. 7, 8 y 9). Creemos que la interacción CRT- IP_3R representa una condición importante para la RA, ya que facilitaría el almacenamiento y la liberación del Ca^{2+} del acrosoma. Proponemos que la CRT almacenaría e inmovilizaría al Ca^{2+} captado durante la capacitación y que durante la RA ocurriría la liberación del Ca^{2+} , debido a la apertura del IP_3R , inducida por el aumento capacitativo de Ca^{2+} y el ligando IP_3 . Nosotros sugerimos que el IP_3R sufre un cambio conformacional al abrirse, y que este cambio afecta directamente a la CRT, induciéndola a liberar el Ca^{2+} secuestrado.

La CRT, también la encontramos en el citoplasma de los espermatozoides de varias especies de mamíferos (fig. 2). Su función en esta región espermática, aún está por aclararse. Una posible función de la CRT citoplásmica es que ella participe como chaperona, regulando la función de otras proteínas, como en el caso de la proteína cinasa C (PKC), cuya presencia en la región acrosomal de los espermatozoides de los mamíferos es conocida (ver Breitbart, 2002). Además, ha sido reportado que varias isoformas de PKC, se encuentran asociadas a CRT tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que sugiere que ellas en conjunto podrían operar en vías comunes de señalización (Rendón-Huerta y col., 1999).

Adicionalmente en este trabajo se describe por primera vez la presencia de sinapsina-I (SNP-I) en el espermatozoide, la cual fue localizada en la región acrosomal. La SNP-I fue encontrada asociada a las MP y MAE (Fig. 6E). La detección fue realizada mediante dos anticuerpos policlonales que reconocen sitios diferentes de la SNP-I, ambos dieron los mismos resultados positivos por IFI y por Wb. Además SNP-I fue

coprecipitada con CaM, es sabido que SNP-I es una proteína que asocia una o dos moléculas de CaM (Goold y col., 1995; Nicol y col., 1997), lo que teóricamente corresponde a un peso molecular de 105 kDa, similar al de las proteínas reveladas en este trabajo, por los anticuerpos anti-SNP-I. El revelado positivo de SNP-I con anticuerpos específicos y su asociación con CaM, apoyan que se trata de SNP-I. Las sinapsinas forman una familia de fosfoproteínas que se encuentran en células de origen neuronal y endocrino (Romano y col., 1987; Tooze y col., 1989; Matsumoto y col., 1999; Krueger y col., 1999 y Maienschein y col., 1999), así como en osteoblastos (Bhangu y col., 2001); son las proteínas más abundantes asociadas a la superficie de las vesículas sinápticas. Una de las características más importantes de las sinapsinas es que se asocian a actina-F, formando agregados de vesículas sinápticas de reserva, en la vecindad de la zona activa (ver Hilfiker y col., 1999). Sugerimos que de manera similar, la SNP-I podría asociar al citoesqueleto de actina-F a la MAE y a la MP, citoesqueleto que recientemente fue reportado por nuestro grupo (Hernández-González y col., 2000). Lo anterior indica, que SNP-I aparentemente es importante en el mantenimiento de la estructura de la región acrosomal. Se ha sugerido que la MAE se encuentra anclada a la MP, a través de los complejos formados por las proteínas de la familia SNARES (Kierzenbaum, 2000). Sin embargo la presencia de SNP-I en las membranas espermáticas sugiere lo contrario (no ancladas), ya que las sinapsinas en conjunto con mallas de actina-F, mantienen a las vesículas sinápticas separadas de la membrana presináptica (Landis y co., 1988; Hirokawa y col., 1989; Gotow y col., 1991; Takei y col., 1995). Así, SNP-I en los espermatozoides y su interacción con las mallas de actina evitarían una fusión prematura de las MAE y MP. Además, la función de la SNP-I pudiera estar regulada por CaM, por la fosforilación de la proteína por CaM-quinasa II y PKA, ya que ellas regulan la interacción de SNP-I con actina-F (Goold y col., 1995; Hilfiker y col., 1999). Finalmente, futuros estudios son necesarios para dilucidar la función de SNP-I durante la capacitación y la RA.



Esquema 4. Mecanismo por el cual CaM y CRT se sugiere que estén regulando el proceso de la exocitosis acrosomal. (1) La unión de la glicoproteína ZP₃ a su receptor espermático da como resultado (2) la despolarización de la membrana plasmática y un influjo subsecuente de Ca²⁺ a través de un canal de calcio dependiente de voltaje (CCVD) y (3) la activación de la fosfolipasa C (PLC) que conduce a la (4) generación de inositoltrifosfato (IP₃). El primer incremento lento y sostenido de Ca²⁺ conjuntamente con con el segundo mensajero revierten la inhibición del IP₃R por CaM, permitiendo (5) la liberación del Ca²⁺ del acrosoma al citoplasma. Sugerimos que el Ca²⁺ almacenado en el acrosoma esté asociado a CRT y que durante la RA, IP₃ y Ca²⁺ alteran la conformación del IP₃R, cambio que afecta directamente a CRT, induciéndola a liberar el Ca²⁺ secuestrado. (6) El vaciamiento de este almacén provoca (7) la apertura de los canales operados por almacenes de Ca²⁺ (SOCs) presentes en la membrana plasmática.

CONCLUSIONES

1. CRT al igual que CaM se encuentran en la región acrosomal de los espermatozoides de varias especies de mamíferos.
2. CRT se encuentra presente en tanto en el citoplasma espermático como asociada a la MAE.
3. CaM interacciona con las membranas espermáticas de manera independiente de Ca^{2+} a diferencia como lo hace CRT (de manera dependiente de Ca^{2+}).
4. IP_3R forma un complejo con CaM y CRT en la MAE. Mientras que SNP-I se asocia solamente a CaM, tanto en la MP como en la MAE.
5. La presencia de CRT y CaM dos proteínas que asocian Ca^{2+} y muestran funciones antagónicas durante la RA, son necesarias para regular finamente el proceso de la RA.

REFERENCIAS

- Aitken RJ, Clarkson JS, Hulme MJ, Henderson CJ. (1988). Analysis of calmodulin acceptor proteins and the influence of calmodulin antagonists on human spermatozoa. *Gamete Res.* 21(1):93-111.
- Allen CA, Green DP. (1997). The mammalian acrosome reaction: gateway to sperm fusion with the oocyte?. *Bioessays.* 19(3):241-7. Review.
- Austin, CR. (1982). En germ Cells and fertilization. En CR. Austin y RV, Shorts. 2nd. Ed. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 63-101.
- Baldi E, Casano R, Falsetti C, Krausz C, Maggi M, Forti G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J Androl.*;12(5):323-30.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Forti G. (2002). Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol.* 53(1-2):121-31. Review.
- Bedford JM and Hoskins DD. (1990). The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry an physiology. En: Marshall's Physiology of Reproduction. G.E. Lamming, editor. Pp 379-358. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Bhangu PS, Genever PG, Spencer GJ, Grewal TS, Skerry TM. (2001). Evidence for targeted vesicular glutamate exocytosis in osteoblasts. *Bone.* 29(1):16-23.
- Blackmore PF. (1993). Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell Calcium;* 14 (1):53-60.
- Breitbart, H. (2002). Role and regulation of intracellular calcium in acrosomal exocytosis. *J. Reprod Immunol* 2002;53 (1-2):151-9. Review.
- Camacho P, Lechleiter JD. (1995). Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca²⁺ waves. *Cell.* 82(5):765-71.
- Camatini M, Anelli G, Casale A. (1986). Immunocytochemical localization of calmodulin in intact and acrosome-reacted boar sperm. *Eur J Cell Biol.* 41(1):89-96.
- Camatini M, Colombo A, Bonfanti P. (1991). Identification of spectrin and calmodulin in rabbit spermiogenesis and spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 28(1):62-9.
- Chaw-Long S, Mu-Jung GCh, Klaus Linse and Kuan wang. (1997). Molecular contacts between nebulin and actin: Cross-Linking of nebulin modules to the N-terminal of actin. 36: 1814-1825.

Coronel CE and Lardy HA. (1987). Characterization of Ca^{2+} uptake by guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 37: 1097-1107

Darzon A, Labarca P, Nishigaki P y Espinosa F. (1999). Ion channel in sperm physiology. *Physiology Rev.* 79, 481-510.

De Blas AL, Cherwinski HM. (1983). Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal Biochem.* 133(1):214-9

Dedman JR, Kaetzel MA. (1983). Calmodulin purification and fluorescent labeling. *Methods Enzymol.* 102:1-8.

de Lourdes Juárez-Mosqueda M and Mújca A. (1999). A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J Struct Biol.* 128(3):225-36.

Dupuis M, Schaerer E, Krause KH, Tschopp J. (1993). The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med.* 177(1):1-7.

Enyedi P, Szabadkai G, Krause KH, Lew DP, Spat A. (1993). Inositol 1,4,5-trisphosphate binding sites copurify with the putative Ca-storage protein calreticulin in rat liver. *Cell Calcium.* 14(6):485-92.

Feinberg J, Weinman J, Weinman S, Walsh MP, Harricane MC, Gabrion J, Demaille JG. (1981). Immunocytochemical and biochemical evidence for the presence of calmodulin in bull sperm flagellum. Isolation and characterization of sperm calmodulin. *Biochim Biophys Acta.* 673(3):303-11.

Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, Reithmeier RA, Michalak M. (1989). Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 264(36):21522-8.

Florman HM. (1994). Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol.* 165(1):152-64.

Fraser LR, McDermott CA. (1992). Ca^{2+} -related changes in the mouse sperm capacitation state: a possible role for Ca^{2+} -ATPase. *J Reprod Fertil.* 96(1):363-77.

Fraser LR. (1992). Requirements for successful mammalian sperm capacitation and fertilization. *Arch Pathol Lab Med.* 116(4):345-50. Review.

Fraser LR. (1995). Mechanisms redulating capacitation and the reaction acrosomal. En: Human sperm reactio. Eds: Fenichel P., Parinaud J., Colloqu/INSERIM jhon Libbey Eurotex Ltd, Montroge Ffrance, vol. 236, 17-33.

Frenette G, Chafouleas JG, Tremblay RR, Dube JY. (1990). In vitro interactions of calmodulin with the ovine proacrosin-acrosin system. *J Androl.* 11(1):25-31.

Garcia MA, Meizel S. (1999). Regulation of intracellular pH in capacitated human spermatozoa by a Na⁺/H⁺ exchanger. *Mol Reprod Dev.* 52(2):189-95.

Gilles MA, Hudson AQ, Borders CL Jr. (1990). Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. *Anal Biochem.* 184(2):244-8.

Glander HJ, Herrmann K, Haustein UF. (1987). The equatorial fibronectin band (EFB) on human spermatozoa--a diagnostic help for male fertility?. *Andrologia.* (4):456-9.

Goold R, Chan KM, Baines AJ. (1995). Coordinated regulation of synapsin I interaction with F-actin by Ca²⁺/calmodulin and phosphorylation: inhibition of actin binding and bundling. *Biochemistry.* 34(6):1912-20.

Gopalakrishna R, Anderson WB. (1982). Ca²⁺-induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-Sepharose affinity chromatography *Biochem Biophys Res Commun.* 104(2):830-6. No abstract available.

Gordon, M, Morris EG and Young J. (1983). The localization of Ca²⁺-ATPase and Ca²⁺-binding proteins in the flagellum of guinea pig sperm. *Gamete Res.* (8): 49-55.

Gotow T, Miyaguchi K, Hashimoto PH. (1991). Cytoplasmic architecture of the axon terminal: filamentous strands specifically associated with synaptic vesicles. *Neuroscience.* 40(2):587-98.

Gur Y, Breitbart H, Lax Y, Rubistein S, Zamir N. (1998). Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am J Physiol.* 275 (1 Pt 1):E87-93.

Hernández-González EO, Espinosa AM, González A, Mújica A. (1994). Calmodulin binding proteins in the membrane vesicles released during the acrosome reaction and in the perinuclear material in isolated acrosome reacted sperm heads. *Tissue Cell.* 26(6):849-65.

Hernández-González EO, Roa-Espitia AL, Cruz Trejo J, Mújica A. (1996). Sperm protein (sp50) binds to acrosome and plasma membranes in a Ca²⁺-dependent manner: possible role in acrosome reaction. *Mol Reprod Dev.* 43(3):366-75.

Hernández-González EO, Lecona-Valera AN, Escobar-Herrera J, Mújica A. (2000). Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil Cytoskeleton.* 46(1):43-58.

Hilfiker S, Pieribone VA, Czernik AJ, Kao HT, Augustine GJ, Greengard P. (1999). Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354(1381):269-79. Review.

- Hirokawa N, Sobue K, Kanda K, Harada A, Yorifuji H. (1989). The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin I. *J Cell Biol.* 108(1):111-26.
- Holt WV. (1984). Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *Int Rev Cytol.* 87:159-94.
- Ikawa M, Wada I, Kominami K, Watanabe D, Toshimori K, Nishimune Y, Okabe M. (1997). The putative chaperone calmeglin is required for sperm fertility. *Nature.* 387(6633):607-11.
- Jones HP, Lenz RW, Palevitz BA, Cormier MJ. (1980). Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 77:2772-2776
- Kakiuchi S y Sobue. (1983). Control of the cytoskeleton by calmodulin and calmodulin-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* 4. 59-62.
- Kierszenbaum AL. (2000). Fusion of membranes during the acrosome reaction: a tale of two SNAREs. *Mol Reprod Dev.* 57(4):309-10. Review.
- Kirkman-Brown JC, Bray C, Stewart PM, Barratt CL, Publicover SJ. (2000). Biphasic elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in individual human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol.* Jun 15;222(2):326-35.
- Kirkman-Brown JC, Punt EL, Barratt CL, Publicover SJ. (2002). Zona pellucida and progesterone-induced Ca^{2+} signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J Androl.* 23(3):306-15
- Krause KH, Michalak M. (1997). Calreticulin. *Cell.* 88(4):439-43. Review.
- Krueger KA, Ings EI, Brun AM, Landt M, Easom RA. Site-specific phosphorylation of synapsin I by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in pancreatic betaTC3 cells: synapsin I is not associated with insulin secretory granules. *Diabetes.* 1999 Mar;48(3):499-506.
- Kuroda Y, Kaneko S, Yoshimura Y, Nozawa S, Mikoshiba K. (1999). Are there inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) receptors in human sperm?. *Life Sci.* 65(2):135-43.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*;227(259):680-5. No abstract available.
- Lagace L, Chafouleas JG, Trejo R, Delhumeau-Ongry G, Dedman JR. (1981). Calmodulin levels during ret testis development and intracellular localization in isolated cells. *Biol. Reprod.* 22 (suppl): 53A.

Landis DM, Hall AK, Weinstein LA, Reese TS. (1988). The organization of cytoplasm at the presynaptic active zone of a central nervous system synapse. *Neuron*. 1(3):201-9.

Langais J y Roberts KD. (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosoma reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12, 183-224.

Lax Y, Rubinstein S. y Breitbart H. (1994). Epidermal growth factor induces acrosomal exocytosis in bovine sperm. *FEBS Lett.* 339: 234-238.

Leclerc P, Langlais J, Lambert RD, Sirard MA, Chafouleas JG. (1989). Effect of heparin on the expression of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 85(2):615-22.

Leclerc P, Sirard MA, Chafouleas JG, Lambert RD. (1990). Decreased binding of calmodulin to bull sperm proteins during heparin-induced capacitation. *Biol Reprod.* 42(3):483-9.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L. and Randall RL. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Maienschein V, Marxen M, Volkandt W, Zimmermann H. (1999). A plethora of presynaptic proteins associated with ATP-storing organelles in cultured astrocytes. *Glia.* 26(3):233-44.

Martin TFJ. (1997). Stages of regulated exocytosis. *Trend Cell Biol.* 7, 271-276.

Manjunath P, Chandonnet L, Baillargeon L, Roberts KD. (1993). Calmodulin-binding proteins in bovine. *J Reprod Fertil.* 97(1):75-81.
semen.

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem.* 87(1):206-10.

Matsumoto K, Ebihara K, Yamamoto H, Tabuchi H, Fukunaga K, Yasunami M, Ohkubo H, Shichiri M, Miyamoto E. (1999). Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules. *J Biol Chem.* 274(4):2053-9.

Meizel S, Turner KO. (1993). Initiation of the human sperm acrosome reaction by thapsigargin. *J Exp Zool;* 267(3):350-5.

Michalak M, Corbett EF, Mesaali N, Nakamura K, Opas M. (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 344 Pt 2:281-92. Review.

Minelli A, Allegrucci C, Rosati R, Mezzasoma I. (2000). Molecular and binding characteristics of IP3 receptors in bovine spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 56(4):527-33.

Moore PB, Dedman JR. (1984). Calmodulin, a calmodulin acceptor protein, and calcimedins: unique antibody localizations in hamster sperm. *J Cell Biochem.* 25(2):99-107.

Morrissey JH. (1981). Silver stain from proteins in polyacrilamide gel: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117: 307-310.

Mújica A y Valdés-Ruiz. (1983).

Muñoz-Gotera RJ, Hernández-González EO, Mendoza-Hernández G, contreras RG, Mújica A. (2001). Exocytosis of a 60 kDa protein (calreticulin) from activated hamster oocytes. *Mol Reprod Dev.* 60(3):405-13

Naaby-Hansen S, Wolkowicz MJ, Klotz K, Bush LA, Westbrook VA, Shibahara H, Shetty J, Coonrod SA, Reddi PP, Shannon J, Kinter M, Sherman NE, Fox J, Flickinger CJ, Herr JC. (2001). Co-localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and calreticulin in the equatorial segment and in membrane bounded vesicles in the cytoplasmic droplet of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 7(10):923-33.

Nakamura M, Oshio S, Tamura A, Okinaga S, Arai K. (1992). Antisera to calreticulin inhibits sperm motility in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 86(2):984-90.

Nakamura M, Michikawa Y, Baba T, Okinaga S, Arai K. (1992). Calreticulin is present in the acrosome of spermatids of rat testis. *Biochem Biophys Res Commun.* 186(2):668-73.

Nakamura M, Moriya M, Baba T, Michikawa Y, Yamanobe T, Arai K, Okinaga S, Kobayashi T. (1993). An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp Cell Res.* 205(1):101-10.

Nicol S, Rahman D, Baines AJ. (1997). Ca^{2+} -dependent interaction with calmodulin is conserved in the synapsin family: identification of a high-affinity site. *Biochemistry.* 36(38):11487-95.

Noland TD, Van Eldik LJ, Garbers DL Y Burgers WH. (1985) Distribution of calmodulin-binding proteins in membranes from bovine epididymal spermatozoa. *Gamete Research.* 11:297-303.

Olson GE, Winfrey VP, Garbers DL, Noland TD. (1985). Isolation and characterization of a macromolecular complex associated with the outer acrosomal membrane of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 33(3):761-79.

Ostwald TJ, MacLennan DH. (1974). Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 249(3):974-9.

O'Toole CM, Arnoult C, Darzon A, Steinhardt RA y Flormam HM. (2000). Ca^{2+} entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell.* 11:1571-1584.

Oura C, Toshimori K. (1990). Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *Int Rev Cytol.* 122:105-51. Review.

Parks JE y Ehrenwald E. (1990). Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. En: *Fertilization in mammals* (B.D. Bavister, J. Cumminis, and E R Roldan, Eds.), pp 155-168. Serono Symposia, Norwell, Massachusetts.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Graham JK. (1999). In vitro capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. *Theriogenology.* 51(2):461-72.

Patel S, Morris SA, Adkins CE, O'Beirne G, Taylor CW. (1997). Ca^{2+} -independent inhibition of inositol trisphosphate receptors by calmodulin: redistribution of calmodulin as a possible means of regulating Ca^{2+} mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(21):11627-32

Peterson RN, Ashraf M, Russell LD. (1983). Effect of calmodulin antagonists on Ca^{2+} uptake by boar spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 114(1):28-33.

Peterson RN, Russell LD. (1985). The mammalian spermatozoon: a model for the study of regional specificity in plasma membrane organization and function. *Tissue Cell.*;17(6):769-91. Review.

Rendón-Huerta E, Mendoza-Hernández G, Robles-Flores M. (1999). Characterization of calreticulin as a protein interacting with protein kinase C. *Biochem J.* 344 Pt 2:469-75.

Roldan ER. (1998). Role of phospholipases during sperm acrosomal exocytosis. Front Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci.* 1996 Jul;109 (Pt 7):1947-55. *Biosci.* 3:D1109-19. Review.

Romano C, Nichols RA, Greengard P, Greene LA. (1987). Synapsin I in PC12 cells. I. Characterization of the phosphoprotein and effect of chronic NGF treatment. *J Neurosci.* 7(5):1294-9.

Saling PM, Heffner LJ and Storey BT. (1980). Separation of calcium effects on motility and zona binding ability in mouse spermatozoa. *J Exp Zool.* 212(1):53-9.

Sarafian T, Aunis D, Bader MF. (1987). Loss of proteins from digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells essential for exocytosis. *J Biol Chem.* 262(34):16671-6.

Smith MJ, Koch GL. (1989). Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J.* 8(12):3581-6.

Spungin B, Margalit I, Breitbart H. (1995). Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci.* 108 (Pt 6):2525-35.

Spungin B, Breitbart H. (1996). Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci.* 109 (Pt 7):1947-55.

Schulman H. (1993). The multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Curr Opin Cell Biol.* 5(2):247-53. Review.

Smith MJ, Koch GL. (1989). Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J.* 8(12):3581-6.

Spungin B, Breitbart H. (1996). Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci.* 109 (Pt 7):1947-55.

Stojanoff A, Bourne H, Andrews AG, Hyne RV. (1988). Phospholipid composition of isolated guinea pig sperm outer acrosomal membrane and plasma membrane during capacitation in vitro. *Gamete Res.* 21(3):297-311.

Takei Y, Harada A, Takeda S, Kobayashi K, Terada S, Noda T, Takahashi T, Hirokawa N. (1995). Synapsin I deficiency results in the structural change in the presynaptic terminals in the murine nervous system. *J Cell Biol.* 131(6 Pt 2):1789-800.

Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM Jr. (1986). Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(11):4094-8.

Tash JS. (1989). Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer flagellar motility. *Cell Motil Cytoskeleton.* 14(3):332-9. Review.

Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Proc Natl Acad Sci* ; 87(7):2466-70.

Thrower EC, Hagar RE, Ehrlich BE. (2001). Regulation of Ins(1,4,5)P₃ receptor isoforms by endogenous modulators. *Trends Pharmacol Sci.* 22(11):580-6. Review.

Tooze J, Hollinshead M, Fuller SD, Tooze SA, Huttner WB. (1989). Morphological and biochemical evidence showing neuronal properties in AtT-20 cells and their growth cones. *Eur J Cell Biol.* 49(2):259-73

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9):4350-4.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Trejo R and Mújica A. (1990). Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 26(4):366-76.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S and Diekmann AB. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 53: 133-150.
- Walensky LD, Snyder SH. (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J Cell Biol.* 130(4):857-69.
- Wasco WM, Kincaid RL, Orr GA. (1989). Identification and characterization of calmodulin-binding proteins in mammalian sperm flagella. *J Biol Chem.* 264(9):5104-11.
- Wassarman PM. (1999). Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell.* 22;96(2):175-83. Review.
- Watson PF, Plummer JM, Jones PS, Bredl JC. Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 1995 Aug;41(4):513-20.
- Weinman S, Ores-Carton C, Escaig F, Feinberg J, Puszkin S. (1986a). Calmodulin immunoelectron microscopy: redistribution during ram spermatogenesis and epididymal maturation II. *J Histochem Cytochem.* 34(9):1181-93.
- Weinman S, Ores-Carton C, Rainteau D, Puszkin S. (1986b). Immunoelectron microscopic localization of calmodulin and phospholipase A2 in spermatozoa. I. *J Histochem Cytochem.* 34(9):1171-9.
- Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol.* 142(2):473-84.
- Working PK and Meizel S. (1983). Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* 227:97-107.
- Xu Z, Kopf GS, Schultz RM. (1994). Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ release in early and late events of mouse egg activation. *Development.* 120(7):1851-9.
- Yamamoto H, Fukunaga K, Goto S, Tanaka E, Miyamoto E. (1985). Ca²⁺, calmodulin-dependent regulation of microtubule formation via phosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin, and comparison with the cyclic AMP-dependent phosphorylation. *J Neurochem.* 44(3):759-68.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. En: Knobil, E y col. (Ed), *The physiology of reproduction.* Raven Press, NY, pp.189-317.

Yanagimachi, R. (1988). Mammalian fertilization. En: Knobil, E y col. (Ed), The physiology of reproduction. Raven Press, NY, pp.189-317.

Yunes R, Tomes C, Michaut M, De Blas G, Rodriguez F, Regazzi R, Mayorga LS. (2002). Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction. FEBS Lett. 525(1-3):126-30.

Zapata O, Ralston J, Beltran C, Parys JB, Chen JL, Longo FJ, Darszon A. Inositol triphosphate receptors in sea urchin sperm. Zygote. 1997 Nov;5(4):355-64.