

31960
1
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

**PRESENCIA DE ACTINA F Y MIOSINA EN ESTRUCTURAS DEL
ESPERMATOZOIDE DEL COBAYO. SU POSIBLE PARTICIPACION EN PROCESOS
ESPERMATICOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION)

P r e s e n t a :

ZAIRA ORTIZ SALGADO

TUTOR:

M. en C. Leticia Moreno Fierros

DIRECTOR DE TESIS:

Dra Adela Mújica

Los Reyes Iztacala, Edo. de México.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	<i>i</i>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	12
RESULTADOS	21
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	54
LITERATURA CITADA	55

LISTA DE ABREVIATURAS

espermatozoides	EPTZ
fenil sulfonil fluoruro	PMSF
N-ptosil-L-lisina clorometilcetona	TLCK
N-etilmaleimida	NEM
p-aminobenzamida	PABA
ácido p-hidroximercuribenzoico	PHMB
di-isopropilfluorofosfato	DIPF
fracción V de la albúmina sérica bovina	BSA
citocalasina D	Cit-D
Dodecil sulfato de sodio	SDS
faloidina marcada con rodamina	Ph-Rh
PBS Tritón X-100 al 1%	PBST
medio mínimo de cultivo con pirúvico y láctico	MCM-PL
reacción acrosomal	RA
unidad de reactivos inmunológicos	
y anticuerpos monoclonales	URIAM

RESUMEN

La presencia de actina F en los espermatozoides de los mamíferos estudiados solo se demostró en cerdo y otras dos especies de ratones de campo. Sin embargo, a la actina del espermatozoide se le confieren varias funciones potenciales, las cuales sólo serían factibles si la actina estuviera en su forma polimerizada. La presencia de actina F se demostró en espermatozoides de ocho especies de mamífero: ratón, rata, criceto, gerbo, conejo, gato, perro y del hombre.

Se detectó la presencia de actina F en el espermatozoide epididimal inmaduro del cobayo.

Una de las funciones sugeridas para la actina F es su participación en la motilidad flagelar, probalemente interactuando con la miosina. Tomando como modelo al espermatozoide del cobayo, la presencia y distribución de la actina F y la miosina se investigaron por métodos bioquímicos e inmunológicos: Western-blot, inmunofluorescencia indirecta y microscopía electrónica para su localización ultraestructural, demostrándose que la miosina y la actina se localizaron en el núcleo y el flagelo de espermatozoides desmembrados. En el flagelo, las proteínas se observaron en la capa fibrosa, fibras gruesas y mitocondrias, por lo que su presencia refuerza la función sugerida de estas proteínas en la motilidad espermática.

En el espermatozoide del cobayo, el único efecto observado de la citocalasina D, fue la pérdida temprana del acrosoma.

INTRODUCCION

EL ESPERMATOZOIDE EN LOS MAMIFEROS.

El espermatozoide, fue descrito por primera vez por Leewenhoek en 1677, en el semen y en los testículos, sigue siendo hasta nuestros días el principal objeto de estudio para la biología, ya que aún se desconoce toda su funcionalidad (Segal, 1985).

El espermatozoide de los mamíferos posee características estructurales especializadas y son el reflejo de sus actividades funcionales únicas, tiene dos componentes principales, la cabeza y el flagelo. La cabeza constituida del núcleo y acrosoma así como una proporción pequeña de estructuras citoesqueléticas y del citoplasma, se ha sugerido que las estructuras citoesqueléticas de la cabeza tienen un papel mecánico funcional en la fertilización (Yanahimachi, 1970).

El flagelo consiste de cuatro segmentos distintos: La pieza de unión (cuello), la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Fawcett, 1975). Las estructuras principales son el axonema, fibras gruesas, cubierta fibrosa y la hoja mitocondrial. Los diferentes componentes del flagelo están involucrados en : a) generar y dar forma a las ondas de flexión que producen la fuerza mótil y b) en propagar ondas desde la base hasta la punta.

CITOESQUELETO.

La habilidad de las células eucariotas para adoptar una variedad de formas, así como para moverse de manera coordinada y dirigida dependen del citoesqueleto. Este es una compleja red de filamentos proteicos que se extienden a través del citoplasma, siendo

responsable directo de fenómenos como la contracción muscular, así como de muchos cambios en la forma del embrión de vertebrados durante su desarrollo. Además, el citoesqueleto provee la maquinaria necesaria para el movimiento activo de organelos de un lugar a otro en el citoplasma.

La presencia del citoesqueleto en la células pudo haber sido un factor crucial en la evolución de las células eucarióticas (Alberts *et al.*, 1989).

Las funciones del citoesqueleto dependen de tres tipos principales de filamentos proteicos: microfilamentos de actina, microtúbulos, y filamentos intermedios. Cada tipo de filamentos está formado por la polimerización de una clase única de monómeros proteicos; los filamentos pueden construir una gran variedad de arreglos espaciales dependiendo de su asociación a otras proteínas.

Todas las células eucariotas (incluyendo a organismos simples, tales como las levaduras) contienen actina. Esta es una proteína de importancia biológica fundamental, además de ser una de las proteínas más abundantes en la naturaleza, es una de las más conservadas evolutivamente (Korn, 1982).

La actina monomérica o actina G (43 kD) es una proteína globular compuesta de un polipéptido simple de 375 aminoácidos, asociada con una molécula de ATP unida no covalentemente. El fosfato terminal del ATP es hidrolizado después de que el monómero de actina se polimeriza y forma parte de un filamento de actina (actina F). Los filamentos de actina o microfilamentos presentan un grosor de 5-7 nm y forman una hélice uniforme y compacta, son estructuras polares con terminaciones estructuralmente diferentes, y son esenciales en algunos tipos de motilidad celular (Alberts *et al.*, 1989).

ACTINA EN LOS ESPERMATOZOIDES.

La presencia de actina en los espermatozoides analizados hasta hoy, está establecida. Empero, se desconoce su función en los espermatozoides de mamífero, su papel en la reacción acrosomal sólo se ha demostrado en invertebrados marinos, donde esta proteína representa el constituyente principal del material subacrosomal. En la reacción acrosomal la actina es rápidamente polimerizada, ensamblándose y formando una estructura larga y delgada, denominada proceso acrosomal, que ayuda al espermatozoide a hacer contacto con la membrana plasmática del óvulo (Tilney, 1973; 1976a; 1976b; 1987).

Los espermatozoides de los mamíferos son células polarizadas, que poseen una distribución organizada de organelos. Una característica única de los espermatozoides de mamífero es que su membrana plasmática está subdividida en dominios regionales firmemente delineados que difieren en composición y en función, llevando al concepto de que la membrana plasmática del espermatozoide es un mosaico de dominios restringidos que reflejan funciones especializadas de la superficie y de los componentes citoplasmáticos del espermatozoide. Los principales dominios de la membrana plasmática, son: los segmentos acrosomal, postacrosomal, pieza media y la pieza principal. Estos dominios exhiben funciones diferentes; por ejemplo, el segmento ecuatorial y la región postacrosomal participan en la fusión con el óvulo y en la reacción acrosomal, respectivamente (Eddy, 1988; Olson *et al.*, 1987; Virtanen, 1984; Peterson y Russell, 1985). Los mecanismos estructurales y moleculares involucrados en mantener la polaridad del espermatozoide aún no se conocen bien. Ha sido sugerido que la organización polarizada de sus membranas

está modulada por elementos del citoesqueleto, como ha sido descrito en otros tipos celulares (Marchs, 1985; Jacobsen, 1983; Friend, 1982).

La presencia de actina ha sido demostrada en los espermatozoides maduros no capacitados de varias especies de mamífero, que incluyen: criseto, rata, ratón, ratón de campo, cobayo, topo, conejo, cerdo, perro, toro y al ser humano. (Clarke y Yanaginachi, 1978; Baccetti *et al.*, 1984; Lora-Lamia *et al.*, 1986; Flaherty *et al.*, 1986; Moreno-Fierros *et al.*, 1992). Los estudios para la detección de actina se han llevado a cabo utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales, desoxirribonucleasa I; así como sondas específicas (faloidina marcada con rodamina), para determinar la presencia de filamentos de actina. Otros estudios se han realizado a nivel ultraestructural utilizando anticuerpos conjugados covalentemente a ferritina, dextran-hierro u oro coloidal. También se han utilizado técnicas bioquímicas, como electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS seguidas de Western-blot, para probar la presencia de actina en preparaciones de espermatozoide total y en fracciones espermáticas (Campanela *et al.*, 1979; Escalier, 1984; Baccetti, 1984; Castellani-Ceresa *et al.*, 1986; Lora-Lamia *et al.*, 1986; Camatini *et al.*, 1987; Fouquet *et al.*, 1990).

En las células espermátogénicas se han localizado filamentos de actina en el área subacrosomal de espermátidas provenientes del cobayo (Halenda *et al.*, 1987), criseto (Fouquet *et al.*, 1990), rata (Aumüller y Seitz, 1988), ardilla (Volg y Soucy, 1985), conejo (Welch y O'Rand, 1985), cerdo (Camatini *et al.*, 1988), mono y hombre (Fouquet *et al.*, 1989). Los resultados indican un papel potencial de la actina F en los eventos morfogenéticos de la espermiogénesis. Por lo general se podría pensar que la actina F

estuviese involucrada en el transporte de las vesículas del Golgi durante la formación del acrosoma. No se ha demostrado que la actina subacrosomal sea contráctil, pero su función podría ser estructural, y servir para anclar el acrosoma al núcleo con el objeto de armonizar su forma a través de las interacciones mutuas entre el acrosoma y el núcleo durante la fase de alargamiento de las espermátidas (Halenda *et al.*, 1987; Volg, 1989).

FUNCION DE LA ACTINA EN EL ESPERMATOZOIDE.

Se ha sugerido que interacciones de actina con proteínas de la membrana plasmática juegan un papel importante en la capacitación de los espermatozoides del cerdo, y que la actina puede estar involucrada en la redistribución de proteínas de la membrana plasmática, que ocurre en dicho proceso (Peterson, 1990).

Moreno-Fierros (1989) demostró la presencia de actina en espermatozoides del cobayo, por inmunocitoquímica y Western-blot de sus proteínas, utilizando anticuerpos antiactina mono y policlonales. Moreno-Fierros y col. en 1992 sugirieron, que la actina ayuda a mantener la estructura del acrosoma, que además participa en la redistribución de proteínas, que ocurre durante la reacción acrosomal y, que la actina presente en el flagelo puede estar involucrada en la motilidad flagelar. Lo anterior lo fundamentaron en sus resultados del efecto de la citocalasina D sobre los espermatozoides: a) despolimerización de la actina ; b) disminución de la motilidad espermática de manera dependiente de la concentración de la droga y c) ruptura del acrosoma e inhibición de la aparición de calmodulina en la región postacrosomal.

ACTINA POLIMERIZADA EN EL ESPERMATOZOIDE DEL COBAYO.

La presencia de actina polimerizada en el espermatozoide del cobayo fue observada por Moreno-Fierros (1989) en los espermatozoides lavados no capacitados, en los capacitados y también en los que presentaban reacción acrosomal, de muestras espermáticas obtenidas de los conductos deferentes. Es importante remarcar que existen pocas comunicaciones adicionales, que muestran la presencia de actina F en los espermatozoides, Saxena *et al.*, (1986) y Peterson *et al.*, (1990) observaron actina filamentosa en espermatozoides maduros del cerdo, capacitados y no capacitados, respectivamente, Flaherty (1983) y Breed y Leigh (1991) muestran la presencia de actina F en los espermatozoides maduros del ratón de campo, en dos ganchos ventrales de la cabeza formando un componente estructural único del espermatozoide de roedores (*Hidromyos*, *Conilurine* y *Unomyridos*).

POSIBLE SEGUNDO MECANISMO EN EL MOVIMIENTO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LOS MAMIFEROS.

El movimiento de todos los flagelos de eucariotes está regulado por el deslizamiento de los túbulos del axonema. Los nueve pares de dobletes poseen proyecciones semejantes a puentes constituidos de una proteína llamada dineína. Las moléculas de dineína forman conexiones transitorias entre los dobletes externos y catalizan la hidrólisis de moléculas de adenosín trifosfato-magnesio (ATP-Mg²⁺) para producir la energía, que impulsa el deslizamiento de un doblete de microtúbulos en relación a otro. En el espermatozoide de los mamíferos el deslizamiento de los microtúbulos ocurre de manera similar al

deslizamiento de ellos en los espermatozoides de los invertebrados. También, tienen una interacción activa en la motilidad flagelar, elementos estructurales radiales, que conectan al par central de los microtúbulos con los nueve dobletes externos. Estas conexiones son llamadas rayos, son móviles presentan actividad de ATPasa y en el batimiento flagelar pueden reorganizar su punto de conexión al anillo proteico, que rodea al par central de microtúbulos (Lindemann y Kanous, 1989).

El mecanismo de la motilidad flagelar, señalado anteriormente, no está a discusión. Por el momento las evidencias existentes concuerdan con el modelo, el cual es totalmente adecuado para explicar la motilidad de los cilios, y flagelos simples de espermatozoides de invertebrados. Sin embargo, la locomoción de espermatozoides de mamífero, es mucho más compleja, debido a los componentes fibrosos adicionales (fibras gruesas externas) así como a las cubiertas circunferenciales de sus flagelos (hoja mitocondrial y capa fibrosa), los cuales parecen imponer restricciones para la flexión y para el deslizamiento de los microtúbulos (Fawcett, 1975).

En un principio se propuso, que las fibras densas externas eran contráctiles (Nelson, 1968) y, eran elementos motores accesorios del flagelo, que surgieron para soportar la mayor resistencia a la locomoción en el tracto reproductor de la hembra de los mamíferos; donde se había observado que las fibras densas estaban asociadas estrechamente con el axonema, y su aparición era coincidente, durante la filogenia, con la fecundación interna. Las proteínas de las fibras densas están estabilizadas por abundantes puentes disulfuro, y se ha sugerido que podrían servir para dar rigidez o para proveer elasticidad al flagelo. Debido a que las fibras densas han sido consideradas como componentes pasivos

rígidos, surgieron varias interrogantes (Fawcett, 1970; Eddy, 1988). ¿Cómo puede operar un mecanismo de deslizamiento cuando las fibras densas están fijadas por sus extremos a los dobletes del axonema que se presume que se deslizan? ¿Qué ventajas proveen estas estructuras adicionales rígidas sobre un flagelo simple $9+2$? ¿En especies con flagelos más complejos, cómo puede un axonema central delgado sobrellevar la resistencia de 9 fibras densas periféricas situadas a poca distancia del eje de flexión? De los datos existentes sobre la composición de las fibras densas externas, se concluyó que no existen componentes contráctiles (como actina). Sin embargo, no es posible excluir la posibilidad de que estas estructuras fibrosas sean contráctiles debido a que en la extracción no se utilizaron inhibidores de proteasas (Fawcett 1975; Eddy, 1988; Lindemann y Kanous, 1989), la cubierta mitocondrial incrementada se interpretó como una adaptación, para proveer la energía necesaria para la contracción de fibras densas externas (Fawcett, 1970; Eddy, 1988), y la presencia de actina en las mitocondrias recientemente ha sido descrita (Etho, 1990). De este modo en los espermatozoides de mamíferos es posible la participación de un mecanismo adicional que involucre la participación de proteínas contractiles en las fibras gruesas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Hasta el momento, la presencia de actina F en los espermatozoides de los mamíferos no ha sido demostrada claramente, por lo que es difícil atribuirle una función en la motilidad. Aunque la presencia de proteínas contráctiles como actina y miosina han sido reportadas en el espermatozoide del bovino, estos resultados no han podido ser reproducidos, aun más, la presencia de actina F es esencial, ya que sólo en su forma polimerizada se le confieren funciones biológicas.

La presencia de actina F en los espermatozoides de mamífero sugiere la idea de que intervenga en una función común como lo es la motilidad, se acepta que en el sistema de deslizamiento de los microtúbulos por acción de los brazos de dineína, pero este sistema todavía no logra explicar los diferentes movimientos que presenta el espermatozoide, como en el caso del movimiento hiperactivado.

La determinación de la presencia de actina F en el espermatozoide del cobayo durante su maduración a lo largo del epididimo, en donde aún no se mueve, hace posible establecer a la actina F como parte constitutiva del flagelo. La presencia de proteínas contráctiles como actina y miosina en el espermatozoide del cobayo como modelo experimental, retoman la posible participación de estas proteínas en la motilidad espermática.

OBJETIVO GENERAL:

Investigar la presencia de actina F en los espermatozoides de varias especies de mamíferos y, utilizando al espermatozide del cobayo, aportar evidencias adicionales de que la actina F y lamiosina son constituyentes del flagelo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Detectar la presencia de actina F en los espermatozoides del ratón, criceto, rata, gerbo, conejo, gato, perro y humano.
- 2.- Detectar la presencia de actina F en los espermatozoides del cobayo durante la maduración epididimal.
- 3.- Detectar la presencia de actina y miosina en subestructuras del flagelo y en extractos flagelares en los espermatozoides de cobayo.
- 4.- Determinar la posible función de la actina usando como modelo el espermatozoide del cobayo.

MATERIAL Y METODOS

REACTIVOS.

Triton X-100, faloidina marcada con rodamina, faloidina, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), N-ptosil-L-lisina clorometilcetona (TLCK), N-etilmaleimida (NEM), p-aminobenzamida (PABA), leupeptina, ácido p-hidroximercuribenzic (PHMB), diisopropilfluorofosfato, Trizma base, sacarosa, fracción V de la albúmina sérica bovina, 2-mercaptoetanol, 3',3,' diaminobenzamidina, cloruro de níquel, cloruro de cobalto, citocalasina D, Percoll, rojo Ponceau, anticuerpo monoclonal anti- α actina de músculo liso clona 1A4, anticuerpo policlonal anti-actina, anticuerpo policlonal anti-miosina, ditiotreitól, Tween 20, proteína A-oro coloidal, todos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co, St Louis M.O., cloruro de sodio, cloruro de amonio, EDTA , metanol absoluto, fueron de J.T. Baker México. Brij 36T, de Canamex, México. Dodecil sulfato de sodio (SDS) de BDH Chemical Ltd England. Anticuerpo de carnero anti conejo, y anticuerpo de conejo anti ratón, marcados con rodamina o acoplados a peroxidasa fueron de E.Y. Laboratories INC. USA. Resina acrílica LR White grado medio de Electron Microscopy Sciences Washigton USA, acetato de uranilo de Poly Science USA.

I. OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES DEL EPIDIDIMO Y CONDUCTO DEFERENTE

Se utilizaron cobayos machos (*Cavia*, sp) de 600-700 g de peso y se sacrificaron por dislocación cervical. Se les lavó y rasuró la región abdominal hasta la bolsa escrotal . Se localizaron los testículos, se pinzó y se ligó el extremo distal del conducto deferente. El complejo testículo-epidídimo-conducto se recibió en solución de NaCl al 0.9%, se disecó

el conducto deferente y se le introdujo una cánula por el extremo ligado, cortando en su unión con el epidídimo. Los espermatozoides fueron expulsados fuera del conducto por la inyección de 2 ml de la solución de NaCl a 37°C. Se observaron los espermatozoides al microscopio de luz, para seleccionar únicamente las muestras con motilidad normal y con menos del 1% de células contaminantes.

Las muestras de espermatozoides (EPTZ) de cada uno de los conductos de los diferentes organismos, se centrifugaron a 2500 rpm por 4 min. La pastilla se lavó dos veces más añadiendo 1 ml de NaCl. Para la determinación de la concentración celular se tomó una muestra alícuota de 50 µl de la suspensión de EPTZ se le adicionó un mililitro de Tritón X-100 0.1% en PBS y el conteo se efectuó en una cámara de Neubauer.

II. CAPACITACION Y REACCION ACROSOMAL EN LOS ESPERMATOZOIDEOS DEL COBAYO.

Los espermatozoides obtenidos de los conductos deferentes lavados, se incubaron a 37°C em medio mínimo de cultivo (MCM-PL) sin glucosa (Rogers y Yanagimachi, 1975) a una concentración de 35×10^6 eptz/ml.

Durante la incubación se examinaron las muestras al microscopio óptico, para observar su movilidad y el tiempo de aparición de la reacción acrosomal que fue valorada cualitativamente, observando al microscopio óptico, la presencia de espermatozoides sin acrosoma y con hiperactivación, es decir con movilidad aumentada y ondulación del flagelo, en forma de látigo. La reacción acrosomal (RA), también se determinó, cuantitativamente, para esta valoración se determinó el porcentaje de espermatozoides que perdían el acrosoma en un periodo determinado de tiempo en relación con otro, cuando la RA era evidente.

Para ello se tomaron muestras alícuotas de 50 μ l fijadas en formaldehído al 3% en PBS; al inicio de la RA y cuando esta aumentava con respecto al tiempo.

El porcentaje de la RA de cada muestra fijada se determinó de la cuenta de no menos de 200 células, en la cámara de Neubauer, utilizando la ecuación:

Porcentaje de RA = número de eptz sin acrosoma / número de eptz contados. El porcentaje de reacción acrosomal de cada muestra experimental corresponde a la diferencia del porcentaje de la reacción acrosomal.

III. PURIFICACION DE FLAGELOS DESMEMBRANADOS DE ESPERMATOZOIDE DE COBAYO POR GRADIENTE DE SACAROSA.

La purificación de los flagelos se realizó siguiendo básicamente el método descrito por Oko (1988). Los espermatozoides (1×10^5 células/ml) fueron decapitados y desmembrados por sonicación a 50 mA por 1 min, en un sonicador Brownsonic; en presencia de una mezcla de los siguientes inhibidores de proteasas (molaridad final): fenil sulfonil fluoruro (PMSF) 5 mM, N-ptosil-L- lisina clorometilcetona (TLCK) 2 mM, N-etilmaleimida (NEM) 5 mM, p-aminobenzamida (PABA) 5 mM, leupeptina 20 mM, ácido p-hidroximercuribenzoato (PHMB) 1 mM, di-isopropilfluorofosfato 5 mM (DIPF), EDTA 2 mM.

Los inhibidores fueron disueltos en Tris-HCl 0.05M pH 9, a excepción del DIPF (5 mg/ml en dimetil sulfóxido) y la leupeptina (2 mg/ml en agua). Los inhibidores se diluyeron a la concentración final indicada, justo en el momento de adicionarse a la muestra espermática. El grado de decapitación fue verificado por microscopía de luz. A continuación los espermatozoides fueron centrifugados a 3000 rpm y resuspendidos en 1

ml de sacarosa al 65% (p/v) diluida en PBS 0.02M.

La purificación de flagelos fue realizada mediante ultracentrifugación en un gradiente discontinuo de sacarosa de 65%, 70% y 75% (p/v), se utilizaron 3.5 ml de cada solución. La ultracentrifugación se llevó a cabo en un rotor Ti SW40 a 20,000 rpm por 70 min a 4°C. Los flagelos fueron colectados de la fracción 65-75% , diluidos en PBS y sedimentados a 10,000 xg por 15 min.

IV. MANEJO DE ESPERMATOZOIDES PARA PREPARACION DE LAMINILLAS PARA LA DETECCION DE ACTINA POLIMERIZADA E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Los tipos de muestras trabajadas de espermatozoides del cobayo fueron: a) espermatozoides recién obtenidos de las diversas regiones del epidídimo; b) espermatozoides recién obtenidos y sin lavar de conducto deferente, lavados, capacitados y con reacción acrosomal; c) espermatozoides desmembrados por detergente Brij 36T y d) flagelos desmembrados purificado.

Los espermatozoides de las demás especies de mamífero ensayadas (ratón, rata, criceto, gerbo, conejo, gato, perro) fueron obtenidos de conducto deferente; los del ser humano fueron de eyaculado. Los espermatozoides se colectaron y lavaron en NaCl por centrifugación a 600 xg y resuspensión. Posteriormente fueron fijados en una suspensión con formaldehído a una concentración final de 1.5%, se neutralizaron los grupos aldehído con cloruro de amonio 50 mM en PBS, 10 minutos, lavándose con PBS 0.15 M pH 7.4, 3 veces, y con agua bidestilada 2 veces, finalmente los espermatozoides se resuspendieron en agua bidestilada y se hicieron frotis en laminillas, dejándose secar a temperatura ambiente.

V. DETECCION DE ACTINA POLIMERIZADA CON EL REACTIVO FALOIDINA-RODAMINA.

Los frotis de espermatozoides fueron permeabilizados durante cinco minutos en metanol absoluto a -20°C y lavados en PBS. La tinción con faloidina se realizó entre porta y cubre objetos, con $30\ \mu\text{l}$ de faloidina marcada con rodamina (Ph-Rh) ($10\ \mu\text{g/ml}$ en PBS) por laminilla durante 20 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. Las laminillas fueron lavadas en PBS, por 3 veces 2 min cada vez, y montadas con PBS-glicerol 1:1, sellando los bordes del cubreobjetos con barniz de uñas. Las células fueron observadas en microscopio de epifluorescencia, se empleó un filtro de (510-560). Un control positivo para la tinción específica de actina F con Ph-Rh, fue el empleo de fibroblastos, donde puede observarse claramente los filamentos de actina característicos del citoesqueleto en estas células; el control negativo fue realizado por la competencia de faliodina sin marca por un exceso de 500 veces la concentración de faliodina marcada. Se tomaron fotografías, usando película TRI-X-Pan ASA 400, a un tiempo de exposición de 30 seg.

VI. DETECCION DE ACTINA Y MIOSINA POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA EN ESPERMATOZOIDE TOTAL, DESMEMBRANADO Y FLAGELOS PURIFICADOS.

Las diferentes muestras empleadas fueron permeabilizadas en metanol absoluto por 5 min lavadas en PBS y bloqueados los sitios inespecíficos con albúmina de suero de bovino al 3% en PBS, durante 1h a 37°C . Las laminillas fueron incubadas con el primer anticuerpo (policlonal anti-actina dilución 1:40 ó policlonal anti-miosina dilución 1:10 durante dos horas a 37°C , y posteriormente lavados en PBS 3 veces. La incubación con el

segundo anticuerpo acoplado a fluorocromo (carnero anti conejo marcado con rodamina), fue realizada durante una hora a 37°C y en seguida lavados en PBS por 3 veces. Las muestras fueron montadas en PBS-glicerol 1:1 (v/v) entre porta y cubre, y observadas al microscopio de epifluorescencia y fotografiadas utilizando película TRI-X-Pan ASA 400.

VII. DETECCION DE ACTINA Y MIOSINA EN LAS PROTEINAS DE FLAGELOS POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES (PAGE-SDS) E INMUNODETECCION CON ANTICUERPOS EN LAS PROTEINAS TRANFERIDAS A PAPEL DE NITROCELULOSA.

Electroforesis (PAGE-SDS) de las proteínas flagelares. Los flagelos desnudos purificados fueron divididos en dos alícuotas, una primera alícuota se solubilizó añadiendo 0.4 ml de DTT 90 mM por 10 min seguida de 0.4 ml de SDS al 10% por cada 100×10^6 células/ml. Una segunda muestra alícuota fue fijada para su posterior análisis ultraestructural. Los flagelos solubilizados fueron corridos electroforéticamente en geles de SDS poliacrilamida al 10% según el método de Laemmli (1970). Para la detección de miosina el gel se construyó con poliacrilamida al 6% .

Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa. La transferencia de proteínas se llevó a cabo básicamente según el método de Towbin (1979), para la detección de actina y miosina en las proteínas del flagelo desmembrado.

Inmunodetección de actina y miosina en el papel de nitrocelulosa.

Las proteínas de espermatozoide purificado, así como las de flagelo puro, fueron transferidas a papel de nitrocelulosa, bloqueadas con leche al 5% en PBS Tritón X-100 al 1% (PBST) durante una hora, en seguida las tiras de papel lavadas en PBST se incubaron con el primer anticuerpo. El policlonal anti-miosina (1:10), ó monoclonal anti-actina de (Sigma)

diluido 1:400 o con el elaborado por la unidad de reactivos inmunológicos y anticuerpos monoclonales (URIAM) del departamento de biología celular del CINVESTAV sin diluir, durante 1 hora a 37°C. El exceso de anticuerpo fue retirado lavando el papel tres veces, por diez minutos cada lavado en PBST. Se adicionó el segundo anticuerpo, carnero anti conejo o conejo anti ratón acoplado a peroxidasa (1:8000) según el primer anticuerpo empleado, se dejó interaccionar durante 1 hora a 37°C y se retiró, lavando tres veces en PBST 10 min cada vez, y una vez en amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4. Finalmente, el papel se incubó en amortiguador de preincubación durante 10 min y la peroxidasa se reveló inmediatamente después con solución reveladora, para peroxidasa, en la que se empleo diaminobenzamidina y peróxido como sustrato (De Blas y Cherwinski, 1983).

VIII. DETECCION ULTRAESTRUCTURAL DE ACTINA Y MIOSINA EN FLAGELOS DESMEMBRANADOS PURIFICADOS.

Los espermatozoides intactos, los desmembrados y los flagelos purificados fueron fijados en suspensión según el protocolo seguido para las muestras, que fueron trabajadas para inmunofluorescencia indirecta y tinción con Ph-Rh. Las diferentes muestras se trabajaron siguiendo la técnica de Aumüller (1988). Fueron bloqueadas en suspensión, con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS durante una hora, y la deshidratación etanólica (30%, 50%, 60%, 70%) se realizó durante 10 minutos cada vez a 4°C. La infiltración en resina LR White fue realizada bajo el siguiente esquema: a) las muestras fueron tratadas con etanol al 70% (1 vol) resina LR White (2 vol) a -20°C durante una hora, b) incubadas con resina LR White (100%) a -20°C por una hora, tres veces, c) incubadas en resina LR White (100%) a 4°C durante toda la noche, y d) las muestras fueron incluidas en la resina

en cápsulas de gelatina, previa identificación, para su polimerización a 50°C por 24 horas. De los bloques fueron obtenidos cortes finos y montados en rejillas de níquel, y se procedió a la inmunolocalización de las proteínas a estudiar.

Para un control positivo, se empleó músculo de cobayo, en donde es conocida la gran cantidad de actina y miosina como proteínas contráctiles.

Las muestras en las rejillas fueron bloqueadas con leche descremada al 1% en PBS Tween al 0.05% durante 30 minutos, posteriormente los cortes fueron incubados con el primer anticuerpo, anti-actina monoclonal 1:400, o el anti-actina policlonal 1:40 o el anti-miosina policlonal 1:10, durante una hora a temperatura ambiente. Se lavaron en PBS Tween al 1% 5 veces durante 2 minutos cada lavado, la incubación con proteína A-oro 10nm diluida 1:20 en PBS Tween, se realizó por 45 min, en seguida fueron lavadas con PBS Tween cinco 5 veces y en agua destilada 2 veces. Las rejillas fueron teñidas con acetato de uranilo al 3% en solución acuosa, y lavadas con agua dejando secar para su posterior observación y fotografía en el microscopio electrónico de transmisión (Joel modelo JEM-2000 EX).

IX. EFECTO DE LA CITOCALASINA D SOBRE LA REACCION ACROSOMAL.

Los espermatozoides fueron tratados con citocalasina-D (Cit-D) a una concentración final de 10 μ M durante el procedimiento de extracción, lavados en NaCl e incubados en MCM. Los espermatozoides control recibieron el mismo tratamiento pero en ausencia de el fármaco. La concentración de espermatozoides se ajustó desde el principio a 7×10^6 células/ml y se mantuvo durante todo el procedimiento.

La reacción acrosomal se valoró cualitativa y cuantitativamente a lo largo de la incubación de los espermatozoides en el medio MCM y MCM Cit-D.

X. EFECTO DE LA CITOCALASINA D SOBRE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Se analizó el efecto de este fármaco sobre la estabilidad del material espermático se tiñe con Ph-Rh, el cual se considera representante actina F. Para ello, los espermatozoides se obtuvieron del conducto deferente y se diluyeron de inmediato a una concentración menor a 5×10^6 células/ml en NaCl.Cit-D ($75 \mu\text{M}$) o en NaCl (control). Se incubaron a 37°C durante 9-120 min y se fijaron en formaldehído, para su posterior tinción con Ph-Rh.

RESULTADOS.

DETECCION DE ACTINA F EN EL ESPERMATOZOIDE EPIDIDIMAL Y DEL CONDUCTO DEFERENTE DEL COBAYO.

En este trabajo, en primer término se procedió a reproducir las observaciones reportadas por Moreno-Fierros (1989), quien utilizó faloidina marcada con rodamina (Ph-Rh), una sonda específica para actina F, y demostró la presencia de la proteína en su estado polimerizado en los espermatozoides del cobayo: lavados en NaCl (0.9%), en los capacitados y en los que mostraban reacción acrosomal; e indicó, observar poca o nula fluorescencia en espermatozoides recién extraídos del conducto deferente. Se infirió que la técnica de fijación-permeabilización (Moreno-Fierros, 1989), no permitía una buena conservación de la estructura espermática, ya que muchos espermatozoides perdían el acrosoma. Por ello, se ensayaron otras condiciones para la fijación, y se logró que los espermatozoides conservaran el organelo, aparentemente bien estructurado, mediante 1 h de fijación en formaldehído (1.5% final) y la permeabilización posterior. En espermatozoides fijados bajo esta condición; también, pudo ser observada la actina F en los gametos recién obtenidos de los conductos deferentes (Fig. 1a) y su localización fue igual a la mostrada en los gametos después de ser lavados y en los capacitados, presentando una fluorescencia a todo lo largo del espermatozoide siendo mas intensa en el acrosoma y en la pieza media (Fig. 1b, y c) respectivamente, concordando con lo descrito por Moreno-Fierros (1989). En los que presentaban reacción acrosomal el flagelo se conservó fluorescente, la fluorescencia del acrosoma se perdió junto con el organelo y un cono fluorescente, en la región postacrosomal fue visible, confirmando lo mostrado por Moreno-Fierros et al. (1992) (Fig 1d).

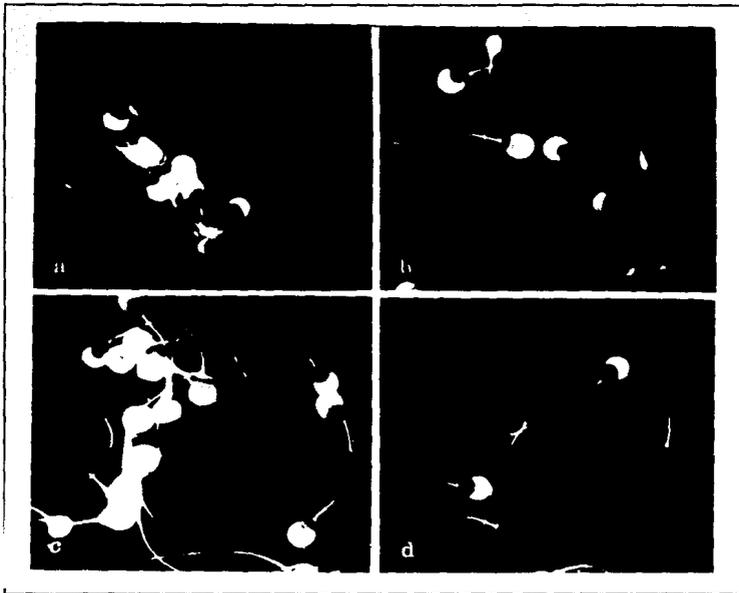


Fig. 1. Detección de actina polimerizada, con faloidina-rodamina (Ph-Rh). a) En espermatozoides recién extraídos, b) lavados, c) capacitados en MCM-PL y d) con reacción acrosomal. Se observó fluorescencia a lo largo del espermatozoide, más intensa en la región del acrosoma, así como en la pieza media; se aprecia un nuevo sitio fluorescente en aquellas células que sufrieron reacción acrosomal. 197X.

Se decidió investigar, si la actina se polimerizaba en los espermatozoides durante su paso por el epidídimo. Los resultados mostraron, que los espermatozoides obtenidos de las tres regiones principales del epidídimo (cabeza, cuerpo y cauda), contenían actina F (Fig. 2).

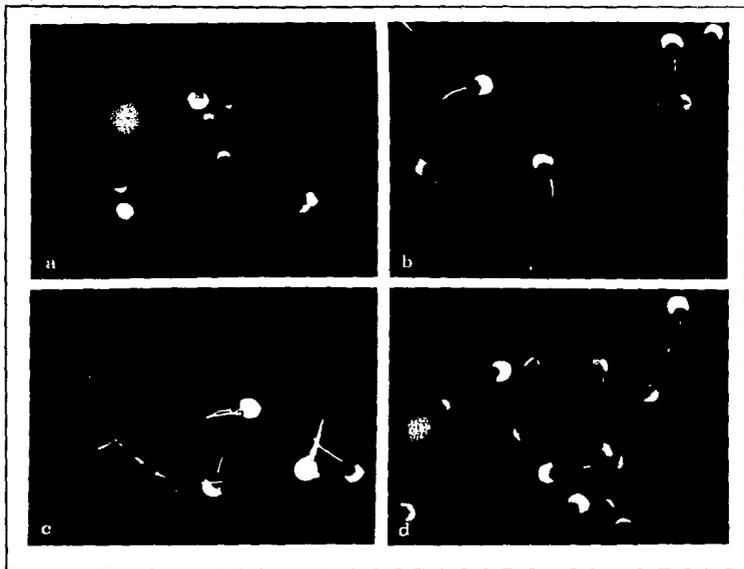


Fig. 2. Tinción con Ph-Rh en espermatozoides provenientes de las tres regiones del epidídimo: a) cabeza, b) cuerpo, c) cauda y d) espermatozoides del conducto deferente. 197X.

Un patrón común de localización de la actina F, usando la sonda fluorescente, fue observado en los espermatozoides epididimales y fue igual al comunicado por Moreno-Fierros (1989), para los lavados y los capacitados. Es decir, el acrosoma incluyendo la región ecuatorial mostró fluorescencia brillante; además, todo el flagelo presentó fluorescencia, más intensa en la pieza media. En los fibroblastos, utilizados como controles positivos de tinción específica de actina F con Ph-Rh, se observaron claramente filamentos de actina, característicos del citoesqueleto de estas células (datos no mostrados).

DETECCION DE ACTINA F EN ESPERMATOZOIDES DE OCHO ESPECIES DE MAMIFEROS.

El hecho de encontrar a la actina en su forma polimérica en los espermatozoides del cobayo, nos daba bases para sugerir su participación en alguna función espermática. Para poder considerar una función general para la actina, en el espermatozoide, su presencia en los gametos de otros mamíferos, sería un requisito. Por ello, se procedió a la identificación de la actina F en otras especies.

La actina F se detectó en los espermatozoides lavados del conejo, criceto, perro, gato, rata, ratón, gerbo y del hombre. Un patrón similar de fluorescencia fue observado entre los gametos de las ocho especies. En todos, el flagelo presentó fluorescencia, siendo más fuerte en la región del cuello y en la pieza media, y menos intensa en el resto del flagelo, a lo observado en el del cobayo. La cabeza de los espermatozoides de las ocho especies trabajadas también mostró fluorescencia, aunque la intensidad de la misma varió entre ellas (Fig. 3). Un exceso de faloidina sin marca (500 veces la concentración de faloidina marcada) añadida antes de la incubación con Ph-Rh, evitó la unión de Ph-Rh, siendo nula la fluorescencia, mostrándose así la especificidad de unión a la actina F (Fig. 4).

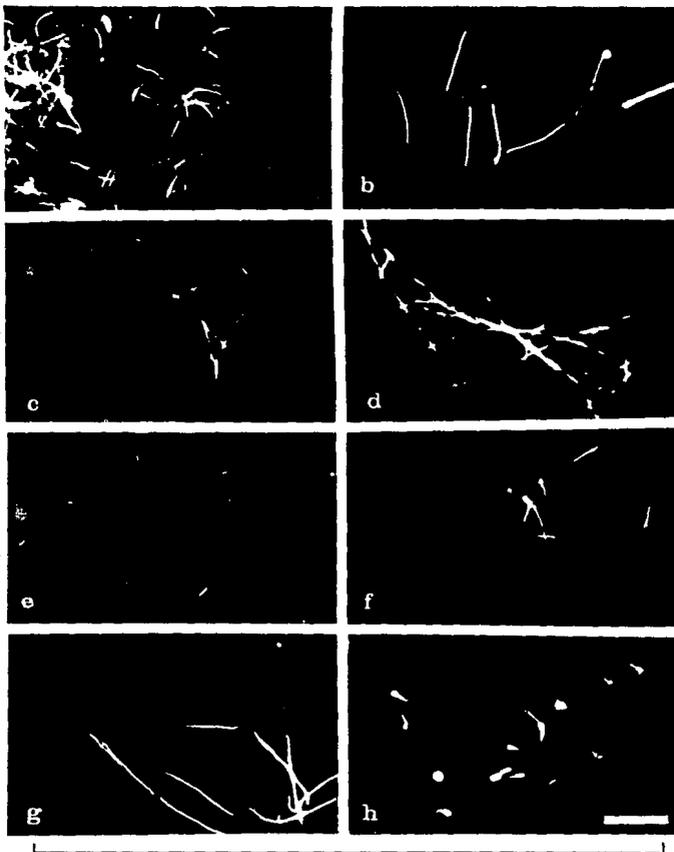


Fig. 3. Localización de actina F en los espermatozoides de varias especies de mamíferos, teñidos con Ph-Rh. Se observó un patrón homogéneo de localización en la región del flagelo de todas las especies: a) conejo, b) ratón, c) Rata, d) criceto, e) perro, f) gato, g) gerbo y h) humano. 197x barra= 10 μ m.

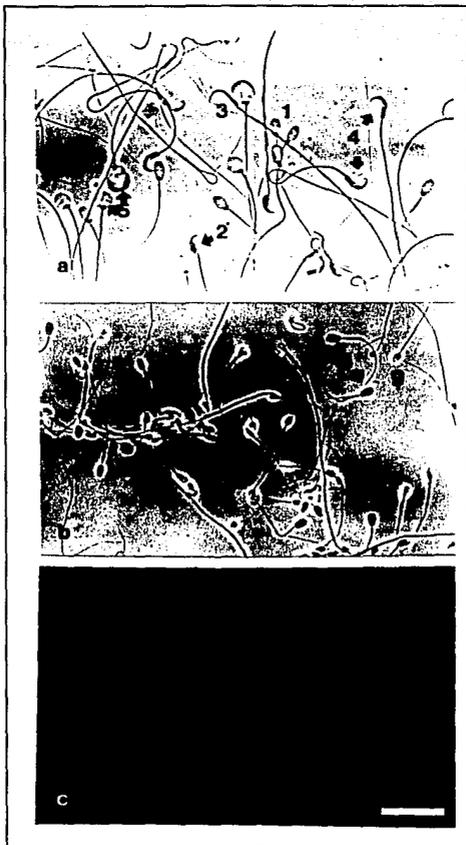


Fig. 4. Espermatozoides de nueve especies de mamíferos pretratados con un exceso de faloidina no marcada antes de teñir con Ph-Rh. a) y b) Contraste de fase: a) conejo (1), ratón (2), rata (3), criceto (4) cobayo (5); b) perro (6), gato (7), gerbo (8) y humano (9) c) Tinción con Ph-Rh en competencia con un exceso (500X) de faloidina sin marca. 197X. barra= 10 μ m.

DETECCION DE ACTINA F CON FALOIDINA-RODAMINA EN ESPERMATOZOIDES DESMEMBRANADOS Y EN FLAGELOS PURIFICADOS DEL COBAYO.

Para aclarar si la actina F observada en el flagelo del espermatozoide total estaba asociada sólo a la membrana plasmática, o si estaba presente en otras estructuras flagelares, se trabajó en espermatozoides desmembrados con el detergente Brij 36T y en flagelos purificados, desmembrados por sonicación.

Espermatozoides desmembrados con Brij 36T. Por el tratamiento con Brij 36T, el espermatozoide del cobayo pierde la membrana plasmática y el acrosoma (Mújica, 1979). En los espermatozoides tratados con Brij la pérdida del acrosoma fue aparente (Fig. 5b) y la distribución de la actina en los espermatozoides desmembrados fue igual a la observada en los espermatozoides con reacción acrosomal (compare la Fig. 5b con la 1d), teñidos ambos con faloidina-rodamina. El flagelo del espermatozoide desmembrado se veía fluorescente, quizá como adelgazado y la pieza media siguió presentando mayor fluorescencia que el resto del flagelo (Fig. 5b). En la cabeza del espermatozoide desmembrado, la actina se localizó en la región posacrosomal (Fig. 5b). La presencia de esta proteína en la región posacrosomal también se observó en los espermatozoides que han sufrido reacción acrosomal (Fig. 1d). Parece así, que en los espermatozoides carentes de acrosoma se hace evidente, por tinción con Ph-Rh, actina F en un nuevo sitio, la región posacrosomal, donde en espermatozoides lavados no había sido observada.

Flagelos purificados. Para obtener esta preparación, los espermatozoides estuvieron sujetos a sonicación, un procedimiento drástico y posteriormente a un gradiente de sacarosa. A pesar de ello, en estos flagelos se detectó la presencia de actina F (Fig. 5d). Puede observarse la carencia de la membrana plasmática, pero la

presencia de las restantes estructuras (Fig. 5c).

Debido a que el retiro de la membrana plasmática del espermatozoide no canceló la interacción de la Ph-Rh en el flagelo, puede considerarse la presencia de actina F en estructuras flagelares diferentes a la membrana plasmática. Este resultado permite a su vez considerar, que la actina F podría estar implicada en un segundo mecanismo de motilidad flagelar, quizá operando en unión con miosina. Para sustentar esta sugerencia, analizamos la presencia de la miosina en el espermatozoide total y específicamente en los flagelos (se describirá posteriormente).

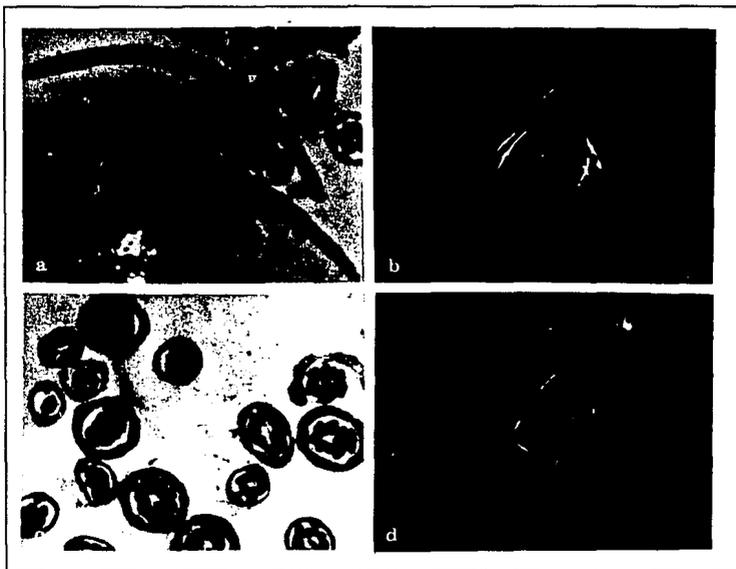


Fig. 5. Espermatozoides desmembrados y flagelos purificados, teñidos con Ph-Rh. a y c) Microscopía electrónica de b y d, respectivamente. b) y d) Fluorescencia en espermatozoides desmembrados por tratamiento con Brij 36-T y en d) flagelos purificados. 197X.

DETECCION DE ACTINA CON UN ANTICUERPO POLICLONAL.

Con el propósito de corroborar la presencia de la actina en las preparaciones desmembradas, la actina se detectó por inmunofluorescencia indirecta, utilizando un anticuerpo policlonal. Las preparaciones trabajadas fueron: espermatozoide total, desmembrado y flagelos purificados.

Los resultados mostraron la presencia de actina en las tres preparaciones (Fig. 6). En general la fluorescencia fue baja y el patrón de distribución de actina fue similar al encontrado con faloidina-rodamina, en cada una de ellas. En la muestra de espermatozoide total, el acrosoma y el flagelo se observaron fluorescentes; pero, la pieza media no se delimitó tan claramente (compare la Fig. 6b con la Fig. 1).

Los espermatozoides desmembrados con el detergente presentaron el flagelo teñido; pero no fueron aparentes ni el límite de la pieza media, ni el cono posacrosomal. El núcleo parece más bien estar teñido en su parte apical, quizá, correspondiendo a los residuos de acrosoma, visibles en el contraste de fase (Fig. 6b).

El flagelo purificado, teñido con el anticuerpo anti-actina, presentó fluorescencia a todo lo largo; aunque la pieza media tampoco fue tan aparente (Fig. 6f) a diferencia de lo observado con la tinción con Ph-Rh (Fig. 5d).

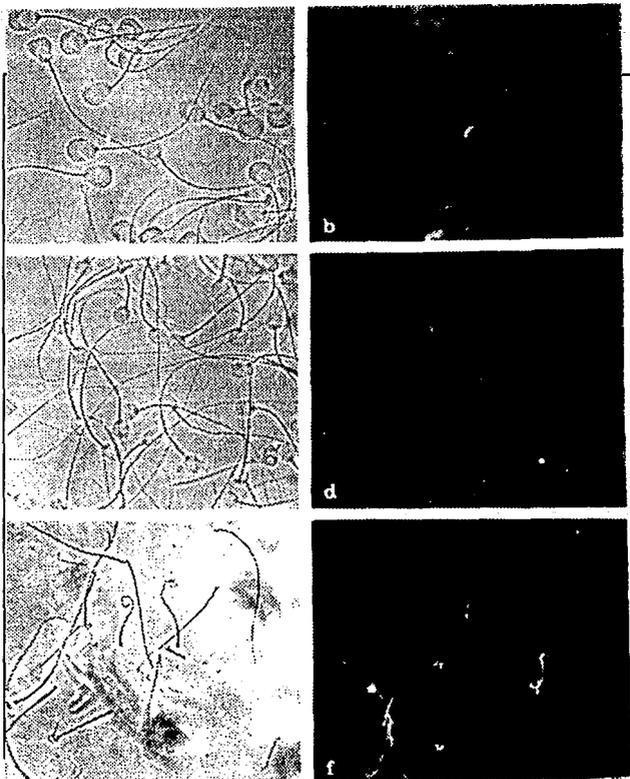


Fig. 6. Inmunolocalización de actina en espermatozoides lavados de conducto deferente, incubado con anticuerpo policlonal anti-actina. a, c y e) Contraste de fases: a) espermatozoides lavado; c) desmembrado con Brij 36T y e) flagelo purificado. b, d y f) Fluorescencia de a, c y e, respectivamente. 197x

DETECCION DE MIOSINA POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA EN ESPERMATOZOIDES COMPLETOS, EN DESMEMBRADO Y EN FLAGELOS PURIFICADOS.

La detección de miosina se realizó con un anticuerpo policlonal anti-miosina, en espermatozoides obtenidos de los conductos deferentes del cobayo: en los espermatozoides lavados, en los desmembrados por tratamiento con Brij 36 T; así mismo, en flagelos purificados por gradiente de sacarosa. En las tres preparaciones

el patrón de localización de miosina (Fig. 7), fue similar al patrón observado para actina utilizando el anticuerpo anti-actina, en muestras similares (Fig. 6).

El espermatozoide total presentó miosina en el acrosoma y en el flagelo (Fig 7a). En éste, la pieza media no se delimita muy claramente; sin embargo, en el flagelo purificado la pieza media está más teñida (Fig. 6c). En los espermatozoides desmembrados con detergente, el flagelo está teñido de manera homogénea; la pieza media no es más fluorescente que el resto del flagelo. La cabeza parece mostrar residuos de acrosoma y una fluorescencia residual (Fig. 6b).

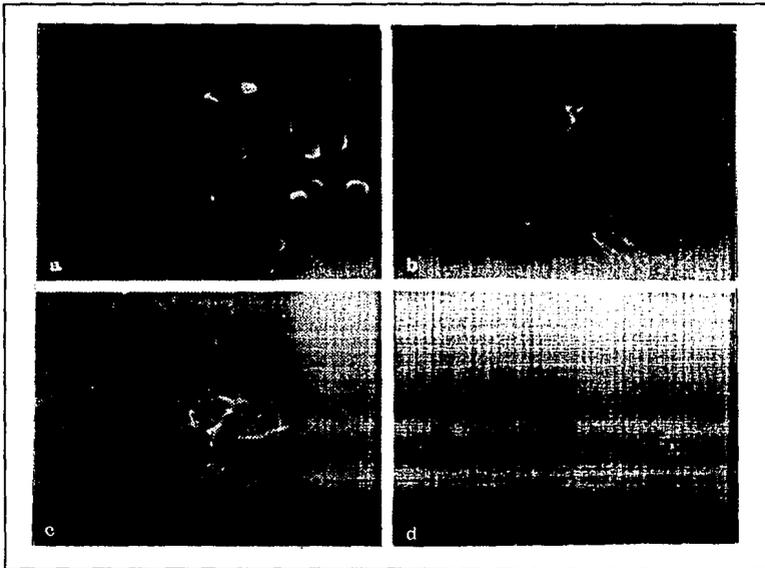


Fig.7. Detección de miosina en espermatozoides completos e incompletos, por inmunofluorescencia indirecta: a) espermatozoide lavado de conducto deferente, b) desmembrado, c) flagelo purificado y d) control negativo, en el que se omitió el primer anticuerpo ó se empleó una IgG inespecífica.197x.

DETECCION DE ACTINA POR ELECTROFORESIS Y WESTERN-BLOT EN PROTEINAS DE FLAGELO PURIFICADO DEL COBAYO.

La actina había sido identificada por inmunoblot en las proteínas del espermatozoide total purificado del cobayo (Moreno-Fierros y col., 1992). Hemos presentado evidencia, de que la actina está presente en los flagelos desmembrados. Para poder hablar de un papel potencial de la actina en el flagelo del espermatozoide del cobayo, consideramos importante corroborar a nivel bioquímico, la presencia de dicha proteína entre las proteínas del flagelo desmembrado.

El patrón electroforético los flagelos puros desmembrados reveló, la presencia de una proteína de 43 kD de peso molecular (Fig. 8a). En el patrón de proteínas transferido a papel de nitrocelulosa se observó reacción positiva en la banda de 43 kD, al hacer la inmunodetección utilizando un anticuerpo monoclonal anti-actina (elaborado por la URIAM). La misma banda fue detectada con un segundo anticuerpo monoclonal anti-actina (obtenido de Sigma), también fue revelada una banda tenue de aproximadamente 30 kD. Es importante remarcar, que durante la solubilización de los flagelos, purificados por gradiente de sacarosa, fue necesario el empleo de la mezcla de inhibidores de proteasas: PMSF, TLCK, PHMB, NEM, leupeptina, PABA, di-isopropilfluorofosfato y EDTA (véase Métodos), para evitar la degradación de la actina. En experimentos previos, en los que la extracción se realizó en presencia de sólo tres inhibidores (PMSF, TLCK y PHMB), la inmunodetección en blot reveló; además de una banda muy tenue de 43 kD, otras dos bandas de menor peso molecular (aprox. 20 kD y 30 kD), que al parecer son productos de degradación de actina; ya que fueron reconocidos por los anticuerpos monoclonales.

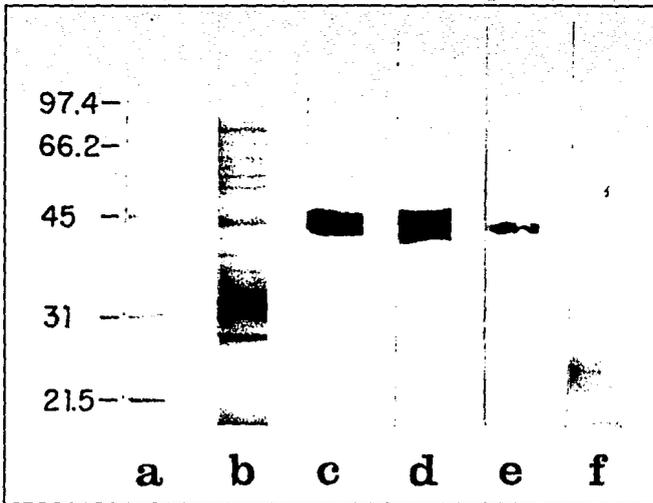


Fig. 8. Presencia de actina en el patrón electroforético de proteínas de flagelos puros desmembrados por electroforesis (PAGE-SDS, acrilamida al 10%) y Western-blot. a) Marcadores de bajo peso molecular (kD); b) patrón de proteínas flagelares, teñidas con azul de Coomassie; c) actina purificada de músculo de cobayo teñida con azul de Coomassie. Inmunolocalización: d) actina muscular de cobayo; e) y f) extracto de proteínas flagelares. En e) se utilizó un anticuerpo monoclonal elaborado por la URIAM en f) el anticuerpo monoclonal Sigma (Clona 1A4).

DETECCION DE MIOSINA POR ELECTROFORESIS Y WESTERN-BLOT EN EXTRACTOS DE ESPERMATOZOIDES PURIFICADOS DEL COBAYO.

No existe en la literatura, comunicación respecto a si la miosina está presente entre las proteínas del espermatozoide del cobayo. Nuestros resultados mostraron, que la célula espermática da reacción positiva al anticuerpo anti-miosina. Para corroborar decidimos identificarla a nivel bioquímico en las proteínas del espermatozoide purificado, por un gradiente de Percoll (Moreno-Fierros *et al.*, 1992). El patrón de bandeo de las proteínas del espermatozoide intacto purificado mostró la presencia de una proteína de alto peso molecular de aproximadamente 200 kD (Fig. 9).

Utilizando anticuerpo policlonal anti-miosina, en el patrón de proteínas espermáticas transferido a papel de nitrocelulosa, se observó reacción positiva en tres bandas. Una de peso molecular alto, de aproximadamente 200 kD, otra de aproximadamente 90-110 kD y la tercera muy fuertemente teñida, de 66 kD (Fig. 9d). Al igual que para la detección de actina, durante la solubilización de los espermatozoides, fue utilizada una mezcla de inhibidores de proteasas (véase Métodos), para evitar la degradación de la proteína, además se siguieron varios esquemas de solubilización, como el empleo de fijación de Carnoy (Conti *et al.*, 1988); a pesar de ello, aparentemente la degradación de la miosina no pudo ser evitada.

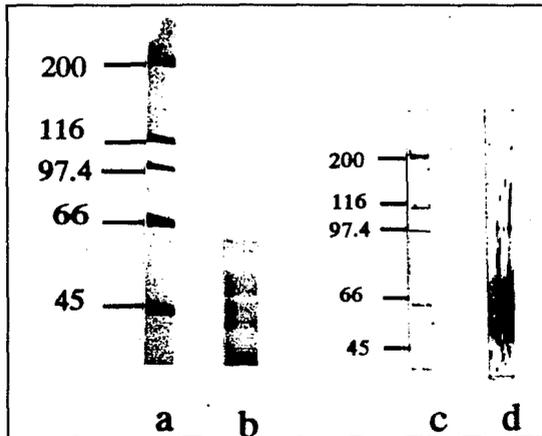


Fig.9. Presencia de miosina en espermatozoides purificados. a) y c) Marcadores de alto peso molecular (kD), b) patrón electroforético de proteínas, teñidas con azul de Coomassie, y d) inmunolocalización de miosina.

LOCALIZACION ULTRAESTRUCTURAL DE ACTINA Y MIOSINA EN ESPERMATOZOIDEOS DEL COBAYO.

Para tener una correlación entre estructura y función de las proteínas contráctiles actina y miosina, detectadas por métodos bioquímico, e inmunológico en el

espermatozoide, se procedió a su detección a nivel ultraestructural. El reconocimiento de las estructuras espermáticas específicas donde se localizan la actina y la miosina, se realizó en muestras de espermatozoides totales, en desmembrados y en flagelos purificados. Se procedió a trabajar las diferentes muestras en inclusión en resina LR-white y la posterior inmunolocalización de actina y miosina en cortes finos con anticuerpos mono y policlonales específicos y proteína A-oro coloidal, obteniéndose los siguientes resultados:

Actina en la cabeza espermática.- En la cabeza del espermatozoide intacto así como en la de los desmembrados se detectó la presencia de actina en el material nuclear y en la región perinuclear, probablemente la teca perinuclear. En la micrografía (Fig. 10a) se muestra la marca de oro en un corte longitudinal del núcleo de un espermatozoide, y en subestructuras flagelares, en éstas el anticuerpo monoclonal utilizado también reconoció actina, aunque no en la misma proporción, que la mostrada en el núcleo; como se observa por la poca reactividad en las fibras gruesas (Fig. 10a). En la Fig. 10b se muestra el reconocimiento de actina, por un anticuerpo policlonal en una cabeza de espermatozoide desmembrado. Al igual que con el anticuerpo monoclonal, la marca de oro se encontró en el material nuclear y en la región perinuclear. Por alguna razón, tal vez la metodología empleada (utilización de resina LR White), no se observaron acrosomas en las muestras de espermatozoides totales.

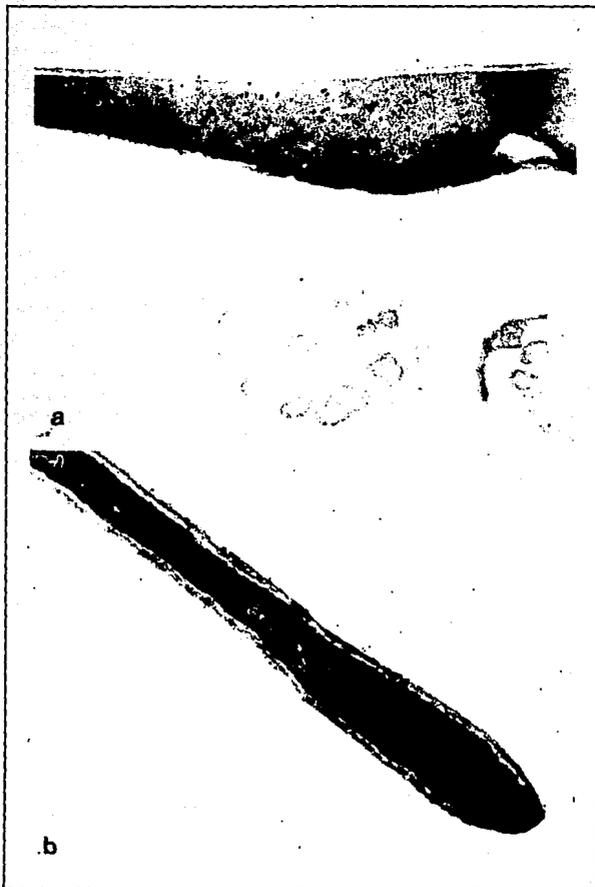


Fig. 10. Inmunolocalización ultraestructural de actina en espermatozoide del cobayo. En a) el anticuerpo utilizado fue un monoclonal y en b) un policlonal.

Actina en el flagelo.- En el flagelo se observó actina, la cual fue detectada con el anticuerpo policlonal y proteína A-oro (ver Métodos) la marca se presentó a nivel de las mitocondrias, fibras gruesas y capa fibrosa (Fig 11).

En un corte sagital de la pieza media, se observó marca en las mitocondrias, y en la capa fibrosa (Fig. 11a). Las partículas de oro coloidal, que se presentaron fuera del corte del flagelo, aparentemente no se tratan de marca inespecífica, ya que ellas se encuentran sobre residuos, posiblemente membrana plasmática, y mientras que en otras regiones, ambas están ausentes (compare Fig. 11a vs 11b). En un corte longitudinal del flagelo, la marca de oro en las fibras gruesas fue aparente mientras que en las costillas de la capa fibrosa fue escasa, (Fig. 11b). Sin embargo a nivel de un corte transversal de pieza principal, fue muy aparente la presencia de la marca de oro en la capa fibrosa, tanto en las costillas como en las columnas de esta estructura (Fig. 11c).

Se realizó además la detección de actina en los flagelos de muestras de espermatozoides desmembrados, por tratamiento con Brij 36T y en flagelos purificados carentes de membrana. Los resultados fueron similares a los mostrados para los espermatozoides totales.

Se realizaron dos tipos de controles negativos, uno en ausencia del primer anticuerpo y otro con IgG preadsorbida en una columna de sefarosa-actina. Ambos dieron resultados negativos. La detección de la actina con el anticuerpo policlonal en músculo de cobayo se muestra en la figura 11d.



Fig. 11. Localización ultraestructural de actina en el flagelo espermático. a) En mitocondrias; b) fibras gruesas; c) capa fibrosa y d) control positivo (músculo del cobayo).

Miosina en la cabeza espermática.- Los espermatozoides totales incluidos en la resina LR White, no mostraron acrosoma ni membrana plasmática aparente. La distribución de miosina en la cabeza fue similar a la detectada para actina siendo aparente en el material nuclear y en la región perinuclear (Fig. 12a). En el material perinuclear la marca de miosina fue más abundante en el borde externo. En la región posacrosomal casi no se observó marca de miosina (Fig. 12b). Los núcleos de las muestras de espermatozoide total y de los espermatozoides demembrados, presentaron una distribución similar de miosina.

Miosina en el flagelo.- El flagelo mostró una marca escasa de miosina. La proteína fue localizada en las mitocondrias, en las fibras gruesas y en la capa fibrosa; tanto en las costillas como en las columnas (Fig. 13 a-d).

Se realizaron dos tipos de controles negativos, uno en ausencia del primer anticuerpo y otro con una IgG inespecífica, ambos dieron resultado negativo. Un control positivo para miosina fue el músculo de cobayo incluido en la resina LR-white; la detección posterior de la proteína se hizo con el anticuerpo policlonal, el cual mostró baja afinidad como puede observarse, (Fig. 12c). Este resultado puede explicar la baja afinidad que en general, el anticuerpo también mostró por las estructuras espermáticas.



Fig. 12. Inmunodetección ultraestructural de miosina en la cabeza espermática, con anticuerpo policlonal. a) Espermatozoide total, b) desmembranado y c) control positivo (músculo de cobayo).

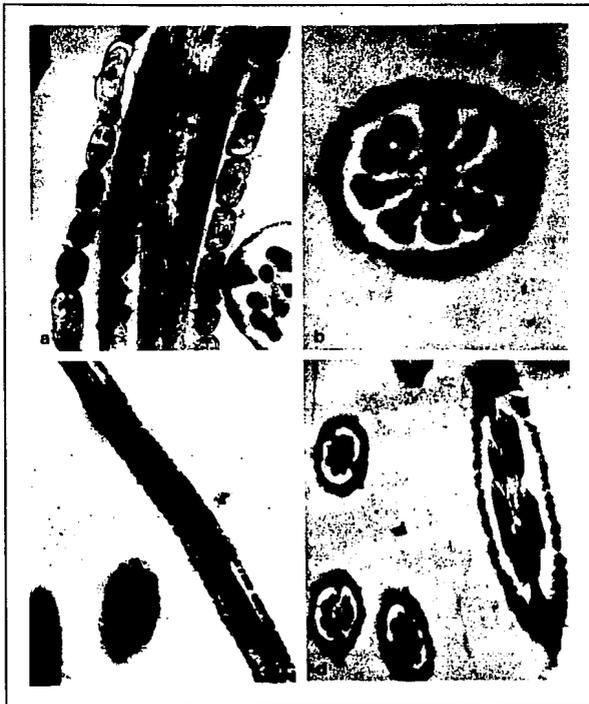


Fig. 13. Inmunolocalización ultraestructural de miosina en el flagelo del espermatozoide, con anticuerpo policlonal. a) En mitocondria; b) fibras gruesas; c) capa fibrosa y costillas y d) columnas segmentadas.

EFFECTO DE LA CITOCALASINA D SOBRE LA REACCION ACROSOMAL.

Las muestras tratadas con Cit-D (véase Métodos) presentaron un número mayor de espermatozoides con reacción acrosomal (valorada cualitativamente) así como una mayor pérdida de acrosomas, al ser comparadas con sus respectivos controles (Tabla 1). El tiempo de presentación de la RA no fue afectado por Cit-D, ya que ocurrió al mismo tiempo de incubación, en el control y en la muestra tratada.

En la Tabla 1, se presentan los datos de 3 experimentos donde el farmaco estuvo presente desde la extracción. En otra serie de 3 experimentos los espermatozoides se dejaron en NaCl-Cit-D 10 μ M (el control en NaCl) durante 120 min a 37°C (en el segundo lavado) y enseguida se incubaron en MCM con y sin Cit-D, respectivamente (Tabla 2). La presentación de la RA fue simultánea y temprana, ya que a los 40 min de incubación era alta. Los resultados en conjunto señalan, que la presencia de Cit-D resulta en un mayor número de espermatozoides con RA, independientemente del protocolo seguido.

Tabla 1. EFECTO DE LA CITOCALASINA-D SOBRE LA PERDIDA DE ACROSOMAS.

	Tiempo de incubación en MCM-PL (minutos)				
	18	30	45	60	90
	% de pérdida de acrosomas				
Control	45	14 \pm 0.0 (2)	47	12 \pm 0.0 (2)	16 \pm 0.0 (2)
Citocalasina-D*	64	35 \pm 5.6 (2)	71	51 \pm 19.8 (2)	62 \pm 21.2 (2)

La incubación se realizó a una concentración menor de 5×10^4 espermatozoides/ml. *La Cit D(10 μ M) estuvo presente desde la extracción de los espermatozoides hasta el tiempo de incubación en MCM, señalado en cada caso (número de experimentos)

Tabla 2. EFECTO DE CITOCALASINA-D EN ESPERMATOZOIDEOS INCUBADOS POR TIEMPO PROLONGADO EN NaCl Y SU EFECTO EN LA PERDIDA DE ACROSOMAS.

	Tiempo de incubación en MCM-PL (minutos)	
	10	45
	% de pérdida de acrosoma	
CONTROL	19	34 \pm 4 (3)
Cit-D*	51	71 \pm 5* (3)

Los espermatozoides fueron mantenidos en Cit-D (10 μ M) por 120 min; antes de ser transferidos al MCM-PL-Cit-D, para su incubación. El control fue manejado paralelamente en ausencia de cit-D * $p < 0.0005$ (número de experimentos).

Fue indispensable distinguir, si el mayor porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal o sin acrosoma era debido al efecto de la Cit-D, y no una consecuencia de la dilución de los gametos. Para ello, los espermatozoides se manejaron a dos concentraciones celulares diferentes en NaCl, la primera, a una concentración celular aproximadamente igual a la concentración de la muestra de espermatozoides en Cit-D (5×10^6 células/ml) y, la segunda, a menor concentración (3×10^6 células/ml). Los resultados de estos experimentos mostraron, que no hubo diferencia entre las dos diluciones en el comportamiento de los espermatozoide con respecto a la pérdida de acrosomas (datos no mostrados).

FLUORESCENCIA DADA POR FALOIDINA-RODAMINA EN ESPERMATOZOIDES INCUBADOS A BAJA CONCENTRACION EN PRESENCIA DE CITOCALASINA D.

El tratamiento de los espermatozoides a baja concentración durante 2 horas, tanto en NaCl con Cit-D como en NaCl solo, aparentemente disminuyó su capacidad de unión a Ph-Rh. La fluorescencia que se observó en ellos fue baja, comparada con la presentada por los espermatozoides que fueron de inmediato lavados y fijados. Sin embargo, debemos indicar, que las observaciones no fueron consistentes, ya que en varias laminillas preparadas de una misma muestra, la tinción fue variable de laminilla a laminilla y en ocasiones no se veía diferencia de fluorescencia con los espermatozoides lavados y fijados de inmediato (datos no mostrados).

Una observación consistente en estos experimentos fue, que los espermatozoides incubados a 37°C a baja concentración celular (con y sin Cit-D) perdían su motilidad, pero la readquirían al ser transferidos a un medio con sustratos (MCM-PL). La motilidad se presentaba en los primeros diez minutos de su transferencia. El número de

espermatozoides y el vigor de la motilidad readquirida variaban de muestra a muestra. Además en general, ambos parámetros eran mejores, si los espermatozoides permanecían inmóviles, por tiempos no muy prolongados, antes de la reactivación. Se tiñeron con Ph-Rh, laminillas de espermatozoides antes y después de su reactivación. Igual a lo anteriormente señalado, la fluorescencia presentada por los espermatozoides en diferentes laminillas, de una misma muestra, no fue consistente (datos no mostrados).

DISCUSION

La presencia de actina F ha sido descrita en la cabeza de las espermátidas del conejo (Welch y O'Ran, 1985), ardilla (Volg *et al.*, 1986), rata (Masri *et al.*, 1987) y cobayo (Halenda *et al.*, 1987). Así mismo se ha comunicado, que ocurre una despolimerización de la actina F a actina G durante las etapas tardías de la espermiogénesis, debido a la no detección de actina polimerizada en los espermatozoides testiculares, así como en los epididimales (Fouquet *et al.*, 1989,1990).

En los espermatozoides lavados del cobayo, obtenidos de los conductos deferentes, Moreno-Fierros (1989) mostró la presencia de actina F y comunicó además observar una menor fluorescencia, dada por faloidina-rodamina, la sonda específica para actina F; cuando los espermatozoides eran fijados recién obtenidos, de los conductos, sin lavado previo. Estas observaciones abrían la posibilidad para el estudio de las condiciones que llevaran, a la posible polimerización de la actina en los espermatozoides. Sin embargo, al mejorar la técnica de fijación-permeabilización en este trabajo, se aclaró, que los espermatozoides recién obtenidos mostraban el mismo grado de fluorescencia de actina F, que después de lavados.

De los resultados anteriores surgió la siguiente pregunta ¿Se polimeriza la actina en el espermatozoide del cobayo durante su maduración? Los resultados mostrados en la Fig. 2 indican, que el espermatozoide epididimal ya tiene actina polimerizada y que el patrón de distribución, de esta forma de actina, es igual a la mostrada por el espermatozoide no capacitado (lavado en NaCl) y en los capacitados por incubación en MCM. Nuestros resultados no concordaron con los comunicados por Halenda y col. (1987), quienes no

lograron detectar actina F en los espermatozoides epididimales.

La discrepancia entre nuestras observaciones y lo comunicado por Halenda y colaboradores, puede atribuirse al esquema diferente de tinción con la sonda para actina F. Ellos utilizan p-formaldehído, a una concentración final de 4%. Esta condición única aplicada a nuestro esquema, dió una menor fluorescencia, pero detectable. Halenda y col. permeabilizan y tiñen simultáneamente a las células y la concentración de faloidina-rodamina por ellos empleada, es un tercio de la utilizada por nosotros. Esta condición analizada en nuestro sistema, también nos dió menor fluorescencia. Al utilizar su sistema completo, nosotros como ellos, no obtuvimos fluorescencia. Aparentemente contamos con una técnica capaz de detectar actina F, en espermatozoides del cobayo, en los cuales aún la presencia de actina estaba en debate.

Los espermatozoides de todas las especies estudiadas de mamífero contienen actina (Clarke y Yanagimachi, 1978; Flaherty *et al.*, 1988), y la distribución de la proteína, en dicha célula, se considera ser específica de especie (Fouquet y Kann, 1992) y además, se sugiere que está presente como actina monomérica (G) (Virtanen *et al.*, 1984). En general a la actina monomérica no se le ha atribuido, en la célula, una función. Se conoce que es capaz de unirse a la DNAsa I e inhibir su actividad (Reisler, 1993), también se une a proteínas (proteínas que se unen a actina o ABPs), algunas de las cuales regulan la poza de actina G (Weeds y Maciver, 1993). Así, sólo a la actina polimérica se le reconocen funciones biológicas (Korn, 1987) y en células no musculares, existe un proceso continuo de polimerización-despolimerización, involucrado en una amplia variedad de fenómenos biológicos.

En este trabajo se corroboró la presencia de actina F en los espermatozoides del cobayo. En espermatozoides de algunas especies, ya se había observado la presencia de la actina en su forma polimérica. En la cabeza del espermatozoide de ratones de campo, en una estructura específica (Flaherty, 1983; Breed, y Leigh, 1992) y en los espermatozoides del cerdo (Saxena *et al.*, 1986; Peterson *et al.*, 1990). Aquí, aplicamos en otros espermatozoides de mamíferos, la metodología utilizada para el del cobayo. En la Fig. 3 se mostró la reacción positiva, que cada tipo de espermatozoides presentó con la faloidina-rodamina. Esto evidenció la existencia de un patrón homólogo, de localización de la actina F, en las ocho especies, entre sí y con los espermatozoides del cobayo. Estos resultados no concordaron con lo comunicado por un gran número de autores (Welch y O'Rand, 1985; Flaherty *et al.*, 1986; Halenda *et al.*, 1987), quienes no logran detectar actina F en los espermatozoides de un gran número de especies de mamíferos.

El patrón de actina F es consistente para el flagelo de las nueve especies. La actina se presentó a todo lo largo de la estructura y fué más evidente en la zona de unión entre flagelo y cabeza y en la pieza media. En las últimas ocho especies trabajadas, la actina F también fué observada en la cabeza espermática. La posibilidad de distinguir la localización de la actina F en las estructuras específicas, como en el acrosoma, es limitada por el tipo de metodología y por el tamaño mismo de la estructura.

La presencia y localización de actina F en un patrón común, en el flagelo de las nueve especies de espermatozoides aquí estudiadas, nos permiten sugerir una posible función de la actina en el flagelo y apoyar la posible participación de la actina en distintas funciones espermáticas (Escalier, 1984). Para establecer una posible función para la actina

y validar la propuesta en la investigación, sobre el reconocimiento de la localización de la actina en las estructuras espermáticas específicas, para poder inferir y posteriormente reconocer el papel, que la actina podría estar jugando en el flagelo, consideramos primordial el establecer cuales estructuras flagelares contenía a la proteína. Bajo estas consideraciones, seleccionamos al espermatozoide del cobayo, como el modelo para la investigación de la localización de la actina F, en las estructuras flagelares.

a) **Actina F.** La fluorescencia dada por Ph-Rh en los flagelos, desmembrados de manera mecánica (Fig. 5b) o por el tratamiento con el detergente no iónico (Fig. 5d), nos permite indicar la existencia de la actina en su forma polimerizada en estructuras flagelares, diferentes a la membrana plasmática. La presencia de actina F en esta estructura no fue investigada.

b) **Actina.** La presencia de actina en el flagelo desmembrado y purificado fué confirmada, por la reacción positiva con un anticuerpo policlonal anti-actina, de músculo de pollo. Aunque el anticuerpo reconoce tanto a la actina F como a la G, el patrón de fluorescencia que se observó (Fig. 6b, d y f) fue menos definido, que el obtenido con Ph-Rh (Fig. 5d y d) creemos, que lo anterior se deba al inmunógeno contra el que fué preparado el anticuerpo anti-actina (actina de ave) ya que cuando Moreno-Fierros (1989) empleó un anticuerpo contra la actina del músculo del cobayo, el patrón de reconocimiento fue igual al dado por Ph-Rh. Una evidencia contundente de la existencia de actina en el flagelo es la reacción positiva (a dos anticuerpos monoclonales) de una banda de 43 kD, de las proteínas provenientes de los flagelos puros desnudos (Fig. 8). Uno de los dos anticuerpos empleados, el elaborado por URIAM ha sido capaz de reconocer actina en las proteínas

del frijol (Pérez, 1992) y en las de amiba (comunicación personal).

La técnica de inmunodetección de actina posembido de la muestra en la resina LR-white, mostró la presencia de actina en varias estructuras del flagelo: en la mitocondria, en las fibras gruesas y en la capa fibrosa; tanto en las columnas como en las costillas de esta estructura (Fig. 11). Esto confirmó las observaciones relativas a una fluorescencia a lo largo del flagelo (dada por Ph-Rh o por inmunofluorescencia indirecta). Los resultados de la localización ultraestructural de actina no podemos correlacionarlos con las observaciones realizadas por otros autores, para la detección ultraestructural de actina en espermatozoides epididimales de varias especies: conejo, hombre, *Z. m. m.*, toro (Flaherty *et al.*, 1988), cerdo y topo (Lora-Lamia *et al.*, 1986) debido a que dichos autores no señalan la presencia de actina en el flagelo espermático, sólo describen y muestran su presencia en la cabeza del gameto. Aümuller (1988) comunicó la presencia de actina en el flagelo del espermatozoide: en las fibras gruesas del gameto testicular de rata. Fouquet y Kan, 1991, 1992) observaron actina en el espermatozoide epididimal del hámster, en la capa fibrosa y en las mitocondrias, y en el del ratón (Fouquet y Kan, 1992), en la capa fibrosa. Para el espermatozoide de conducto deferente del cobayo, no encontramos en la literatura alguna comunicación, a nivel ultraestructural, referida a la detección de actina.

En este trabajo, las evidencias mostradas parecen indicar con claridad la presencia de actina en estructuras flagelares específicas y probablemente se trata de actina F.

En el espermatozoide de los mamíferos tanto la presencia de actina, como la de la miosina ha sido investigada por otros autores (Campanella *et al.*, 1979; Tamblyn, 1981; Virtanen *et al.*, 1984). Lo anterior obedece a que un sistema contráctil actina-miosina fue

sugerido muy tempranamente (Burnasheva, 1958; Young y Nelson, 1968 y Philaja y Roth, 1973) y no confirmado hasta ahora. Los resultados que obtuvimos sobre la presencia de actina F en el flagelo del espermatozoide del cobayo, nos motivaron a la búsqueda de la presencia de la miosina, como un candidato a participar en conjunto con la actina en algunos aspectos de la motilidad flagelar.

La detección de la miosina, utilizando anticuerpos policlonales específicos, mostró tanto por inmunofluorescencia indirecta como a nivel ultraestructural, la presencia de miosina, en los mismos sitios en los que se localizó a la actina, por ambas técnicas. Estos resultados mostraron así, una colocalización de ambas proteínas. Lo anterior permite sugerir una función flagelar, que involucre a ambas proteínas la miosina y a la actina.

La citocalasina D forma parte de un grupo de metabolitos fúngicos permeables a la membrana celular, que al unirse al extremo barbado de microfilamentos, inhiben la asociación y disociación de monómeros de actina a dicho extremo (Cooper, 1987). Se ha demostrado que las citocalasinas inhiben la motilidad celular (Goddette, 1986).

El incremento en pérdida de acrosoma, observado por efecto de la citocalasina D Tablas 1 y 2, apoya la sugerencia de Moreno-Fierros *et al.*, (1992), sobre la posible participación de la actina en la reacción acrosomal. La proposición estaría apoyada por la presencia de actina F en la región acrosomal, confirmada en este trabajo. En la literatura se sugiere, la presencia de un citoesqueleto submembranal cuya función, se considera sea, la determinación de dominios de la superficie espermática (Eddy, 1988); así, la presencia de actina F como un componente de este citoesqueleto submembranal (membrana plasmática) es factible.

La estructuración de un citoesqueleto de actina en la región posacrosomal de los espermatozoides del cobayo, que sufrieron reacción acrosomal (Moreno-Fierros et, al 1992). Jamil (1984b) mostró la organización inducida por la proteína S-1 de la meromiosina pesada, de un complejo citoesquelético de actina, en la región posacrosomal de los espermatozoides del ser humano, tratados con Ca^{2+} y A23187. La localización del complejo, Jamil la refiere a la membrana plasmática. La presencia de actina F (detectada por Ph-Rh) en la región posacrosomal, de los espermatozoides desmembrados con Brij indica que se conforma un citoesqueleto de actina y que se localiza en el material perinuclear posacrosomal, aunque no puede excluirse la estructuración de microfilamentos en membrana plasmática.

Jamil (1984a) describió la participación de la actina nuclear en la descondensación de la cromatina. Esta propuesta no la hemos vista confirmada. Tampoco tenemos conocimiento de evidencias en la literatura, que presenten a la actina en la matriz del núcleo espermático. En los cortes del núcleo de los espermatozoides del cobayo incluidos en LR-white, la actina fue claramente reconocida por dos anticuerpos específicos (mono y policlonal). No nos parece que la actina presente sea residual, más bien propondríamos, que debe ser funcional y el hecho de haber observado también miosina en la matriz nuclear, apoyaría la suposición de que se trata de proteínas funcionales.

Los resultados de la localización de miosina en el espermatozoide del cobayo, utilizando un anticuerpo policlonal (Sigma), mostraron co-localización de la miosina con actina, tanto en el núcleo como en el flagelo. La co-localización de la miosina con actina ya había sido descrita en los espermatozoides del hombre por Campanella y col. (1979). La ocurrencia de ambas proteínas, en las mismas estructuras fue indicada también por el

análisis ultraestructural (Fig. 10 y 12). Con este método observamos la presencia abundante de miosina en el material perinuclear (Fig. 12a y b), a pesar de que en su control positivo, con tejido muscular (Fig. 12c), la reactividad no fue muy alta.

La presencia de miosina en el espermatozoide total purificado, fue indicada por la presencia de una banda (Mr) de alrededor de 220 kD y posteriormente confirmada en el inmunoblot por la reactividad positiva, al anticuerpo anti-miosina. Las bandas, de menor peso molecular, detectadas con el anticuerpo anti-miosina, podrían atribuirse a productos de degradación, de la miosina. Sin embargo, no se descarta la presencia de miosinas no convencionales (Mooseker, 1993, Titus,1993); en general, de menor peso que la miosina convencional.

Todavía menos conocida, que para la actina, es la función de la miosina en el espermatozoide. Para la miosina, que co-localiza con actina en la región subacrosomal del espermatozoide del hombre, Capanella y col. (1979) proponen, que mediante una actividad contráctil participen en la reacción acrosomal, o durante etapas subsecuentes de la fertilización. En el espermatozoide del cobayo, la presencia de ambas proteínas en el material perinuclear apoya el que ellas pudieran llevar a cabo las funciones propuestas por Campanella. Por su presencia en el flagelo, quisieramos proponer, que ambas proteínas podrían estar implicadas en un mecanismo adicional de motilidad flagelar, que llenaría los requerimientos de un segundo mecanismo, sugerido por Lindemann y col. (1988).

El sistema tubulina-dineina, que forma parte del axonema o aparato motor flagelar no está en discusión. La pregunta que ha sido planteada varias veces es, si este solo mecanismo puede llevar a cabo los diferentes patrones de movimiento, que presenta el

espermatozoide de los mamíferos; ejemplo, la motilidad hiperactivada. Las estructuras fibrosas voluminosas presentes en los flagelos de estos espermatozoides han sido postuladas más como impedimentos estéricos resilientes, que como elementos contráctiles, que coadyuven en la flexión pronunciada, que en ocasiones presenta el flagelo a nivel de la pieza media. Existe la propuesta de la no participación activa de las fibras gruesas y de la capa fibrosa en la motilidad flagelar, con base en los resultados negativos, de la presencia de proteínas contráctiles en el flagelo espermático (Lindemann y Kanous, 1989).

Lindemann y col. (1987, 1988) proponen la participación de un segundo mecanismo en el movimiento flagelar espermático. Ellos observan en el espermatozoide desmembrado de la rata, una curvatura pronunciada a nivel de la pieza media en respuesta a una concentración elevada de Ca^{2+} en el medio. La curvatura que ellos denominan como curvatura reversa, no es bloqueada por la presencia de vanadato, un inhibidor de la dineína. El sitio de curvatura máxima, la pieza media, es la región del flagelo en donde las fibras gruesas presentan su mayor diámetro.

En este trabajo se mostró la presencia, en la capa fibrosa y en las fibras gruesas del espermatozoide del cual se detectaron dos proteínas contráctiles: la actina, y la miosina; detectadas por métodos inmunológicos por microscopía de fluorescencia y electrónica así como de Western-blot y a nivel, bioquímico. Ambas proteínas son elementos adicionales muy importantes a considerar, en relación al movimiento espermático, por lo que se abre la posibilidad de la participación de ambas en el movimiento del flagelo, del espermatozoide de los mamíferos.

CONCLUSIONES

- Los espermatozoides del conducto epididimal, independientemente de su grado de maduración, ya tienen actina en estado polimerizado y su patrón de localización no difiere entre ellos, ni con el mostrado por el espermatozoide, obtenido del conducto deferente.
- En los espermatozoides de las nueve especies de mamífero estudiadas (ratón, rata, criceto, gerbo, conejo, cobayo, gato, perro y hombre) existe un patrón común de distribución de actina F, ya que todas la muestran a lo largo del flagelo, así como la presencia de actina F en la cabeza del espermatozoide de las nueve especies.
Existe actina en los flagelos desmembrados del espermatozoide del cobayo y al menos parte de esta actina se encuentra como actina F.
- Las mitocondrias, las fibras gruesas y la capa fibrosa contienen actina.
- La miosina está presente en el espermatozoide del cobayo.
- Existe una co-localización de la miosina con la actina en el flagelo desmembrado del espermatozoide del cobayo (mitocondrias, fibras gruesas y capa fibrosa).
- Las proteínas, actina y miosina están presentes en el material perinuclear.
- La matriz nuclear también tiene actina y miosina.
- La presencia de citocalasina D durante el manejo de los espermatozoides y su incubación en MCM produce una mayor proporción de espermatozoides con reacción acrosomal y pérdida de acrosomas.

LITERATURA CITADA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J.D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Capitulo 10 2a. ed. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (eds). New York & London; Garland Publishing. INP 550-605 pp.
- Amelar, R., D., Dubin, L., y Schoenfeld, C. (1980) : Sperm motility. *Fert. Steril.* 34(3): 197- 215.
- Aumüller, G., y Seitz, J. (1988): Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry* 89: 261-267.
- Baccetti, B., Bigliardi, E., Burrini, A.G., Gabbiani, G., Jockusch, B.M., y Leoncini (1984): Microfilaments and intermediate sized filaments in sperm tail. *J. Submicrosc. Cytol.* 16(1): 79-84.
- Breed, W.G., y Leigh, C.M. (1991): Distribution of filamentous actin in around spermatids and in spermatozoa of Australian Conilurine rodents. *Mol. Reprod. Dev.* :369-384.
- Burnasheva, S.A. (1959): Properties of spermiosin, a contractile protein in sperm cells. *Biokhimiia* 23: 558-563.
- Camatini, M., Anelli, G., y Casale, A. (1986a) Identification of actin in boar spermatids and spermatozoa by immunoelectron microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* 42:311-318.
- Camatini, M., Casale, A., Anelli, G., Cifarelli, M. (1986b): Immunoelectronmicroscopic localization of actin in ionophore treated boar sperm. *Cell Biol. Int. Rep.* 10:231-238.
- Camatini, M., Casale, A., Cifarelli, M. (1987): Immunocytochemical identification of actin in rabbit spermiogenesis and spermatozoa. *Eur. J. Cell Biol.* 45:274-281.
- Campanella, C., Gabiani, G., Baccetti, B., Burrini, A.G., y Pallini, V. (1979): Actin and myosin in the vertebrate acrosomal region. *J. Submicr. Cytol.* 11:53-71.
- Clarke, G.N., y Yanahinachi, R. (1978): Actin in mammalian sperm heads. *J. Exp. Zool.* 205:125-132.
- Clarke, G.N., Clarke, F.M., y Wilson, S. (1982): Actin in human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 26:319-327.
- Conti, C., J., Larcher, F., Chesner, J. (1988): Polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting of proteins extracted from paraffin embedded tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 36(5):547-550.
- Cooper, J., A., (1987): Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105:1473-1478.
- De Blass A.L. y Cherwinski, H.M. (1983): Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* 133:214-219.
- Eddy, E. M. (1988): The spermatozoon. In Knobil, E., y Nneil, J. (eds): *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press Lidid pp 27-67.
- Escaleier, D. (1984): The Cytoplasmic matrix of the human spermatozoon: cross-filaments link the various cells components. *Biol. Cell* 51:347-364.

- Etho, S., Matsui, H., Tokuda, M., Itano, T. y Nakamura, M. (1990): Purification and immunohistochemical study of actin in mitochondrial matrix. *Biochem. Int.* 20:599-606.
- Fawcett, D.W. (1975) : The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44:394-436.
- Flaherty, S.P., Breed, W. G., y Sarafis, V (1983) : Localization of actin in the sperm head of the plains mouse, *Pseudomys australis*. *J. Exp. Zool.* 225:497-500.
- Flaherty, S.P., Winfrey, V.P., y Olson, G.E. (1986): Localization of actin in mammalian spermatozoa: A comparison of eight species. *Anat. Rec.* 216:504-515.
- Flaherty, S.P. (1987): Further ultrastructural observations on the sperm head of the plains mouse, *Pseudomys australis* (rodentia: Muridae). *Anat. Rec.* 217:240-249.
- Flaherty, S.P., Winfrey, V.P. y Olson, G.E. (1988): Localization of actin in human, bull, rabbit and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anat. Rec.* 221: 599-610.
- Fouquet, J.P., Kan, M-L., y Dadoune, J-P. (1989): Immunogold distribution of actin during spermiogenesis in rat, hamster, monkey, and human. *Anat. Rec.* 223:599-610.
- Fouquet, J.P., Kan, M-L., y Dadoune, J-P. (1990): Immunogold distribution of actin in hamster spermatids and epididymal, capacitated and acrosome-reacted spermatozoa. *Tissue Cell* 22 (3):291-300.
- Fouquet, J-P., y Kann, M.-L. (1992): Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa: fact or artifact? *Microsc. Res. Tec.* 20:251-258.
- Friend, D.S. (1982): Plasma membrane diversity in a highly polarized cell. *J. Cell Biol.* 93:293-249.
- Goddette, D., W., y Frieden, C. (1986): Actin polymerization. *J. Biol. Chem.* 26(34): 15974-15980.
- Halenda, R.M., Primakoff, P., y Myles, D.G. (1987): Actin filaments, localized to the region of the developing acrosome during early stages, are lost during later stages of guinea pig spermiogenesis. *Biol. Rep.* 36:491-499.
- Jacobsen, B.S. (1983). Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton: An overview. *Tissue Cell* 15: 829-852.
- Jamil, K. (1984a): Descondensation of human spermatozoal chromatin by nuclear actin polymerization. *Arch. Androl.* 13:137-146.
- Jamil, K. (1984b): Plasma membrane cytoskeletal complex of the mammalian spermatozoa. *Arch. Androl.* 13: 177-194.
- Korn, E.D. (1982): Actin polymerization and its regulation by proteins from non muscle cells. *Phys. Rev.* 62: 672-737.
- Korn, E.D., Carrier, M-F., y Pantaloni, D. (1987): Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science* 238:638-644.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Lindemann, C.B., Goltz, J.S. y Kanous, K.S. (1987): Regulation of activation state and flagellar wave form in epididymal rat sperm: evidence for the involvement at both Ca^{2+} and cAMP. *Cell Motil. Cytoskel.* 8:324-332.
- Lindemann, Ch. B. y Goltz, J.S. (1988): Calcium regulation of flagellar curvature and swimming pattern in Triton X-100 extracted rat sperm mitochondrial movement. *Cell Motil. Cytoskel.* 10:420-431.
- Lindemann, C.B. y Kanous, K.S. (1989): Regulation of mammalian sperm motility. *Arch of Androl* 23:1-22.
- Lora-Lamia, C., Castellani-Ceresa, L. Andretta, F., Cotelli, F., y Brivio, M. (1986): Localization and Distribution of actin in mammalian sperm heads. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 96:12-21.
- Marchesi, V.T. (1985): Stabilizing infrastructure of cell membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 531-561.
- Masri, B.A., Russell, L.D., y Volg, W.A. (1987): Distribution of actin in spermatids and adjacent Sertoli cell regions of the rat. *Anat. Rec.* 218:20-26.
- Moreno Fierros L. (1989). Inmunolocalización de actina en espermatozoide de cuyo, durante su capacitación y reacción acrosomal. Tesis Maestría en Ciencias. CINVESTAV-IPN.
- Moreno-Fierros L., Hernández, E.O., Saigado, Z.O. y Mújica, A.(1992): F-actin in guinea-pig spermatozoa: Its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* 33:172-181.
- Mooseeker, M. (1993): A multitude of myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3(4):245-248.
- Mújica, M.A. (1979). Estudios sobre el espermatozoide humano eyaculado. Localización y síntesis de sus proteínas. Tesis Doctorado en Ciencias. CINVESTAV-IPN.
- Nelson, L. (1966): Contractile proteins of marine invertebrate spermatozoa. *Biol. Bull* 130:378-368.
- Ochs, D.y Wolf, D.P. (1985): Actin in ejaculated human sperm cells. *Biol. Rep.* 33:1223-1226.
- Oko, R (1988): Comparative analysis of proteins from the fibrous sheath and outer dense fibers of rat spermatozoa. *Biol. Rep.* 39:169-182.
- Olson, G.E., Winfrey, V.P., y Flaherty, S.P.(1987): Cytoskeletal assemblies of mammalian spermatozoa. *Ann. NY Acad. Sci.* 513 Cell Biology of the testis and epididymid 222-246.
- Pérez, R., H. E. (1992). Purificación de actina vegetal de nódulos simbióticos de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis Doctorado en ciencias. CINVESTAV-IPN.
- Peterson, R.N., y Russell, L.D. (1985): The mammalian spermatozoon : A model for the study of regional specificity in plasma membrane organization and function. *Tissue Cell* 17:769-791.
- Peterson, R.N., Bozzola, J.J., Hunt, W.P., y Darabi, A.(1990): Characterization of membrane-associated actin in boar spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 253:202-214.
- Pihlaja, D., y Roth, L. E. (1973): Bovine sperm fractionation. II morphology and chemical analysis of tail segments. *J. Ultrastruct. Res.* 44:293-309.
- Reisler, R. (1993): Actin molecular structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:41-47.

- Rogers, B.J. y Yanahimachi (1985): Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose: the possible importance of piruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 13:568-575.
- Saxena, N., Peterson, R.N., Saxena, N.K. y Russell, L.D. (1986): Microfilaments appear in boar spermatozoa during capacitation in vitro. *J. Exp. Zool.* 239: 423-427.
- Segal, S. (1985): Sexual differentiation in vertebrates. En: *The origen and evolution of sex, MBL Lectures in Biology*, vol. 7 Edit. H.O.Halvorson y A. Monroy, pp:263-270. Alan R. Liss, New York.
- Talbot, P., y Kleve, M.G. (1978): Hamster sperm cross react with antiactin. *J. Exp. Zool.* 204:131-136.
- Tamblin, M.T. (1981): Evidence for non muscle myosin in bovine ejaculated spermatozoa. *Gamete Res.* 4:499-506.
- Tilney, L.G., Hatano, S., Ishikawa, H., y Mooseller, M.S.(1973) : The polymermization of actin: its role in the generation of the process acrosomal of certain echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 59: 109-126.
- Tilney, L. G. (1976a): The polymerization of actin II. How nonfilamentous actin becomes nonrandomly distributed in sperm: evidence for the asociation on this actin with embranes. *J. Cell Biol.* 69:51-72.
- Tilney, L. G.(1976b): The polymerization III aggregates of nonfilamentous actin and its associated proteins: a storage from of actin. *J. Cell Biol.* 69:73-89.
- Tilney, L. G., Fukui, Y., y DeRosier, D.J.: (1987) Movement of the actin filament bundle in Mytilus sperm: a new mechanins is proposed. *J. Cell Biol.* 104: 981-993.
- Titus, M.(1993): Myosins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 77-81.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:4350-4354.
- Virtanen, I., Badley, R.A., Passivuo, R., y Lehto, V.P. (1984): Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J. Cell Biol.* 99:1083-1091.
- Virtanen, I, Passivuo, R., y Lehto, V.P. (1984): Cytoskeletal organization of human spermatozoon. *J. Submicrosc. Cytol.* 16(1):137.
- Volg, W.A. y Lew, G.J. (1986): Distribution of actin in Sertoli cell estoplasmic specializations and associated spermatids in the ground squirrel testis. *Anat. Rec.* 215: 331-341.
- Volg, W.A. (1989): Distribution and function of organized concentrations of actin filaments in mammalian spermatogenic cells and Sertoli cells. *Int. Rev. Cytol.* 119:1-56.
- Welch, E.J., y O'Ry, M.G. (1985): Identification ans distribution of actin in spermatogenic cell and spermatozoa of the rabbit. *Dev. Biol.* 109:411-417.
- Weeds, Alan, y Maciver, S. (1993): F-actin capping proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:63-69.
- Yanahimachi, R., y Noda, Y., D. (1970): Ultrastructural changes in the hamster sperm head durig fertilization. *J. Ultraestruc. Res.* 31:465-485.

Young, L.G., Nelson, L. (1968): Viscometric analysis of the contractile proteins of mammalian spermatozoa. Exp. Cell Res. 51:34-44.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**