



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

“DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMALES, FRESCOS Y
DESCONGELADOS DE BOVINO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
YAZMÍN ELIZABETH FELIPE PÉREZ

TUTOR

DR. JAVIER VALENCIA MÉNDEZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

DR. ENRIQUE OTHÓN HERNÁNDEZ GONZÁLEZ

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La realización de este trabajo se logró gracias al apoyo del

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

a través de la beca de estudios, número de registro 189887.

Se contó con el apoyo de los proyectos

CONACYT: 79921, EOHG

y

UNAM: PAPIIT IN-206506 MLJM.

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Othón Hernández González, por brindarme su apoyo incondicional en todo momento, por permitirme desarrollar este proyecto en su laboratorio, por proveerme de todos los reactivos requeridos para los experimentos realizados, por darme la oportunidad de aprender bajo su dirección, pero sobre todo por haber depositado en mí toda su confianza y por enseñarme a confiar en mi misma para emprender nuevos proyectos.

A la Dra. Ana Lilia Roa, por su valioso apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por sus consejos y por la amistad que me ha brindado.

Al Dr. Javier Valencia Méndez, por toda su valiosa enseñanza y por ayudarme a resolver los problemas a los que nos hemos enfrentado durante la realización de este proyecto, gracias por la confianza que depositó en mí.

A la Dra. Lourdes Juárez, por darme la oportunidad de continuar con este proyecto y por haberle insistido al Dr. Enrique para que formara parte de mi comité tutorial.

A la Unidad de Microscopía Electrónica del CINVESTAV por el apoyo brindado durante todo el proceso referente a la microscopía electrónica, muy especialmente a la Dra. Sirenia González y a la Dra. Lulú Rojas

A todo el personal que labora en el área de bovinos del rastro municipal de Mexicaltzingo, Estado de México, por haberme facilitado del material biológico para la realización de este trabajo, gracias por haberme atendido siempre amable y respetuosamente.

Al Dr. Gabino Nava Bernal y a la Dra. Ana María Pedraza Fuentes, por el apoyo incondicional que siempre he recibido de ustedes, por darme las facilidades que he requerido para la elaboración de este trabajo, por su colaboración en la revisión y edición de la publicación en inglés, pero sobre todo por el cariño y la valiosa amistad que me han brindado.

Al Dr. José Alfredo Medrano, por compartirme sus conocimientos en el campo de la criobiología y por su grata amistad.

A todos los integrantes de mi jurado, por el tiempo dedicado a la revisión esta tesis y por todos los valiosos comentarios emitidos con el fin de enriquecer el presente trabajo:

Dr. Javier Valencia Méndez

Dra. Maria Elena Trujillo Ortega

Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro

Dr. José Manuel Hernández Hernández

Dr. Joel Hernández Cerón

A mis amigos, Cipatli y Oscar, por su apoyo y su invaluable amistad.

Al personal de la biblioteca del CINVESTAV, y a l personal de servicios escolares de la FMVZ, UNAM, por la atención tan amable que siempre me han dado, especialmente a Ara, Elsa, Mercedes y al Dr. Librado.

Dedicatorias

A mi esposo, Gerardo
mil gracias por haberme impulsado
para seguir superándonos,
gracias por contagiarme tu fortaleza
y tus ganas de aferrarte a la vida,
muchas gracias por cuidarte
para mí y para nuestros hijos,
¡nunca te rindas amor de mi vida!

A mis hijos

Andrés, Isabella y Laura

gracias por darme todo su amor

y su apoyo incondicional, sobre todo por la enseñanza

tan llena de ternura que me dan cada día, gracias por dejarme ir, y
perdón por todos esos momentos en los que les hice falta.

A mi Mamá y a mi Papá

por su ejemplo de lucha ante la adversidad,

por inculcarme el deseo de superación,

y por seguir al pendiente de mí, gracias a ustedes soy lo que soy.

A mis padrinos Doña Chayo y Don Beny

por todo su apoyo y el cariño de siempre,

gracias por todas sus enseñanzas.

A mi hermano Víctor, adelante, decídete a
alcanzar tus metas

y a la memoria de mi hermanito Irvin.

Señor mío, gracias por la fortaleza que me das
en todos y en cada uno de mis días para lograr
dar otro paso importante de mi vida, gracias señor
por todas las bendiciones recibidas.

“Entre más aprendo,... más dudas tengo”.

INDICE

	Página
Indice de figuras	ii
Indice de tablas	iii
Lista de abreviaturas	iv
Resumen	I
Abstract	III
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	5
Procesos fisiológicos del espermatozoide	6
Citoesqueleto espermático	18
Criopreservación	35
III. Justificación	41
IV. Hipótesis	42
V. Objetivos	43
VI. Material y Métodos	44
VII. Resultados	58
VIII. Discusión	85
IX. Conclusiones	98
X. Literatura Citada	100
Glosario	108

Indice de figuras

Figura	Título	Página
1	Testículo mostrándo las diferentes regiones del epidídimo	8
2	Espermatozoides inmaduros presentando la gota citoplasmática	9
3	Esquema de la capacitación espermática	13
4	Esquema de la reacción acrosomal	14
5	Descondensación espermática	17
6	Estructura del flagelo espermático	22
7	Estructura del axonema	23
8	Modelo de nucleación de actina	26
9	Interacción del citoesqueleto con la membrana plasmática	34
10	Esquema de los daños espermáticos por efecto de las diferentes tasas de enfriamiento durante la criopreservación	37
11	Daños en la TP por la criopreservación	39
12	Metodología	44
13	Epidídimo del bovino	47
14	Ausencia de la STP	61
15	Etapas de desarrollo temprano de la STP	63
16	Etapas de desarrollo intermedio de la STP	64
17	Etapas de desarrollo avanzado de la STP	65
18	STP completa	66
19	Gráfica de frecuencias relativas del desarrollo de la STP	69

20	Localización de actina F en las diferentes regiones del epidídimo	71
21	Cabezas espermáticas antes y después del proceso de extracción de proteínas con un kit comercial de extracción de proteínas citoesqueléticas	73
22	Cabezas espermáticas antes y después del proceso de extracción de proteínas empleando soluciones con DTT 25 mM	75
23	Patrón electroforético de las proteínas extraídas de espermatozoides frescos y descongelados	77
24	Inmunodetección de actina en espermatozoides frescos y descongelados de bovino mediante western blot	78
25	Inmunodetección de distrobrevina mediante western blot	80
26	Localización de actina F mediante fluorescencia con faloidina-TRITC	82
27	Localización de distrobrevina mediante inmunofluorescencia indirecta	84

Indice de Tablas

Tabla	Título	Página
1	Clasificación y conteo de los espermatozoides extraídos de las diferentes regiones del epidídimo	59
2	Proporciones espermáticas obtenidas de las diferentes regiones del epidídimo del bovino	67

Lista de Abreviaturas

μl	Microlitros
ABP	Actin binding proteins, proteínas asociadas a actina
actina F	Actina polimerizada o filamentosa
actina G	Actina monomérica o globular
ARP	Proteínas relacionadas con actina
BSA	Albúmina sérica de bovino
Ca^{2+}	Calcio
CO_2	Dióxido de carbono
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Treacetato etilen diamino
h	Horas
IA	Inseminación artificial
KCl	Cloruro de potasio
KH_2PO_4	Fosfato de potasio dibásico
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
MP	Membrana plasmática
NaCl	Cloruro de sodio
NaH_2PO_4	Fosfato de sodio dibásico
PAGE	Geles de poliacrilamida
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
Ph-TRITC	Faloidina rodaminada
RA	Reacción acrosomal
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
SSF	Solución salina fisiológica
STP	Sub estructura de la teca perinuclear
TP	Teca perinuclear
Tris	Hidroximetil amino metano
WASP	Proteína del Síndrome de Wiskott Aldrich

RESUMEN

El citoesqueleto espermático de actina desempeña diferentes funciones, no obstante, la forma en que se desarrolla durante su tránsito por el epidídimo no se ha identificado en los espermatozoides del bovino. La criopreservación espermática provoca alteraciones celulares importantes. Por lo que los objetivos planteados fueron: estudiar mediante microscopía electrónica el desarrollo del citoesqueleto de la cabeza espermática, observando la subestructura de la teca perinuclear (STP) durante su tránsito por el epidídimo, relacionar los cambios con la presencia de actina filamentosa (F) (empleando faloidina rodaminada) y estudiar los cambios provocados por la criopreservación en el citoesqueleto de actina y en algunas las proteínas asociadas a actina mediante inmunofluorescencia indirecta y western blot. Se extrajeron espermatozoides epididimales de bovinos del rastro. En el 88% de los espermatozoides de la cabeza la STP se observó ausente, en diferentes etapas de desarrollo en el 66% de los del cuerpo y completamente formada en el 33% de los de la segunda porción de la cola ($P=0.01$). La actina F se observó en la región ecuatorial y postacrosomal de la cabeza, en la pieza media y principal del flagelo, la fluorescencia fue más intensa en los del cuerpo. En el western blot, en los espermatozoides descongelados la actina se observó más intensa en los extractos de membrana y citoesqueleto, en contraste la distrobrevina (proteína que se asocia a actina) apenas fue visible en el extracto citoesquelético. Ambas proteínas se localizaron en la región ecuatorial de la cabeza y en el flagelo de los espermatozoides frescos, pero se encontraron alteradas en los descongelados. No fue posible detectar WASP, ARP 2 y ARP 3, proteínas asociadas a actina. Los resultados sugieren que actina interviene dinámicamente en el desarrollo del citoesqueleto durante la maduración epididimal y que la criopreservación altera al citoesqueleto espermático, reflejándose en

una redistribución de actina y distrobrevina en el espermatozoide del bovino.

Palabras clave: maduración epididimal, criopreservación, citoesqueleto espermático, subestructura de la teca perinuclear, actina, distrobrevina.

ABSTRACT

The actin sperm cytoskeleton plays many crucial functions, nonetheless, the way the actin cytoskeleton develops through the epididymis has not yet, been identified in the bovine sperm. Semen cryopreservation causes important cellular alterations. The objectives set were the following: to study the cytoskeleton development on the sperm head observing, by electron microscopy, the perinuclear theca substructure (PTS) during epididymal transit, relate those changes with the presence of filamentous actin (F) (stained with phalloidine-TRITC) and to study the changes caused by cryopreservation on the actin cytoskeleton and some of the actin binding proteins, by indirect-immuno-fluorescence and western blotting. Epididymal sperm were obtained from bulls at slaughter houses. PTS was absent in 88% of caput sperm, in different developing stages on 66% of the corpus, and fully developed in 33% of the second portion of the cauda ($P=0.01$). F-actin was observed on the equatorial and postacrosomal region of the head, in the mid and principal piece of flagellum, sperm from the corpus showed the most intense fluorescence. By western blotting, actin was intensively observed on the membrane and cytoskeleton extracts of frozen-thawed sperm, in contrast, distrobrevin (protein associated to actin) was hardly visible on the cytoskeleton extracts. Both proteins were localized on the head equatorial region and on the flagellum of fresh sperm, but were altered on the thawed ones. It was not possible to detect WASP, ARP 2 and ARP 3, actin binding proteins. The results suggest that actin dynamically participates in the cytoskeleton development during epididymal maturation and that cryopreservation alters the sperm cytoskeleton, which was reflected by a re-distribution of actin and distrobrevin on the bovine sperm.

Key words: epididymal maturation, cryopreservation, sperm cytoskeleton, perinuclear theca substructure, actin, distrobrevin.

I. INTRODUCCION

Existe la necesidad de buscar la implementación de nuevas tecnologías y prácticas de manejo que permitan mejorar en cierta medida la ya deteriorada fertilidad en el ganado lechero, que en la actualidad se encuentra alrededor del 33%. Desde hace décadas, el ganado bovino, se emplean técnicas de reproducción asistida como el uso de semen congelado-descongelado para su aplicación en la inseminación artificial (IA), y actualmente es una práctica habitual que ha sido adoptada de manera rutinaria en la mayoría de explotaciones lecheras a nivel mundial (Cruz *et al.*, 2006; Muino *et al.*, 2008).

Los daños ocasionados a las células espermáticas que principalmente se han estudiado son a nivel de las membranas (Watson, 1995; Noiles *et al.*, 1997; Neild *et al.*, 2003; Flores, 2005), pero poco se ha estudiado el daño espermático ocasionado por el proceso de criopreservación a nivel de otras estructuras celulares como el citoesqueleto. Además hasta la fecha no existen reportes de la formación del citoesqueleto durante la maduración epididimal en el bovino.

Son varios los cambios que ocurren durante el tránsito epididimal para lograr que los espermatozoides maduren y adquieran la capacidad fertilizante (Hafez, 1987). Sin embargo, en los espermatozoides de bovino no se ha estudiado el desarrollo del citoesqueleto durante su tránsito por el epidídimo.

El citoesqueleto es una estructura tridimensional que forma una parte importante en todas las células eucariotas, entre otras cosas proporciona un avanzado nivel de organización celular. Está compuesto de una basta

red de filamentos proteicos que determinan la forma y la organización de organelos dentro del citoplasma, (Alberts *et al.*, 2002).

Se ha observado que después de someter a las células al proceso de congelación y descongelación, el citoesqueleto sufre alteraciones estructurales (Petrunkina, 2004). Algunos autores mencionan que debido a que sus proteínas son termosensibles, sufren un proceso de despolimerización y tales cambios en su arquitectura traen como consecuencia la alteración en su funcionalidad (Noiles, 1997; Storey *et al.*, 1998). En los espermatozoides de bovino se han descrito daños similares, después de ser descongelados. Entre los daños observados se señalan alteraciones a nivel de la región post acrosomal de la teca perinuclear (TP), específicamente en la subestructura de la teca perinuclear (STP) (Martínez, 2003; 2006).

El citoesqueleto espermático se compone de dos partes, la primera que rodea la cabeza y la segunda que forma el flagelo. La teca perinuclear es la principal estructura citoesquelética de la cabeza espermática, esta cápsula fibrosa se encuentra rodeando casi la totalidad del núcleo, excepto en el sitio de inserción de la cabeza con el flagelo (Courstens *et al.*, 1976), a manera de un casco. Entre algunas de las funciones atribuibles a la teca se encuentran: el brindar forma y protección a la célula, servir como cemento para mantener unidas a las membranas plasmática y acrosomal interna con la envoltura nuclear, conservar los dominios de membrana y proteger al núcleo de agentes descondensantes (Sutovsky *et al.*, 1997, 2000, 2003; Juárez-Mosqueda, 2000; Mújica *et al.*, 2003). Además, participa en los procesos de fusión con el óvulo y la descondensación espermática una vez que ocurre la fertilización (Mújica *et al.*, 2003).

Por otra parte el flagelo tiene una estructura central, el axonema, compuesto por 9 dobletes de microtúbulos, los cuales se encuentran

alineados en un círculo rodeando a un par central. Se encuentran unidos por nexina y proteínas radiales, y se deslizan por medio de dineínas usando ATP (Wayne *et al.*, 2007).

En la teca perinuclear de varios mamíferos, como el toro, cerdo, cobayo y humano, la actina es una de las proteínas más abundantes, se ha localizado tanto a nivel del segmento ecuatorial como en la región post acrosomal en los espermatozoides del cobayo, bovino, cerdo y humano (Castellani y Ceresa, 1992, 1993; Sánchez-Gutiérrez *et al.*, 2002; Mújica, 2003).

La actina es una proteína citoesqueléticas altamente conservada, que se encuentra presente en altas concentraciones en casi todas las células eucariotas. Se asocia a otras proteínas llamadas actin binding proteins (ABP) para polimerizar y forma microfilamentos para cumplir con varias de las funciones *que se le han atribuido* (Alberts *et al.*, 2002). Entre las ABP que forman complejos con actina se encuentran las proteínas relacionadas con procesos de polimerización de actina como las WASP, ARP2, ARP3 y la proteína distrobrevina, la cual participa anclando las proteínas del citoesqueleto con la matriz extracelular, además de muchas otras (Higgs y Pollard, 1999; Becker *et al.*, 2007; Ceccarini *et al.*, 2007).

La actina desempeña un papel muy importante en los espermatozoides, pues se le ha relacionado tanto en la motilidad espermática como en los diferentes procesos fisiológicos que debe experimentar el espermatozoide para lograr la fertilización.

Los reportes de la existencia de actina a nivel del segmento ecuatorial (Camatini *et al.*, 1986; Castellani y Ceresa, 1992, 1993; Sánchez-Gutiérrez, *et al.*, 2002), además de los daños observados en la TP en semen de bovino descongelado (Martínez, 2004), aunado a los resultados recientes Felipe-

Pérez (2006), quien reporta la despolimerización o fragmentación de las proteínas de la TP ocasionadas por el proceso de descongelación, sugieren que la actina y las proteínas asociadas a actina se podrían dañar por el proceso de congelación y descongelación.

Pese a los esfuerzos científicos realizados por mantener altos índices de viabilidad en el semen de bovino descongelado, hasta nuestros días solamente menos del 50% de la población espermática es viable al momento de la descongelación, y de estos solamente aproximadamente el 33% son aptos para la fecundación (Felipe-Pérez *et al.*, 2009). Lo anterior se ha comprobado mediante estudios de triple tinción en semen fresco y descongelado, cuyos patrones indican el número de espermatozoides vivos y muertos, ya sea con o sin acrosoma. Son los vivos con acrosoma los únicos espermatozoides aptos para la fertilización (Felipe-Pérez, 2006).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el papel que desempeñan en el citoesqueleto del espermatozoide bovino las proteínas actina y algunas de las proteínas asociadas a actina, entre ellas distrobrevina, durante la maduración epididimal e investigar si existen cambios en la distribución de actina y distrobrevina en el citoesqueleto espermático provocadas por el proceso de congelación-descongelación.

II. REVISION DE LITERATURA

Varias investigaciones a nivel internacional coinciden en que la baja fertilidad del ganado vacuno en Latinoamérica responde principalmente a los siguientes factores: edad tardía de la incorporación de las novillas a la reproducción, la cual a su vez es motivada por no cumplir con los requerimientos de manejo y alimentación de los animales durante el desarrollo y que trae por consecuencia que lleguen a una edad tardía al primer parto, ocasionando con ello la pérdida de un ciclo reproductivo, un periodo prolongado de días abiertos o parto-gestación (Cruz, *et al.*, 2008).

Otro factor importante es el relacionado con la alta producción de leche, cuya producción media es de 1,118 Kg. de leche/vaca en América Latina y el Caribe (Cruz *et al.*, 2008). Aunque la elevada producción láctea por sí sola no afecta la fertilidad, se encuentra en la mayoría de los casos, asociada a malas prácticas de manejo nutricional, puesto que después del parto, las vacas se encuentran en un balance energético negativo, es decir que la suma de energía necesaria para su mantenimiento y la producción láctea es mayor que la energía consumida, lo cual implica que deban utilizar sus reservas corporales para tratar de mantener la producción. Sin embargo, las dietas administradas a las vacas altas productoras, al ser de un elevado contenido proteico (entre el 17 y 19%), incrementan la concentración de urea y amoníaco tanto en la sangre como en los fluidos uterinos, afectando la viabilidad de los espermatozoides, los óvulos y al mismo embrión (Hernández, 2007).

Existen otros factores medioambientales como el estrés calórico y la producción excesiva de radicales libres que afectan a los gametos y a los embriones, contribuyendo también a la baja fertilidad. Como una alternativa ante ésta problemática, además de realizar cambios en el manejo zootécnico del hato, se ha propuesto incrementar el número de

gestaciones mejorando la detección de estros para implementar eficientemente los programas de IA (Hernández, 2007).

Es importante mencionar que entre las especies de mamíferos cuyo semen se emplea para la IA, el bovino es la que ha mostrado una mayor resistencia al proceso de criopreservación. No obstante, para mantener índices de fertilidad similares a los obtenidos mediante la monta natural, se requiere incrementar las dosis inseminantes de espermatozoides descongelados para realizar la IA, debido a que el proceso de congelación-descongelación ocasiona un drástico decremento en la viabilidad espermática, además de alterar los mecanismos necesarios para que los espermatozoides interactúen con el óvulo (Rodríguez-Martínez, 2000; Watson, 2000).

Procesos fisiológicos del espermatozoide Los espermatozoides que salen de los testículos son incapaces de realizar la fertilización, para ello requieren ser habilitados a través de diferentes procesos, como son la maduración epididimal, que ocurre mientras los gametos se encuentran dentro del aparato genital masculino, además de la capacitación y la reacción acrosomal, los cuales ocurren naturalmente dentro del aparato genital de la hembra (Moreno-Fierros, *et al.*, 1992; Galloway, 1994; Howes, *et al.*, 2001). Posteriormente se da el reconocimiento celular entre gametos de la misma especie para permitir la fusión de membranas y por último la formación de los pronúcleos, momento en el cual se confirma que ha ocurrido una fertilización exitosa (Senger, 1999; Alberts, *et al.*, 2002).

Maduración epididimal

Una vez que los espermatozoides salen del testículo se almacenan en el epidídimo dentro de sinuosos túbulos, los conductos eferentes, los cuales convergen en un solo conducto cuya función es agrupar a los

espermatozoides recién formados y enviarlos junto con el fluido tubular hacia el epidídimo (Cole y Cupps, 1977). La función principal del epidídimo es proveer el ambiente adecuado para que ocurra la maduración final del espermatozoide, con lo cual adquiere la motilidad y la potencial capacidad fertilizante. El epidídimo también funciona como un reservorio o almacén de espermatozoides (Senger, 1999).

El epidídimo es un órgano compacto y fibroso, ubicado lateralmente desde el borde superior al inferior de ambos testículos, se conforma por un ducto altamente sinuoso. Además, está altamente convolucionado o tortuoso, su longitud varía desde los 30 hasta los 60 metros y se encuentra rodeado de musculatura lisa, la cual es responsable de las contracciones rítmicas del conducto, forzando a los espermatozoides a viajar desde la cabeza epididimal hasta la porción de la cola del epidídimo (Senger, 1999), ver figura 1.

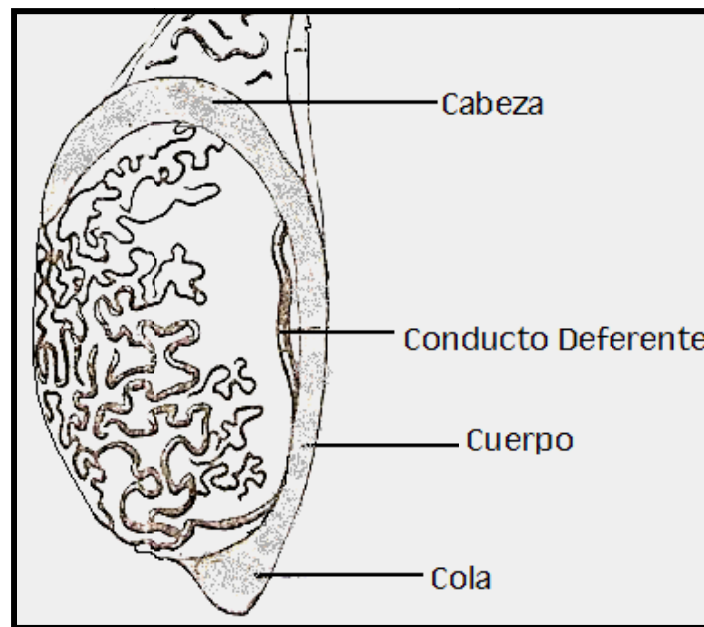


Figura 1. Testículo mostrando las diferentes regiones del epidídimo. La región apical muestra la cabeza, seguida del cuerpo, que es la porción más estrecha y en la región basal del testículo se ubica la cola del epidídimo, cuyo conducto continúa con el conducto deferente.

Anatómicamente el epidídimo se divide en cabeza, cuerpo y cola. La cabeza ocupa una proporción mayor que la cola, mientras que el cuerpo ocupa la porción menor y más estrecha del epidídimo (Hafez, 1987). Se considera que la porción caudal del epidídimo es el principal sitio de almacenamiento espermático y el lumen del conducto de la cola es mayor (Amann, 1981).

Los cambios en la localización de la gota citoplasmática se han considerado como indicadores de cambios morfológicos que ocurren cuando los espermatozoides migran a lo largo de las diferentes porciones del epidídimo (Galloway, 1994). Los espermatozoides maduran durante su tránsito por el epidídimo, siendo la migración de la gota citoplasmática desde la región del cuello hasta la pieza media del flagelo, un indicador del estado de madurez espermática y del estado funcional de los testículos y el epidídimo (Van Demark y Free, 1990; Oyeyemi y Eucine, 2006), ver figura 2.

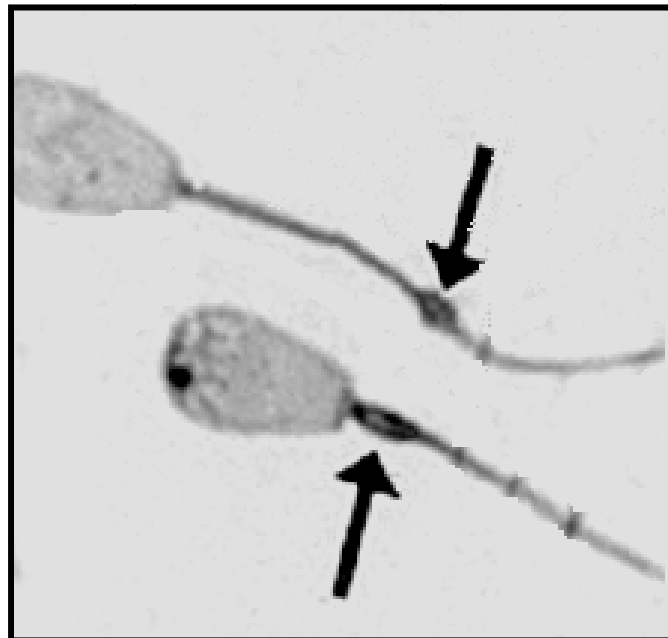


Figura 2. Espermatozoides inmaduros presentando la gota citoplasmática. Las flechas señalan la posición de la gota citoplasmática, ya sea distal, al final de la pieza principal del flagelo, o proximal, en la pieza media del flagelo, muy pegada a la cabeza espermática.

La reducción en la proporción de espermatozoides que mantienen la gota citoplasmática a lo largo del epidídimo ha sido empleada como un indicador útil del estado funcional de los testículos y el epidídimo, así como de los cambios morfológicos que ocurren ahí (Galloway, 1994; Oyeyemi y Eucine, 2006).

Primeramente los espermatozoides son depositados en la cabeza del epidídimo, la cual contiene un sitio de unión entre los conductos eferentes y el segmento inicial del conducto epididimal. En el caso de los bovinos, los espermatozoides permanecen en ésta región alrededor de dos días.

Posteriormente avanzan a la región del cuerpo, que es más alargada y ocupa un volumen menor. En el cuerpo del epidídimo los espermatozoides del toro permanecen durante dos días, luego son conducidos hacia la región de la cola, la cual se caracteriza por contener la parte del conducto de mayor diámetro. En éste sitio el espermatozoide se mantiene durante diez días, siendo en total catorce los días que el espermatozoide del toro debe permanecer en el epidídimo antes de ser eyaculado (Senger, 1999).

Mientras el espermatozoide se encuentra en proceso de maduración epididimal, sufre cambios bioquímicos que le permiten adquirir el movimiento propio, perder la gota citoplasmática y la habilidad de interactuar con el óvulo. Cuando el espermatozoide maduro es eyaculado, se mezcla con diversos componentes que forman el plasma seminal; entre ellos diferentes iones como sodio y potasio, hormonas como las prostaglandinas, ergotioneina y otras sustancias como la fructosa y el ácido cítrico (Senger, 1999).

Sin embargo, un espermatozoide maduro recientemente expulsado del epidídimo es incapaz de unirse, de manera específica a la zona pelúcida e interactuar con un óvulo, previamente necesita ser expuesto a una

secuencia de eventos conocidos como capacitación (Harrison y Gadella, 2005).

Capacitación

Durante varios años un gran número de investigadores consideró que la capacitación es una continuación de los cambios de maduración que se llevan a cabo en el epidídimo, sin embargo, notaron que los espermatozoides almacenados por tiempos prolongados, ya sea dentro del epidídimo o bien en un medio simple, no se capacitan. Una de las mayores dificultades a las que se enfrentaban cuando realizaban la fertilización *in vitro* (FIV) fue el desarrollar un medio que les permitiera una interacción exitosa del espermatozoide con el óvulo. Sin embargo, la capacitación no se había llevado a cabo. Hace algunos años los componentes del medio para realizar una FIV contenían Ca^{2+} , albúmina sérica, bicarbonato y CO_2 (Harrison y Gadella, 2005). En la región del epidídimo, en donde los espermatozoides maduros son almacenados, los niveles de bicarbonato se mantienen considerablemente bajos, comparados con la concentración encontrada en la circulación, por lo que cuando los espermatozoides se encuentran dentro del aparato genital de la hembra, se enfrentan a un incremento repentino en la concentración de bicarbonato y CO_2 , tal situación indica que el bicarbonato juega un papel importante *in vivo* (Harrison, 1996). Los cambios en la concentración de bicarbonato en los niveles fisiológicos, inducen cambios rápidos en la arquitectura de la MP (Harrison y Gadella, 2005).

La capacitación espermática consiste en el desarrollo funcional que sufre el espermatozoide, cuando ocurre una serie de cambios o modificaciones estructurales y funcionales como resultado de su interacción con las secreciones de la mucosa del aparato reproductor de la hembra, tal proceso es necesario para proveer al espermatozoide de las condiciones

adecuadas para que se efectúe la fertilización. Entre estas modificaciones se incluyen cambios bioquímicos y fisiológicos en donde se alteran y eliminan sustancias que fueron integradas en la membrana plasmática (MP) del espermatozoide durante su paso por el epidídimo (Breitbart, 2002; Tienthai, *et al.*, 2003).

Antes de que un espermatozoide maduro y móvil pueda penetrar la corona radiada y la zona pelúcida que rodea al óvulo, debe experimentar el proceso de capacitación, el cual es un proceso de activación que dura alrededor de 7 h en el humano, 2 h en el cerdo, 4 h en el bovino, y se lleva a cabo en el útero o en los oviductos. Bioquímicamente éste proceso se caracteriza por el aumento en la permeabilidad de la MP, disminución en el contenido de fosfolípidos y cambios en su carga neta. El modelo más aceptado de los procesos que acompañan a la capacitación implica la eliminación de los factores descapacitantes de la superficie espermática, con lo que se logra la desestabilización de la MP y un cambio que favorece la interacción con la membrana acrosomal externa, ver figura 3.

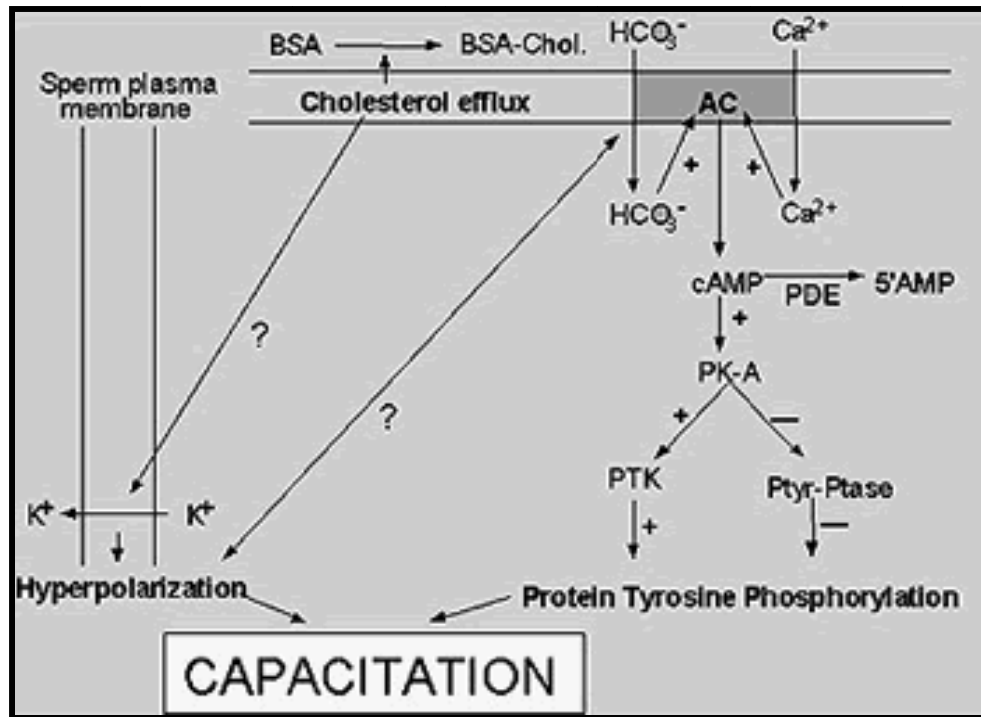


Figura 3. Esquema de la capacitación espermática.

Dentro del aparato genital de la hembra, éste proceso ocurre debido a los estrógenos femeninos y el sitio de la capacitación completa depende del sitio de depósito de los espermatozoides después del coito. Varios autores sugieren que la capacitación empieza después de un tiempo de haber pasado por el cérvix y el moco cervical (Knobil, 1992).

En 1963, Yanagimachi y Chang reportaron que el espermatozoide maduro puede ser capacitado *in vitro*. No obstante, el éxito de la fertilización *in vitro* depende de que el espermatozoide sea capacitado adecuadamente, lo cual comprende un proceso en el que gradualmente se va modificando la arquitectura de la MP, mediante la remoción del colesterol y la sensibilización del espermatozoide a señales específicas, que son mediadas por glucosaminoglicanos, glicoproteínas, pH y calcio. Dichos cambios preceden a modificaciones en el transporte de calcio, hiperactivación y a la

reacción acrosomal y aunque la reacción acrosomal es el indicador de la capacitación completa, la ausencia de esta no necesariamente implica la existencia de una falla del espermatozoide durante la capacitación (Frase, 1998; Breitbart H, 2002).

Reacción acrosomal (RA)

El acrosoma es un organelo secretor que se encuentra en la región apical de la cabeza espermática, entre el núcleo y la MP del espermatozoide. La RA se define como una serie de eventos que involucran la exocitosis de los gránulos secretados después de ocurrir la fusión de la membrana citoplasmática con la membrana acrosomal externa, ver figura 4.

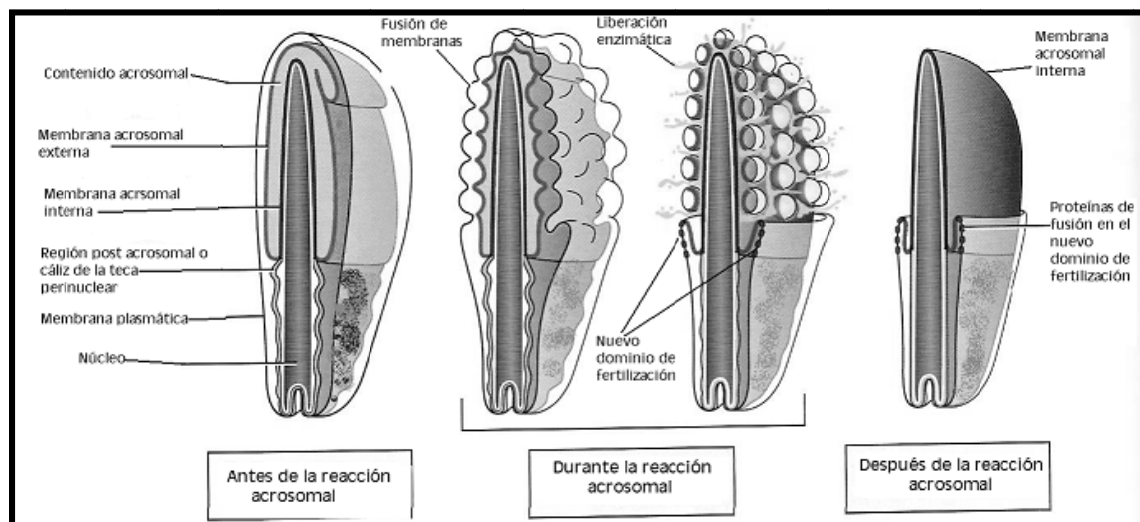


Figura 4. Reacción acrosomal. Se ilustran las estructuras de la cabeza espermática antes, durante y después de que ocurre la reacción acrosomal.

Existen muchas sustancias capaces de inducir la reacción acrosomal como los ionóforos de calcio y fluidos secretados dentro del aparato genital de la hembra. El fluido folicular, el cumulus y la zona pelúcida pueden inducir la reacción acrosomal, además de varias moléculas bioactivas asociadas al

ovocito, incluyendo a la progesterona, el sulfato glicosaminoglicano (GAGS), la albúmina sérica, la serotonina, las prostaglandinas, los ácidos insaturados y una variedad de enzimas (Frase, 1998).

Descondensación

La condensación de la cromatina nuclear durante la espermatogénesis y la subsecuente descondensación en el óvulo, son esenciales para que se de la transmisión exitosa del genoma masculino (Dias *et al.*, 2006)

Durante la espermiación, primero ocurre una descondensación densa y homogénea, posteriormente ocurre la compactación nuclear en donde las histonas son reemplazadas por protaminas, las cuales son ricas en grupos thiol (S-H), lo que provoca que puedan formarse varios puentes disulfuro (S-S) que le brindan mayor estabilidad a la estructura del complejo nucleoproteico ya condensado (Huret, 1985, Jager *et al.*, 1990). De hecho, la unión de protaminas es considerada como el factor primario que induce la compactación de la cromatina nuclear en los espermatozoides mamíferos, siendo importantes también, la formación de puentes disulfuro, así como la influencia del zinc en la fisiología espermática (Dias *et al.*, 2006)

Se ha encontrado que los puentes S-S se forman durante el tránsito epididimal y que el zinc le brinda estabilidad a las membranas espermáticas debido a que estabiliza proteínas, lo cual parece brindar una inhibición temporal al mecanismo de descondensación nuclear (Huret, 1985). Sin embargo, en el aparato genital de la hembra parece existir una depleción de zinc, y al llegar al reservorio espermático se induce la desestabilización de membranas. Se sugiere que la albúmina, que también se encuentra presente en el líquido folicular, juegue un papel importante para inducir la capacitación, debido a que la albúmina puede

quelar al zinc. Experimentos *in vitro* han demostrado que al emplear albúmina al 4% se induce la descondensación en espermatozoides de ratón (Huret, 1985).

Otro factor importante presente en fluido uterino, en el ovoplasma y en el líquido folicular, es la heparina, la cual provoca la descondensación en espermatozoides humanos (Huret, 1985), ya que compite por las protaminas secuestrándolas y dejando libre a la cromatina. Se ha sugerido que la heparina participe tanto en la fase final del proceso de capacitación como en la descondensación del núcleo espermático (Huret, 1985).

La descondensación *in vitro* se ha logrado empleando diferentes agentes químicos capaces de reducir los puentes disulfuro y remover las protaminas (Huret, 1985; Jager *et al.*, 1990). Dichos estudios indican que antes de que ocurra la fertilización, los núcleos espermáticos son altamente resistentes a varios agentes químicos, sin embargo al ser sometidos a tratamientos con agentes reductores de puentes disulfuro, como el ditionitrotiol (DTT), los detergentes aniónicos como el dodecil sulfato de sodio (SDS), proteasas como la tripsina, y diferentes concentraciones de sales (NaCl), entre otros, ocasionan la descondensación del núcleo, ver figura 5.

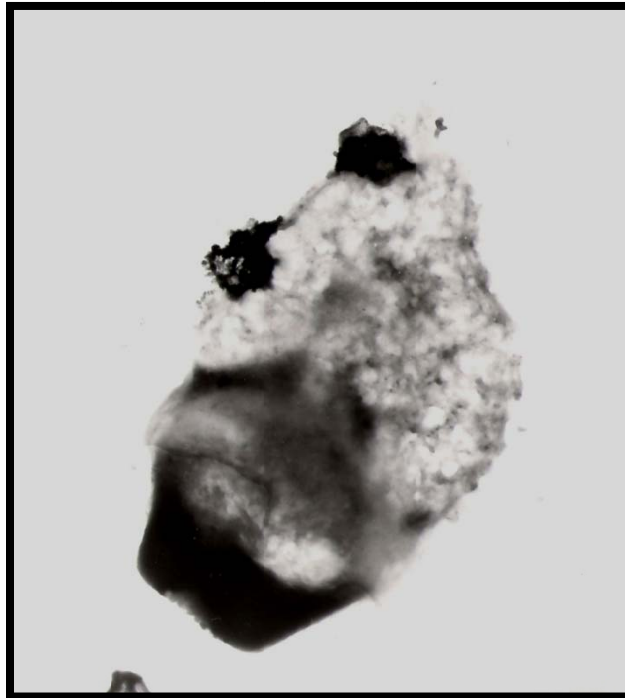


Figura 5. Descondensación espermática. Micrografía electrónica de un espermatozoide de cerdo en franca descondensación nuclear a los 90 seg postratamiento con DTT/heparina. (Gutiérrez-Pérez, 2006).

Mientras que de manera natural, poco tiempo después de la fusión del espermatozoide con el óvulo durante la fertilización, la densa y compacta masa de cromatina del núcleo espermático comienza a descondensarse para formar el pronúcleo masculino, dentro del ovoplasma (Gall y Ohsumi, 1976). En el ovoplasma existen factores que provocan la descondensación de la cromatina, como el glutatión reducido y la nucleoplasmina que inducen la remodelación de la cromatina espermática para formar el pronúcleo masculino (Katayama *et al.*, 2005).

El proceso de descondensación *in vivo*, involucra la reducción de puentes disulfuro, lo cual puede atribuirse al glutatión reducido del óvulo (Jager *et al.*, 1990).

Powell y colaboradores (1990) observaron *in vitro* que la descondensación espermática del bovino empleando de 0.02 a 0.5 mg/ml de tripsina, se lleva a cabo desde la mitad posterior de la cabeza hacia la parte anterior. De igual manera, reportan que durante la fertilización la región postacrosomal se descondensa primero. Por otra parte, existe fuerte evidencia de que la reacción acrosomal está mediada por el citoesqueleto espermático (Juárez y Mújica, 1999).

La célula espermática tiene como finalidad transportar el material genético paterno hasta el óvulo, para que en conjunto ambas células den lugar a la formación de un nuevo ser, cuyas características genotípicas y fenotípicas sean una mezcla de ambos progenitores. Para que el espermatozoide logre su cometido, además de exponerse a una serie de barreras físico-químicas dentro del aparato genital de la hembra, debe estar provisto de un caparazón lo bastante resistente que le permita sobrevivir durante todo el trayecto y alcanzar al sitio de fertilización con el material genético intacto. El componente espermático responsable de esta función es la teca perinuclear a la cual, entre otras funciones, se le atribuye directamente la protección del material genético al prevenir la descondensación nuclear prematura (Sutovsky *et al.*, 1997, 2000, 2003; Juárez, 2000; Mújica *et al.*, 2003).

Citoesqueleto espermático

El citoesqueleto del espermatozoide se divide en dos partes importantes, la teca perinuclear y el flagelo; cada uno cumple funciones diferentes que en conjunto habilitan al gameto masculino para lograr la fertilización del óvulo.

Teca perinuclear

La cabeza espermática, además de contener al material genético, cumple una función importante en la locomoción, ya que brinda la direccionalidad celular, para ello debe contener una estructura que le brinde la forma, el soporte y la rigidez necesaria para lograrlo, tal estructura se conoce con el nombre de teca perinuclear (TP).

La TP es el principal elemento citoesquelético de la cabeza de la célula espermática, la cual rodea al núcleo, formando un casco protector, excepto en el sitio de inserción con el flagelo. Se divide en dos regiones, la subacrosomal que se encuentra subyacente al acrosoma y se extiende caudalmente hasta la zona ecuatorial, y la postacrosomal que se encuentra caudal a la primera, formando un cáliz que rodea al núcleo excepto en la inserción con el flagelo, ambas regiones difieren tanto en su densidad como en su composición proteica (Oko y Maravei, 1994; Sutovsky *et al.*, 2003).

Durante la maduración epididimal, la TP sufre cambios morfológicos que le proporcionan al espermatozoide la capacidad de fertilizar. Estos cambios fueron descritos inicialmente en el cobayo y consisten en la formación de una subestructura (STP) la cual se localiza en la zona ecuatorial y forma parte de la porción apical de la región postacrosomal (Juárez-Mosqueda, 2000).

La STP se ha identificado en espermatozoides de varias especies, incluyendo al bovino (Koehler, 1970; Watson, 1995; Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999; Mújica, 2003) y presenta diferente forma la cual es especie específica. Se ha reportado que la STP se mantiene en espermatozoides

capacitados del cobayo; sin embargo está ausente en aquellos que han sufrido reacción acrosomal (RA) (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999).

La STP, al ser parte de la región postacrosomal de la TP ha sido empleada como marcador morfológico de la TP (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999) se ubica en la zona ecuatorial, justo entre la unión con la región subacrosomal. Se ha reportado que en el espermatozoide bovino la STP sufre alteraciones causadas por el proceso de congelación-descongelación, los cuales van desde alteraciones en su arquitectura, hasta la pérdida total de la misma (Martínez, 2003; 2006).

Vista con el microscopio electrónico, la STP intacta del espermatozoide bovino se observa como un anillo calado de grecas rectangulares continuas, rodeando al núcleo a manera de un cinturón en la zona ecuatorial. Sin embargo, cuando el semen es sometido al proceso de congelación-descongelación las alteraciones observadas en la STP incluyen la pérdida; en diferente magnitud, de la continuidad de las grecas, que incluso llegan a desaparecer por completo (Martínez, 2003; Felipe-Pérez, 2006).

Flagelo espermático

El flagelo es la maquinaria motriz del espermatozoide, sin embargo, los espermatozoides adquieren la capacidad de moverse únicamente después de haber transitado por el epidídimo. La motilidad espermática es un factor crítico para que pueda realizarse la fertilización, puesto que le permite al gameto masculino aproximarse al gameto femenino y le facilita atravesar la zona pelúcida del ovocito para lograr su objetivo.

La cola o flagelo espermático se compone del capitolio o capitulum, la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. El capitolio queda insertado

dentro de la cabeza espermática; la cual es una depresión que se ubica en la región distal del núcleo, formando lo que se conoce como pieza de conexión. La porción anterior del flagelo está constituida por columnas laminadas o costillas, dispuestas lateralmente y unidas en la porción dorsal y ventral por dos columnas centrales, las cuales le brindan flexibilidad a la región del cuello una vez que el espermatozoide adquiere la motilidad, de tal manera que el flagelo puede tener movimientos laterales durante el abatimiento flagelar. Las mitocondrias espermáticas están dispuestas a manera de hélice alrededor de las fibras densas del flagelo, y forman parte de la pieza media, la cual termina en el anulus, el cual marca la unión con la pieza principal. La pieza principal abarca la mayor parte del flagelo y continúa casi hasta el final, hasta conectarse con la pieza terminal. La pieza terminal es la porción más delgada del flagelo, debido a que sólo contiene al axonema cubierto por la MP (Senger, 1999), ver figura 6.

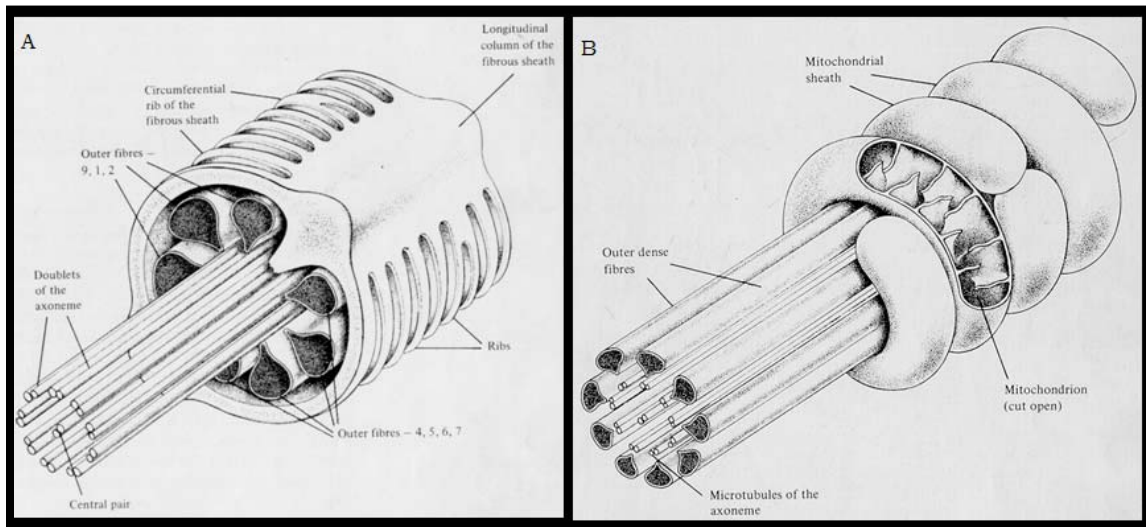


Figura 6. Estructura del flagelo espermático. A) Microtúbulos del axonema rodeados por las fibras externas y por las costillas unidas a las columnas longitudinales de la capa fibrosa. B) Microtúbulos rodeados por las fibras densas externas y por las mitocondrias.

El axonema del flagelo se origina del centriolo distal y se compone por nueve dobletes de microtúbulos dispuestos de forma circular alrededor de dos túbulos centrales. A su vez, los microtúbulos se encuentran rodeados por 9 columnas de fibras densas que cubren al axonema desde la pieza media hasta la pieza principal del flagelo, ver figura 7.

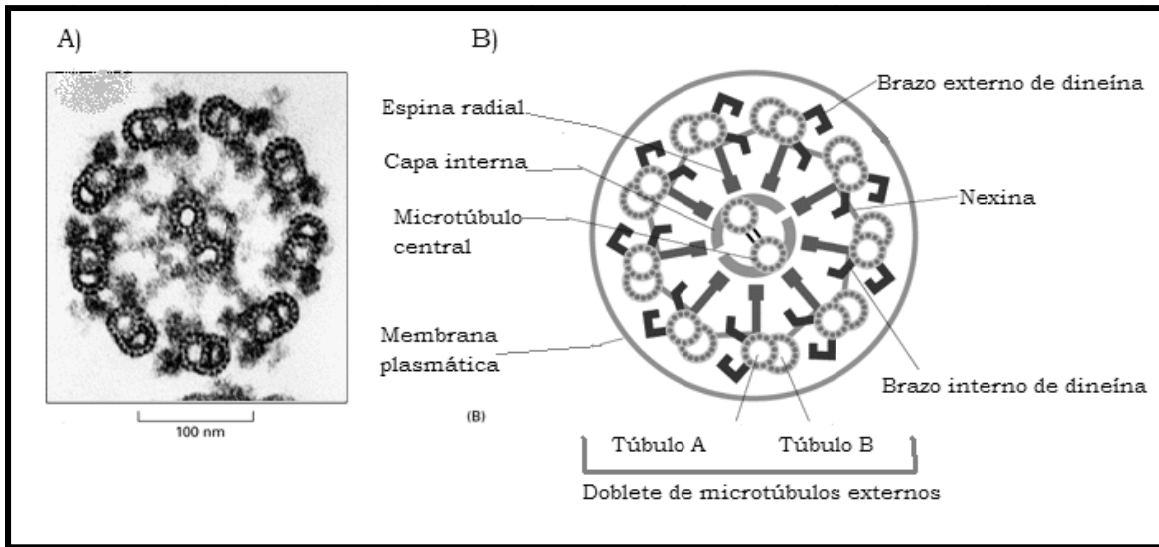


Figura 7. Estructura del axonema. A) Micrografía electrónica del axonema, se observan los microtúbulos centrales, rodeados por los dobletes de microtúbulos externos y los brazos de dineína. B) Esquema de los componentes del axonema (Alberts *et al.*, 2002).

Proteínas del citoesqueleto espermático

Hasta la fecha se han identificado varias proteínas como componentes del citoesqueleto espermático, algunas se ubican solamente en una porción del citoesqueleto, ya sea en la TP o en el flagelo, mientras que otras han sido localizadas en ambas regiones. Cabe hacer notar que existen algunas diferencias entre especies, en cuanto al tipo de proteínas que conforman al citoesqueleto espermático (Mújica *et al.*, 2003). Entre las proteínas más comunes que se han detectado en el citoesqueleto espermático podemos mencionar a la actina, que es de las más abundantes en todas las eucariotas, la calicina, que se encuentra formando el cáliz de la cabeza

espermática, la PERF 15, cuya principal atribución es la de dar forma a la cabeza espermática, la tubulina, como el principal componente flagelar, la dineína; que forma parte importante del axonema, la nexina, que brinda soporte a la maquinaria motriz flagelar, y muchas otras proteínas asociadas a actina (Flaherty *et al.*, 1986, Longo *et al.*, 1987, Mújica *et al.*, 2003, Becker *et al.*, 2007).

Sin embargo, de todas ellas, la proteína actina desempeña un papel bastante dinámico en diferentes funciones espermáticas, y ha sido localizada en la región postacrosomal de la TP del conejo, del cobayo y del bovino (Flaherty *et al.*, 1986), así como en el flagelo espermático de distintas especies de mamíferos, entre ellos el bovino (Howes, 2001; Correa *et al.*, 2007). De forma concomitante, se ha descrito la presencia de proteínas asociadas a actina en espermatozoides de varios mamíferos, entre ellas las proteínas asociadas a actina ARP2, ARP3 (por sus siglas en inglés, actin related proteins), WASP (por sus siglas en inglés, Wiskott-Aldrich syndrom protein), Calicina, CP alfa y beta (por sus siglas en inglés, capping proteins) , entre otras (Longo *et al.*, 1987; Von Bülow *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2003; Delgado-Buenrostro *et al.*, 2005).

Actina

Es una proteína de las más abundantes en el citoesqueleto de las células eucariotas, a la cual se le atribuyen múltiples funciones como regular la función mecanosensitiva de los canales de iones. Participa en la plasticidad del músculo liso, incluyendo la generación y transmisión de vectores de fuerza, determina la forma de la célula y el ensamblaje de la maquinaria involucrada en la transducción de señales (Pollard *et al.*, 2001; Alberts *et al.*, 2002; Staruschenko *et al.*, 2005).

Existe evidencia de que los filamentos de actina son dinámicos y que diversas proteínas asociadas a la actina forman el elemento contráctil y los sitios de anclaje que son necesarios para la contracción del músculo liso (Gerthoffer, 2005); además el desensamble de los filamentos de actina están involucrados en numerosos procesos que requieren un rearrreglo dinámico del citoesqueleto de actina, por ejemplo la formación de lamelipodios en la activación plaquetaria, en la formación del anillo contráctil en el proceso de división celular, durante los procesos de fagocitosis y en la formación de vesículas, (Alberts *et al.*, 2002; Mohri *et al.*, 2006).

La polimerización de actina es un proceso dinámico que está regulado por la hidrólisis de ATP. En células somáticas, la mitad de la actina se mantiene en la forma monomérica a través de pequeñas proteínas de unión. En la corteza de las células animales las moléculas de actina se polimerizan y despolimerizan continuamente. La polimerización puede ser regulada por señales extracelulares unidas a los receptores de la superficie de la MP que actúan a través de proteínas G heterotriméricas y las pequeñas GTPasas Rac y Rho, ver figura 6 (Alberts *et al.*, 2001; Pollard *et al.*, 2001) ver figura 8.

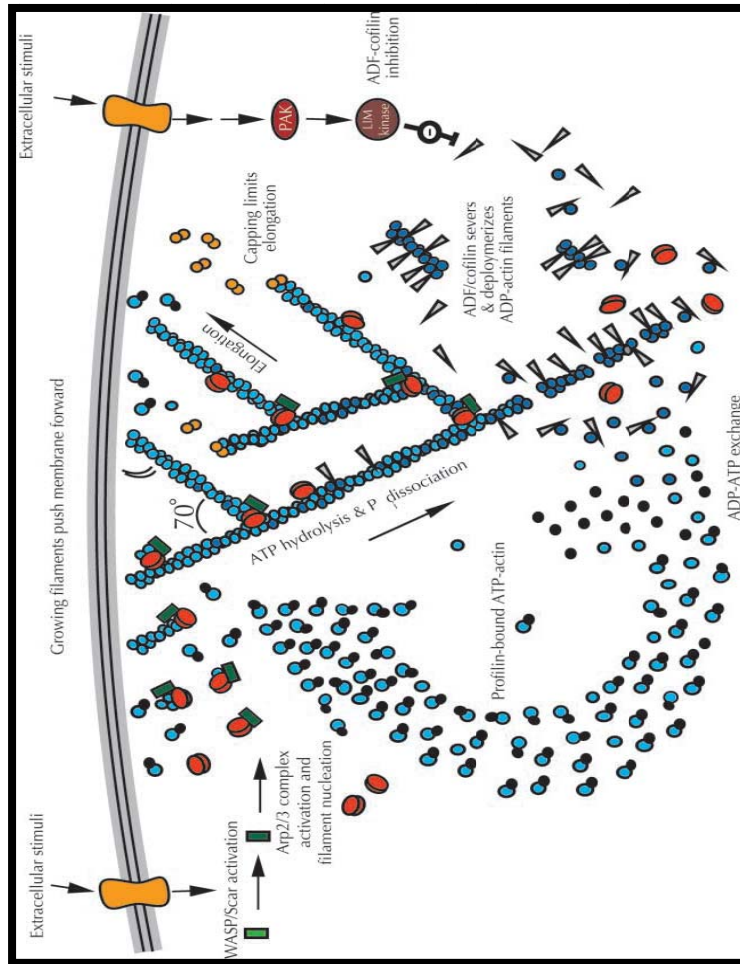


Figura 8. Modelo de nucleación de actina. Actina (círculos azules) se organiza en el borde líder de las células móviles, está organizada en una red en forma de horquillas (círculos azules pequeños representando polímeros) con el extremo de crecimiento rápido, llamado extremo barbado en la punta de los filamentos que se dirigen hacia la membrana. La polimerización se da en los extremos barbados libres, y conforme ocurre, la fuerza generada por el crecimiento rápido de la red de actina conlleva a la protusión de la membrana. La iniciación de nuevos filamentos subyace en el complejo Arp2/3 (círculos rojos), activados por proteínas como las SCAR o las WASP (rectángulos verdes). SCAR, WASP, u otros activadores (no ilustrados en el esquema) responden a una variedad de señales (figuras amarillas). La morfología a manera de ramas se genera por la unión del complejo Arp2/3 a los lados de los filamentos pre-existent (Pollard *et al.*, 2001.)

Los microfilamentos de actina desempeñan un papel importante durante la adhesión, la internalización, la endocitosis, el transporte de partículas, el ensamble y la exocitosis (Radtke *et al.*, 2006). Además, la dinámica del ensamblaje de los filamentos de actina genera la fuerza que mantiene la motilidad celular (Disanza *et al.*, 2006).

Aún cuando los diferentes rearrreglos de actina han sido descritos durante el progreso del ciclo celular, existen muchos procesos celulares en los cuales la dinámica en la organización de la actina citoesquelética requiere de mayores investigaciones (Yu *et al.*, 2005).

La actina también es la proteína más abundante en casi todas las células espermáticas de las especies de mamíferos, hasta ahora estudiados (Howes, 2001). Se ha logrado determinar que la forma monomérica o actina G polimeriza para formar filamentos de fibras delgadas y flexibles (7nm de diámetro), cuya longitud alcanza varios micrómetros, por lo que recibe el nombre de actina filamentosa o actina F (Alberts *et al.*, 2002).

Castellani-Ceresa *et al.*, (1993) demostraron que en los espermatozoides no capacitados de cerdo, la actina se encuentra en la forma monomérica y que se polimeriza a la forma filamentosa después del proceso de capacitación. Además, en varias especies de mamíferos, se ha observado que la polimerización de actina en los espermatozoides juega un papel importante durante el proceso de capacitación y reacción acrosomal (Brenner *et al.*, 2003; Cabello-Agüeros *et al.*, 2003).

Se ha reportado que con la inhibición de la polimerización de actina, ya sea mediante drogas o anticuerpos anti-actina, se inhibe la reacción acrosomal inducida por la zona pelúcida y se altera la motilidad espermática (Liu *et al.*, 1999, 2002; Azamar *et al.*, 2007). Por lo que

dichas evidencias sugieren que actina desempeña un papel importante durante los procesos fisiológicos del espermatozoide de diferentes mamíferos.

La actina en la TP

Durante la década de los ochentas, se especulaba acerca de la presencia de actina en la región postacrosomal de la teca perinuclear del espermatozoide. Para entonces algunos investigadores pensaban que de encontrarse filamentos de actina rodeando al núcleo, estos tendrían la capacidad de promover cambios de conformación nuclear durante la espermiogénesis, además determinaría el vector direccional en la motilidad espermática y facilitaría la penetración del espermatozoide durante la fertilización (Bellvé y O'Brien, 1983). Años más tarde Flaherty *et al.* (1986), reportaron la presencia de actina en la región postacrosomal de la TP en el espermatozoide del bovino, cuyo peso molecular es de 43 kDa.

La actina F se ha encontrado presente en espermátides, asociada a la región subacrosomal de la TP, pero con el desarrollo del espermatozoide, la poza o pool de actina se despolimeriza (Howes, 2001), por lo que algunos autores mencionan que en espermatozoides maduros sólo se encuentra la forma monomérica o actina G (Flaherty, 1986). Sin embargo, otros investigadores han encontrado actina polimérica o F en espermatozoides maduros (Saxewna, 1986; Peterson, 1990).

En el espermatozoide del cobayo, Sánchez-Gutiérrez *et al.* (2002), reportaron que la actina F se polimeriza en la región ecuatorial durante la reacción acrosomal y participa en el proceso de fertilización, específicamente durante la penetración espermática. Por otra parte Castellani y Ceresa (1992;1993) mediante estudios de microscopía electrónica emplearon anticuerpos anti actina marcados con oro coloidal,

demostrando la presencia de actina F en el segmento ecuatorial y región postacrosomal en espermatozoides del cerdo, a los cuales les fue inducida la reacción acrosomal. Lo anterior sugiere que la actina se polimeriza durante la capacitación y/o durante la reacción acrosomal.

Mediante observaciones de fluorescencia con faloidina rodaminada, en el espermatozoide del verraco se ha reportado la presencia de actina en la región postacrosomal, mientras que con anticuerpos monoclonales anti actina con oro coloidal, se ha encontrado a la proteína en el segmento ecuatorial; sin embargo, los autores sugieren que la actina se encuentra formando un agregado, en un estado intermedio entre la forma G y la F, o bien en una forma no filamentosa; pero más grande que la forma monomérica, es decir formando oligómeros (Camattini *et al.*, 1986).

La actina en la cabeza espermática participa en la morfogénesis, junto con otras proteínas ayuda a que ocurra la RA y sirve como almacén de partículas de señalización; además participa en la formación del nuevo dominio de membrana en la región ecuatorial previo a la fertilización (Moreno-Fierros *et al.*, 1992).

Durante el proceso de maduración epididimal, la proteína actina parece desempeñar un papel importante durante el proceso de formación y estabilización de la STP en el espermatozoide del cuy, cobayo y conejo, lo cual fue valorado empleando estabilizadores y despolimerizadores de actina como la faloidina y la citocalasina D, respectivamente (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). No obstante, hasta la fecha no existen reportes que relacionen el proceso de maduración epididimal con el desarrollo de la STP y tampoco se sabe el papel que desempeña actina pueda desempeñar durante éste proceso en espermatozoides bovinos.

Sin embargo, se ha reportado que existe un decremento gradual en la concentración relativa de actina F, conforme los espermatozoides del cuye experimentan los procesos de maduración, capacitación y reacción acrosomal (Azamar *et al.*, 2007).

Actina en el flagelo

Durante la maduración epididimal, los espermatozoides de los mamíferos adquieren gradualmente la capacidad del movimiento, lo cual se logra a través del deslizamiento de los microtúbulos externos de los microtúbulos del axonema. Ahora bien, dentro de la compleja estructura del flagelo de los espermatozoides, se ha identificado la presencia de actina F.

La investigación realizada por Azamar *et al.* (2007) sugiere que es importante la presencia de regiones específicas de filamentos de actina en el flagelo para lograr la motilidad espermática.

Hasta el momento se desconoce la función que desempeña la actina en el flagelo de los espermatozoides epididimales, sin embargo al ser una proteína relacionada con la formación de vesículas, es probable que participe en el desprendimiento de la gota citoplasmática distal, además de su inminente participación para lograr que ocurra la motilidad espermática, sin embargo, en los espermatozoides de algunos mamíferos como el macaco y el cerdo, se ha determinado que el citoesqueleto de actina está relacionado con la regulación del volumen celular, especialmente en los flagelos, al ser sometidos a diferentes concentraciones tanto hipo como hiper osmóticas (Petrunkina *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando el citoesqueleto de actina es alterado, se ha evidenciado que no solamente se previene la RA, sino que además se disminuye considerablemente el movimiento flagelar (Azamar *et al.*, 2006).

WASP

La familia de las proteínas WASP; por sus siglas en inglés (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein), son ABP y constan de cuatro miembros: WASP (células hematopoyéticas), N-WASP (ubicua), SCARE/WAVE y las 17p/Bee1p (Derry *et al.*, 1994; Miki *et al.*, 1996; Bi y Zigmond, 1999; Trasher *et al.*, 2000).

La deficiencia de WASP, está relacionada con el síndrome de Wiskott-Aldrich, en el cual se ven afectadas diversas células hematopoyéticas, especialmente las plaquetas, debido a que en ellas se ve afectada la dinámica de actina, por lo que los pacientes que padecen de ésta enfermedad mueren a causa de graves problemas en la coagulación (Trasher *et al.*, 2000).

Las WASP tienen un peso molecular de 66kDa, son moléculas adaptadoras que se encargan de ejecutar acciones sobre el citoesqueleto de actina debidas a señales múltiples, además son capaces de lograr el reclutamiento de los complejos ARP 2/3, para lograr la nucleación de actina (Higgs y Pollard, 1999); Weaver *et al.*, 2003).

Estas proteínas interactúan con una gran gama de moléculas que participan en las cascadas de señalización celular, entre ellas se encuentran: GTPasas de la familia Rho, PIP2, WIP, CaM, Src-quinasas, Tec-quinasas, Grb2, Nck, profilina y actina (Welch *et al.*, 1997; Higgs y Pollard, 2000). La interacción de todas éstas, permiten regular la actividad y la translocación de WASP a la MP, o bien en aquellos sitios donde es requerida la polimerización de actina, para influir en la dinámica del citoesqueleto a través del reclutamiento de los complejos ARP2/3 (Higgs y Pollard, 2000; Delgado-Buenrostro, 2004). Se ha sugerido que la interacción de las WASP con el complejo ARP2/3 puede ser un mecanismo

de control central para modular la distribución de actina polimerizada en diferentes tipos celulares (Ochs *et al.*, 1980).

ARP2, ARP3

Las proteínas relacionadas con actina ARP, por sus siglas en inglés (Actin Related Proteins), forman complejos asociándose entre sí para permitir la ramificación de actina F mediante la nucleación de varias ramas en los lados de los filamentos ya existentes. Los complejos ARP 2/3 están formados por siete subunidades, dos de ellas se relacionan con actina y profilina, las ARP2 y ARP 3; las otras cinco son: p40-Arc, p21-Arc, p18-Arc y p14-Arc (McCollum *et al.*, 1996; Mullins y Pollard 1999).

Los complejos ARP2/3 han sido localizados en aquellos sitios dinámicos que presentan la polimerización/despolimerización de actina en diferentes células y en conjunto tienen un peso molecular de 224 kDa (Wear *et al.*, 2000; Weaver *et al.*, 2003).

Una vez formado el complejo promueve la nucleación de actina al unirse en uno de los extremos, permitiendo que se ordenen los filamentos de actina en direcciones distintas, cuyas ramificaciones se encuentran formando ángulos de 70°. En cada punto de unión de los filamentos de actina, o bien, en cada ramificación se localizan los complejos ARP 2/3 (Becker *et al.* 2007).

Distrobrevina

La proteína distrobrevina, que pertenece a la familia de las distrofinas, es un componente que se encuentra formando grandes complejos proteicos, cuya función en las células somáticas es la de unir al citoesqueleto con la matriz extracelular, además se cree que dichos complejos sirven como un

reservorio dinámico de proteínas de señalización, por lo que la proteína distrobrevina podría también jugar un papel importante dentro de éste contexto (Ceccarini *et al.*, 2007).

Muchas distrofias musculares son causadas por mutaciones de distintos elementos del complejo glicoproteico de las distrofinas, el cual ayuda a anclar el citoesqueleto muscular con la membrana celular a través de la vía de las distrofinas y sus proteínas asociadas (Glass, 2007). Uno de los ejemplos clásicos de distrofias musculares es la enfermedad de Duchenne, la cual es ocasionada debido a una mutación en el gen de la distrofina (Hoffman, 1987).

El complejo glicoproteico de las distrofinas se encarga de anclar la MP del músculo y funciona como unión mecánica entre las lamininas de la matriz extracelular y la actina del citoesqueleto intracelular (Meter, 2007). La familia de las distrofinas incluye muchas proteínas pequeñas, entre ellas la proteína distrobrevina, las cuales interactúan con proteínas del citoesqueleto intracelular como actina, para formar complejos funcionales, ver figura 9.

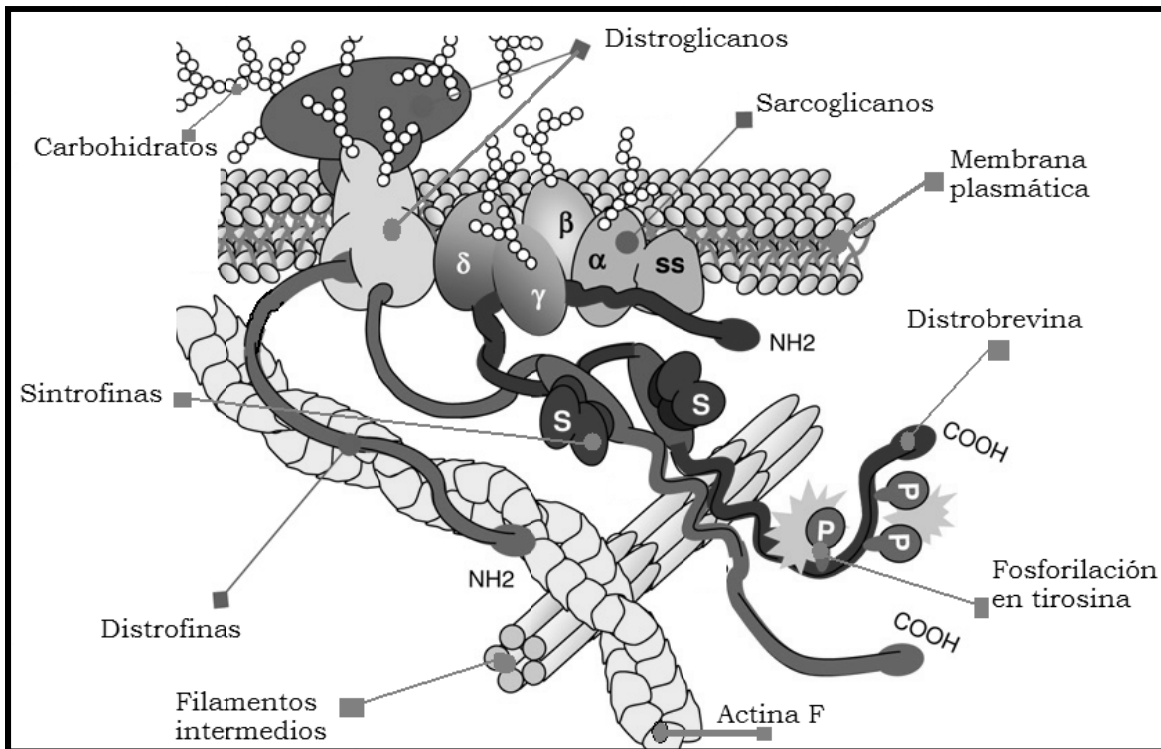


Figura 9. Interacción del citoesqueleto con la membrana plasmática.

Se ha reportado la presencia de diversas proteínas asociadas a actina; entre ellas WASP, ARP 2/3 y distrobrevina, localizándolas tanto en la cabeza como en el flagelo de los espermatozoides murinos (Hernández-González *et al.*, 2001; Delgado-Buenrostro *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si estas proteínas podrían localizarse de forma similar en espermatozoides de otras especies, como en el bovino.

Criopreservación

La criobiología es la ciencia multidisciplinaria encargada del estudio del comportamiento físico y biológico de células y tejidos, incluyendo sus interacciones con el ambiente a bajas temperaturas, especialmente por debajo del punto de congelación del agua, 0°C. El metabolismo biológico de las células vivas disminuye dramáticamente a bajas temperaturas, lo cual permite la preservación a largo plazo de células y tejidos, por lo que el

entendimiento de la biofísica de los efectos de las bajas temperaturas sobre los sistemas celulares y su utilización para el desarrollo de protocolos mejorados son los principales objetivos de la criobiología fundamental (Gao y Critser, 2000). Siendo el espermatozoide el primer tipo celular congelado y descongelado exitosamente (Polge *et al.*, 1949).

Conforme las células son enfriadas a aproximadamente -5°C , tanto las células como el medio que les rodea permanecen superenfriadas pero sin congelar. No obstante, cuando las células se encuentran entre -5 y -15°C aproximadamente, se forman cristales de hielo en el medio extracelular, sin embargo, el contenido intracelular aún permanece sin congelar y se encuentra superenfriado, presumiblemente debido a que la membrana celular bloquea el crecimiento de cristales de hielo en el citoplasma.

El agua superenfriada en las células tiene un potencial químico más elevado que el agua en la solución extracelular parcialmente congelada, así que el agua fluye fuera de la célula osmóticamente y se congela en el exterior. Los eventos físicos subsecuentes dependen de la tasa de enfriamiento, es decir, si las células son enfriadas muy rápidamente, el agua intracelular no se pierde lo suficientemente rápido para mantener el equilibrio, hay un incremento en el superenfriamiento y eventualmente alcanza el equilibrio por congelación intracelular. Si el enfriamiento es lo suficientemente lento, las células perderán agua lo suficientemente rápido para concentrar los solutos intracelulares para eliminar el superenfriamiento, disminuyendo el punto de congelación. Como resultado, las células se deshidratan y no se congelan intracelularmente. Sin embargo, si las células son enfriadas demasiado lento, experimentarán una severa disminución de volumen y una exposición prolongada a altas concentraciones de solutos. El daño celular directo es inducido por la congelación, lo cual ha sido explicado con la “hipótesis de los 2 factores”, la cual sugiere dos diferentes factores dependientes de la tasa de

enfriamiento. El primero es debido a la formación de hielo intracelular a tasas rápidas, mientras que el segundo se atribuye directamente al “efectos de solución” a tasa lentas. Ambos factores son posibles eventos que pueden causar daños celulares como resultado de la concentración de los solutos (Whittingham *et al.*, 1972; Han y Bischof, 2004), ver figura 10.

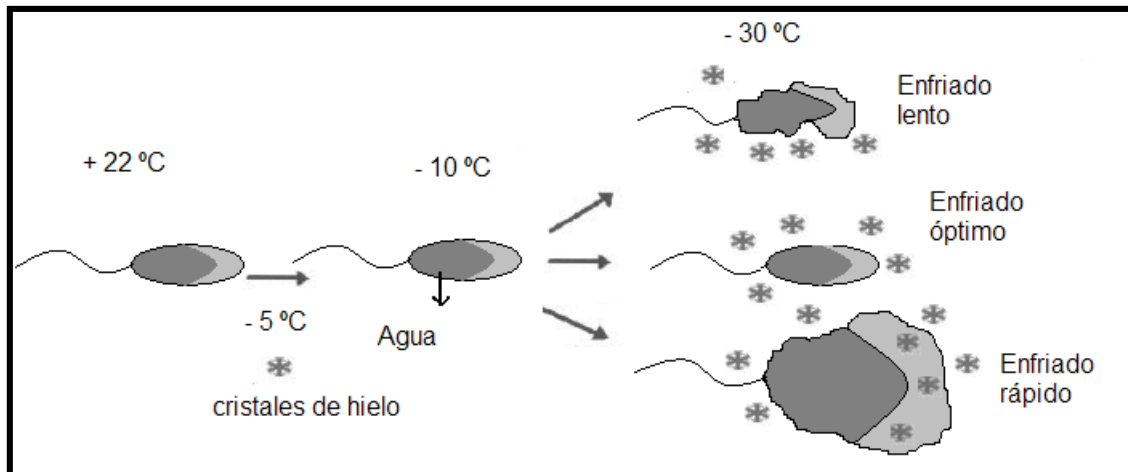


Figura 10. Esquema de los daños espermáticos por efecto de las diferentes tasas de enfriamiento durante la criopreservación. Durante el enfriado lento la célula se deshidrata al perder una mayor cantidad de agua intracelular, los cristales de hielo se forman extracelularmente, pero las membranas plasmática y acrosomal son gravemente dañadas. Un enfriado óptimo debe permitir cierta liberación de agua intracelular, sin provocar una deshidratación celular grave. Un enfriado muy rápido no permite la liberación del agua intracelular, lo cual provoca la formación de cristales de hielo intracelulares, provocando que la célula se hinche y se dañen las membranas plasmáticas y acrosomales. Esquema adaptado para la congelación espermática del esquema de Han y Bischof (2004).

Se sabe que durante el proceso de criopreservación los espermatozoides son expuestos a diferentes concentraciones osmóticas. Durante el proceso de congelación ocurre la formación de cristales de hielo, los cuales excluyen a los solutos del medio, quedando así los espermatozoides en contacto con un medio hiperosmótico. Mientras que durante la descongelación, ocurre lo contrario, puesto que al descongelarse las moléculas de agua crean un ambiente hipoosmótico (Mazur, 1972;

Petrunkina et al., 2004; Correa et al., 2007). Tales cambios implican que los espermatozoides deben estar luchando constantemente por mantener su volumen celular aún expuestos a los mencionados cambios osmóticos.

Daños al citoesqueleto ocasionados por la criopreservación

Estudios realizados en células somáticas indican que el proceso de congelación-descongelación ocasiona daños en la estructura de las proteínas que conforman al citoesqueleto celular (Petrunkina *et al.*, 2004).

Diversas investigaciones han demostrado que durante el proceso de congelación, el citoesqueleto es el encargado de mantener el volumen celular (Petrunkina *et al.*, 2004; 2005).

Martínez (2003; 2006), mediante estudios de microscopia electrónica en semen de bovino descongelado, encontró que existe una correlación directa entre el número de espermatozoides no viables y el número de espermatozoides con daño en la teca perinuclear, ver figura 11.

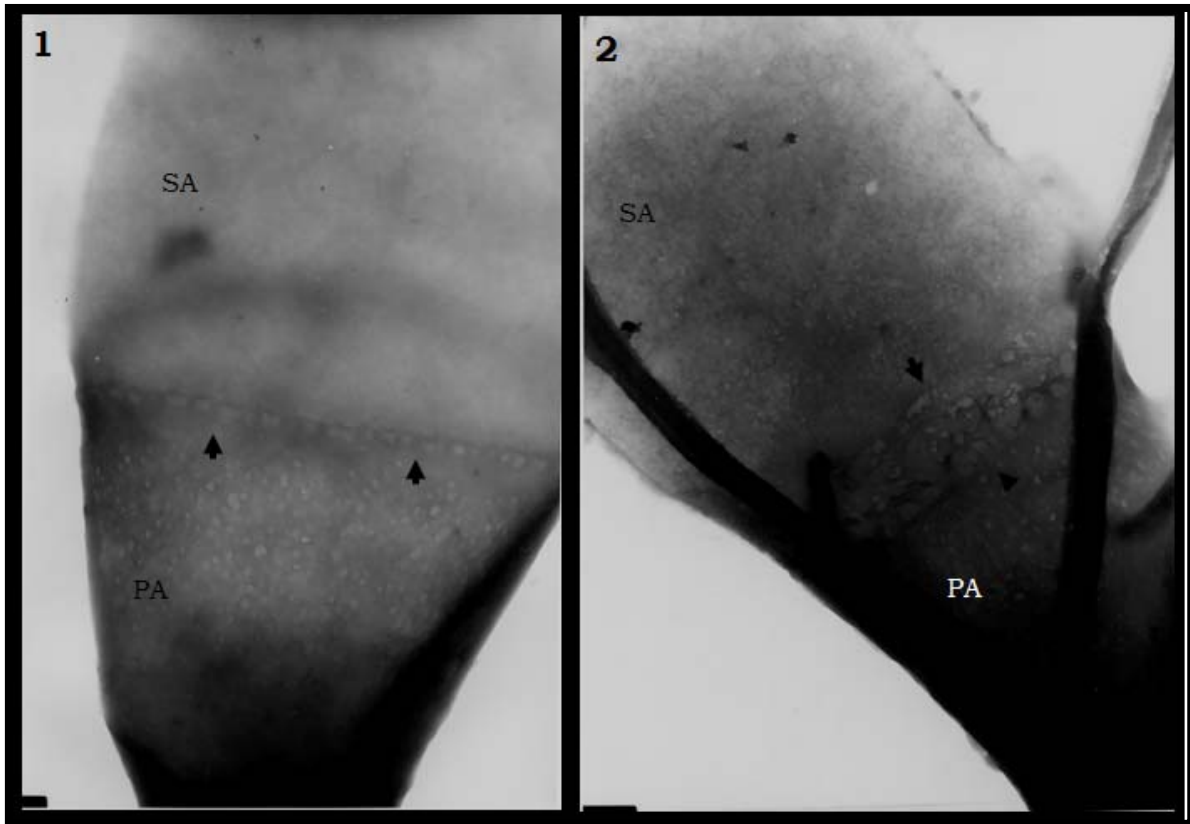


Figura 11. Daños en la TP por la criopreservación. Micrografías electrónicas de cabezas de espermatozoides de bovino con la TP expuesta. 1) Espermatozoide fresco con la STP intacta. 2) Espermatozoide descongelado con alteraciones en la STP. Las puntas de flecha señalan la STP en la región ecuatorial. SA: región subacrosomal de la TP, PA: región postacrosomal de la TP. (Martínez *et al.*, 2006) Barra = 500 nm.

Felipe-Pérez (2006) en un estudio comparativo de semen fresco y descongelado, encontró que varias de las proteínas que conforman la teca perinuclear del espermatozoide bovino son más susceptibles a la extracción después de haber sufrido el proceso de congelación-descongelación, entre ellas actina y distrobrevina, lo que indica una clara alteración y el posible fraccionamiento proteico ocasionado por tal proceso.

Correa *et al.* (2007) reportan que existe una conexión directa entre la regulación del volumen celular, la morfología flagelar, la motilidad y el citoesqueleto de actina con el daño sub-letal que ocurre durante el estrés osmótico y potencialmente durante la criopreservación.

El hecho de que actina se encontrara localizada en el segmento ecuatorial de la TP, aunado a los reportes de que el proceso de congelación-descongelación provoca alteraciones al mismo nivel, dañando a la TP del espermatozoide bovino, sugieren que posiblemente actina sea una de las proteínas que estén siendo fracturadas o despolimerizadas durante dicho proceso. Por lo anterior, el presente trabajo de investigación pretende determinar si la proteína actina y algunas de las proteínas asociadas a actina están siendo modificadas por el proceso de congelación y descongelación en el espermatozoide del bovino.

III. JUSTIFICACION

Debido a que actina es una proteína muy dinámica que está involucrada en varios procesos previos a la fertilización, es importante conocer las etapas de desarrollo del citoesqueleto durante la maduración epididimal y la participación de actina dentro de éste proceso, así como las alteraciones que la actina y algunas proteínas asociadas a actina podrían sufrir a causa de la criopreservación al que se someten los espermatozoides del bovino.

IV. HIPOTESIS

- * Durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo ocurren cambios de maduración en los que se llevan a cabo reacomodos de actina y proteínas asociadas a actina en el citoesqueleto del espermatozoide bovino.

- * Cuando el semen de bovino es expuesto al proceso de criopreservación, se provocan daños estructurales en la red del citoesqueleto espermático, que podrían verse reflejados en alteraciones en la distribución de actina F y de algunas proteínas asociadas a actina, entre ellas la distrobrevina.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los cambios que ocurren en el citoesqueleto de actina F, distrobrevina y algunas proteínas asociadas a actina (como las WASP, ARP2, ARP3 y distrobrevina) en el espermatozoide bovino tanto durante la maduración epididimal como después del proceso de criopreservación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar el desarrollo de la STP en las diferentes regiones del epidídimo de bovino.
2. Identificar la distribución de actina F, WASP, ARP2 y ARP3 en espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo.
3. Correlacionar los cambios en la distribución de actina y las proteínas WASP, ARP2 y ARP3, con el desarrollo de la STP en espermatozoides epididimales del bovino
4. Identificar la presencia de actina, distrobrevina, WASP, ARP2 y ARP3 en extractos proteicos de espermatozoides frescos y descongelados de bovino
5. Identificar y comparar los patrones de localización de actina F, distrobrevina, WASP, ARP2 y ARP3 en espermatozoides frescos y descongelados de bovino.

VI. MATERIAL Y METODOS

El procedimiento general de la metodología empleada para la detección de actina y proteínas asociadas a actina se encuentra resumido en la figura 12.

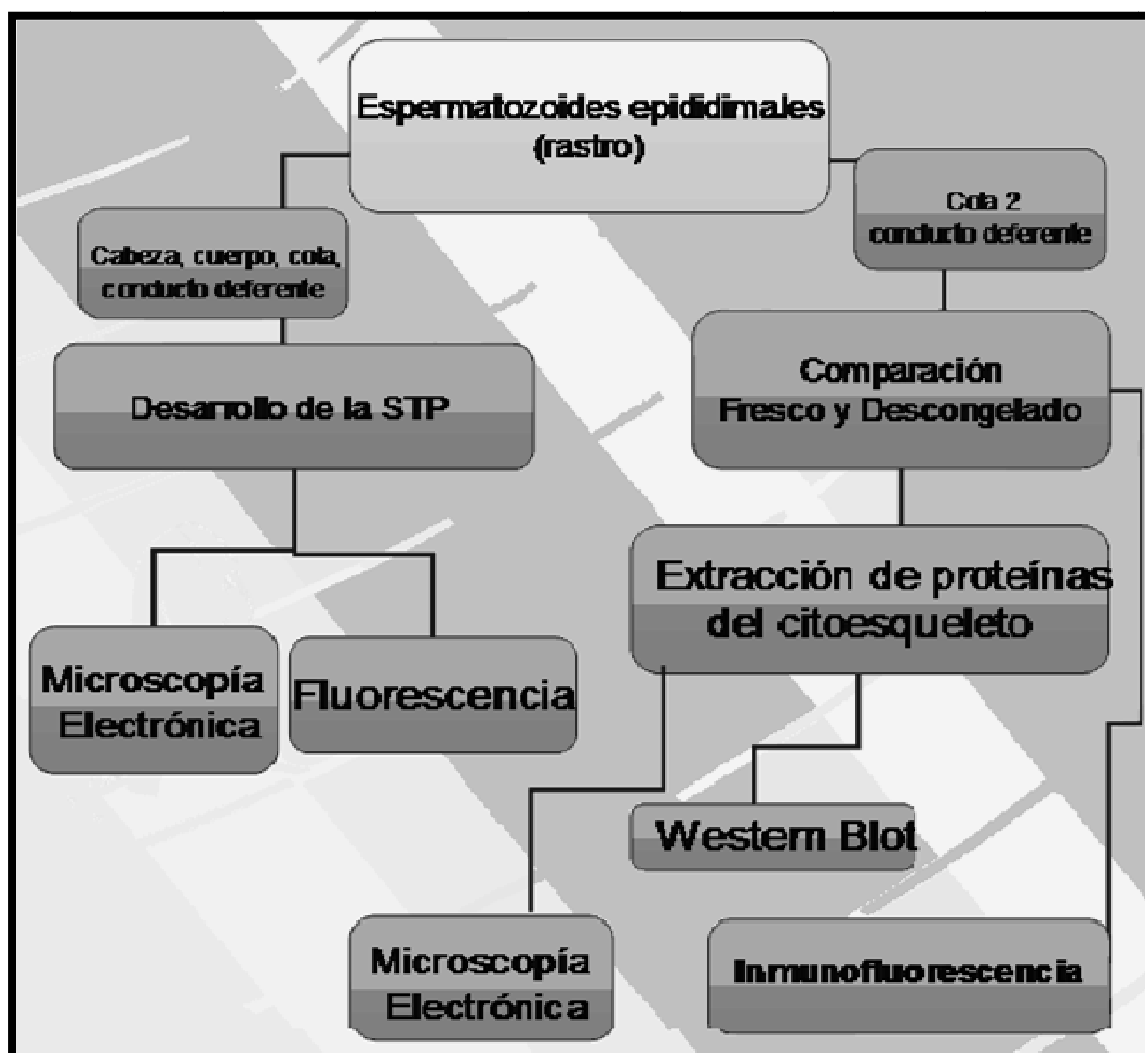


Figura 12. Metodología. Se indican los diferentes procesos a los cuales se sometieron los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo para dar cumplimiento a los objetivos planteados.

Muestras biológicas

Se obtuvieron veinte muestras epididimales de diferentes toros en los rastros de Tenango del Valle y Mexicaltzingo, Estado de México para extraer los espermatozoides.

Reactivos y anticuerpos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico, obtenidos de las marcas SIGMA Chemical Co (At. Louis, Mo., USA) MERCK y AMERSHAM. El kit comercial para la extracción de proteínas empleado fue de la marca Chemicón (Cytoskeleton protein extraction kit). Se emplearon anticuerpos monoclonales anti actina, los cuales fueron producidos y donados por el Dr. Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN. También se emplearon anticuerpos policlonales anti actina, los cuales fueron adquiridos de Santa Cruz Immuno Research (San Diego, CA, USA), los anticuerpos anti distrobrevina, anti ARP 2, anti ARP 3 y anti WASP de Jackson Immuno Research. Mientras que los anticuerpos secundarios IgG anti conejo y el IgG anti ratón se adquirieron de Santa Cruz, Immunoresearch. La mezcla de inhibidores de proteasas Complete™, fue adquirida de Boehringer Mannheim (GMBH, Alemania). Para la quemiluminiscencia se obtuvo el kit ECL de Amersham, Pharmacia Biotech Biosciences.

Obtención de espermatozoides epididimales

Se tomaron aproximadamente 20 epidídimos de diferentes toros, inmediatamente después del sacrificio en los rastros pertenecientes a los municipios de Tenango del Valle y Mexicaltzingo, Estado de México.

Se separaron las 3 regiones epididimales, anudando hilo entre cada una de ellas, los epidídimos se transportaron hasta el laboratorio en solución salina fisiológica (SSF: NaCl 154 mM) a 4°C. Una vez en el laboratorio, los espermatozoides fueron extraídos del epidídimo mediante lavado retrógrado con SSF. En cada procedimiento, se realizaron mezclas o pools de espermatozoides extraídos de epidídimos de por lo menos 3 toros diferentes para eliminar la posible fuente de variación individual.

Las regiones del epidídimo fueron clasificadas como: cabeza, cuerpo, cola1, cola 2 y conducto deferente. La región de la cola a su vez fue subdividida en 2 regiones, debido a que se observó una diferencia importante en cuanto al diámetro observado en el túbulo, siendo mucho mayor en la porción más distal, es decir la parte que se une con el conducto deferente (Figura 13).

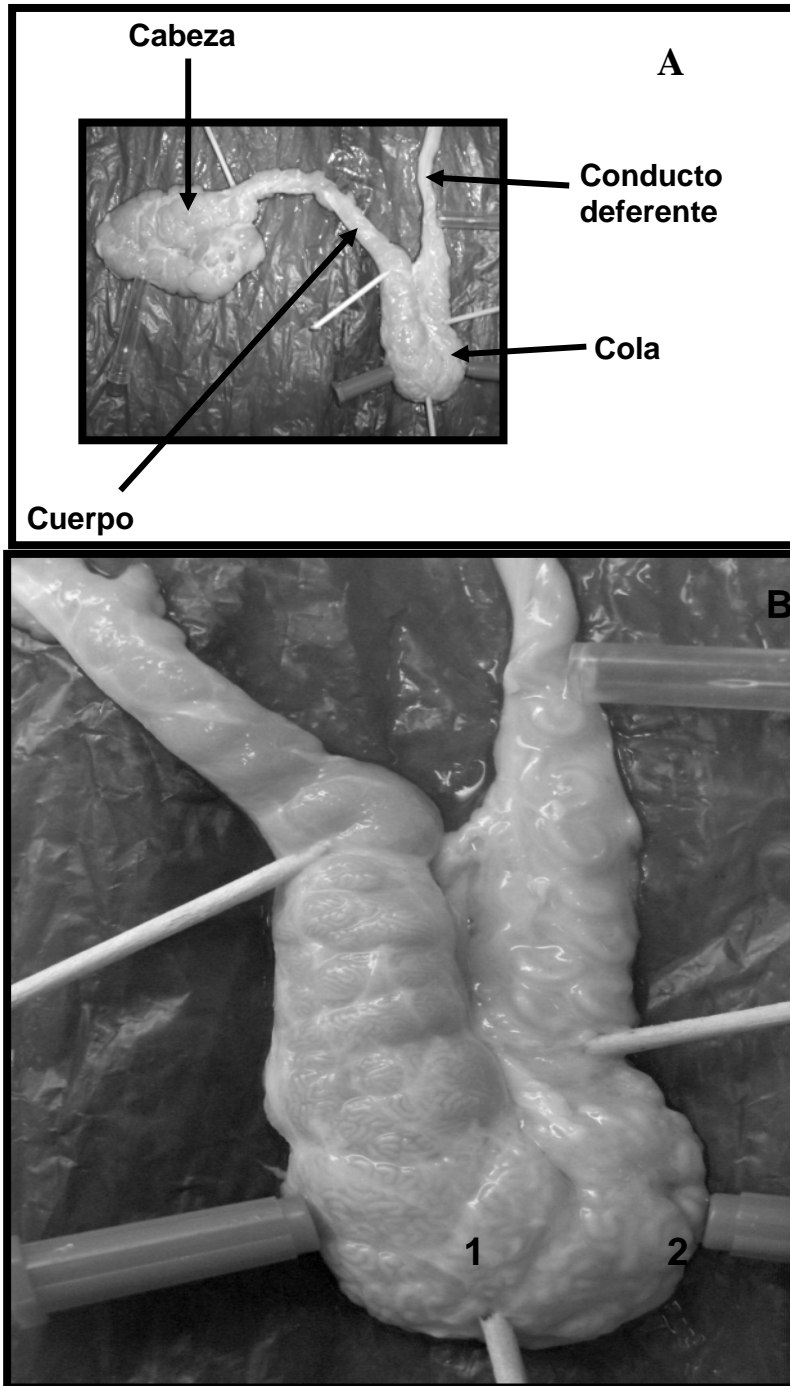


Figura 13. Epidídimo del bovino. A) Regiones en las que se divide anatómicamente al epidídimo. B) Cola del epidídimo, exhibiendo las dos porciones que anatómicamente se diferencian en el diámetro del túbulo, el 1 señala la primera porción de la cola, 2 señala la segunda porción de la cola con mayor diámetro del túbulo, se ubica próxima al conducto deferente.

Además, al evaluar de manera subjetiva a los espermatozoides extraídos de la cola, se observó mediante el microscopio óptico, una muy marcada

diferencia en la motilidad, la cual fue de aproximadamente un 10 a un 20% en los espermatozoides extraídos de la primera porción de la cola, en contraste los espermatozoides extraídos de la segunda porción, mostraron motilidades cercanas al 70%.

Microscopía electrónica

Para lograr el primer objetivo planteado, referente a la identificar el desarrollo de la STP en las diferentes regiones del epidídimo del bovino, se realizaron observaciones de espermatozoides con la teca perinuclear expuesta mediante estudios de microscopía electrónica como se describe a continuación.

Se tomaron muestras de cada porción epididimal para valorar la presencia de la STP mediante microscopía electrónica de la siguiente manera: las muestras después de ser lavadas con solución salina fisiológica, se incubaron con el detergente neutro Brij 36T al 10% en PBS para retirar las membranas plasmáticas y acrosomales de los espermatozoides (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999), durante 10 min a temperatura ambiente, manteniéndolos en agitación constante. Posteriormente fueron lavadas con agua desionizada, y la pastilla se fijó con la solución de Karnovsky (formaldehído y glutaraldehído en PBS) durante al menos 30 min, para luego ser lavadas con agua desionizada filtrada.

Encima de una caja de Petri invertida se colocó una película de parafilm, sobre la cual se colocaron rejillas de cobre con una malla de 200(mesh) tratada con una cubierta de colodión carbonada. Sobre cada rejilla se colocaron 20 μ l de cada muestra de espermatozoides epididimales; los cuales se encontraban suspendidos en 1 ml de PBS, a una concentración de 35×10^6 . Se permitió que la muestra, conteniendo los espermatozoides, sedimentara durante 10 min a temperatura ambiente, para luego quitar el

exceso de muestra con papel filtro y teñir la rejilla con muestra adherida, durante 15 seg con ácido fosfotúngstico (0.002%), lo cual es conocido como tinción negativa. Pasado ese tiempo se pasaron las rejillas a una gota de 20 µl de agua desionizada filtrada para enjuagar los residuos del ácido fosfotúngstico. Finalmente se retiró el exceso de agua de las rejillas, con tiras de papel filtro, se permitió que secan sobre una tira de papel filtro y se guardaron dentro un porta rejillas, para luego ser observados bajo el microscopio electrónico de transmisión.

Detección de actina F

Para lograr el segundo objetivo, la detección de actina F en espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo se realizó la metodología que a continuación se explica.

Las muestras epididimales extraídas con SSF fueron sometidas a 3 lavados con SSF a 37°C a 1200 rpm. Posteriormente fueron sometidas a la tinción con faloidina-TRITC, empleando una concentración de 30 millones de espermatozoides/ml, suspendidas en un amortiguador de fosfatos PBS (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, NaH₂PO₄ 9.6 mM, pH 7.4). Para realizar la observación de los filamentos de actina directamente sobre el citoesqueleto, se retiraron las membranas plasmáticas y acrosomales empleando el detergente neutro Brij 36-T al 1.2%, durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS para retirar los restos de membrana de las muestras y se fijaron durante 1 hora en 1.5% de formaldehído en PBS a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron frotis celulares sobre portaobjetos, se dejaron secar toda la noche. Al día siguiente, las laminillas con las células adheridas fueron rehidratadas con PBS. Enseguida se les aplicó la faloidina unida al izo tiocianato fluorescente (faloidina-TRITC), empleando 0.05mg/ml en PBS con 1% de dimetil sulfóxido y fueron incubadas durante 40 min a

temperatura ambiente en una atmósfera húmeda, en completa oscuridad. Finalmente todas las laminillas fueron lavadas con PBS y agua bidestilada para retirar el exceso de faloidina, se colocó el medio de montaje y se sellaron para su posterior observación.

Los espermatozoides se observaron en un microscopio de epifluorescencia, según la técnica descrita por Wulf, *et al.* (1979) y se realizaron observaciones de 30 células por laminilla, preparando todas las laminillas por duplicado.

Faloidina

Las faloidinas son una familia de heptapéptidos venenosos o toxinas provenientes del hongo *Amanita phalloides*. La más representativa es la faloidina *Ia*, la cual forma complejos con actina F y en consecuencia los filamentos son altamente estabilizados contra varios agentes químicos y físicos, como el calor, enzimas proteolíticas y cambios de pH, entre otros, y por lo tanto evita su despolimerización. La faloidina unida al izo tiocianato fluorescente (faloidina-TRITC) permite observar filamentos de actina en las células (Wulf *et al.*, 1979).

Inmunolocalización de proteínas asociadas a actina en el citoesqueleto espermático

Con el fin de identificar la distribución de algunas de las proteínas asociadas a actina, como se ha planteado en el segundo objetivo, se realizaron los procedimientos que enseguida se describen.

Las muestras epididimales extraídas con SSF fueron sometidas a 3 lavados con PBS a 37°C, empleando una velocidad de 1200 rpm durante 5 min.

Para realizar la observación de las proteínas directamente sobre el citoesqueleto, se retiraron las membranas plasmáticas y acrosomales empleando el detergente neutro Brij 36-T al 1.2%, durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS para retirar los restos de membrana de las muestras y se fijaron durante 1 h en 1.5% de formaldehído en PBS a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS y se realizaron frotis celulares sobre portaobjetos de vidrio, los cuales se dejaron secar al aire hasta el día siguiente. Después de rehidratar las laminillas en PBS, las muestras fueron bloqueadas con PBS-Tween 20 al 0.1%. Después de lavar las laminillas con los espermatozoides adheridos, se les agregaron los anticuerpos primarios correspondientes, los cuales fueron anti distrobrevina, anti actina, anti WASP, anti ARP 2, anti ARP 3, diluidos en PBS- Tween 20 al 0.1%, para todos los anticuerpos se prepararon diluciones de anticuerpos 1:50, excepto para actina que se empleo desde 1:50 hasta 1:1. Las laminillas fueron cubiertas con un cubreobjetos largo y colocadas dentro de una cámara con atmósfera húmeda, dejando actuar los anticuerpos durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la laminillas fueron lavadas con PBS-Tween 20 al 0.1% y se procedió a incubar las laminillas con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h. Luego se realizaron lavados intensos con PBS-Tween 20 al 0.1%, finalizando con un enjuague rápido en agua destilada. Finalmente se colocó el medio de montaje (Gelvatol) y se sellaron las laminillas, las cuales fueron guardadas en cámaras oscuras y en refrigeración hasta su observación en el microscopio de fluorescencia o el confocal.

Método de congelación y descongelación

A fin de lograr la identificación de actina y algunas proteínas asociadas a actina en extractos proteicos de espermatozoides frescos y descongelados

de bovino, tal como está señalado en el cuarto y quinto objetivo, se realizaron los procedimientos descritos a continuación.

Para realizar este experimento, se obtuvieron espermatozoides de la segunda porción de la cola del epidídimo y del conducto deferente, basados en los resultados de experimentos anteriores que indican que los espermatozoides de la cola de epidídimo son tan fértiles como los que se obtienen de un eyaculado (Senger, 1999). La congelación se realizó empleando el diluyente Triladyl-yema de huevo, el cual contiene un crioprotector penetrante, glicerol, antibióticos y ácido cítrico. El empajillando de las muestras se realizó en pajillas de 0.5 ml, dejando un periodo de equilibrio de 4 horas a 4°C, posteriormente se realizó la congelación exponiendo las pajillas a vapores de nitrógeno durante 20 minutos y finalmente sumergiéndolas en nitrógeno líquido, de igual manera se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C (Felipe-Pérez, 2009).

La descongelación se realizó empleando un baño María a 35°C, dentro del cual se sumergieron las pajillas recién sacadas del nitrógeno líquido y se dejaron por 20 seg (Martínez *et al.*, 2006).

Extracción de proteínas citoesqueléticas

La extracción de las proteínas del citoesqueleto espermático se realizó de dos maneras, una fue empleando un kit comercial para la extracción de proteínas citoesqueléticas (Cytoskeleton Protein Extraction Kit, Chemicon). Mientras que para la segunda forma de extracción se emplearon soluciones a base de Tris-NaCl-Tritón, Tris-EDTA, 25 mM DTT, 20% SDS, adicionados con inhibidores de proteasas (Complete™); cuyas concentraciones no están especificadas.

Extracción de proteínas con soluciones del kit comercial (Chemicón)

Después de haber extraído y lavado los espermatozoides de la segunda porción de la cola del epidídimo, junto con los espermatozoides extraídos del conducto deferente se procedió a extraer las membranas plasmáticas y acrosomales de los espermatozoides, empleando el detergente neutro Brij 36-T, como ya se menciona previamente en la sección de microscopía electrónica. Una vez que se obtuvieron espermatozoides con el citoesqueleto expuesto, fueron incubados con 1 ml de la solución del kit comercial de extracción de proteínas, identificado como Buffer C, adicionando a cada muestra 10µl del inhibidor de proteasas, incluido dentro del mismo kit. Se dejó actuar sobre la muestra durante 20 min, en agitación constante a 4°C. Inmediatamente después la muestra fue centrifugada durante 1 h a 11,000 rpm.

Las proteínas obtenidas en el sobrenadante fueron colocadas en un tubo de ensayo con acetona pura y fría en relación 3:1, se mantuvo la muestra a -20°C. La pastilla resultante fue resuspendida en 2 ml de la solución del kit de extracción identificada como Buffer W, manteniéndola en agitación constante a 4°C durante 6 min. De inmediato se realizó el proceso de centrifugación a 11,000 rpm durante 45 min. Posteriormente el sobrenadante obtenido se mezcló con el anterior sobre el tubo con acetona fría. El tubo con acetona y el extracto proteico se mantuvo a -20°C durante 18 h para precipitar las proteínas. Posteriormente el tubo se centrifugó durante 1h a 2500 rpm en una centrifuga clínica, para separar la acetona de la muestra, enseguida la acetona se decantó y las proteínas se resuspendieron en 100µl de agua destilada filtrada, guardando 30 µl de la muestra para su posterior cuantificación mediante el método de Lowry.

Extracción de proteínas con soluciones hipertónicas e isotónicas

Una vez que se obtuvieron los espermatozoides tanto frescos como descongelados, se realizaron 3 lavados con PBS a 35°C a 1200 rpm, posteriormente se concentraron a razón de 500×10^6 espermatozoides dentro de tubos Ependorf de 2 ml. Se retiraron las membranas plasmáticas con el detergente Brij 36-T (1.5% concentración final), incubando las muestras espermáticas durante 15 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm, se guardó el sobrenadante en tubos Ependorf de 0.5 ml que contenía las proteínas de las membranas plasmáticas y acrosomales, una alícuota se guardó para la cuantificación proteica, mientras que el resto de las proteínas se almacenó a -20 °C. La pastilla de espermatozoides restante fue lavada 3 veces con PBS a temperatura ambiente a 1200 rpm durante 5 min y resuspendida en una solución hipertónica con 100 µl del inhibidor de proteasas Complete, HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 0.5 mM, KCl 2.8 mM, EDTA 1 mM y NaCl 500 mM. La muestra se mantuvo en agitación constante sobre hielo durante 20 min. Posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm durante 45 min, y se guardó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con la solución isotónica compuesta de HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 0.5 mM, KCl 2.8 mM, EDTA 1 mM y NaCl 135.7 mM, a la cual se le agregó SDS al 0.1% y se mantuvo sobre hielo en agitación constante durante 6 min. Finalmente se centrifugó a 11,000 rpm durante 45 min. El sobrenadante se colocó en acetona fría y se dejó durante 14 h en refrigeración para precipitar las proteínas, posteriormente se decantó la acetona, las proteínas se resuspendieron en amortiguador de muestra y se hirvieron por 4 min a 100°C.

Extracción de proteínas con soluciones enriquecidas con DTT y SDS

Después de concentrar 500×10^6 de espermatozoides frescos y descongelados en tubos Ependorf de 2ml, ambas muestras fueron lavadas 3 veces con PBS a 35°C a 3,000 rpm durante 3 min. Enseguida se resuspendieron en 100 μ l del inhibidor de proteasas Complete y se le agregaron 900 μ l de Tris 50 mM, NaCl 154 mM, Tritón X-100 1%, pH 7.6. Enseguida las muestras se homogenizaron, disolviendo la pastilla espermática con la punta de una micropipeta. Se dejaron incubas sobre hielo durante 10 min y luego se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min dentro de una centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante que contenía las proteínas de las membranas se guardó a -70°C en alícuotas de 150 μ l. La pastilla espermática fue lavada 3 veces con Tris 50 mM, EDTA 2mM, pH 7.5 en la centrífuga refrigerada a 4°C a 3,000 rpm durante 3 min. Posteriormente la pastilla fue resuspendida en 100 μ l del inhibidor de proteasas, 600 μ l de Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5 y se le agregó 100 μ l de DTT 50 y 25 mM. Las muestras espermáticas en ésta suspensión se dejaron incubas durante 15 min a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente se les agregó 100 μ l de SDS al 20% y se incubaron durante 3 a 5 min. El siguiente paso fue sonicar las muestras durante 30 seg a una velocidad marcada en 60. Luego se realizó la centrifugación a 14,000 rpm durante 7 min dentro de la centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante conteniendo las proteínas citoesqueléticas se guardó a -70°C en alícuotas de 150 μ l.

Inmunodetección de actina y proteínas asociadas a actina en extractos proteicos del citoesqueleto espermático por western blot

La metodología empleada para alcanzar el cuarto objetivo, referente a la identificación de actina y algunas proteínas asociadas a actina en extractos proteicos de espermatozoides frescos y descongelados de bovino, fue la siguiente.

Los extractos de proteínas citoesqueléticas fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%, según la técnica descrita por Laemmli (1970). Una vez realizada la separación proteica se verificó la presencia de bandas proteicas empleando tinciones con plata o azul de Coomassie. Enseguida se procedió a realizar la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente las proteínas citoesqueléticas trasferidas a la membrana de nitrocelulosa, fueron reveladas con Rojo de Ponceau al 2%. Finalmente se realizó la inmunodetección por western blot, la cual consiste en realizar un bloqueo a la membrana de nitrocelulosa empleando una solución de bloqueo a base de PBS-leche descremada-Tween 20 al 0.2%. Después de 2 h de bloqueo se realizaron 5 lavados a las membranas con PBS-Tween 20 al 0.2% y se procedió a incubar las membranas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche, diluyéndolo con la solución de bloqueo original. Posteriormente las membranas fueron lavadas con PBS-Tween 20 al 0.2% y se colocó el anticuerpo secundario correspondiente, dejándolo actuar durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a realizar el revelado de las membranas empleando un kit de quemiluminiscencia de Amersham.

Mientras que para alcanzar el quinto objetivo, identificar la localización de actina F y algunas proteínas asociadas a actina en espermatozoides frescos y descongelados de bovino, se siguió la misma metodología

descrita para cubrir el segundo objetivo, con la diferencia de que se realizó en espermatozoides frescos y descongelados.

Finalmente, después de realizar el procedimiento descrito, se realizaron las comparaciones para dar cumplimiento al sexto objetivo.

Análisis estadístico

Para los resultados obtenidos de los conteos de espermatozoides epididimales se realizó la prueba de hipótesis de independencia empleando la Ji cuadrada, estableciéndose una significancia de $\alpha=0.05$. Posteriormente se realizó la prueba para la diferencia de proporciones con el estadístico Z, con una significancia de $\alpha=0.01$.

Los resultados tanto del western blot como de la inmunofluorescencia directa e indirecta, fueron considerados como positivos al ser observados en tres repeticiones.

VII. RESULTADOS

Observación de espermatozoides epididimales mediante microscopía electrónica

En la tabla 1, se observan los resultados obtenidos de las observaciones realizadas mediante microscopía electrónica de transmisión, correspondiente al conteo y clasificación de los espermatozoides extraídos de las diferentes regiones del epidídimo, valorando la etapa de desarrollo de la subestructura de la teca perinuclear.

Los espermatozoides fueron clasificados de acuerdo a la ausencia de la STP, o la presencia de la STP en diferentes etapas de desarrollo, que incluyen desde la observación del cúmulo de proteínas en la región ecuatorial formando lo que denominamos como la base del cinturón que dará origen a la formación de las grecas típicas de la STP del espermatozoide bovino, hasta la formación de grecas más avanzada. Por último se clasificaron a los espermatozoides cuya STP se encontraba completamente formada.

Región del Epidídimo	STP ausente	STP en formación	STP Completa	Total por región
Cabeza	133	17	0	150
Cuerpo	76	74	0	150
Cola 1	42	99	9	150
Cola 2	16	85	49	150
Conducto Deferente	0	32	118	150

Tabla 1. Clasificación y conteo de espermatozoides extraídos de las diferentes regiones del epidídimo (realizado mediante observaciones de microscopía electrónica). STP: subestructura de la teca perinuclear; STP ausente: clasificación dada a los espermatozoides que presentaron total ausencia de la STP; STP en formación: clasificación dada a los espermatozoides que presentaron diferentes etapas de desarrollo de la STP, desde estadios iniciales del cinturón de formación, hasta etapas avanzadas de las grecas típicas de la STP del bovino; STP completa: clasificación otorgada a los espermatozoides que presentaron la STP totalmente formada, típica de los espermatozoides maduros.

Se obtuvieron micrografías electrónicas de espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo del bovino, en las cuales se observaron espermatozoides con la TP expuesta, los cuales presentaron la STP en diferentes etapas de desarrollo. Primero se observaron los espermatozoides extraídos de la cabeza del epidídimo, en los cuales se observó ausencia completa de la STP y fueron clasificados como STP ausente, ver figura 9.

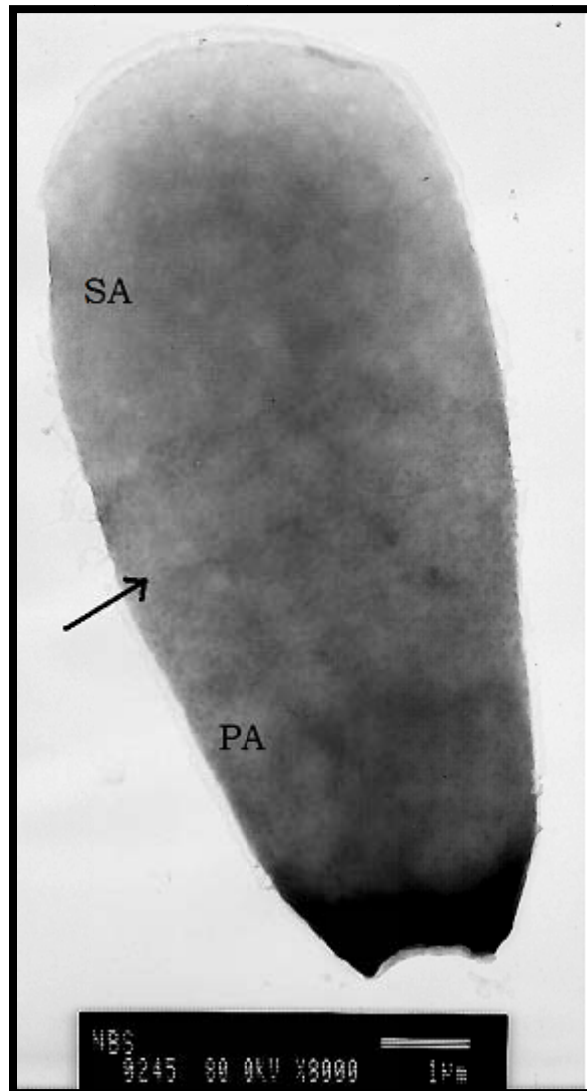


Figura 14. Ausencia de la STP. Micrografía electrónica de la cabeza de un espermatozoide de bovino mostrando el desarrollo de la STP. Espermatozoide extraído de la cabeza del epidídimo con la TP expuesta, nótese la ausencia completa de la STP en la zona ecuatorial señalada por la flecha. SA: región subacrosomal, PA: región postacrosomal. Barra= 1 μ m.

En la región del cuerpo del epidídimo se logró observar espermatozoides que presentaron la STP en diferentes etapas de desarrollo, desde aquellos en los que apenas se lograba visualizar una línea de formación del cinturón de grecas en la región ecuatorial de la TP, hasta los que ya presentaban una etapa de desarrollo avanzada, a los cuales se clasificó como STP en formación, En la figura 15 se observan las etapas de desarrollo temprano de la STP.

Las etapas de formación tempranas incluyen la formación de la línea que dará origen al cinturón de grecas típico de los espermatozoides del bovino, así como la formación de pequeñas papilas sobre la primera línea de formación del cinturón que son acumulación de proteínas de la TP.

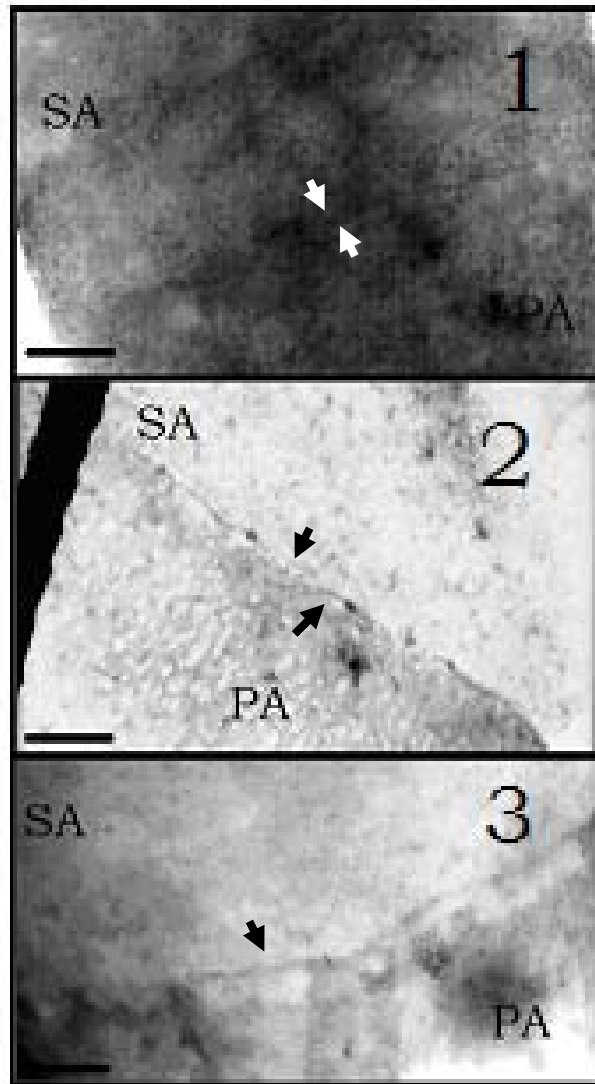


Figura 15. Etapas del desarrollo temprano de la STP. Micrografía electrónica mostrándo la región ecuatorial de las cabezas de los espermatozoides del bovino. Espermatozoides extraídos del cuerpo del epidídimo con la TP expuesta, nótese el desarrollo de la subestructura en diferentes estadios. 1) Cabeza espermática mostrándo una línea de formación que dará lugar al cinturón de la STP. 2) Cabeza espermática mostrándo un acúmulo de proteínas formando papilas sobre la línea de formación del cinturón de la STP. 3) Cabeza espermática mostrando una separación de la línea de formación del cinturón de la subestructura alineada paralelamente a la primera. SA: región subacrosomal de la TP, PA: región postacrosomal de la TP. Las puntas de flecha señalan la formación de la STP en la región ecuatorial. Barra = 500 nm.

Posteriormente se presentan espermatozoides con un desarrollo un poco más avanzado, al cual denominamos como etapa de desarrollo intermedio de la STP, en los cuales se observa la apertura del cinturón de grecas, pero de forma asimétrica, siendo las grecas como rectángulos alargados y poco definidos, ver figura 16.

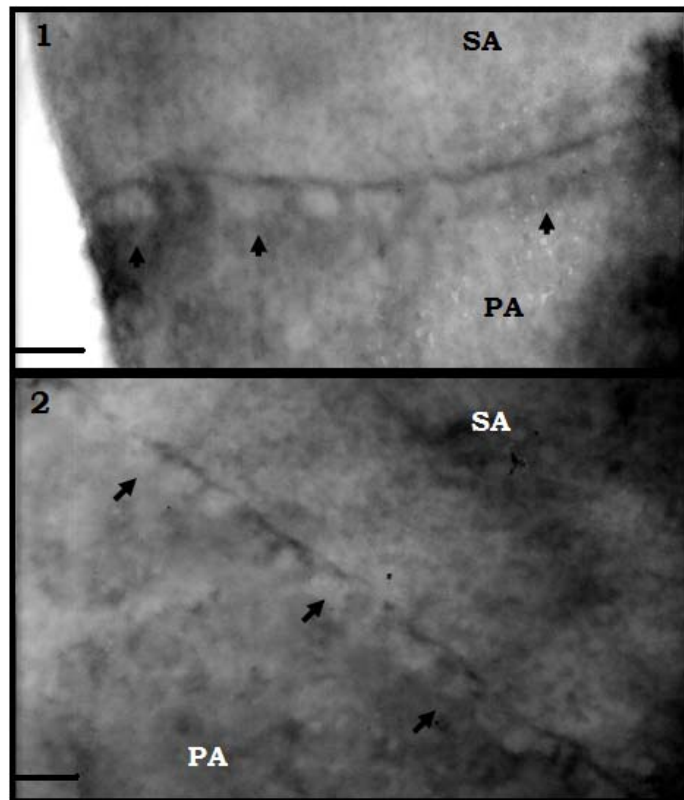


Figura 16. Etapas de desarrollo intermedio de la STP. Micrografía electrónica mostrando la región ecuatorial de las cabezas de los espermatozoides del bovino. Espermatozoides extraídos del cuerpo del epidídimo con la TP expuesta, nótese el desarrollo de la subestructura en diferentes estadios. 1) Cabeza espermática mostrando una línea de formación en forma perpendicular de proteínas alineándose de manera asimétrica entre la dos líneas de formación de cinturón de la STP. 2) Cabeza espermática mostrando la agregación de líneas perpendiculares formando las grecas cuadradas entre las dos líneas de formación del cinturón de la STP. SA: región subacrosomal de la TP, PA: región postacrosomal de la TP. Las puntas de flecha señalan la formación de la STP en la región ecuatorial. Barra = 500 nm.

En otros espermatozoides se observarán STP en etapas de desarrollo avanzadas, mostrándo las grecas en la región ecuatorial de la TP alineándose de forma más simétrica, pero sin llegar a la formación completa, ver figura 17.

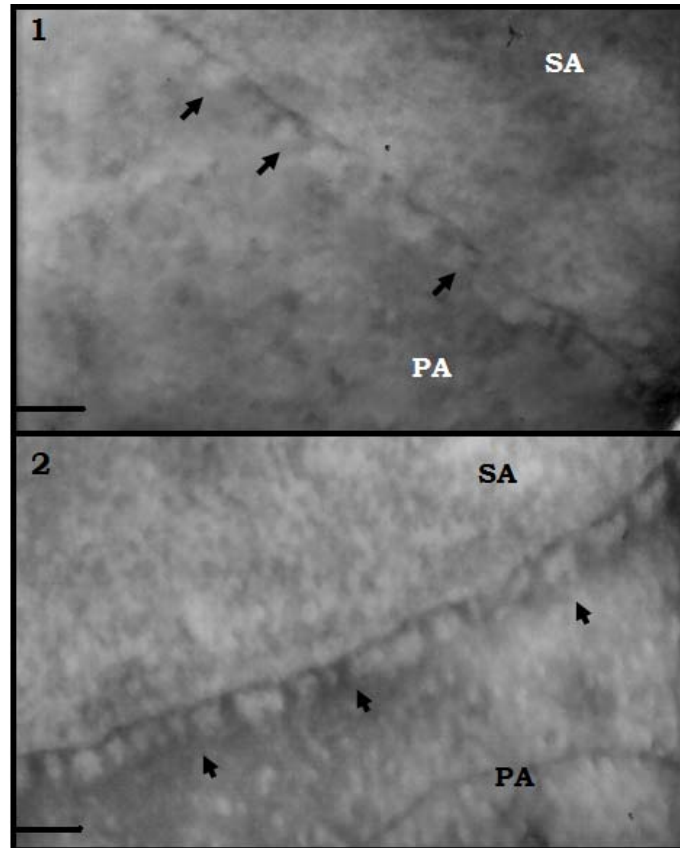


Figura 17. Etapas de desarrollo avanzado de la STP. Micrografía electrónica mostrándo la región ecuatorial de las cabezas de los espermatozoides del bovino. Espermatozoides extraídos del cuerpo y de la primera porción de la cola del epididimo con la TP expuesta. 1) Cabeza espermática mostrando formación avanzada del cinturón de formación de la subestructura de la teca perinuclear. 2) Cabeza espermática mostrando a la subestructura con la típica forma del cinturón de grecas de los espermatozoides maduros. SA: región subacrosomal de la TP, PA: región postacrosomal de la TP. Las puntas de flecha señalan la formación de la STP en la región ecuatorial. Barra = 500 nm.

Finalmente se obtuvieron las micrografías de los espermatozoides de la segunda porción de la cola del epidídimo, los cuales presentaron la STP que se observó totalmente formada, cuya clasificación fue de STP completa, ver figura 18.

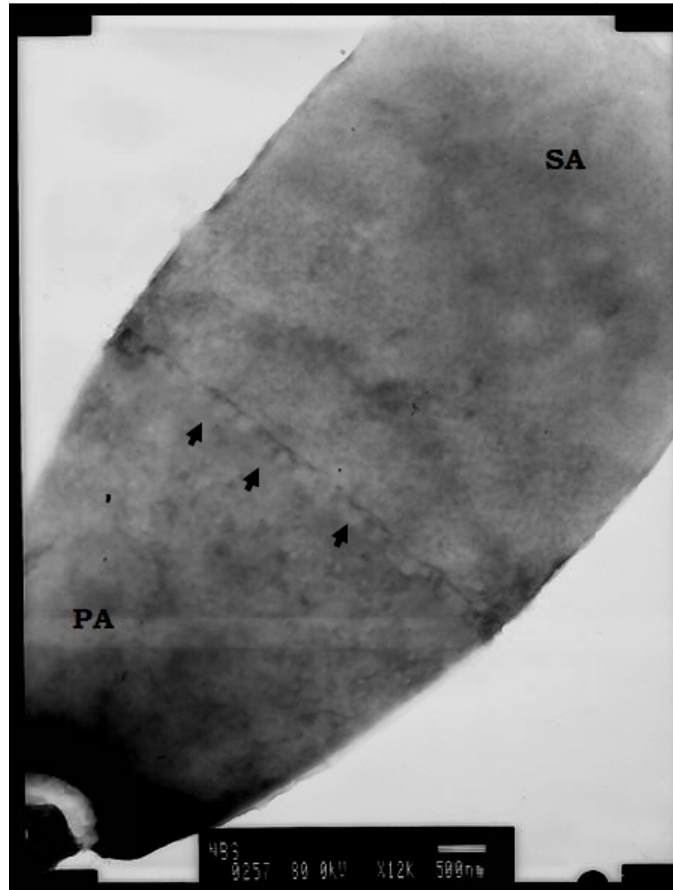


Figura 18. STP completa. Micrografía electrónica mostrando la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide del bovino. Espermatozoide extraído de la segunda porción de la cola del epidídimo con la TP expuesta, mostrando a la subestructura con la típica forma del cinturón de grecas de los espermatozoides maduros. SA: región subacrosomal de la TP, PA: región postacrosomal de la TP. Las puntas de flecha señalan la formación de la STP en la región ecuatorial. Barra = 500 nm.

Una vez obtenidos los conteos se realizó una prueba estadística, la Ji cuadrada. Derivado de la prueba estadística, se observó que el desarrollo de la STP depende de la región del epidídimo en donde se encuentren los espermatozoides ($P= 0.000$). Al realizar la comparación de las

proporciones de espermatozoides con la STP en diferentes etapas de desarrollo obtenidas en cada región, se encontró diferencia entre las proporciones de STP ausente entre regiones ($P = 0.01$), así como una diferencia entre las proporciones de STP completa entre regiones ($P = 0.01$) (Tabla 2).

Región del epidídimo	Desarrollo de la STP		
	Ausente	En formación	Completa
Cabeza	0.88a	0.11a	0.00a
Cuerpo	0.51b	0.49b	0.00a
Cola 1	0.28c	0.66b	0.06b
Cola 2	0.10d	0.57bc	0.33c
Conducto deferente	0.00e	0.21d	0.79d

Tabla 2. Proporciones espermáticas obtenidas de las diferentes regiones del epidídimo del bovino. Se empleó la prueba para la diferencia de dos proporciones. Estadístico Z. Literales diferentes dentro de la misma columna indican diferencia estadística entre las regiones ($P=0.01$). STP: subestructura de la teca perinuclear.

Posteriormente se graficaron los datos obtenidos para visualizar los resultados con mayor facilidad, lo cual puede ser observado en las gráficas, donde se observa la distribución de los espermatozoides con STP en diferentes etapas de desarrollo, representando los datos obtenidos en una gráfica de frecuencias relativas, ver figura 19.

Se puede apreciar que de los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del epidídimo, casi el 100% carece de la subestructura, es decir que presentaron ausencia total de la STP. Mientras que los espermatozoides encontrados en el cuerpo del epidídimo son los que representan al mayor porcentaje de células que presentan la STP en diferentes etapas de desarrollo, desde las etapas iniciales hasta etapas de desarrollo avanzado de la STP. A partir de la segunda porción de la cola incrementa el porcentaje de espermatozoides que presentan la STP completa.

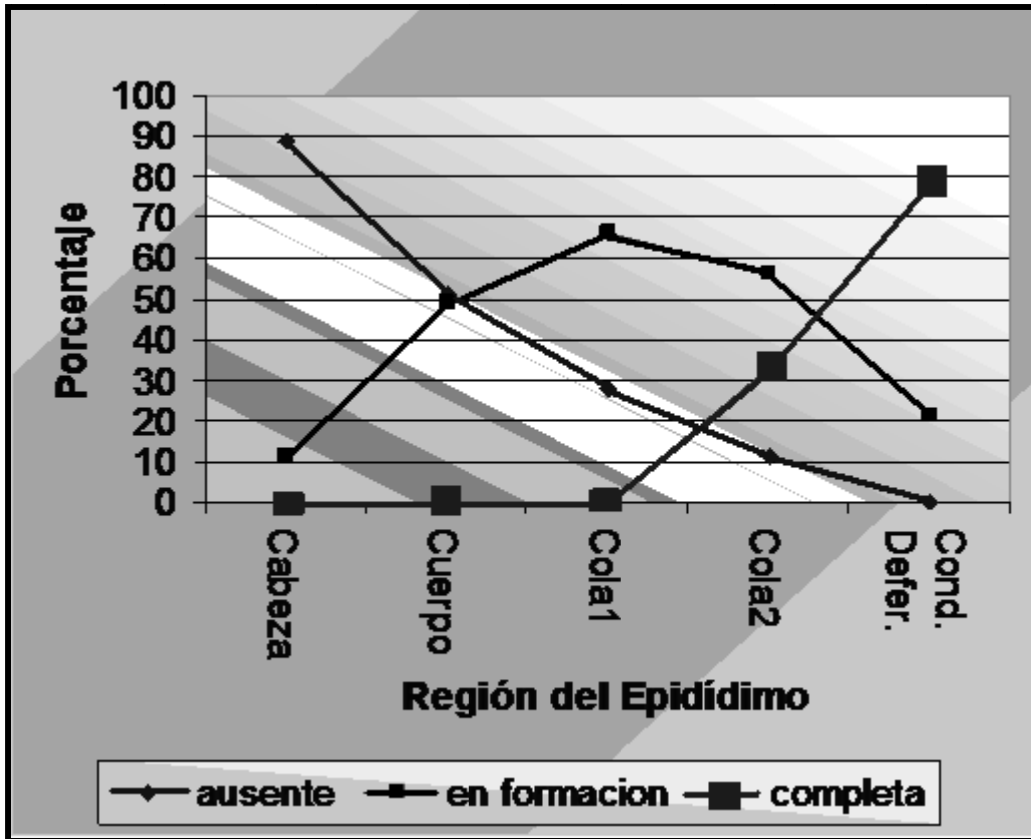


Figura 19. Gráfica de frecuencias relativas. Se muestra el porcentaje del desarrollo de la STP en las diferentes regiones del epidídimo.

Detección de actina en espermatozoides epididimales mediante fluorescencia

Mediante el empleo de faloidina-TRITC, se logró localizar actina F en los todos los espermatozoides extraídos de las diferentes regiones del epidídimo. La fluorescencia se observó en la cabeza espermática, principalmente en la región ecuatorial y postacrosomal, mientras que en el flagelo fue en la pieza media y principal.

El patrón de localización de actina F en los espermatozoides epididimales no sufrió ningún cambio de localización, sin embargo se observaron diferencias en cuanto a la intensidad de la fluorescencia, siendo mucho más intensa en los espermatozoides extraídos del cuerpo, en los que se observó fluorescente toda la cabeza, aunque con mayor intensidad en la región postacrosomal y en la inserción con el flagelo. La intensidad de la fluorescencia disminuyó conforme los espermatozoides alcanzaban las regiones más distantes del epidídimo, es decir, conforme avanzaban hacia el conducto deferente, ver figura 20.

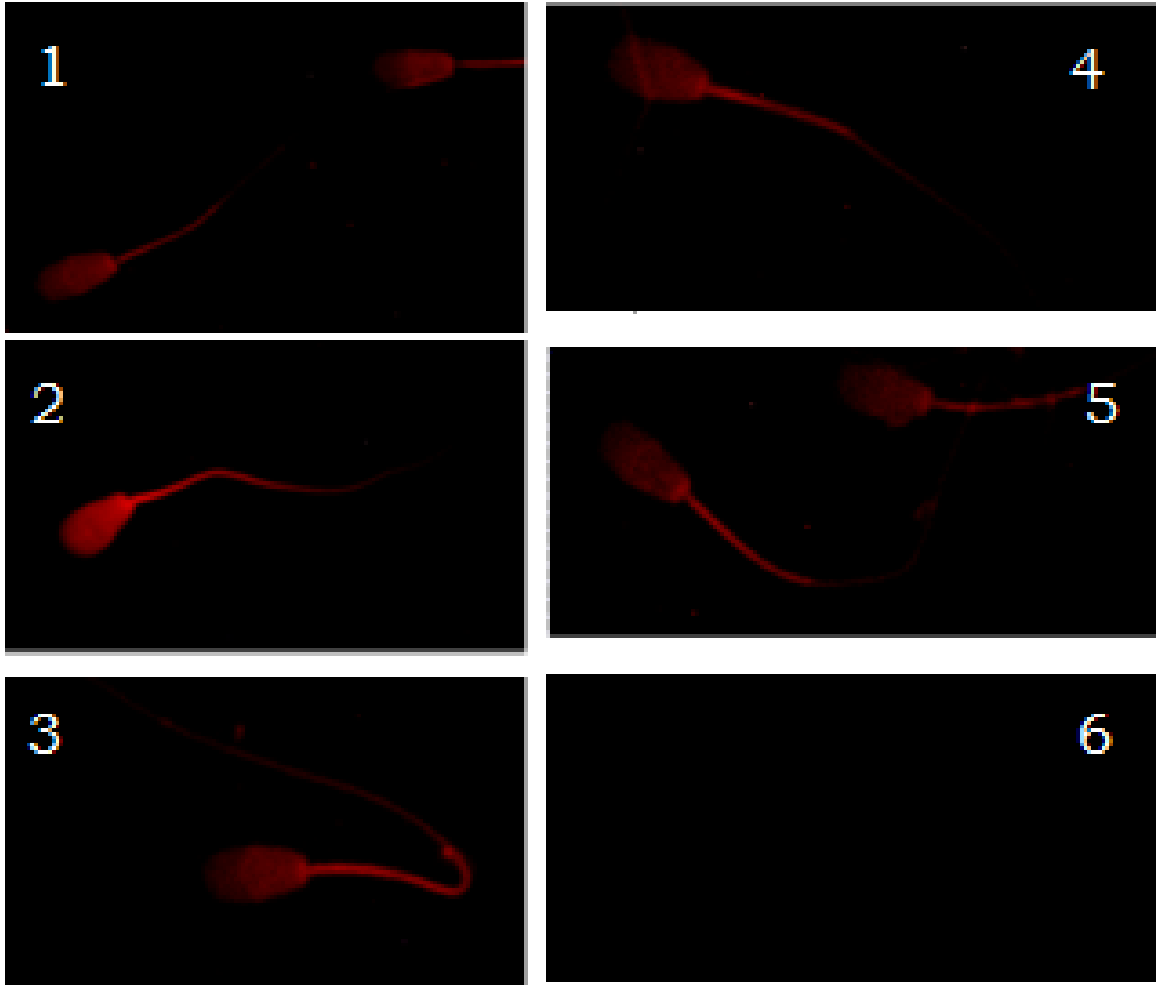


Figura 20. Localización de actina F en espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo. 1) Espermatozoides extraídos de la cabeza, se observó fluorescencia en la zona ecuatorial, en el cáliz y con mayor intensidad en la base de la región postacrosomal, también se observó fluorescencia en la pieza media y principal del flagelo. 2) Espermatozoides extraídos del cuerpo, se nota un incremento en la fluorescencia, observándose en toda la cabeza, principalmente en la región postacrosomal en la inserción con el flagelo y en la misma localización del flagelo que en los espermatozoides extraídos de la cabeza. 3) Espermatozoides extraídos de la primera porción de la cola, se observa fluorescencia en la región postacrosomal y en el flagelo, similar a lo observado en cuerpo, pero con menor intensidad. 4) Espermatozoides extraídos de la segunda porción de la cola, se observa el mismo patrón de localización, pero con un decremento en la intensidad de la fluorescencia. 5) Espermatozoides extraídos del conducto deferente, se observa el mismo patrón de localización que en los de la segunda porción de la cola. 6) Espermatozoides control, sin faloidina-TRITC, no se observó fluorescencia.

Extracción de proteínas con soluciones del kit comercial para extracción de proteínas citoesqueléticas

El extracto de proteínas del citoesqueleto espermático tanto de muestras frescas como descongeladas fue cuantificado mediante el método de Lowry, obteniendo un promedio de 81.6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteínas en las muestras frescas, mientras que en las muestras descongeladas se logró extraer 144 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Mediante preparaciones de microscopía electrónica se verificó el proceso de extracción proteica en espermatozoides frescos y descongelados, siendo notorio que en los espermatozoides descongelados fue posible extraer una cantidad mucho mayor de los componentes citoesqueléticos que en los espermatozoides frescos. Se pudo observar que en la TP de los espermatozoides frescos se lograba mantener la STP, aunque con ciertas alteraciones; sin embargo, en los espermatozoides descongelados la STP era extraída en su totalidad, ver figura 21.

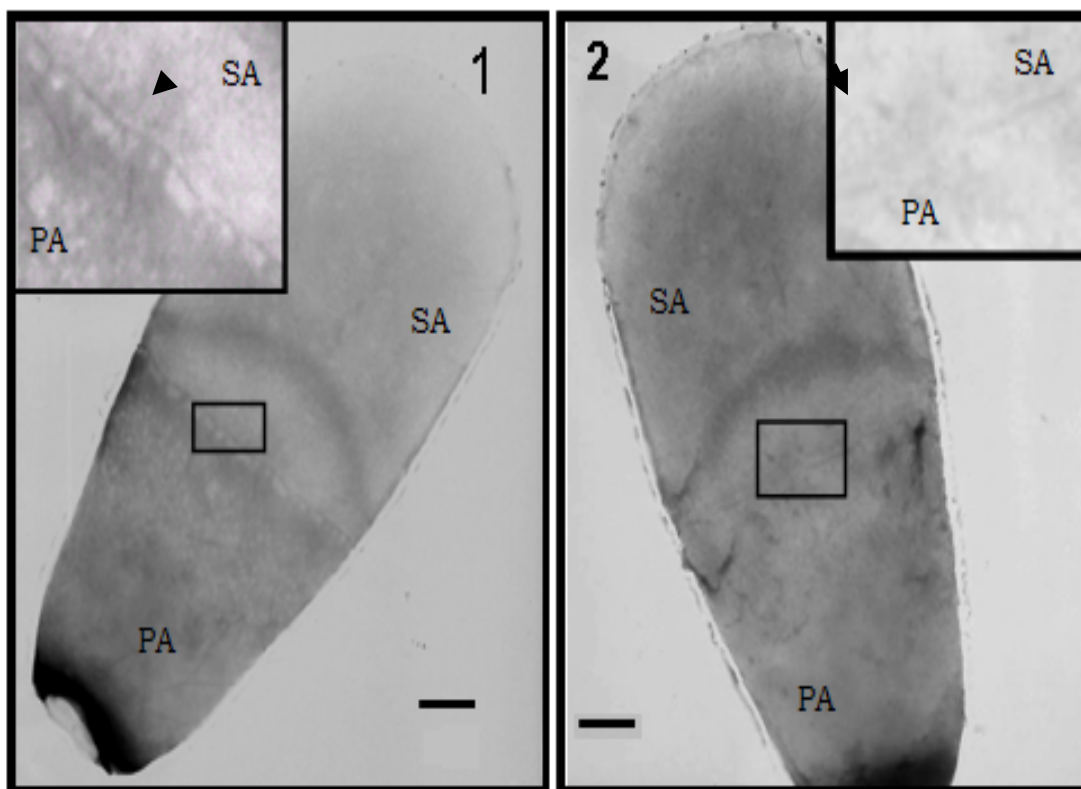


Figura 21. Cabezas espermáticas antes y después del proceso de de extracción de proteínas con un kit comercial de extracción de proteínas citoesqueléticas. Micrografías electrónicas. 1) Espermatozoides frescos, nótese en el inserto la presencia de la STP. 2) Espermatozoides descongelados, nótese en el inserto las alteraciones a nivel de la STP, cuyas proteínas fueron extraídas en una cantidad mucho mayor que en los espermatozoides frescos. SA: región subacrosomal. PA: región postacrosomal. Los cuadros en la región ecuatorial muestran la STP. Las puntas de flecha señalan la STP en la región ecuatorial. Barra = 1 μ m.

Extracción de proteínas con soluciones hiper e isotónicas

Al precipitar las proteínas obtenidas con éste método se obtuvo una cantidad visiblemente grande de proteínas tanto de la muestra de espermatozoides frescos como descongelados. Al realizar la separación proteica mediante electroforesis SDS-PAGE, se observó una migración aberrante de las proteínas, las cuales formaron picos hacia ambos lados del cátodo desde el inicio del sitio de migración. Debido a que la separación de proteínas fue tan irregular no se procedió a realizar la transferencia a papel de nitrocelulosa para el western blot.

Extracción de proteínas con soluciones de DTT y SDS

Mediante el empleo de soluciones con DTT y SDS se obtuvo una cantidad lo suficientemente buena de proteínas de tanto de espermatozoides frescos como de descongelados. No obstante, cuando se realizó la extracción proteica empleando una concentración al 50mM de DTT se observó que los espermatozoides tanto de las muestras frescas como descongeladas fueron disueltos en su totalidad. En contraste, al disminuir la concentración de DTT al 25mM, se observó que en los espermatozoides frescos eran disueltos la mayoría de los flagelos, quedando aproximadamente un remanente del 1 al 2%, y la TP se extraía en su totalidad, quedando los núcleos desnudos. Por otra parte, al realizar la extracción proteica en los espermatozoides descongelados, se observó que el 100% de los flagelos quedaron disueltos empleando la concentración menor del DTT, sin embargo las cabezas espermáticas no sólo perdieron las proteínas componentes de la TP, sino que además perdieron su típica morfología, observándose más anchos en la región postacrosomal y de un tamaño visiblemente mayor que los espermatozoides frescos, ver figura 22.

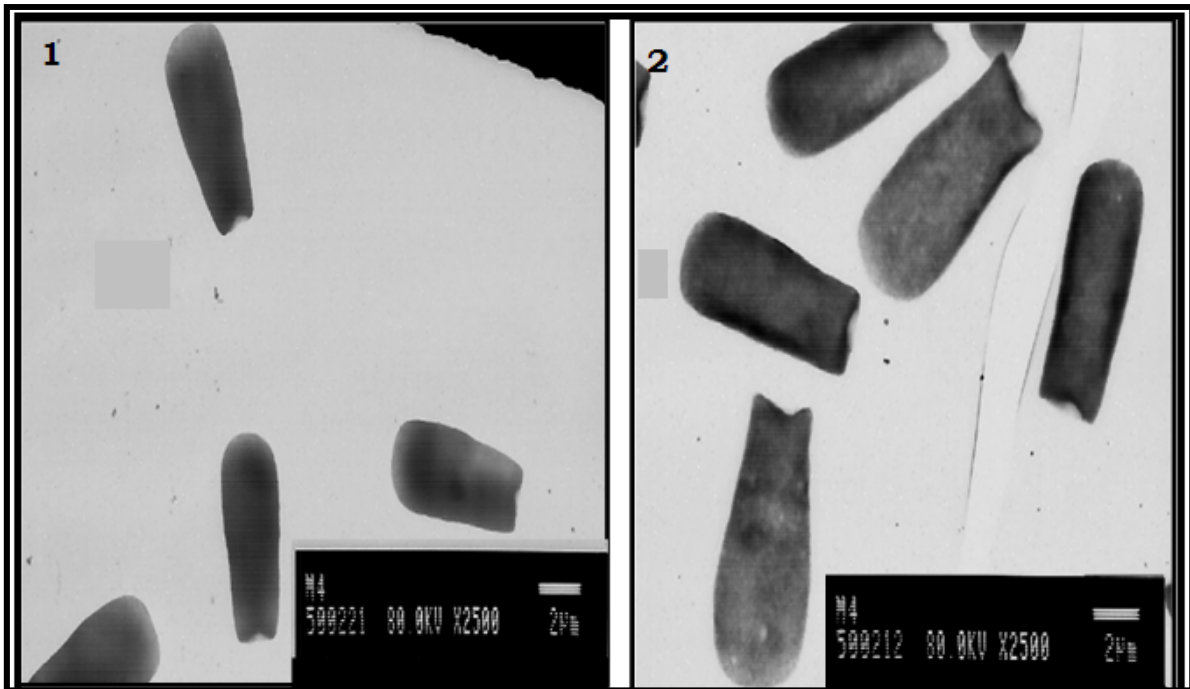


Figura 22. Cabezas espermáticas después del proceso de extracción de proteínas citoesqueléticas empleando soluciones con DTT 25 mM. Micrografías electrónicas. 1) Espermatozoides frescos, nótese la presencia de núcleos desnudos, y los cambios morfológicos de algunas cabezas espermáticas. 2) Espermatozoides descongelados, nótese el gran aumento del tamaño de las cabezas así como los graves cambios morfológicos, especialmente en la región postacrosomal.

Debido a que la adición del DDT, interfiere para lograr la cuantificación de proteínas, sólo fue posible determinar la concentración proteica en los extractos de membrana. Después de realizar el método de cuantificación de proteínas de Markwell, se obtuvieron 2.971 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína en el extracto de membranas de espermatozoides frescos, comparado con 4.969 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del extracto de espermatozoides descongelados.

Inmunodetección de actina y proteínas asociadas a actina mediante la técnica de western blot

Empleando el anticuerpo monoclonal anti actina, ya sea diluido (1:5000, 1:2500, 1:500, 1:100 y 1:50) o colocándolo directamente sobre la membrana de nitrocelulosa, no se logró detectar ninguna banda al momento de revelar el negativo. No obstante, al emplear el anticuerpo policlonal anti actina a una dilución de 1:75 fue posible visualizar una banda correspondiente a los 43 kDa, tanto en las muestras de membrana, como en los extractos proteicos del citoesqueleto de espermatozoides frescos y descongelados. Se observó una diferencia marcada en cuanto a la intensidad del marcaje, siendo siempre mucho más intensas las bandas observadas en las muestras de espermatozoides descongelados.

En la figura 23 se muestra el patrón electroforético obtenido de los extractos de proteína de las membranas y del citoesqueleto de espermatozoides frescos y descongelados.

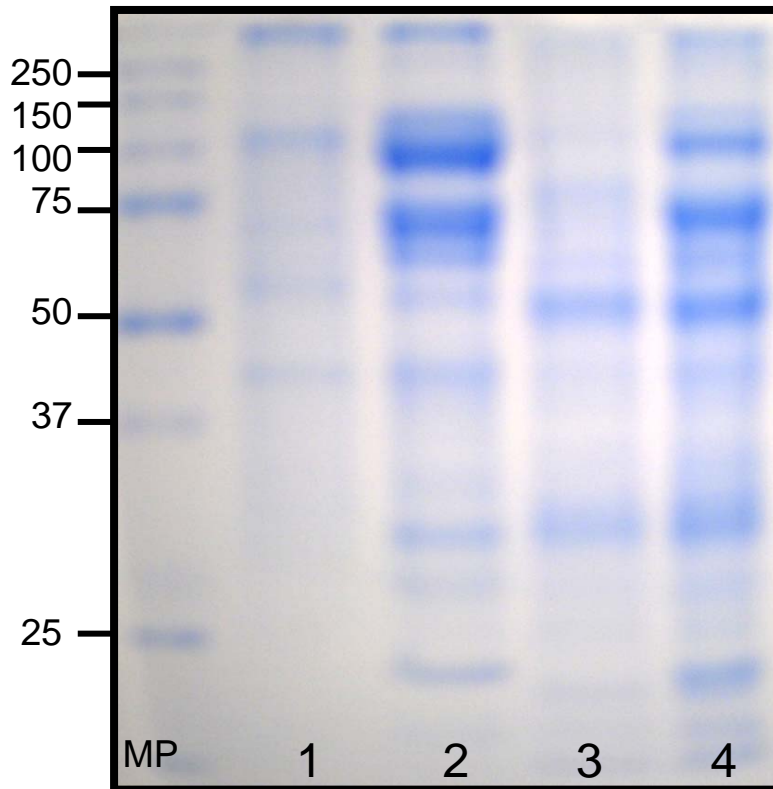


Figura 23. Patrón electroforético de las proteínas extraídas de espermatozoides de bovino frescos y descongelados. La extracción se realizó con el protocolo de soluciones enriquecidas con DTT y SDS. MP: marcadores estándar del peso molecular de proteínas en kDa . Línea 1. Extracto proteico de membranas plasmáticas y acrosomales de espermatozoides frescos. Línea 2. Extracto proteico de membranas plasmáticas y acrosomales de espermatozoides descongelados. Línea 3. Extracto de proteínas del citoesqueleto de espermatozoides frescos. Línea 4. Extracto de proteínas del citoesqueleto de espermatozoides descongelados. Nótese que una mayor cantidad de proteínas son extraídas de los extractos de espermatozoides descongelados.

El resultado del western blot para actina reveló una banda proteica con una masa molecular de 43 kDa, la cual coincide con el peso molecular de actina, la cual se obtuvo al utilizar un anticuerpo policlonal 1:75 diluido en PBS-BSA al 0.1%, y se colocó un anticuerpo secundario anti-conejo 1:5000, se cargó el equivalente a las proteínas extraídas de 20×10^6 de espermatozoides, ya sea frescos o descongelados, ver figura 24.

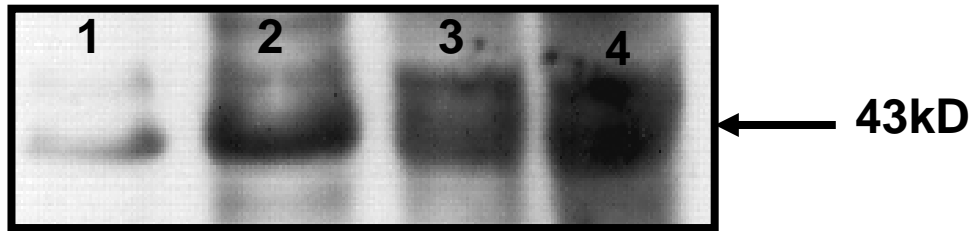


Figura 24. Detección de actina en espermatozoides frescos y descongelados de bovino mediante western blot. Línea 1. Extracto proteico de membranas plasmáticas y acrosomales de espermatozoides frescos. Línea 2. Extracto proteico de membranas plasmáticas y acrosomales de espermatozoides descongelados. Línea 3. Extracto de proteínas de citoesqueleto de espermatozoides frescos. Línea 4. Extracto de proteínas de citoesqueleto de espermatozoides descongelados. Nótese una mayor concentración proteica en las bandas de los extractos de espermatozoides descongelados.

Mediante las técnicas de western blot e inmunofluorescencia indirecta empleadas en el presente trabajo, no fue posible lograr la detección de las proteínas ARP2, ARP3 y WASP.

Sin embargo, al emplear el anticuerpo policlonal anti distrobrevina en una dilución de 1:3000 se detectó una banda cercana a los 35 kDa en las muestras de membrana obtenidas de espermatozoides frescos y descongelados, siendo más intenso el marcaje en la banda del extracto de los espermatozoides descongelados. En contraste, al observar las bandas del extracto proteico del citoesqueleto, la banda del citoesqueleto de los espermatozoides frescos mostró un marcaje de mayor intensidad que la del extracto de los descongelados, en los que ésta apenas era visible, ver figura 25.

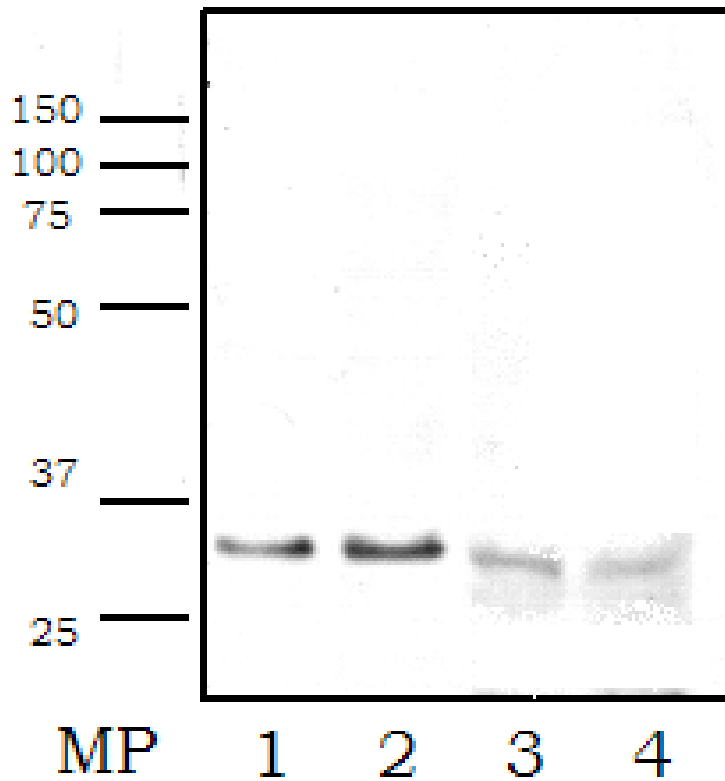


Figura 25. Inmunodetección de distrobrevina mediante western blot. Línea 1. Extracto proteico de membranas plasmáticas y acrosomales de espermatozoides frescos. Línea 2. Extracto proteico de membranas plasmáticas y acrosomales de espermatozoides descongelados. Línea 3. Extracto de proteínas de citoesqueleto de espermatozoides frescos. Línea 4. Extracto de proteínas de citoesqueleto de espermatozoides descongelados. Se observó una banda menor a los 37 kDa en todos los extractos proteicos, sin embargo se notó un marcaje de mayor intensidad en el extracto de membranas de espermatozoides descongelados, en cambio, en el extracto citoesquelético de los espermatozoides descongelados se observa un decremento en la intensidad de la marca. MP: marcadores de peso molecular estándar en kDa.

Detección de actina en espermatozoides frescos y descongelados mediante fluorescencia

En las muestras de espermatozoides frescos se detectó actina F tanto en la cabeza como en el flagelo, observándose con mayor intensidad en la región ecuatorial y post acrosomal de la cabeza, justo en el sitio de inserción con el flagelo. En contraste, en los espermatozoides descongelados se perdió la fluorescencia de la región ecuatorial, y disminuyó notablemente en la región postacrosomal, justo en el sitio de inserción flagelar. Mientras que en la pieza media y principal del flagelo no sólo se detectó una disminución en la intensidad de la fluorescencia, sino que se observó un patrón fluorescente similar a un puntillado, ver figura 26.

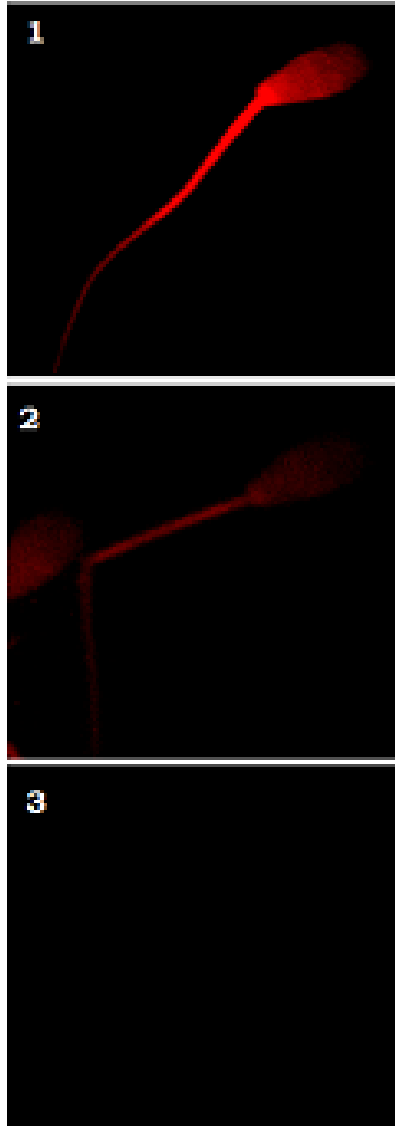


Figura 26. Localización de actina F mediante fluorescencia con faloidina-TRITC. Se muestran espermatozoides desprovistos de membranas, exponiendo el citoesqueleto. 1) Espermatozoides frescos; se observa con mayor intensidad el marcaje de actina F en la región ecuatorial y postacrosomal de la TP, justo en la inserción con el flagelo y en la pieza media y principal del flagelo 2) Espermatozoides descongelados; se observa un decremento marcado de la fluorescencia de actina F en la TP al igual que en el flagelo. 3) Espermatozoides control, se omitió la incubación con faloidina-TRITC. Además del decremento en la intensidad de la fluorescencia tanto en la cabeza como en el flagelo, se observa un patrón de fluorescencia en forma de puntillado en los espermatozoides descongelados de bovino.

Inmunolocalización de proteínas asociadas a actina en el citoesqueleto espermático

Al emplear los anticuerpos anti ARP2, anti ARP3 y anti WASP no se logró la detección de estas proteínas, mediante inmunodetección indirecta, en los espermatozoides frescos ni en los descongelados.

Mientras que al emplear el anticuerpo anti distrobrevina, en los ensayos de inmunodetección indirecta, se observó la localización de ésta proteína en la cabeza de los espermatozoides frescos, tanto en la región subacrosomal como en la región ecuatorial. Además también fue posible identificar el patrón de fluorescencia a lo largo del flagelo, siendo más notable la marca de distrobrevina en la pieza media y principal de los espermatozoides frescos. No obstante, cuando se observaron las muestras de espermatozoides descongelados, se perdió completamente el patrón de fluorescencia de la distrobrevina en la cabeza, aunado a ello, se observó un decremento en la intensidad de la fluorescencia en todo el flagelo, observándose nuevamente el patrón de fluorescencia en forma de puntilleo, ver figura 27.

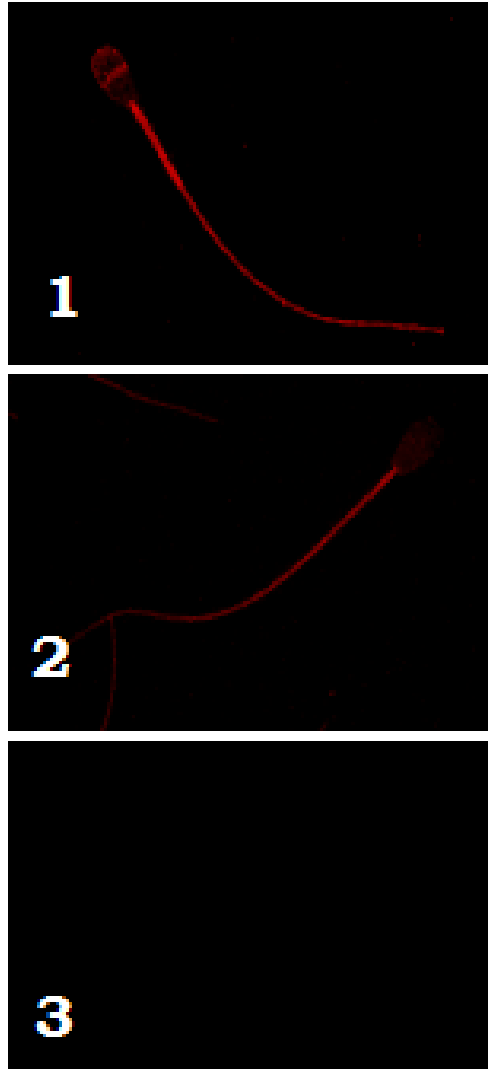


Figura 27. Localización de distrobrevina mediante inmunofluorescencia indirecta. Se muestran espermatozoides de bovino desprovistos de membranas, exponiendo el citoesqueleto. 1) Espermatozoides frescos; se observa la fluorescencia en la región ecuatorial y sub acrosomal de la TP, y en todo el flagelo, aunque con mayor intensidad en la pieza media. 2) Espermatozoides descongelados; la fluorescencia se ha perdido totalmente en la TP y la intensidad disminuyó en el flagelo, sobre todo en la pieza media. 3) Espermatozoides control, se omitió el anticuerpo anti distrobrevina. Nótese que además del decremento en la intensidad de la fluorescencia en los espermatozoides descongelados de bovino, en el flagelo se observa un patrón de fluorescencia en forma de puntillito.

VIII. DISCUSION

Detección de actina en espermatozoides epididimales mediante fluorescencia

Anatómicamente el epidídimo se divide en tres regiones, cabeza, cuerpo y cola (Senger, 1999). Sin embargo, en el presente trabajo se realizó una subdivisión de la cola del epidídimo, debido a que justo a la mitad de la cola se observa un drástico incremento en el diámetro tubular. Además, derivado de éstas observaciones tanto de microscopia electrónica como al microscopio óptico, fue posible determinar que existen diferencias estructurales y de motilidad entre los espermatozoides de la primera y de la segunda porción de la cola, aunque la evaluación de la motilidad se realizó aleatoriamente y de manera subjetiva por un mismo observador. Siendo los espermatozoides de la segunda porción los que presentan una motilidad mayor, similar a la reportada para los espermatozoides eyaculados (cercana al 70%). En lo que a la ultraestructura se refiere, los espermatozoides extraídos de la segunda porción de la cola son los que presentan un porcentaje mayor de STP completas, lo cual al correlacionarlo con el porcentaje de motilidad que presentan podría ser indicativo de un estado de madurez avanzado. Nuestras observaciones coinciden con lo descrito por otros autores (Azamar, et al., 2007), quienes reportan que existe un incremento en la motilidad conforme los espermatozoides van adquiriendo la madurez, y con ello la capacidad de fertilizar.

Aún cuando los epidídimos obtenidos se evaluaron en cuanto al tamaño y contenido espermático en la cola para asegurar que se tratara de muestras pertenecientes a toros sexualmente activos, por tratarse de animales de rastro, no se contó con datos del manejo que los toros hayan tenido y que pudieran afectar la calidad espermática. Sin embargo en la actualidad

existen muchos trabajos de investigación cuyos resultados son aceptados aún tratándose de muestras epididimales de toros que provienen de rastro.

La desventaja que los espermatozoides de cola y conducto deferente tendrían para su congelación con respecto a los espermatozoides eyaculados es que no entraron en contacto con líquido seminal, el cual se sabe que contiene los factores descapacitantes, lo cual haría que los espermatozoides no eyaculados fueran más sensibles al proceso de criocapacitación inducida por el proceso de congelación-descongelación.

Los resultados de la localización de actina-F tanto en la cabeza (en la región ecuatorial y postacrosomal) como en el flagelo de los espermatozoides epididimales de bovino, observados en el presente estudio, difieren de los hallazgos reportados por Howes, *et al.*, (2001), quienes reportan la localización de actina sólo en la región de la pieza principal del flagelo en espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo del bovino.

No obstante, al observar la figura que los mencionados autores presentan del western blot, sus resultados coinciden con lo que el estudio presente reporta, puesto que mediante localización de actina-F con faloidina-TRITC, nosotros observamos un decremento en la intensidad de la fluorescencia de actina, conforme los espermatozoides avanzan hacia las regiones más distantes del epidídimo.

En los espermatozoides eyaculados, Howes, *et al.* (2001), localizaron actina en su forma monomérica en la cabeza espermática y también se observa actina localizada en la región ecuatorial, aunque no reportan la localización de actina monomérica en el flagelo. Sin embargo, al emplear faloidina-TRITC, no pudieron detectar actina-F en los espermatozoides eyaculados, solamente la lograron observar en la región postacrosomal de

los espermatozoides que ya habían sufrido la reacción acrosomal. Lo anterior difiere por completo con nuestros hallazgos, ya que logramos identificar actina-F en espermatozoides inmaduros, así como en espermatozoides maduros tanto en la cabeza espermática, especialmente en la región ecuatorial y en la postacrosomal justo en la inserción flagelar, como en la pieza media y principal del flagelo.

Los resultados de la localización de actina F en espermatozoides epididimales y el decremento en la intensidad de la fluorescencia conforme los espermatozoides avanzan hacia la cola del epidídimo, apoyan los hallazgos de Azamar, *et al.* (2007) quienes reportan que durante la maduración existe un decremento gradual en la concentración de actina F en los espermatozoides del cobayo.

Mientras que los hallazgos de actina F en la TP de espermatozoides epididimales de bovino, soportan los reportes de Moreno Fierros, *et al.*, 1995, quienes afirman que actina participa en la morfogénesis de la cabeza espermática.

Extracción de proteínas citoesqueléticas con soluciones del kit comercial

La técnica empleada para lograr la extracción de proteínas del citoesqueleto espermático resultó más efectiva para lograr la extracción de las proteínas de los espermatozoides descongelados que de los frescos, lo cual se pudo constatar mediante las observaciones de microscopía electrónica, donde se muestra que en los espermatozoides frescos, a pesar de que la TP está perdiendo proteínas, aún es posible observar las grecas en la región ecuatorial, lo que corresponde a la STP. En contraste, al observar la TP de los espermatozoides descongelados, se observa que el proceso de extracción logró retirar por completo la STP. Aunado a ello, al

cuantificar las proteínas extraídas de ambas muestras espermáticas se confirmó que se logró extraer 1.76 veces más proteína de los espermatozoides descongelados que de los frescos. Lo cual constató las observaciones previas reportadas por Felipe-Pérez (2006) y Martel (2006), referente a que las proteínas de los espermatozoides descongelados son mucho más sensibles al proceso de extracción, posiblemente debido a que al ser elementos termosensibles, el proceso de criopreservación provoca la despolimerización de las proteínas citoesqueléticas.

Extracción de proteínas citoesqueléticas con soluciones hipertónicas e isotónicas

Aún cuando el método de extracción de proteínas con soluciones hipertónicas e isotónicas resultó bastante efectivo para obtener grandes cantidades de proteína citoesquelética de los espermatozoides de bovino, el hecho de precipitar las proteínas con acetona afectó la obtención de una muestra apropiada para realizar la electroforesis, debido a que además de precipitar a las proteínas, precipitó también las sales contenidas en las soluciones empleadas para lograr la extracción. Una solución para tal problema podría ser el dializar las proteínas mediante el empleo de membranas, tal como lo realizaron Oko y Maravei (1994) al purificar proteínas de la TP del espermatozoide bovino. Sin embargo, al momento de correr los experimentos no se disponía de tales membranas, por lo que no fue una opción viable y se optó por cambiar el método de extracción.

Extracción de proteínas citoesqueléticas con soluciones de DTT y SDS

Al realizar la extracción proteica empleando soluciones enriquecidas con DTT y SDS se observó que empleando el DTT a una concentración de 50 mM, los espermatozoides bovinos fueron solubilizados en su totalidad, sin embargo al disminuir la concentración de DTT al 25 mM, la estructura del

citoesqueleto espermático que demostró tener más resistencia a la extracción fue la TP, en contraste la mayoría de las estructuras flagelares se disuelven a esta concentración. Al comparar la extracción de proteínas citoesqueléticas en los espermatozoides frescos y descongelados, se observó que las proteínas de los espermatozoides descongelados son mucho más sensibles al proceso de extracción. Además, el hecho de observar mediante microscopía electrónica la pérdida de la morfología de la cabeza espermática después de haber realizado la extracción, indica que el proceso de criopreservación no solamente altera gravemente a la estructura citoesquelética, es decir, daña gravemente a las proteínas espermáticas, sino que además al alterar a las proteínas de la TP se pierden las funciones de la misma, entre ellas la de brindar forma a la cabeza espermática y la protección del material genético.

Inmunodetección de actina en extractos proteicos del citoesqueleto espermático por western blot

En los extractos proteicos de las membranas plasmáticas y acrosomales, así como en los extractos de proteínas citoesqueléticas de espermatozoides frescos y descongelados de bovino, al emplear un anticuerpo policlonal anti actina, se logró la detección de una banda proteica ubicada en los 43 kDa que corresponde a lo reportado para la proteína actina. Lo anterior se detectó en todos los extractos analizados, es decir fue visible tanto en los extractos de membranas plasmáticas y acrosomales, como en los extractos de proteínas del citoesqueleto de espermatozoides frescos y descongelados. No obstante el hecho de haber detectado bandas con una mayor intensidad en los extractos de las muestras de semen descongelado (membrana y citoesqueleto), sugiere que en los espermatozoides descongelados la proteína actina se vuelve mucho más sensible al proceso de extracción, lo cual a su vez indica que el proceso de criopreservación de los espermatozoides bovinos, está alterando al citoesqueleto de actina.

En contraste, Howes *et al.* (2001), empleando anticuerpos monoclonales anti actina, detectaron una banda de 45 kDa en los espermatozoides extraídos del testículo, sin embargo, la intensidad de ésta banda de actina va en decremento en los espermatozoides eyaculados del bovino, al grado de que apenas permite ser detectada.

En el presente estudio estamos de acuerdo con la conclusión de Howes, *et al.* (2001), donde indican que “la inmunoreactividad de actina varía en las diferentes etapas de maduración, lo que depende de la conformación estérica de la molécula de actina”.

Inmunodetección de ARP2, ARP3 y WASP en el citoesqueleto espermático

Diferentes autores reportaron la presencia de proteínas asociadas a actina, entre ellas las ARP3, ARP3 y la WASP, localizándolas tanto en la región de la cabeza espermática como en el flagelo del cobayo (Delgado-Buenrostro, *et al.*, 2005). Sin embargo, en el espermatozoide bovino no fue posible lograr su detección. Posiblemente debido porque se trata de especies distintas, no fueron reconocidos los epítopes de esas proteínas por los anticuerpos empleados.

A diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, Delgado-Buenrostro *et al.*, (2005), lograron detectar las proteínas ARP2, ARP 3 y WASP empleando anticuerpos monoclonales en los extractos de MP y acrosomal de espermatozoides del cobayo, detectando una banda de 65kDa al emplear el anti WASP, una banda de 48kDa al emplear el anti ARP3 y una banda de 44 kDa al utilizar en anticuerpo anti ARP2. A diferencia de lo reportado por los autores antes mencionados, respecto a la detección por inmunofluorescencia indirecta de algunas proteínas

asociadas a actina, mediante la técnica empleada en el presente estudio, no fue posible la detección de ARP 2, ARP3 ni de WASP. Posiblemente esto se debió a que no hubo un reconocimiento de los anticuerpos empleados para los epítopes de los espermatozoides del bovino; o bien, simplemente la técnica empleada no fue la adecuada para ésta detección.

Inmunodetección de distrobrevina por western blot

El uso de anticuerpos policlonales anti distrobrevina, reveló la presencia de una banda polipeptídica alrededor de los 35 kDa en los extractos de membranas plasmática y acrosomal, así como en los extractos de proteínas citoesqueléticas de espermatozoides frescos y descongelados de bovino. La banda detectada podría corresponder a las distrobrevinas pequeñas, cuyo peso molecular ha sido detectado alrededor de los 40 kDa. La mayor intensidad observada en el extracto de membranas de las muestras descongeladas puede ser un indicador de los daños ocasionados a la distrobrevina por el proceso de criopreservación.

Los datos anteriores se correlacionan con la mayor cantidad de proteínas detectadas en los extractos de membranas, lo cual sugiere que en los espermatozoides criopreservados, el citoesqueleto está tan alterado que sus componentes pueden ser fácilmente extraídos con el empleo de los detergentes neutros. Por definición, las proteínas citoesqueléticas son resistentes a la extracción con detergentes neutros, lo cual parece ser válido para espermatozoides frescos (Alberts, et al., 2002), no así en los descongelados.

Detección de actina por inmunofluorescencia directa

Howes, *et al.*, (2001), mediante el uso de anticuerpos monoclonales detectaron actina en la región ecuatorial y postacrosomal en los

espermatozoides de bovino. Sin embargo, en el presente estudio mediante el uso de faloidina-TRITC, además de lograr la detección de actina F en la cabeza espermática, con un patrón similar a lo reportado por dichos autores, también fue detectada en la pieza media y en la pieza principal del flagelo. El hecho de que el método de detección sea diferente, sugiere que los anticuerpos monoclonales podrían estar detectando la localización de actina en su forma monomérica, mientras que en el presente estudio se detectó actina en su forma filamentosa.

Al realizar la detección de actina F en espermatozoides descongelados se observó un decremento muy marcado de la fluorescencia, perdiéndose la marca de actina en la región ecuatorial. El hecho de observar el patrón de puntillado en los espermatozoides descongelados, sugiere que actina se este alterando por el proceso de congelación-descongelación, es decir que esté ocurriendo una fragmentación de los filamentos de actina F.

Correa *et al.*, (2007) intentaron mimetizar el proceso de criopreservación en espermatozoides del macaco, al exponerlos a diferentes concentraciones de solutos, es decir que fueron sometidos tanto a soluciones hipoosmóticas como hiperosmóticas. Posteriormente realizaron la detección de actina en los espermatozoides con membrana, y derivado de sus observaciones concluyen que los cambios en la localización de actina podrían ocurrir de manera similar en los espermatozoides criopreservados. Estos autores asocian los cambios en la localización de actina con la respuesta a los cambios de volumen celular, además refieren que tales cambios de actina pueden ser reversibles. Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con lo reportado por estos autores, puesto que su estudio no se enfoca a la actina del citoesqueleto, sino más bien se enfoca al estudio del citoesqueleto subcortical de actina, el cual interactúa directamente con la MP. Debido a que ellos no congelaron sus células, no podemos coincidir en que en los espermatozoides de bovino los cambios de localización de actina

sean reversibles, al menos no en todas las células, puesto que más de la mitad son incapaces de sobrevivir al proceso de criopreservación. Un estudio previo, reveló que en los espermatozoides del bovino criopreservados, menos del 50% sobrevive, y de ellos solamente un 33% es capaz de mantener el acrosoma y por lo tanto, en teoría, son los que mantienen la capacidad fertilizante (Felipe-Pérez, *et al.*, 2009). Por lo tanto, si los daños a nivel del citoesqueleto ocasionados a los espermatozoides del bovino por el proceso de criopreservación realmente fueran reversibles, esto sugiere que solamente el 33% de la población sería capaz de revertir las alteraciones sufridas en las proteínas citoesqueléticas, que serían aquellos que conservan la capacidad fertilizante.

Detección de distrobrevina por inmunofluorescencia indirecta

La proteína distrobrevina ha sido identificada en la región subacrosomal de la cabeza, en la región ecuatorial, en la inserción con el flagelo, y en toda la extensión del flagelo del espermatozoide del cobayo (Hernández-González, *et al.*, 2001). De forma similar, en el presente trabajo se logró identificar a la distrobrevina en la región subacrosomal de la TP y justo en la región ecuatorial de la cabeza espermática, además en la pieza media y en la principal del flagelo. Sin embargo la localización de distrobrevina en la zona ecuatorial es mucho más marcada en el espermatozoide del bovino que en el del cobayo.

Debido a que el flagelo requiere incrementar su actividad motriz durante la capacitación, Hernández-González *et al.* (2001), sugieren que distrobrevina participa junto con actina brindando mayor resistencia a las estructuras flagelares. Por otra parte, su localización a nivel del segmento ecuatorial, misma que coincide con la localización de actina, sugiere que la distrobrevina también desempeña un papel importante en el mantenimiento de dominios de membrana en esa región y además podría

desempeñar otra función durante el proceso de fertilización, en el momento de la fusión de membranas de ambos gametos, la cual se sabe que ocurre precisamente en la región ecuatorial.

Sin embargo, esto último, así como otras posibles funciones atribuidas a la proteína distrobrevina deberán ser estudiadas en investigaciones futuras.

En los espermatozoides frescos se identificó el patrón de la proteína distrobrevina en la región subacrosomal de la TP y justo en la región ecuatorial de la cabeza espermática, además en la pieza media y en la pieza principal del flagelo. Sin embargo, en los espermatozoides descongelados se observaron cambios en los patrones de localización de distrobrevina, perdiéndose completamente la fluorescencia en la cabeza espermática y disminuyendo la fluorescencia en el flagelo. De hecho, también se observó el patrón de puntilleo, similar a lo ocurrido con la detección de actina en los espermatozoides descongelados, lo cual sugiere que esté ocurriendo alguna alteración de las proteínas del citoesqueleto espermático por el proceso de criopreservación.

Posiblemente el proceso de congelación-descongelación esté afectando directamente a éstas proteínas, además de otras que aún no se han reportado, lo cual apoya a lo establecido por Noiles *et al.* (1997) y Storey *et al.* (1998), quienes señalan que las proteínas que integran al citoesqueleto celular son termosensibles y por ende son despolimerizadas. En consecuencia las mencionadas alteraciones citoesqueléticas debidas a la criopreservación traen consigo cambios en la arquitectura que podrían alterar la funcionalidad espermática.

Discusión global

Hasta el momento no se habían realizado estudios a nivel del citoesqueleto en donde se realizaran comparaciones en cuanto a los patrones de localización de proteínas en espermatozoides frescos y descongelados, de hecho nuestro equipo de trabajo es el pionero en los estudios de la proteína distrobrevina en los espermatozoides del bovino.

El desarrollo de la STP en diferentes estadios que se observó en el cuerpo del epidídimo, es indicativo de que ocurre una mayor actividad que implica un rearrreglo dinámico de las proteínas citoesqueléticas. Y parece ser que el desarrollo de la STP es un evento de maduración común en los espermatozoides de todos los mamíferos.

La actina F apareció con mayor intensidad en los espermatozoides epididimales de la región del cuerpo del epidídimo, y tanto en la región ecuatorial como en el flagelo de los espermatozoides maduros, lo cual nos indica que ésta proteína se encuentra dinámicamente activa durante el proceso de maduración espermática.

El decremento observado en la fluorescencia de actina F en los espermatozoides de la región de la cola del epidídimo, podría sugerir que actina esta cambiando su concentración, es decir que esta siendo despolimerizada y en consecuencia no fue detectable con el uso de la faloidina-TRITC, puesto que ha pasado a su forma monomérica. Esto último ocurre gracias a las múltiples asociaciones que ésta proteína es capaz de establecer con otras diferentes que le permiten tal dinamismo.

Finalmente, es posible que el proceso de criopreservación no sólo altere a la actina y la distrobrevina, sino a otras proteínas que forman grandes complejos para mantener el dinamismo del citoesqueleto espermático.

Los resultados encontrados no cambiarán los índices de fertilidad en el ganado lechero, sin embargo, proveen nuevos datos acerca de los daños ocasionados al espermatozoide del bovino por la criopreservación, lo que dará pie a que se realicen estudios en los que se implementen nuevas tecnologías a fin de disminuir las alteraciones estructurales observadas en el citoesqueleto de estos gametos y con ello optimizar los procesos de congelación-descongelación para mejorar las prácticas actuales de reproducción asistida.

IX. CONCLUSIONES

- En el bovino la formación de la STP es un proceso gradual que se adquiere durante la maduración, es decir que el espermatozoide la adquiere a través de su paso por las diferentes regiones del epidídimo.
- La localización de actina F se mantiene constante durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo, siendo notoria su presencia en la región ecuatorial de la TP, así como en la pieza principal del flagelo, sin embargo, disminuye conforme el espermatozoide atraviesa las diferentes regiones del epidídimo, notándose en los espermatozoides que alcanzaron las regiones más distantes (cola y conducto deferente).
- Las proteínas del citoesqueleto son más susceptibles al proceso de extracción en los espermatozoides descongelados que en los frescos, lo cual se observó en la intensidad del marcaje del western blot.
- Las proteínas del citoesqueleto espermático son solubilizadas en su totalidad al exponerlas a soluciones que contienen DTT al 50mM; sin embargo, al ser expuestas a soluciones que contienen DTT al 25mM, en los espermatozoides descongelados se logra solubilizar en su totalidad a las proteínas del flagelo y de la teca perinuclear, mientras que en los espermatozoides frescos queda un remanente de proteínas en la TP y el 1% de flagelos sin solubilizarse.
- La extracción de proteínas citoesqueléticas en el espermatozoide descongelado ocasiono que la cabeza sufriera alteraciones morfológicas, observándose bastante aumentadas de tamaño, lo cual fue comprobado por microscopía electrónica.

- El proceso de criopreservación, ocasionó que las redes del citoesqueleto espermático sufran alteraciones que se ven reflejadas en una mayor solubilidad de éste por detergentes neutros.
- El western blot reveló que en los espermatozoides del bovino, el proceso de criopreservación ocasiono que una gran cantidad de actina y distrobrevina fueran extraídas junto con los componentes de las membranas plasmáticas y acrosomales.

X. LITERATURA CITADA

Alberts B, Honson A, Lewis J, Raff M Roberts K, Water P. The cytoskeleton. The molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.

Amann RP. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. J Androl. 1981; 2:37-58.

Becker WM, Kleinsmithe LJ, Hardin J. El citoesqueleto. El mundo de la célula. 6^a ed. Madrid: Pearson Addison Wesley. 2007.

Bellvé and O'Brien. Mechanism and control of animal fertilization. The mammalian spermatozoa. Academic Press. 1883;

Breitbart H. Intracelular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. Mol Cell Endocrin. 2002; 187: 139-144.

Brener E, RubinsteinS, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. Biol Reprod. 2003; 68: 837-845.

Cabello-Agüeros J, Hernández-González EO, Mújica A. The role of F-actin cytoskeleton associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. Cell Motil Cytoskel. 2003; 56: 94-108.

Camatini M, Anelli G, Casale A. Identification of actin in boar spermatid and spermatozoa by immunoelectron microscopy. Eur J Cell Biol. 1986; 42: 311-318.

Castellani-Ceresa L, Mattioli M, Radaelli G, Barboni B, Brivio MF. Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with the use of cytochalasin D. Mol Reprod Dev. 1993; 36: 203-211.

Ceccarini M, Grasso M, Veroni C, Gambarà G, Artegiani B, Macchia G, Ramoni C, Torreri P, Mallozzi C, Petrucci TC, Macioce P. Association of dystrobrevin and regulatory subunit of protein kinase A: a new role for dystrobrevin as a scaffold for signaling proteins. J Mol Biol. 2007; 371(5):1174-87.

Cole HH y Cupps PT. Reproduction in domestic animals. 3rd ed. New York: Academic Press, 1977.

Correa , Thomas , Meyers. The macaque actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress, and contributes to motility and morphology defects. 2007; In press.

Courtens JL, Courot M, Flechon JE. The perinuclear substance of boar, bull, ram and rabbit spermatozoa. *J Ultrastruct Res* 1976; 57: 54-64.

Cruz ZA, Pajan VJ, Puza RR, Cuesta CC. Principales factores que frenan la prolificidad del ganado vacuno en Latinoamérica. *Memorias del XXX Congreso Nacional de Buiatría*; 2006 agosto 10-12; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC, 2006: 219.

Delgado-Buenrostro NL, Hernández-González EO, Segura-Nieto M, Mújica A. Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol Reprod Develop.* 2005; 70:198-210.

Dias GM, Retamal C, Tobella L, Arnholdt A, Lopez M. Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 2006; 15 (66)354-365.

Disanza A, Steffen A, Hertzog M, Frittoli E, Rottner K, Scita G. Actin polymerization machinery: the finishing line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 9: 955-970.

Felipe-Pérez YE. Caracterización bioquímica de las proteínas extraídas de la teca perinuclear antes y después de la congelación del semen bovino (tesis de maestría). México (D. F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.

Felipe-Pérez YE, Juárez-Mosqueda ML, Hernández-González EO, Valencia J. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Veterinaria Brasilica.* 2009. In press.

Flaherty SP, Winfrey UP, Olson GE. Localization of actin in human, bull, rabbit and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anat Rec* 1986; 221: 599-610.

Flores H. Efecto del enfriado lento hasta -5°C previo a la congelación sobre la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide porcino (tesis de maestría). México (D. F.) México: Fes C Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.

Frase LR. Sperm capacitation and acrosome reaction. *Hum Reprod* 1998;13 Suppl1: 9-12.

Gall WE y Ohsumi Y. Decondensation of sperm nuclei in vitro. *Experimental Cell Research.* 1976; 349-358 .

Galloway DB. A review of male reproductive function and dysfunction. *Animal Reproduction*. Inter Found Sci. 1994; 171-92.

Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILSRJ*. 2000; 41 (4): 187-196.

Glass DJ. Two tails concerning skeletal muscle. *The J Clin Invest*. 2007; 117: 2388-2391.

Gerthofer WT. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle contraction. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005; 10: 851-856.

Gutiérrez-Pérez O. Correlación del daño de la teca perinuclear y la descondensación del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo (tesis de maestría). México (D. F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.

Hafez ESE. *Reproduction in Farm Animals*. 5th Ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1987.

Han B, Bischof JC. Thermodynamic nonequilibrium phase change behavior and thermal properties of biological solutions for cryobiology. *J Biomech Eng*. 2004; 2: 196-203.

Han B, Bischof JC. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology*. 2001; 48 (1): 8-21.

Harrison RAP. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*. 1996; 8: 581-594.

Harrison RAP y Gadella BM. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*. 2005; 63: 342-351.

Hernández-González EO, Martínez-Rojas D, Mornet D, Rendon a, Mújica A. Comparative distribution of short systrophin superfamilij products in various guinea pig spermatozoa domains. *Eur J Cell Biol*. 2001; 80: 792-798.

Hernández CJ, Zavala RJ. Factores que determinan la fertilidad en programas de inseminación artificial. *Reproducción bovina*. México, D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.

Higgs HN, Pollard TD. Regulation of actin polymerization by ARP2/3 complex and WASP/SCAR proteins. *J Biol Chem.* 1999; 274(46): 32531-32534.

Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987; 51: 919-928.

Howes EA, Hurst SM, Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *J Androl.* 2001; 22: 62-72.

Huret JL. Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Archives Androl.* 1986; 16: 97-109.

Jager S, Wijchman J, Kremer J. Studies on the decondensation of human, mouse and bull sperm nuclei by heparin and other polyanions. Wiley-Liss, INC. 1990; 315-322.

Juárez-Mosqueda ML. Caracterización de una nueva subestructura de la tepla perinuclear del espermatozoide maduro no capacitado del cobayo (tesis de doctorado). México (D.F.), México. CINVESTAV- IPN, 2000.

Juárez-Mosqueda ML y Mújica A. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J Structuct Biol.* 1999; 128: 225-236.

Katayama M, Sutovsky P, Yang B, Cantley T, Rieke A, Farwell R, Oko R, Day B. Increased disruption of sperm plasma membrane at sperm immobilization promotes dissociation of perinuclear theca from sperm chromatin after intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Reprod.* 2005; 6:907.

Koheler JK. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J Ultrastruc. Res* 1970; 33: 598-614.

Knobil E. *et al.* The Physiology of Reproduction. New York: Raven. 1992.

Liu DY, Martic M, Clarke GN, Dunlop ME, Baker HWG. An important role of actin polymerization in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. *Mol Hum Reprod.* 1999; 941-949.

Liu DY, Martic M, Clarke GN, Grkovic I, Garret C, Dunlop ME, Baker HWG. An anti-actin monoclonal antibody inhibits the zona pellucida-induced acrosome reaction and hyperactivated motility of human sperm. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8: 37-47.

Liu DY, Martic M, Clarke GN, Baker HWG. Exposure of actin on the surface of the human sperm head during in vitro culture relates to sperm morphology, capacitation and zona binding. *Hum Reprod* 2005; 20:999-1005.

Longo FJ. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *The J Cell Biol* 1987; 105: 1105-1120.

Martínez OC. Efecto del congelamiento y descongelamiento sobre la tecaperinuclear del espermatozoide de bovino (tesis de licenciatura). México (D.F.) México. Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.

Martínez OC, Juárez-Mosqueda ML, Hernández J, Valencia J. Criopreservation of bull sperm results in alteration of the perinuclear theca. *Theriogenology*. 2006;

Moreno-Fierros L, Hernández EO, Salgado ZO, Mújica A. F-actin in guinea pig spermatozoa: Its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Mol Reprod Dev*. 1992; 33: 172-181.

Muino R, Rivera MM, Rigau T, Rodríguez-Gil JE, Pena AI. Effects of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile subpopulations structure of bull semen. *Anim Reprod Sci*. 2008; 109: 50-64.

Mújica A, Navarro FG, Hernández G, Juárez M ML. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Micros Res Tech*. 2003; 61:76-87.

Neild DM, Gadella BM, Cháves MG, Miragaya MH, colenbrader B, Agüero A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*. 2003; 59: 1693-1705.

Noiles EE, Tompson KA, Storey BT. Water permeability, L_p of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiol*. 1997; 35:79-92.

Oko R, Maravei D. Protein composition, distribution and possible role of perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol Reprod*. 1994; 50: 1000-1014.

Ostermeier C, Sargeant G, Yandell B, Evenson D, Parrish J. Relationship of bull fertility and sperm nuclear shape. *J Androl*. 2001; 22: 595-603.

Ocampo LJ. Identificación de actina durante la descondensación in vitro de la cromatina del espermatozoide del cuye (tesis de maestría). México (D.F.) México. CINVESTAV- IPN, 1995.

Oyeyemi MO, Eunice TB. Testicular parameters and morphological characteristics of testicular and epididymal spermatozoa of white Fulani bulls in Nigeria. *Int J Morphol.* 2006; 24(2):175-180.

Peris S, Morrier A, Dufour M, Bailey J. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl.* 2004; 25: 224-233.

Peter AC, Miller G, Crosbie RH. Disrupted mechanical stability of the dystrophin glycoprotein complex causes severe muscular dystrophy in sarcospan transgenic mice. *J Cell Sci.* 2007; 120: 996-1008.

Petrunkina AM, Hegbel M, Waberski D, Weitzka KF, Topfer-Petersen E. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reprod.* 2004; 127: 105-115.

Petrunkina AM, Gropper B, Trópfers-Petersen E, Gunzel-Apel AR. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology.* 2004; 63: 1390-1406.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949; 164: 666.

Powell D, Cian D, Jennings C, Jones R. Spatial organization of repetitive DNA sequences in the bovine sperm nucleus. *J Cell Sci.* 1990; 97: 185-191.

Radtke K, Dohner K, Sodeik B. Viral interaction with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* 2006; 3: 387-400.

Sánchez-Gutiérrez M, Contreras RG, Mújica A. Cytochalasin D retards sperm incorporation deep into the egg cytoplasm but not membrane fusion with the egg plasma membrane. *Mol Reprod Dev.* 2002; 63: 518-528.

Senger PL. The organization and function of the male reproductive system. Pathways to pregnancy and parturition. Washington, 1999.

Staruschenki A, Negulyaev YA, Morachevskaya EA. Actin cytoskeleton disassembly affects conductive properties of stretch-activated cation channels in leukaemia cells. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1: 53-60.

Storey BT, Noiles E, Tompson KA. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 1998; 37: 46-58.

Tienthai P, Kimura N, Heldin P, Sato E, Rodriguez-Martinez H. Expression of hyaluronan synthase-3 in porcine oviductal epithelium during oestrus. *Reprod Fertil Dev*. 2003; 15: 99-105.

Thrasher Aj, Burns S, Lorenzi R, Jones GE. The Wiskott-Aldrich syndrome: disordered actin dynamics in haematopoietic cells. *Immunol Rev*. 2000; 178: 118-128.

Van Demark WL & Free MJ. *The testis*. New York: Academic Press, 1990. vol III; 233.

Von Bülow M, Rackwitz HR, Zimbelmann R, Franke WW. Cp β 3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res*. 1997; 233: 216-224.

Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 7:871-891.

Weaver AM, Young ME, Lee WL, Cooper JA. Integration of signals to the ARP2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15: 23-30.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*. 1972, 178 (59): 411-414.

Wiesel S, Schultz G. Factors which may cause removal of protamine from sperm DNA during fertilization in the rabbit. *Gamete Res*. 1981; 4:25-34.

Wulf E, Deboben A, Bautz F, Faulstich H, Wieland TH. Fluorescent phalloidin, a tool for the visualization of cellular actin. *Cell Biol*. 1979; 9:4498-4502.

Yu M, Yuan M, Ren H. Visualization of actin cytoskeletal dynamics during cell cycle of Tobacco BY-2 cells. *Biol Cell*. 2005; In press.

Zirkin BR, Soucek DA, Chang TSK, Perreault SD. In vitro and in vivo studies of mammalian sperm nuclear decondensation. *Gamete Res*. 1985; 11:349-365.

GLOSARIO

Brij 36 T: Es un detergente neutro que comúnmente se utiliza en el laboratorio para solubilizar membranas celulares.

Distrofia Muscular de Duchenne (o enfermedad de Duchenne): Enfermedad miodegenerativa y progresiva, se produce por defectos en la expresión del gen de la distrofina, gradualmente se produce debilidad muscular y pueden presentarse cuadros asociados de cardiomiopatías, deficiencias visuales, defectos en la audición y deterioros cognoscitivos no progresivos.

Inmunofluorescencia directa: Método para determinar la localización de un antígeno en una sección de tejido o en una célula, usando una sustancia o un anticuerpo que tiene alta afinidad por el antígeno (en éste caso una proteína) y se encuentra unido químicamente por un fluorocromo

Inmunofluorescencia indirecta: Método para determinar la localización de un antígeno en una sección de tejido o en una célula, se usa una antiinmunoglobulina marcada que se une al anticuerpo específico.

Síndrome de Wiskott-Aldrich: Enfermedad de inmunodeficiencia genética, se caracteriza por la reducción en la movilidad de linfocitos, afecta a diversas células hematopoyéticas como a las plaquetas, por lo que los pacientes con este síndrome mueren por problemas de coagulación.

Tween 20: Es un detergente neutro, empleado comúnmente en el laboratorio para realizar diferentes las técnicas de inmunodetección.