



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización funcional y morfológica de los
espermatozoides del ratón mutante heterócigo para la
fosfatasa de lípidos fosfatados tipo 3**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

AURA DEL ANGEL ANDRADE ORLOFF



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CLAUDIA LYDIA TREVIÑO SANTA CRUZ
2011**



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.

A Claudia Treviño,
con todo mi cariño...

AGRADECIMIENTOS:

A mi familia, sin sus rarezas no me habría atrevido a volar lejos del nido. Gracias...

A Claudia Treviño, mi salvadora académica. Gracias por los consejos, el apoyo, las pláticas... ¡Gracias por todo!

A Coral, Deneb, Rafael, Sandra y Marina... la familia que encontré en mis vagabundeos por la Facultad de Ciencias. Gracias por su apoyo y por compartir momentos hogareños, aventureros y mágicos conmigo. Las memorias que tengo con ustedes me acompañan siempre...

Al Dr. Alberto Darszon por dejarme formar parte de su grupo de trabajo y a todos los miembros que me recibieron e instruyeron...para mí su laboratorio es un santuario dentro del IBt.

A la UNAM, por todo lo que aprendí al entrar por sus puertas y por darme la oportunidad de teñir mi piel de azul y transmutar mi sangre a oro... ¡Por mi raza hablará el espíritu!

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESÚMEN.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. ANTECEDENTES.....	10
5. HIPÓTESIS.....	13
6. OBJETIVO GENERAL.....	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
8. RESULTADOS.....	23
8.1 Datos Generales.....	23
8.2 Reacción Acrosomal.....	24
8.3 Inmunocitoquímicas.....	26
8.4 Morfología.....	32
8.5 Movilidad.....	35
9. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	39
10. PERSPECTIVAS.....	44
11. FUENTES CONSULTADAS.....	45
12. ANEXOS.....	47
12.1 Obtención de espermatozoides	47
12.2 Obtención de células espermatogénicas.....	48
12.3 Purificación de Zona Pelúcida.....	49
12.4 Reacción Acrosomal.....	50
12.5 Inmunocitoquímicas.....	51
12.6 Morfología.....	52

ABREVIATURAS

LPP3: Fosfatasa de Lípidos Fosfatados Tipo 3

***LPP3^{Stw03}*:** Alelo utilizado durante la recombinación homóloga de células troncales embrionarias

***LPP3^{Stw03/+}*:** Genotipo heterócigo de ratones portadores del alelo *LPP3^{Stw03}* y el alelo silvestre de *LPP3*

ZP: Zona Pelúcida

ATP: Adenosin Trifosfato

[Ca²⁺]_i: Concentración de calcio intracelular

LPPs: Fosfatasas de lípidos

PA: Ácido lisofosfatídico

S1P: Esfingosina-1-fosfato

C1P: Ceramida-1-fosfato

VCL: Velocidad Curvilínea

VAP: Velocidad Promedio

VSL: Velocidad Progresiva

+/+ Jóvenes: Población de ratones jóvenes silvestres utilizados en los experimentos

+/- Jóvenes: Población de ratones jóvenes silvestres heterócigos en los experimentos

+/+ Viejos: Población de ratones viejos silvestres utilizados en los experimentos

+/- Viejos: Población de ratones viejos silvestres utilizados en los experimentos

RESUMEN

La fosfatasa de lípidos fosfatados tipo 3 (LPP3) juega un papel importante en el metabolismo de los lípidos y puede participar en procesos como apoptosis, proliferación, diferenciación, quimiotaxis, adhesión y secreción. Para estudiar su función Escalante et al. 2003, generaron una línea de ratones mutantes, llamada $LPP3^{Stw03}$, en la que la expresión de LPP3 fue abatida. Debido a que los ratones nulos para la LPP3 presentan un fenotipo letal en estado embrionario, la línea $LPP3^{Stw03}$, se mantiene mediante la cruce de ratones heterocigotos.

Durante el mantenimiento de la línea $LPP3^{Stw03}$ se observó que el envejecimiento de los ratones heterocigotos portadores del alelo $LPP3^{Stw03}$, se correlacionaba con una descendencia mayoritariamente silvestre, es decir, la transmisión del transgen era afectada.

Esto sugiere la posibilidad de que una subpoblación de los espermatozoides de ratones portadores del alelo mutado pierdan viabilidad conforme incrementa su edad. Esta viabilidad reducida podría ser causada por anomalías funcionales y/o morfológicas evidentes en la población de espermatozoides de ratones viejos.

El objetivo de este proyecto consistió en verificar si existían diferencias significativas a nivel funcional y/o morfológico entre los espermatozoides de ratones mutantes heterocigotos $LPP3^{Stw03}$ con respecto a ratones silvestres, las cuales se acrecentaron con la edad.

Para establecer estas posibles diferencias se realizaron diversas determinaciones de manera comparativa entre cuatro poblaciones: ratones jóvenes (2-4 meses) y viejos (más de 6 meses), tanto mutantes como silvestres.

Encontramos que LPP3 no se expresa en el espermatozoide maduro del ratón pero sí en las células espermatogénicas, lo que sugiere su participación en procesos relacionados con la espermiogénesis del espermatozoide.

No se encontraron anomalías significativas ni a nivel funcional ni morfológico en los espermatozoides de los ratones $LPP3^{Stw03/+}$, atribuibles a la disminución en el nivel de expresión de la LPP3.

INTRODUCCIÓN

En los animales, la reproducción sexual puede clasificarse de acuerdo al tipo de fertilización involucrada. En algunos casos la fertilización es externa y el óvulo es fecundado por los espermatozoides fuera del cuerpo del animal.

En otros casos la fertilización es interna y el óvulo es fecundado dentro del cuerpo del animal. La reproducción sexual en los animales que llevan a cabo la fertilización interna, como es el caso del humano y del ratón (*Mus musculus*), es más compleja ya que, por lo general involucra algún tipo de comportamiento de cortejo por parte de los machos, competencia entre éstos y un proceso de selección de pareja por parte de las hembras, lo que lleva finalmente al apareamiento.

Tras el apareamiento es fundamental que se lleve a cabo la fertilización. Para que la fertilización ocurra de manera exitosa, es necesario que se lleve a cabo una serie ordenada de procesos moleculares que concluyen en la fusión del espermatozoide con el óvulo tras lo cual se genera un nuevo individuo.

Estructura del óvulo y del espermatozoide

El gameto femenino, llamado óvulo, es una célula esférica con un contenido citoplasmático alto (contiene ~10,000 veces más citoplasma que una célula somática). En el ratón, el óvulo llega a tener un diámetro de 40-60 μm , (B. Alberts *et al.* , 2002). El óvulo se encuentra bloqueado en la segunda división meiótica, la cual no se reanuda hasta que la fecundación ocurra. Tras la fusión del espermatozoide con la membrana plasmática del óvulo, los gránulos corticales se exocitan y su contenido (proteasas, glicosidasas, etc.) modifica la estructura de la matriz extracelular que rodea al óvulo previniendo la fusión de otros espermatozoides con el mismo (poliespermia). Esta matriz se conoce como *Zona Pelúcida* (ZP) y es una estructura tridimensional filamentosa compuesta, en el caso del ratón, por filamentos de tres glicoproteínas ZP1, ZP2 y ZP3 (Evans *et al.* 2005). La ZP a su vez, se encuentra rodeada de una serie de células llamadas células foliculares (células del *cumulus* o acompañantes), éstas forman la corona

radiada del ovocito y se encargan de sintetizar y secretar progesterona y prostaglandinas (Figura 1).

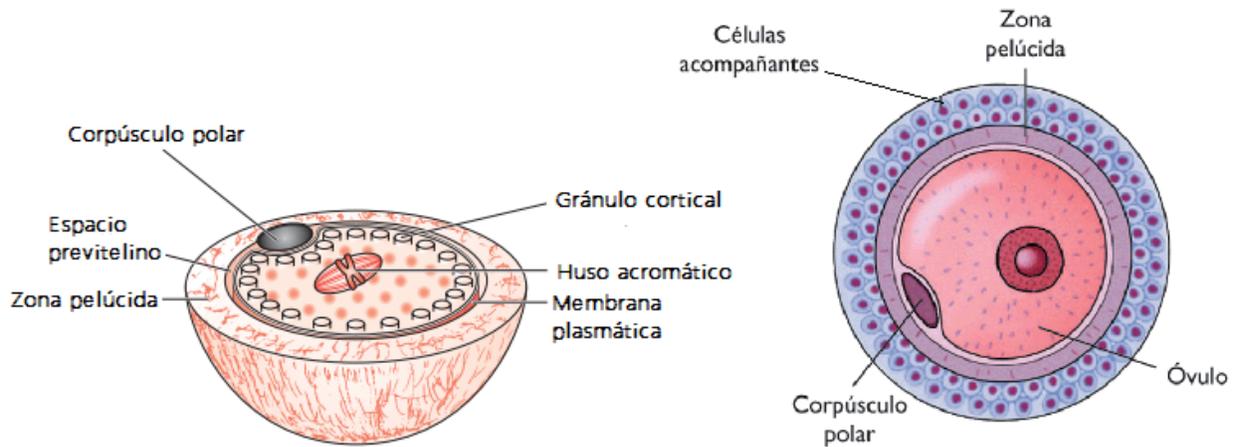


Figura 1. Esquemas de la estructura del ovocito de mamífero. Izquierda: Corte transversal del ovocito, se observa la matriz extracelular denominada *Zona Pelúcida* rodeando la membrana plasmática del óvulo. Derecha: Corte longitudinal del óvulo, además de la *Zona Pelúcida* se esquematizan las células acompañantes. En ambas figuras se destacan otros componentes importantes del ovocito. (Evans *et al.*, 2005)

Los espermatozoides de los mamíferos son células altamente especializadas. En su estado maduro, carecen de retículo endoplasmático y la síntesis de proteínas es nula. Su estructura puede ser dividida en dos compartimentos principales: la cabeza y el flagelo (Fig. 2). El espermatozoide de ratón mide aproximadamente 80 μm de largo y su cabeza tiene aproximadamente 2.5 μm de ancho y 6 μm de largo, es decir, es casi 200 veces más pequeño que el óvulo. El flagelo, a su vez, está conformado por la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. Esta estructura es un componente fundamental gracias al que el espermatozoide puede desplazarse hacia el óvulo. En la pieza media se encuentran las mitocondrias, que le dan la energía necesaria al espermatozoide al generar Adenosin Trifosfato (ATP) a través de la fosforilización oxidativa. Este ATP de origen mitocondrial en conjunto con el ATP generado por glicólisis (Ford, 2006) en la pieza principal, activa la movilidad del flagelo mediante vías de señalización dependientes de la fosforilación de proteínas. En la cabeza del espermatozoide se encuentra el núcleo con la cromatina altamente condensada y el acrosoma, pieza clave en la fertilización del óvulo (Evans *et al.*, 2005).

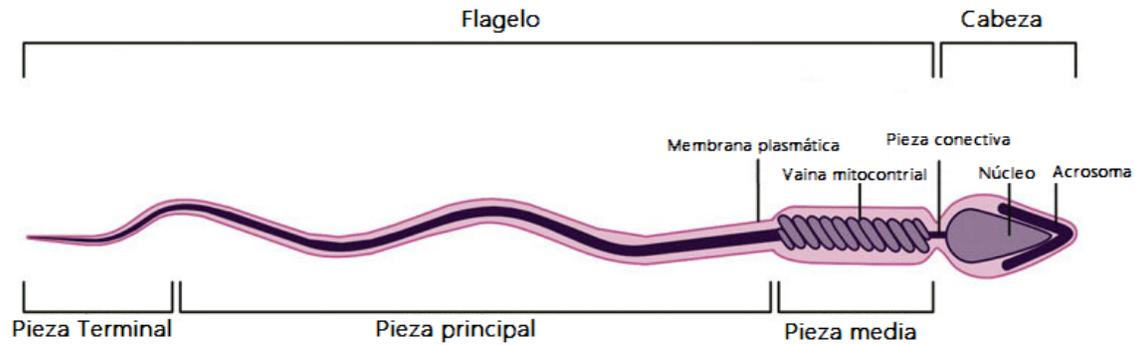


Figura 2. Esquema de la estructura de un espermatozoide de ratón. Se muestra la cabeza, el flagelo y el acrosoma, el cual contiene enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa y la acrosina. El flagelo está dividido en pieza media, pieza principal y pieza terminal (Borg et al., 2010).

Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual los espermatozoides maduros se desarrollan a partir de células madre diploides masculinas llamadas espermatogonias, que se dividen mitóticamente para producir células que entran en meiosis y que finalmente se diferencian en espermatozoides haploides.

En el epitelio seminífero y las regiones intersticiales que lo rodean, existe una relación estrecha entre las células somáticas (Sertoli, Leydig y células peritubulares) y las células germinales. Si esta comunicación es afectada, la espermatogénesis y la fertilidad pueden ser alteradas. Los túbulos seminíferos son unidades estructurales altamente organizadas en las que se encuentran las células germinales en distintas etapas de maduración. La maduración y diferenciación aumenta conforme se aproximan al lumen central (Figura 3). Las divisiones mitóticas que llevan a cabo las espermatogonias dan origen a los espermatocitos secundarios. Los espermatocitos secundarios, continúan su maduración a lo largo de una serie de fases celulares. Posteriormente realizan una división meiótica final para formar espermátidas haploides.

El siguiente paso es la espermiogénesis, durante la cual comienza la condensación de la cromatina. En los mamíferos euterios, la condensación de la cromatina presenta dos fases principales. La primera fase, ocurre en los testículos e involucra la sustitución de las

histonas (proteínas somáticas) por las protaminas (proteínas específicas del testículo). Las protaminas tienen la mitad del tamaño que las histonas y son extremadamente básicas. Durante la espermiogénesis también ocurre la formación del acrosoma, la eliminación de la mayor parte del citoplasma y el desarrollo del flagelo (Oliva & Castillo, 2011).

La espermatogénesis culmina cuando los espermatozoides maduros se liberan en el lumen del epitelio seminífero, a este proceso se le conoce como espermiación, y se trata de un evento complejo y poco comprendido que involucra, entre otros eventos, la pérdida progresiva de las uniones celulares (Cooke & Saunders, 2002), que son regiones en

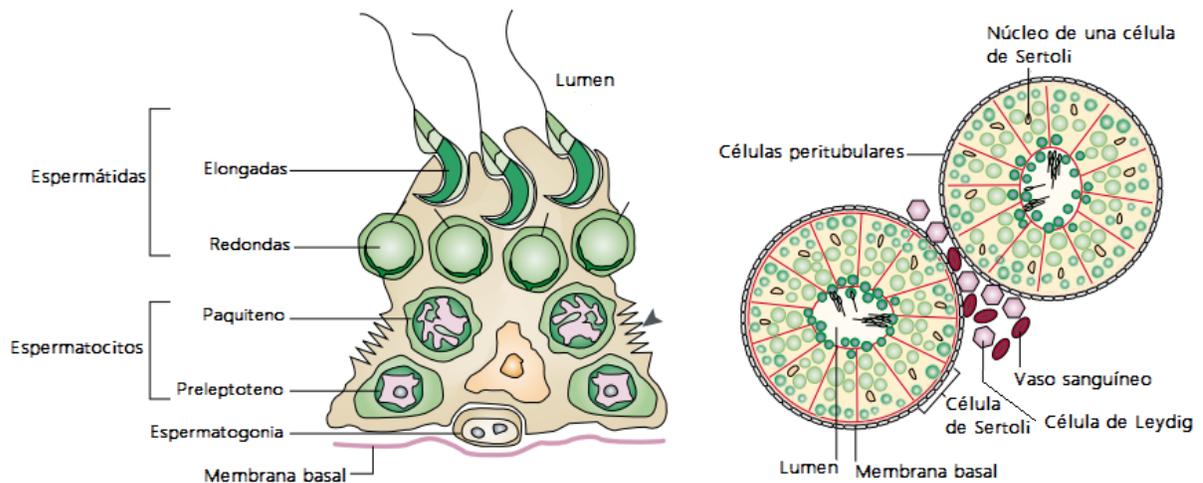


Figura 3. Esquema de la organización del testículo. Izquierda: Esquema de una célula de Sertoli con células germinales asociadas. Existen uniones estrechas entre las células de Sertoli (cabeza de flecha). Las células se encuentran organizadas en un orden estricto, aumentando el grado de maduración conforme se acercan al lumen del túbulo. Derecha: Diagrama de cortes transversales del túbulo testicular, se observan las células germinales (verde) en diferentes etapas de maduración rodeadas por las células de Sertoli (delineadas en rojo) y las células de Leydig (encargadas de sintetizar testosterona) (Imagen modificada de (Cooke & Saunders, 2002).

donde se unen dos células de tal forma que hay un intercambio entre los contenidos citoplasmáticos ya sea por difusión o por transporte activo, estas regiones están enriquecidas en proteínas como las integrinas. Durante la espermiación también ocurre la segunda fase de la condensación de la cromatina, la cual implica la formación de numerosos puentes disulfuro entre las protaminas. Estos puentes son formados cuando los espermatozoides avanzan hacia el epidídimo caudal, región en la que se almacenan antes de ser eyaculados (Oliva & Castillo, 2011).

Maduración epididimal

Después de la espermiación, los espermatozoides se transportan a lo largo de los túbulos seminíferos hasta llegar al epidídimo, en donde continúan su maduración. En el epidídimo caudal los espermatozoides se encuentran funcionalmente inmaduros. La maduración epididimal, involucra múltiples procesos entre los cuales se encuentran la adición y remoción de proteínas, la remodelación de la composición de la membrana lipídica y sus dominios, así como modificaciones postraduccionales de algunas proteínas (proteólisis, glicosilación y fosforilación). Una vez que los espermatozoides llegan al epidídimo caudal se almacenan en un estado inmóvil.

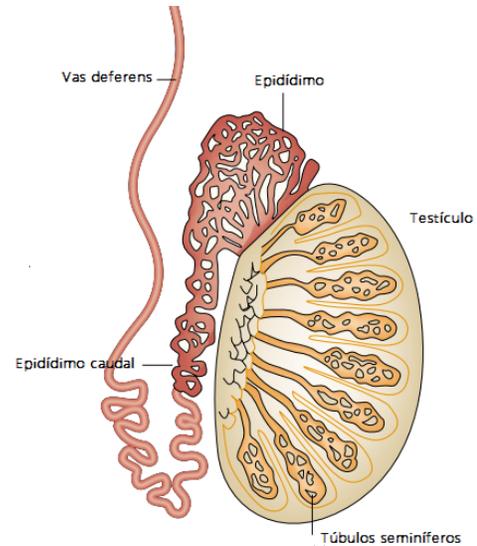


Figura 4. *Testículo y estructuras asociadas por las que transitan y maduran los espermatozoides.* Posterior a la espermiación los espermatozoides se transportan por los túbulos seminíferos hasta el epidídimo caudal, en donde se almacenan (Imagen modificada de Cooke & Saunders 2002).

Activación de la movilidad

Tras la eyaculación, los espermatozoides entran en contacto con el microambiente del tracto genital femenino, en donde el pH aumenta y la osmolaridad disminuye (Q. Chen *et al.*, 2010). La exposición de los espermatozoides a las condiciones características de este microambiente, producen entre otros cambios importantes, un aumento en la concentración del Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), repercutiendo directamente en los patrones de movilidad de los espermatozoides. La movilidad puede dividirse en dos tipos: (1) movilidad activada, en la cual el flagelo presenta una curvatura simétrica, un movimiento rápido y una amplitud pequeña. Los espermatozoides activados presentan una movilidad progresiva en medios de baja viscosidad, (2) la movilidad hiperactivada, implica un movimiento flagelar asimétrico, lento y una amplitud mayor. Los espermatozoides hiperactivados presentan un patrón de movilidad errático en medios de baja viscosidad (Figura 5). Se ha propuesto que la movilidad hiperactivada le permite al espermatozoide

desplazarse a través del oviducto en un ambiente sumamente viscoso, este tipo de movilidad también le permite despegarse del epitelio (Ho, 2001) y penetrar las capas externas del óvulo.

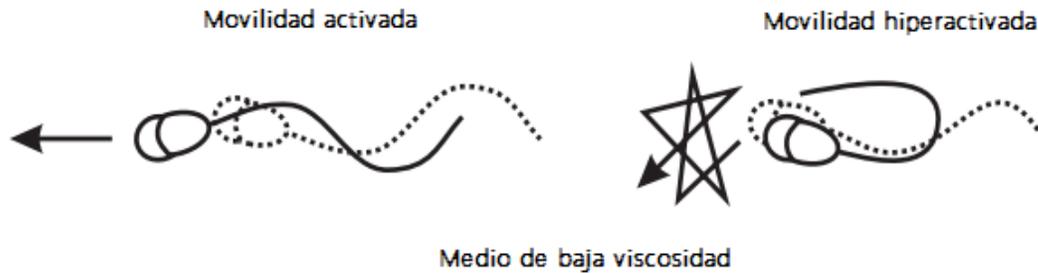


Figura 5. Movilidad de los espermatozoides de mamífero. Movilidad activada (izquierda) e hiperactivada (derecha), se observa la forma flagelar y la dirección del movimiento que presentan espermatozoides en medio no viscoso. Los espermatozoides activados avanzan con un patrón simétrico de batido flagelar, en cambio los hiperactivados se mantienen en un mismo lugar y no avanzan de manera progresiva debido al patrón asimétrico de batido flagelar. (Imagen modificada de Darszon *et al.*, en prensa).

Capacitación

Una vez que los espermatozoides han sido eyaculados en el tracto genital femenino, estos deben pasar por una serie de cambios para ser capaces de fecundar al óvulo. A este conjunto de cambios se le llama capacitación. Un evento fundamental durante la capacitación es la modificación de la arquitectura y organización de la membrana lipídica, este cambio está directamente relacionado con la remoción del colesterol de la membrana citoplasmática del espermatozoide. La remoción del colesterol genera un aumento en la fluidez de la membrana plasmática y la relocalización o disgregación de balsas lipídicas, eventos que podrían facilitar la interacción y subsecuente activación de los receptores del espermatozoide con la zona pelúcida del óvulo. (Darszon *et al.*, en prensa / Borg *et al.*, 2010). La capacitación puede simularse *in vitro* en un medio rico adicionando HCO_3^- y albúmina bovina (BSA) (Medio Whittens, ver Materiales y Métodos).

Reacción Acrosomal

El acrosoma es un organelo, derivado del aparato de Golgi, el cual está delimitado por una sola membrana (Figura 2). En presencia del inductor fisiológico o farmacológico adecuado, la membrana externa del acrosoma se fusiona con la membrana plasmática del espermatozoide, produciendo la exocitosis del contenido del acrosoma (enzimas hidrolíticas). Estos componentes ayudan al espermatozoide a perforar la zona pelúcida que rodea al óvulo, expone una nueva membrana con propiedades fusogénicas y de esta forma éste podrá entrar en contacto directo con la membrana plasmática del óvulo y llevar a cabo la fecundación (Darszon *et al.*, en prensa).

El ratón como modelo de infertilidad

La fertilidad es el resultado de la serie de procesos extraordinariamente complejos que se describieron brevemente en las secciones anteriores. En cada uno de los pasos necesarios para que ocurra una fecundación exitosa, están involucradas numerosas vías de señalización e interacciones celulares, generando una gran cantidad de oportunidades para que una falla ocurra, produciéndose la infertilidad o la subfertilidad (C. Hann *et al.*, 2011).

Un ejemplo claro es la espermatogénesis, para que los procesos englobados en la espermatogénesis ocurran exitosamente, se requiere la expresión coordinada de >2300 genes diferentes. Dicho lo anterior, no debe sorprendernos el hecho de que la obtención de ratones mutantes, con un fenotipo relacionado a la infertilidad, sea frecuente (Borg *et al.*, 2010).

La producción de ratones mutantes como modelo de esterilidad o subfertilidad es una herramienta fundamental para dilucidar y comprender el papel que juega un gen en la amplia gama de procesos indispensables para que ocurra la fertilización. Una vez que se ha obtenido una línea de ratones mutantes que presente algún fenotipo de esterilidad o subfertilidad es necesario llevar a cabo un estudio protocolario para identificar el proceso

que está ocurriendo deficientemente y de esta forma determinar cómo, cuándo y en dónde está participando el gen.

ANTECEDENTES

La LPP3 pertenece a la familia de las fosfatasas de lípidos (LPPs). Esta familia está conformada por tres enzimas: LPP1, LPP2 Y LPP3. La reacción enzimática que cataliza este tipo de enzimas consiste en la defosforilación de moléculas lipídicas presentes a nivel intracelular y extracelular. Los principales sustratos de las LPPs son: el ácido lisofosfatídico (LPA) el ácido fosfatídico (PA), la esfingosina 1-fosfato (S1P) y ceramida 1-fosfato (C1P). Los lípidos mencionados son importantes en eventos de señalización. Al defosforilarlos, las LPPs mantienen el balance entre las formas bioactivas (fosforiladas) y las defosforiladas, participando de esta forma en el metabolismo de los lípidos (Sigal *et al.* 2005).

Estructuralmente, la LPP3 está conformada por 6 dominios transmembranales, su región catalítica se encuentra en dos asas extracelulares o lumbinales, la segunda asa a veces puede estar glicosilada. La región N-terminal y C-terminal de la LPP3 se encuentran del lado intracelular. Entre el segundo y tercer segmento transmembranal (Figura 6) se encuentra la segunda asa intracelular de la LPP3, en la cual hay dos residuos de tirosina (Tyr-Tyr) que regulan el destino celular de esta proteína (Sigal *et al.* 2005).

La LPP3 de los humanos cuenta con una región de unión a integrinas (Arg-Gly-Asp) que se encuentra en la tercera horquilla extracelular (Figura. 6). Este sitio de unión sugiere que la LPP3 tiene un papel importante en procesos de interacción celular. En el caso del ratón a pesar de que la LPP3 presenta una secuencia distinta de aminoácidos (Arg-Gly-Glu), se ha observado que esta también promueve la adhesión celular y permite la unión de la LPP3 a integrinas (Humtsoe *et al.*, 2005).

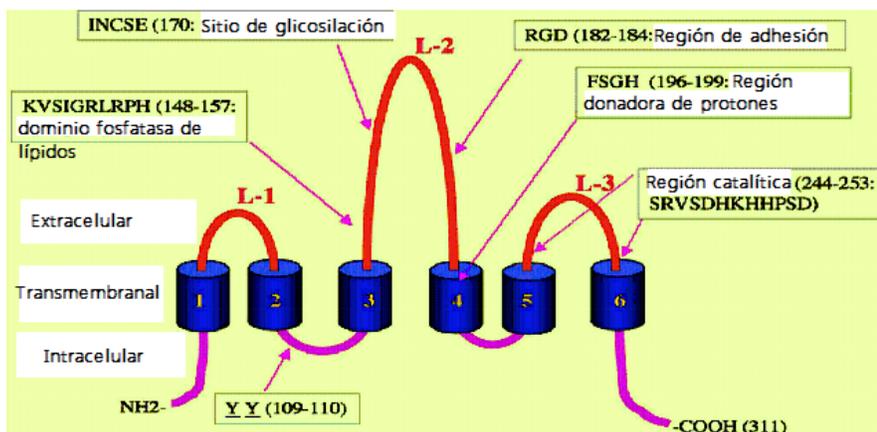


Figura 6. Esquema de la estructura de la LPP3, se indican los principales segmentos de la enzima (Imagen modificada de Wary & Humtsoe, 2005).

A nivel celular, la LPP3 se encuentra en el retículo endoplasmático, en la membrana plasmática y en regiones endomembranales (Aparato de Golgi y Endosomas). En la membrana plasmática, la LPP3 se ha encontrado particularmente en dominios membranales resistentes a detergentes (balsas lipídicas y caveolas). Un aumento en la concentración extracelular del LPA, sustrato de la LPP3, puede tener efectos mitogénicos en ciertos tipos celulares, por lo que la regulación de éste es fundamental para mantener la integridad del organismo (Sigal *et al.* 2005).

Existen líneas de ratones mutantes nulas para los distintos miembros de la familia de LPPs, sin embargo el único fenotipo evidente se observó en el caso de los ratones nulos para la LPP3.

La línea de ratones nulos para LPP3 fue obtenida a partir de la recombinación homóloga en células troncales embrionarias, en donde se sustituyó el alelo endógeno por uno modificado ($LPP3^{Stw03}$), de tal forma que ocurre la delección de ocho aminoácidos que conforman el sitio catalítico de la LPP3. Esta serie de mutaciones provoca la ausencia de enzima funcional en los ratones.

Los ratones nulos $LPP3^{Stw03}$, presentan un fenotipo extremo: letalidad embrionaria, defectos en la vasculogénesis y duplicación del eje de simetría (Escalante-Alcalde *et al.* 2003).

Debido a la letalidad embrionaria de los ratones $LPP3^{Stw03}$, nulos, la línea se mantiene a través de cruces entre ratones heterocigos $LPP3^{Stw03}$ ($LPP3^{Stw03/+}$). Durante el mantenimiento de la línea $LPP3^{Stw03}$ se observó que el envejecimiento de los ratones $LPP3^{Stw03/+}$, correlacionaba con una descendencia mayoritariamente silvestre, es decir, la transmisión del transgen era afectada. A partir de la observación mencionada, se planteó realizar esta tesis.

HIPÓTESIS

Los espermatozoides de los ratones $LPP3^{Stw03/+}$ presentarán anomalías funcionales y/o morfológicas que se incrementarán con la edad.

OBJETIVO GENERAL

Detectar si existen diferencias significativas a nivel funcional y/o morfológico, acrecentadas con la edad, entre los espermatozoides de ratones $LPP3^{Stw03/+}$ con respecto a ratones silvestres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de ratones

Todos los ratones utilizados en los experimentos fueron de la cepa 129/Sv, algunos se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Biotecnología. Los ratones mutantes de la línea *LPP3^{Stw03}* y algunos de los silvestres utilizados, fueron una amable donación de la Dra. Diana Escalante, del Instituto de Fisiología Celular. Para realizar los experimentos expuestos en esta tesis se utilizaron un total de veinte ratones, el genotipo de estos se encuentra registrado en la Tabla 1. Los ratones que contaran entre dos y medio y tres meses de edad, fueron denominados jóvenes, los ratones entre los seis y nueve meses de edad fueron denominados viejos.

GENOTIPO	EDAD	# RATONES UTILIZADOS
Silvestre	Jóven	5
Silvestre	Viejo	8
Mutante (LPP3 Stw03)	Jóven	4
Mutante (LPP3 Stw03)	Viejo	3

Tabla 1. Ratones utilizados en los distintos experimentos.

Obtención de espermatozoides

Se obtuvieron espermatozoides de ratones entre dos y medio y tres meses de edad, denominados: jóvenes y de ratones entre seis y nueve meses de edad, denominados: viejos.

Cada ratón fue sacrificado mediante dislocación cervical. Tras el sacrificio, se disectaron los epidídimos caudales, se realizaron tres cortes a lo largo de ambos y se colocaron en un tubo de 1.5 ml, al cual se le agregó 1 ml (ratones jóvenes) ó 0.5 ml (ratones viejos) de medio Whittens completo (en mM: 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 5.4 Dextrosa, 0.8 Ácido Pirúvico, 4.8 de Ácido Láctico, 20 HEPES, 100 NaCl, 4.7 KCl, 25 NaHCO_3 , 2 CaCl_2 , BSA 5mg/ml, pH= 7.4). El volumen de medio Whittens completo agregado fue la mitad en el caso de los ratones viejos con la finalidad de que la concentración de espermatozoides obtenida, la cual es menor en el caso de los ratones viejos, fuera lo suficiente como para realizar las pruebas de movilidad sin complicaciones. Se incubó la

muestra a 37°C durante 10 min permitiendo el nado libre o hacia arriba (“swim up”) de los espermatozoides, posteriormente se tomaron 10 µl y se realizó un conteo de células presentes en la fase superior de la muestra utilizando una cámara de Mackler. Se extrajo la fase superior y se colocó en un tubo nuevo el cual se dejó incubando 35 minutos a 37 °C para que los espermatozoides se capacitaran. Se utilizaron 300 µl de espermatozoides capacitados para realizar pruebas de motilidad y de reacción acrosomal y 200 µl de espermatozoides no capacitados para analizar la morfología y realizar pruebas de inmunocitoquímica (Ver ANEXO I).

Obtención de células espermatogénicas

Tras haber sacrificado el ratón, se disectaron los testículos y se colocaron en medio EKRB (en mM: 120 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.8 KCl, 1.2 KH₂ PO₄, 1.2 MgSO₄, 1.3 CaCl₂, 11 Glucosa; pH= 7.6, aminoácidos esenciales y no esenciales). Se retiró la túnica albugínea de cada testículo y se colocaron en 4 ml de medio EKRB, se adicionaron 1.5 mg de colagenasa y se incubó la muestra a 33°C en agitación constante para disociar los túbulos seminíferos. Posteriormente se esperó a que la muestra sedimentara en hielo y se realizaron tres lavados por decantación utilizando 2 ml de EKRB. Posteriormente en 4 ml de medio se agregaron 1.5 mg de tripsina, 20 µl de DNasa 20 µg/ml y se agitó la muestra a 33 °C durante 15 min, para completar la disgregación de los túbulos seminíferos se realizó trituración mecánica utilizando una pipeta Pasteur de plástico y así liberar a las células espermatogénicas. Se filtró la muestra obtenida a través de una malla de Nitex de 80 µm sobre un tubo que contenía 1 ml de EKRB con 0.5% de BSA, se agregó al filtrado obtenido 150 µg de inhibidor de tripsina para detener la actividad de la enzima. La muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min y el sobrenadante se desechó, tras lo cual se resuspendieron las células en medio EKRB con 0.5 % de BSA en un tubo nuevo, se realizaron dos lavados más utilizando PBS 1X. Las células se filtraron y se resuspendieron en PBS 1X.

En una cámara húmeda se colocaron laminillas (TGH-Virology de 3 pozos) y se agregaron 100 µl de células en PBS 1X en cada pozo, se extendió la gota y se dejó reposar la muestra 1- 2 hrs a temperatura ambiente. Finalmente, se siguió el protocolo posteriormente descrito (Ver Inmunocitoquímica) con la diferencia de que, en el caso de

las células espermatozógenas no se les deja secar, si no que deben mantenerse siempre en PBS para que no sufran daño estructural (Ver ANEXO II).

Evaluación del peso total y testicular

Después de ser sacrificados, los ratones se pesaron, se extrajeron los testículos y se pesaron también. Posteriormente los datos obtenidos se promediaron y se compararon los valores obtenidos de los ratones mutantes y ratones control, tanto jóvenes como viejos.

Purificación de Zona Pelúcida (ZP) de ratón

Se extrajeron los ovarios de 40 ratones hembra los cuales se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C durante un periodo no mayor a un mes. Posteriormente los ovarios se descongelaron y se homogenizaron utilizando 6 ml de buffer de homogenización 1X por cada 20 ovarios (10X en mM: Tris 250, NaCl 1500, MgCl_2 10, CaCl_2 10, azida de sodio 0.2%; el medio se ajusta a pH 8.5), suplementado con DNasa 0.6 mg/ml, inhibidor de tripsina 6 mg/ml, hialuronidasa 0.6 mg/ml con un homogenizador eléctrico durante 5 seg. Se agregaron 300 μl de una solución stock de detergente NP-40 20% de tal forma que la concentración final fuese 1% (Stock 20%, almacenado a 4°C). Posteriormente se homogenizó nuevamente la muestra con el homogenizador eléctrico durante otros 5 seg. El tejido se disoció utilizando un homogenizador de émbolo, se le adicionaron 300 μl de deoxicolato de sodio 20% de tal forma que la concentración final fuese 1% en la muestra, se continuó triturando la muestra con el homogenizador de émbolo. En un tubo con rosca para centrífuga de 10 ml se agregaron 3.8 ml de percoll al 90%. Sobre el percoll se agregó la muestra homogenizada, y se agregó nuevamente percoll al 35% hasta llenar el tubo para formar un gradiente, la muestra se agitó vigorosamente y se centrifugó a 19000 rpm durante 1 hr a 12°C . La ZP se concentra, formando un anillo en el tercio superior del gradiente y se extrajo del gradiente con la aguja de una jeringa y se colocó en un tubo falcon de 15 ml dentro del cual se agregaron 15 ml de Medio 2 (en mM: NaCl 150, Tris 25; el medio se ajusta a pH 8.5) y 75 μl de NP-40 y se llenó el tubo con Medio 2. Se centrifugó la muestra a 5000 rpm durante 15 min a 4°C , el sobrenadante se desechó y se resuspendió la pastilla en 500 μl de Medio 2. Se centrifugó la muestra a 8000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla

se resuspendió en 40 μ l de PBS/glicerol 50%. Se tomó una alícuota de 10 μ l, se observó al microscopio para comprobar la presencia ZPs. Las ZPs aisladas se congelaron a -20°C . Antes de ser utilizadas, se cuantificó la cantidad de ZPs en un espectrofluorómetro a través de una prueba colorimétrica en la cual se utilizó reactivo de Bradford (en 500 ml: 0.05 gr de Comassie G-250, 25 ml de etanol, 50 ml de ácido fosfórico y 500 ml de agua destilada) como colorante de las proteínas, este ensayo nos permite cuantificar la concentración de proteína en una muestra a través de la absorbancia de la misma para esto es necesario generar una curva estándar utilizando concentraciones conocidas de albúmina bovina, posteriormente se mide la absorbancia de la muestra con la concentración de proteínas desconocida y se compara con la curva de concentración estándar para determinar de esta forma la concentración desconocida. Para los experimentos que requieren ZP, se solubilizó la cantidad necesaria de ZPs el día del experimento (Ver Solubilización de ZP y ANEXO III).

Solubilización de ZP

Antes de comenzar con el protocolo para evaluar la reacción acrosomal se tomaron 20 μ l de ZP en PBS/Glicerol 50% de la ZP aislada (Ver purificación de ZP), se agregaron 80 μ l de medio Whittens adicionado con HCO_3^- y albúmina bovina (Medio capacitante), se centrifugó la muestra durante 10min, a 14000 rpm a 4°C , posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en medio Wittens capacitante de tal forma que por cada 50 μ l de espermatozoides capacitados a una $4-6 \times 10^6$ células/ml, se agregó 1 μ l de la ZP solubilizada. Se calentó la muestra a 60°C por 1hr, una vez fría se utilizó la ZP solubilizada como uno de los inductores de la reacción acrosomal.

Ensayos de Reacción Acrosomal

La reacción acrosomal se llevó acabo en tubos eppendorf donde se colocaron alícuotas de 30 a 50 μ l de espermatozoides capacitados a una concentración de $4-6 \times 10^6$ células/ml y se añadió progesterona (45 μM) o ZP (5-8 ZP/ μ l)) como inductores fisiológicos y A-23187 (15 μM) o DMSO (no más de 0.5%) como controles positivo y negativo, respectivamente. Los espermatozoides se incubaron con los compuestos mencionados durante 30 min a 37°C , después se fijaron agregando formaldehído 10% disuelto en PBS

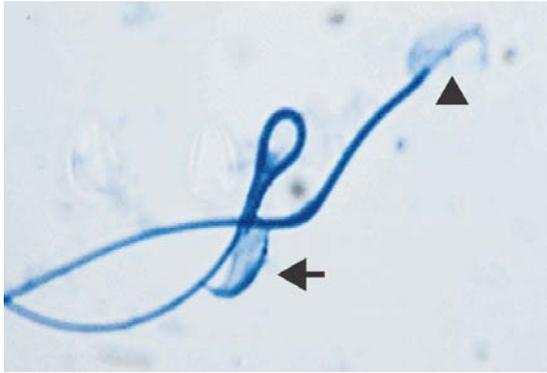


Figura 7. Tinción de espermatozoides con Azul de Coomassie, se observa un acrosoma intacto (flecha) y un espermatozoide que llevó a cabo la reacción acrosomal (cabeza de una flecha) (Jungnickel, Marrero, Birnbaumer, Lemos, & Florman, 2001). El colorante azul de Coomassie se adhiere principalmente a aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente a la arginina. Debido a que en el acrosoma hay un alto contenido de proteínas ricas en los aminoácidos SE mencionados, el azul se observa con mayor intensidad en esta región si el espermatozoide no ha llevado a cabo la reacción acrosomal.

a una relación volumétrica de 1:1, la concentración final de formaldehído en la muestra fue 5%. Se incubaron las muestras durante 15 min a temperatura ambiente, se centrifugaron 10 min a 3000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 30 μ l de PBS 1X. Las muestras se colocaron en portaobjetos y se dejaron secar. Se agregó una gota de Azul de Coomassie R-250 (0.22% Coomassie R-250, 50% metanol, 10% ácido acético glacial) y se incubó el colorante de 10-15 segundos. Tras la exposición se lavó cada muestra con agua, se dejó secar y se agregaron 10 μ l de PBS-Glicerol 1:1, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y

se presionó ligeramente, retirando el exceso de PBS-Glicerol con papel. Se contaron de 100 a 200 células por cada tratamiento utilizando microscopía en contraste de fases con un aumento 100X para obtener el porcentaje de células reaccionadas por tratamiento en el grupo de ratones mutantes con respecto al de ratones control. Se realizaron pruebas estadísticas (Ver ANEXO IV).

Inmunocitoquímica

Se utilizaron alícuotas de 150 μ l de la muestra de espermatozoides y se les agregó 150 μ l de paraformaldehído 8% disuelto en PBS. Dentro de una cámara húmeda se colocaron laminillas (TGH-Virology de 3 pozos) y se agregaron 100 μ l de células en paraformaldehído en cada pozo, se extendió la gota y se dejó reposar la muestra 1- 2 hrs a temperatura ambiente. Se retiró el paraformaldehído y se realizaron tres lavados con PBS con una duración de 5 min por lavado. La muestra se dejó secar al aire, una vez que estuvo seca se permeabilizaron las células adicionando 100 μ l de tritón al 0.1 % en cada pozo, se incubaron las células con tritón durante 10 min, posteriormente se realizaron tres

lavados con PBS con intervalos de 5 min entre cada uno de estos. Al terminar el último lavado se incubó la muestra con 100 μ l de gelatina al 3% durante 2 hrs a temperatura ambiente, ya transcurrido el tiempo indicado se incubó la muestra con el anticuerpo primario contra LPP3 (producido y donado por la Dra. Diana Escalante Alcalde, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM) a distintas diluciones (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000) o con una solución de gelatina al 3% en PBS en caso del experimento control, se incubaron las muestras durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó una dilución 1:100 en PBS del anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes Inc) a 14, 0000 rpm durante 15 min. Se retiró el anticuerpo primario mediante tres lavados con PBS con una duración de 5 min por lavado y se incubó la muestra durante 1 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Posteriormente se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron tres lavados con PBS con una duración de 5 minutos por lavado. Finalmente se agregaron 10 μ l de citifluor sobre cada pozo, se colocaron cubreobjetos sobre los mismos y se selló cada uno con barniz de uñas transparente. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal de fluorescencia Bio-Rad MRC600, láser Kr-Ar, con tres líneas de excitación a 488 nm, 568 nm y 647 nm adaptado a un microscopio de epi-fluorescencia Axioskop de Zeiss de óptica infinita, con objetivo 40X/0,75 Ph2, acoplado a un motor-Z para realizar cortes ópticos, un digitalizador de imágenes y una cámara fotográfica (Ver ANEXO V).

Morfología

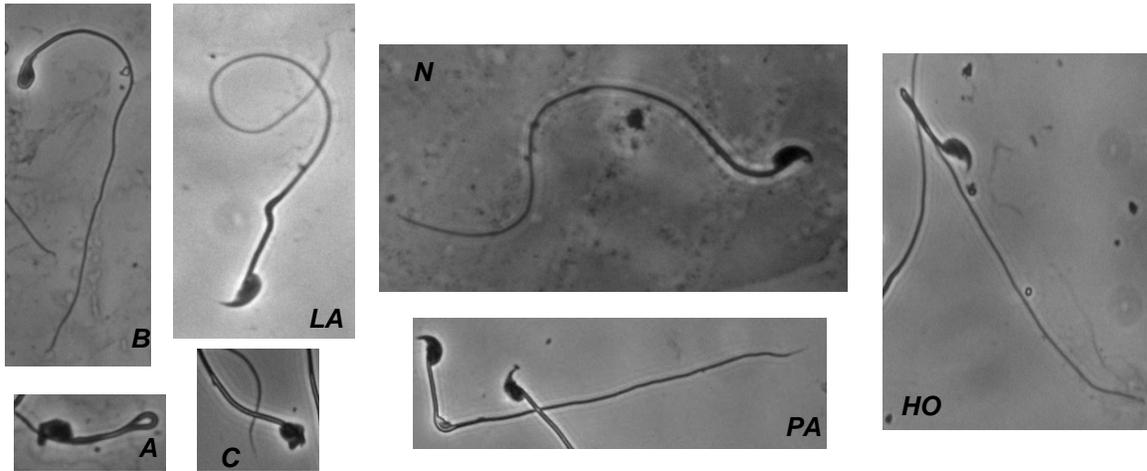


Figura 8. Anomalías morfológicas de los espermatozoides. Diversos morfotipos encontrados para la cabeza y el flagelo en las cuatro poblaciones de ratones estudiadas. Se detectaron tres principales anomalías morfológicas de las cabezas de los espermatozoides, las cuales fueron nombradas de manera arbitraria: Botón (**B**), Achatada (**A**) y Clavel (**C**). En cuanto a las anomalías morfológicas del flagelo se observaron tres principales: Ligeramente angulado (**LA**), Pronunciadamente angulado (**PA**) y Horquilla (**H**). En la figura también se muestra el morfotipo de un espermatozoide normal (**N**).

Se fijó una alícuota de 40 μ l de la muestra de espermatozoides con 40 μ l de paraformaldehído al 8% disuelto en PBS durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 3000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en PBS. Las muestras se colocaron en portaobjetos y se dejaron secar tras lo cual se agregó una gota de Azul de Coomassie R-250 durante 10-15 segundos. Se lavó cada muestra con agua, se dejó secar, se agregaron 10 μ l de PBS-Glicerol 1:1 y finalmente se colocó un cubreobjetos sobre la muestra, presionando ligeramente y retirando el exceso de PBS-Glicerol con papel. Se contaron 100 células de cada muestra utilizando microscopía en contraste de fases con un aumento 20X y se clasificaron dependiendo del estado de su cabeza (normales, clavel y botón) y del ángulo de su flagelo (ligeramente angulado, pronunciadamente angulado y horquilla) (Ver Figura 7). A partir del conteo de las células en cada categoría se cuantificaron los porcentajes de células deformes presentes en el grupo de ratones mutantes con respecto al de ratones control, tanto jóvenes como viejos (Ver ANEXO VI).

Pruebas de Movilidad

Los parámetros de movilidad de las poblaciones de espermatozoides se cuantificaron utilizando un programa de análisis de semen asistido por computadora (CASA, por sus siglas en inglés) llamado Hobson Tracker. Alícuotas de 10 μ L se colocaron en cámaras de conteo

(MicroCell, Conception Technologies) precalentadas (37°C; profundidad de 20 μ m), se analizaron de 100-300 células por

muestra, dependiendo de la concentración obtenida mediante el nado hacia arriba. Los parámetros registrados (Tabla 2) con el programa Hobson Tracker se compararon entre las poblaciones de espermatozoides obtenidas a partir de ratones mutantes y ratones control. La explicación gráfica de los principales parámetros se presenta en la Figura 9.

Nombre del Parámetro	Abreviación
Velocidad Curvilínea	VCL
Velocidad Promedio	VAP
Velocidad en Línea Recta	VSL
Media del Desplazamiento Angular	MAD
Frecuencia del Batido Flagelar	BCF
Amplitud del Desplazamiento Lateral de la Cabeza	ALH
Linealidad	LIN
Rectitud	STR

Tabla 2. Lista de los principales parámetros registrados por el programa Hobson Tracker para cada uno de los espermatozoides rastreados y sus correspondientes abreviaciones.

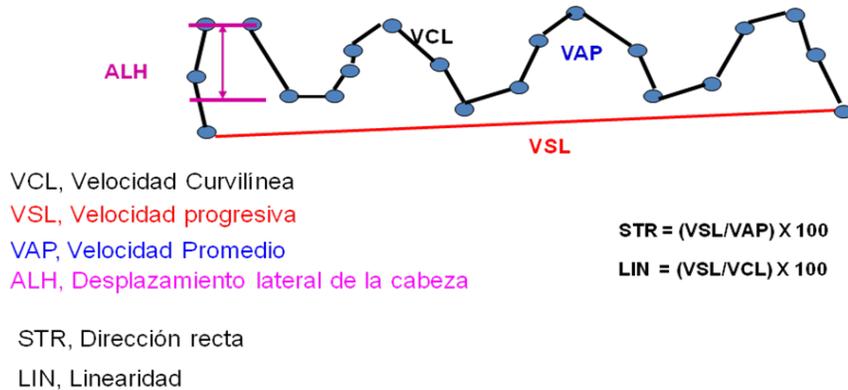


Figura 9. Esquema de parámetros de movilidad registrados a través de CASA. Se muestra la trayectoria hipotética de un espermatozoide y se indican los principales parámetros registrados (ALH, VCL, VAP y VSL). La STR y LIN son porcentajes obtenidos mediante la relación indicada a la derecha.

Se definió a los espermatozoides hiperactivados según criterios indicados anteriormente (Bray, Son, Kumar, & Meizel, 2005): $VCL \geq 180 \mu\text{m/s}$, $ALH \geq 9.5 \mu\text{m}$ y $LIN \leq 38\%$, aquellos espermatozoides que presentaron estas tres condiciones se clasificaron como hiperactivados. Se realizaron pruebas estadísticas para detectar si existían diferencias significativas entre los distintos parámetros de movilidad registrados en espermatozoides de ratones mutantes y ratones control, tanto jóvenes como viejos.

Análisis Estadístico

La diferencia entre las categorías de VCL, velocidad promedio (VAP), velocidad en línea recta (VSL) y la Morfología de ratones mutantes y ratones control fue evaluada mediante una prueba de χ^2 .

La diferencia con respecto al porcentaje de espermatozoides hiperactivados en la población de espermatozoides de ratones mutantes con respecto a la de los ratones control se llevó a cabo utilizando una prueba de Wilcoxon.

Para detectar si existían diferencias significativas entre los porcentajes de reacción acrosomal obtenidos al tratar espermatozoides de ratones mutantes con respecto a aquellos pertenecientes a ratones control se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Cuando fue pertinente se aplicaron análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de una prueba post hoc de comparación múltiple Tukey-Kramer. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Datos generales

En el presente estudio se utilizaron 4 poblaciones de ratones: jóvenes silvestres de la cepa 129/SvJ (+/+ Jóvenes), jóvenes $LPP3^{Stw03/+}$ (-/+ Jóvenes), viejos silvestres de la cepa 129/SvJ (+/+ Viejos) y viejos $LPP3^{Stw03/+}$ (-/+ viejos). El peso total promedio de cada una de las poblaciones se muestra en la Figura 10, la única diferencia significativa fue aquella entre el peso promedio de los ratones $LPP3^{Stw03/+}$ jóvenes y los ratones silvestres viejos, siendo el de los primeros significativamente menor que aquel de los segundos. En cuanto al peso testicular y la concentración de espermatozoides obtenidos a través de la técnica del nado hacia arriba, no existieron diferencias significativas entre las cuatro poblaciones de ratones estudiadas (Figura 11).

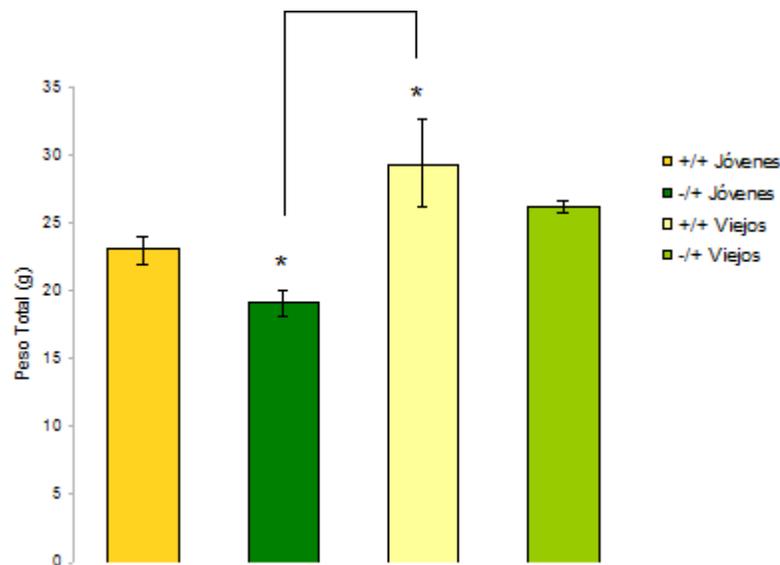


Figura 10. *Peso total promedio de las cuatro poblaciones de ratones estudiadas.* En las gráficas de barra se muestra el peso total promedio. La única diferencia significativa entre el peso promedio de las distintas poblaciones de ratones estudiadas fue entre los ratones jóvenes heterocigos (-/+) y los ratones viejos silvestres (+/+). La diferencia significativa entre los promedios de las dos poblaciones se indica con asteriscos. ($n_{+/+ \text{ jóvenes}} = 5$, $n_{-/+ \text{ jóvenes}} = 4$, $n_{+/+ \text{ viejos}} = 8$, $n_{-/+ \text{ viejos}} = 3$, $*p \leq 0.05$)

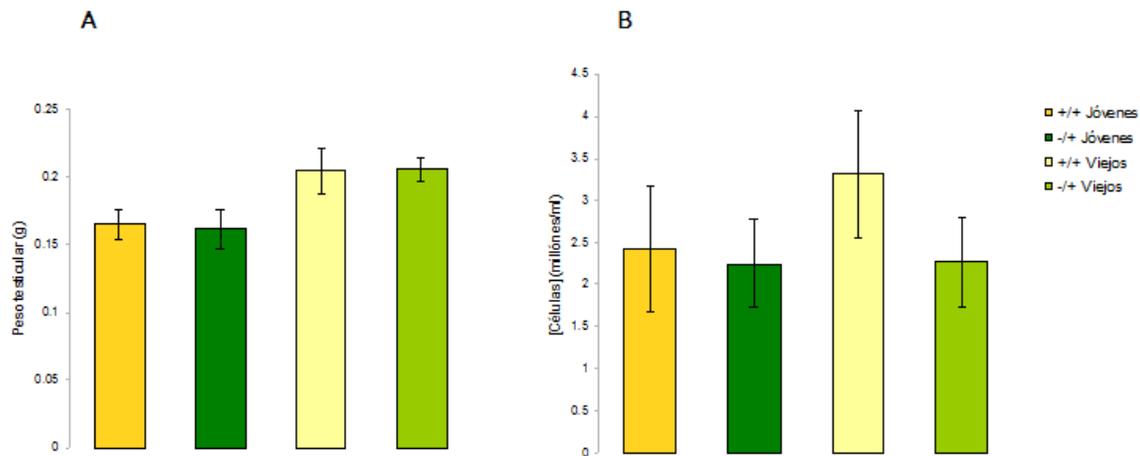


Figura 11. Peso testicular promedio y concentración de espermatozoides obtenida en el nado hacia arriba, en las cuatro poblaciones de ratones estudiadas. Gráficas de barra obtenidas a partir del promedio del peso testicular (A) y la concentración de espermatozoides obtenida en el nado hacia arriba (B) para cada una de las poblaciones de ratones estudiadas. No se encontraron diferencias significativas al comparar los promedios de estos dos parámetros.

($n_{+/+ \text{ jóvenes}} = 5$, $n_{-/+ \text{ jóvenes}} = 4$, $n_{+/+ \text{ viejos}} = 8$, $n_{-/+ \text{ viejos}} = 3$, $P \leq 0.05$)

Reacción Acrosomal

Se observó un incremento en el porcentaje de RA espontánea en la población de ratones envejecidos, tanto silvestres como mutantes, siendo 36.48% para los ratones viejos $LPP3^{Stw03/+}$ y 38.41% para los ratones viejos silvestres. En cuanto a los ratones jóvenes $LPP3^{Stw03/+}$, el porcentaje de RA espontánea fue 28.24% con respecto al 26.57% de los ratones jóvenes silvestres. A pesar de que no encontramos una diferencia significativa entre el porcentaje de RA espontánea de las cuatro poblaciones, se observa un aumento en esta conforme la edad de ambos genotipos se incrementa (Figura 12, Izquierda).

No detectamos diferencias en la inducción causada por la ZP en los ratones jóvenes $LPP3^{Stw03/+}$ y silvestres, que fue de 13.38% y 10.4%, respectivamente. En el caso de ratones viejos, esta inducción presentó una tendencia a disminuir, siendo 6.71% para los ratones viejos $LPP3^{Stw03/+}$ y 5.52% para los ratones viejos silvestres (Figura 12).

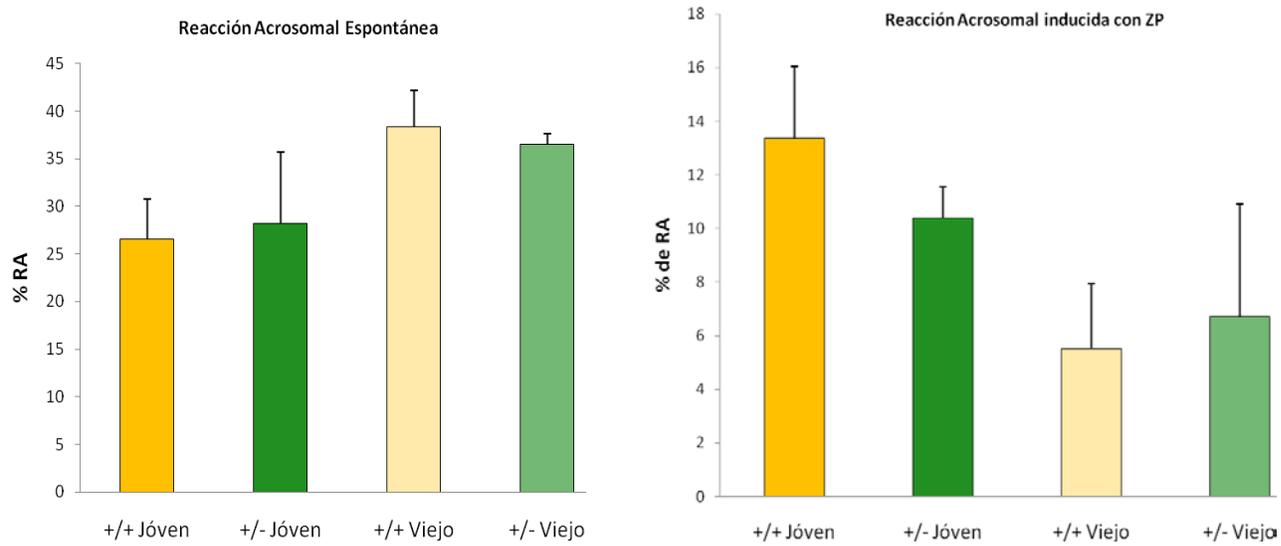


Figura 12. Porcentaje de reacción acrosomal. RA espontánea (Izquierda) y RA inducida utilizando ZP (Derecha). La RA espontánea tiende a aumentar al acrecentarse la edad de los ratones, la inducción causada por ZP tiende a disminuir al envejecer los ratones. ($n_{+/+ \text{ jóvenes}} = 3$, $n_{-/+ \text{ jóvenes}} = 3$, $n_{+/+ \text{ viejos}} = 4$, $n_{-/+ \text{ viejos}} = 3$, $P \leq 0.05$)

Inmunocitoquímicas

Con la finalidad de detectar el patrón de expresión de la LPP3 en el espermatozoide de ratón, se realizaron inmunocitoquímicas utilizando muestras obtenidas a partir del epidídimo caudal de ratones silvestres (Figura 13) y ratones mutantes heterocigos (Figura 14). A pesar de haber incubado algunas muestras con concentraciones extremas de anticuerpo primario (1:25), no se observó señal específica en ningún caso, esto sugiere que la LPP3 no se encuentra presente en los espermatozoides maduros del ratón.

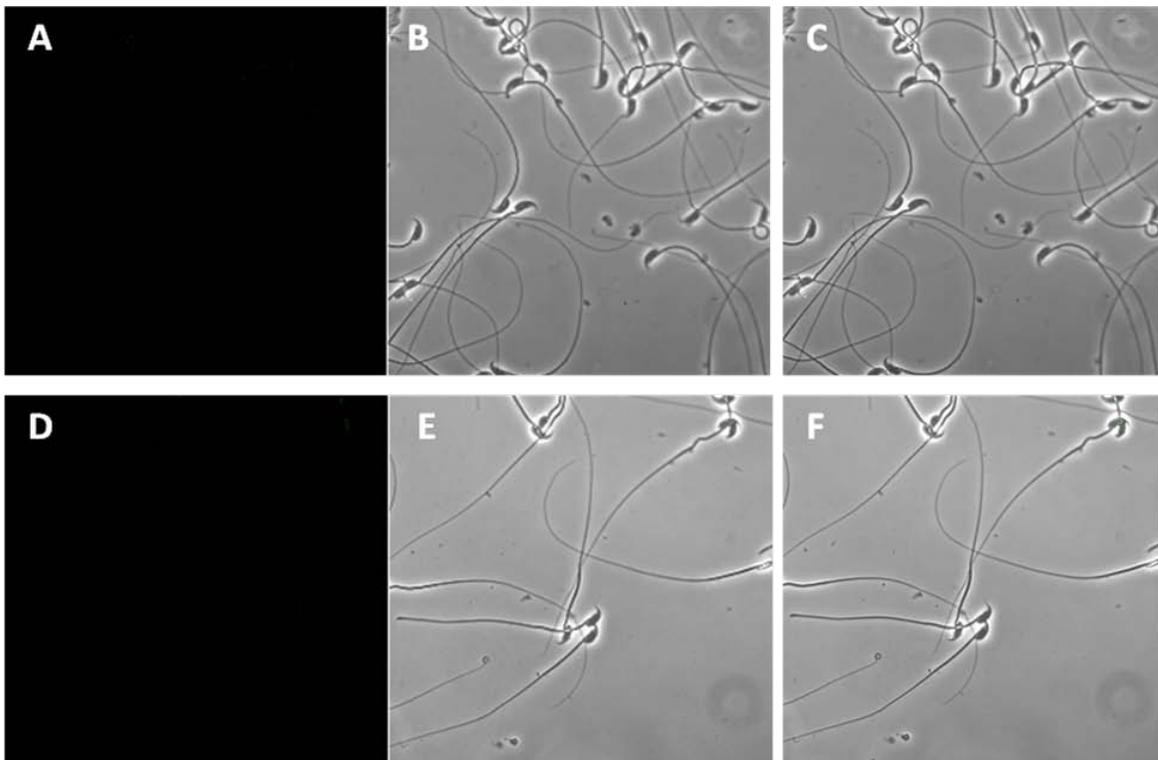


Figura 13. Localización de LPP3 en los espermatozoides de ratón silvestre. Imágenes de microscopía confocal de espermatozoides del epidídimo caudal. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario para LPP3 a una concentración 1:200 (D-F) y con el anticuerpo secundario Alexa488 a una concentración de 1:1000 (A-C). Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopía de contraste (A y D) y microscopía de fluorescencia (B y E). Se muestran también las imágenes sobrelapadas (F y G). No se observa una señal específica en la muestra incubada con el anticuerpo primario para LPP3, lo cual sugiere la ausencia de esta proteína en los espermatozoides maduros de ratón (C y F) (n= 5 ratones, 2 experimentos independientes).

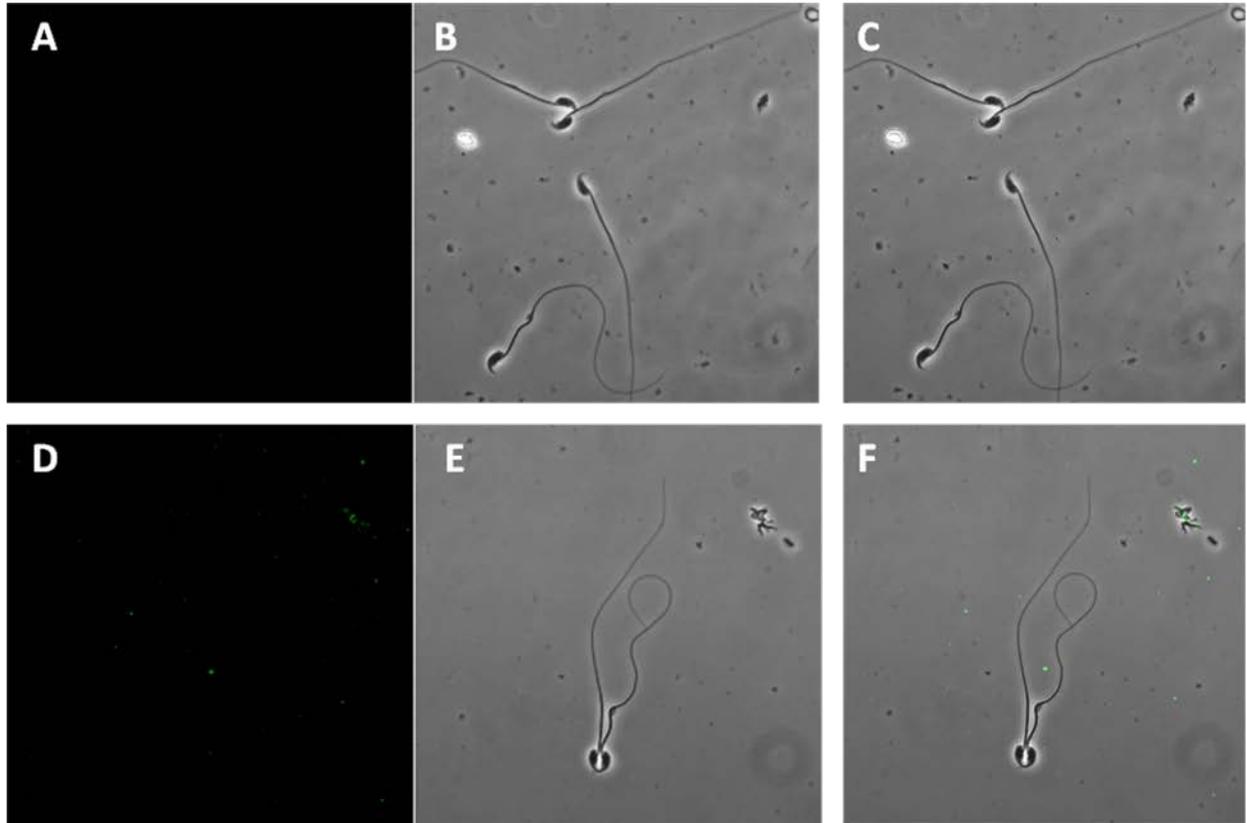


Figura 14. Localización de LPP3 en los espermatozoides de ratón mutante heterócigo. Imágenes de microscopía confocal de espermatozoides del epidídimo caudal. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario para LPP3 a una concentración 1:25 (D-F) y con el anticuerpo secundario Alexa488 a una concentración de 1:1000 (A-C).

Fotografías obtenidas utilizando microscopía de contraste (A y D), microscopía de fluorescencia (B y E), se muestran también las imágenes sobrelapadas (C y F). No se observa una señal específica en la muestra incubada con el anticuerpo primario para LPP3 a pesar del aumento en la concentración del anticuerpo primario utilizado durante la incubación (C y F) (n= 4 ratones, 2 experimentos independientes).

Debido a que no se detectó una señal específica de fluorescencia que indicara la presencia de LPP3 en los espermatozoides maduros del ratón, y a que datos previos con este mismo anticuerpo demostraban la expresión de LPP3 en los túbulos seminíferos (Figura 22), quisimos detectar su presencia en células espermatogénicas aisladas suponiendo que la proteína es necesaria durante la maduración del espermatozoide. Para investigar esta posibilidad, realizamos inmunocitoquímicas con poblaciones heterogéneas de células espermatogénicas de ratones (Figura 15, Figura 16). Detectamos que LPP3 se expresa en células espermatogénicas en distintos estadios de maduración. Curiosamente, se observó una expresión diferencial de la LPP3 entre células espermatogénicas de la misma muestra, es decir, aunque algunas de las células espermatogénicas que aparentaban encontrarse en el mismo estadio que otras (tamaño y morfología) presentaban o no señal positiva (Figura 17).

Se concluyó que LPP3 no se encuentra en el espermatozoide maduro del ratón, pero sí en la mayoría de la población de células espermatogénicas en etapas tempranas de maduración y en proceso de condensación.

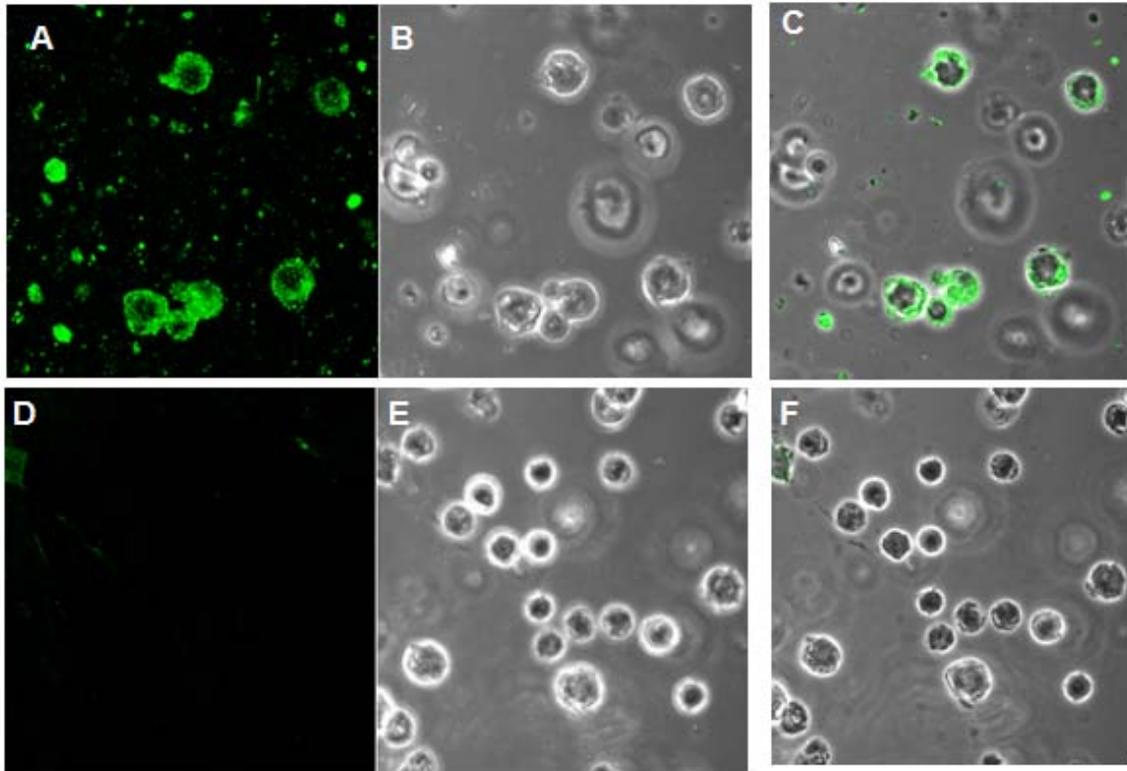


Figura 15. Localización de LPP3 en poblaciones heterogéneas de células espermatogénicas no permeabilizadas. Fotografías de células espermatogénicas no permeabilizadas, incubadas únicamente con el anticuerpo secundario Alexa488 a una concentración de 1:1000 (D-F) e incubadas previamente con el anticuerpo primario para LPP3 a una concentración 1:100 (A-C). Fotografías obtenidas utilizando microscopía de contraste (B y E), microscopía de fluorescencia (A y D), se muestran también las imágenes sobrelapadas (C y F). Se observa señal (D y F) lo que sugiere la presencia de LPP3 en células de distintos estadios dentro de la población de células espermatogénicas (n=2 ratones, 2 experimentos independientes).

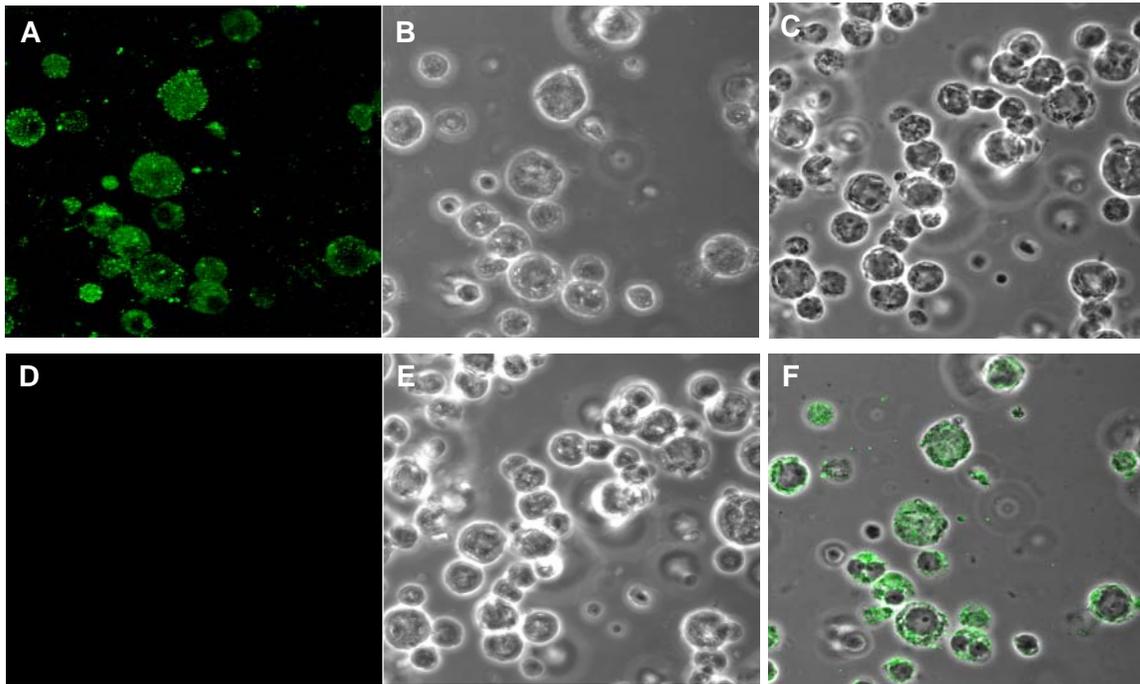


Figura 16. Localización de LPP3 en poblaciones heterogéneas de células espermatogénicas permeabilizadas. Fotografías de células espermatogénicas permeabilizadas, incubadas únicamente con el anticuerpo secundario Alexa488 a una concentración de 1:1000 (D-F) e incubadas previamente con el anticuerpo primario para LPP3 a una concentración 1:100 (A-C). Fotografías obtenidas utilizando microscopía de contraste (B y E), microscopía de fluorescencia (A y D), se muestran también las imágenes sobrelapadas (C y F). Se observa señal (D y F) lo que sugiere la presencia de LPP3 en células de distintos estadios dentro de la población de células espermatogénicas (n=2 ratones, 2 experimentos independientes).

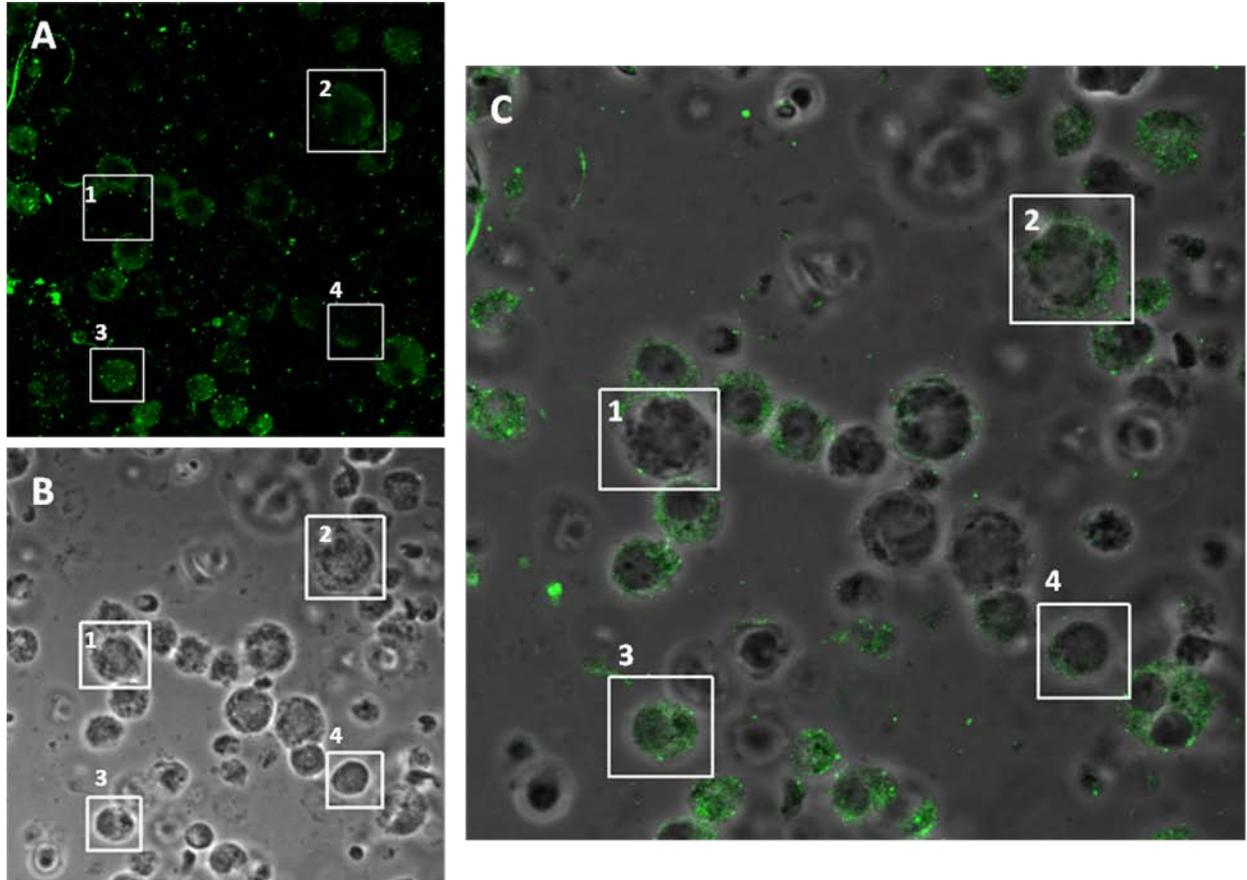


Figura 17. *LPP3* presenta un patrón de expresión irregular entre células espermatogénicas de la misma población heterogénea. Fotografías de células espermatogénicas no permeabilizadas, incubadas con el anticuerpo primario para *LPP3* a una concentración 1:50. Se observa que existen células espermatogénicas sin señal de fluorescencia, las cuales aparentan encontrarse en la misma etapa de maduración que otras con señal positiva (comparar 1 con respecto a 2 y 3 con respecto a 4). La ausencia de señal se observa en algunas células espermatogénicas tanto en un estado temprano de maduración (4), como en células en condensación (1). Fotografías obtenidas utilizando microscopía de contraste (B), microscopía de fluorescencia (A) e imagen superpuesta y ampliada (C).

Morfología

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de espermatozoides anormales al comparar el porcentaje entre ratones jóvenes silvestres y ratones viejos $LPP3^{Stw03/+}$. Se observó que hay una clara tendencia a presentar una mayor cantidad de espermatozoides anormales conforme la edad de los ratones mutantes aumenta (Ver Figura 18), sin embargo la diferencia en el porcentaje de espermatozoides anormales presentes en la población de ratones jóvenes $LPP3^{Stw03/+}$ con respecto a los viejos no fue significativa. Aproximadamente 31.7 % de los espermatozoides observados en las muestras de los ratones viejos $LPP3^{Stw03/+}$ fueron anormales, en contraste con el 19.5 % de espermatozoides pertenecientes a los ratones jóvenes $LPP3^{Stw03/+}$. En el caso de los ratones control, se observó un incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales al aumentar la edad, siendo 13.5 % anormales en ratones jóvenes y 23.26 % en el caso de ratones viejos. Dentro de los espermatozoides anormales, no se observó un aumento en la presencia de ningún morfotipo de manera específica a alguna de las poblaciones estudiadas (Ver Figura 19).

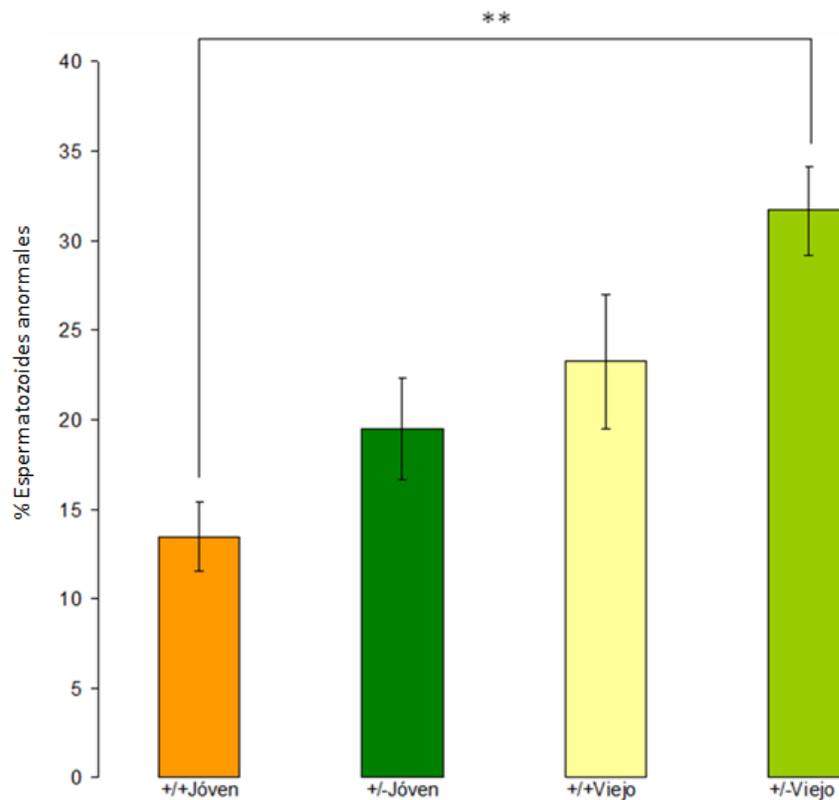


Figura 18. Porcentaje de espermatozoides anormales en las cuatro poblaciones de espermatozoides estudiadas. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides anormales obtenidos a partir de los ratones jóvenes y viejos, portadores del alelo $\Delta 03Stw$. Sin embargo, al comparar el porcentaje de espermatozoides anormales entre los ratones silvestres jóvenes y los ratones viejos portadores del alelo $\Delta 03Stw$, se observó una diferencia significativa (** $P \leq 0.01$). Se observa un aumento en el porcentaje de espermatozoides anormales en el caso de los ratones mutantes, el aumento parece acentuarse al envejecer los miembros de esta población. (n= 3 ratones por grupo, 500 espermatozoides por cada uno)

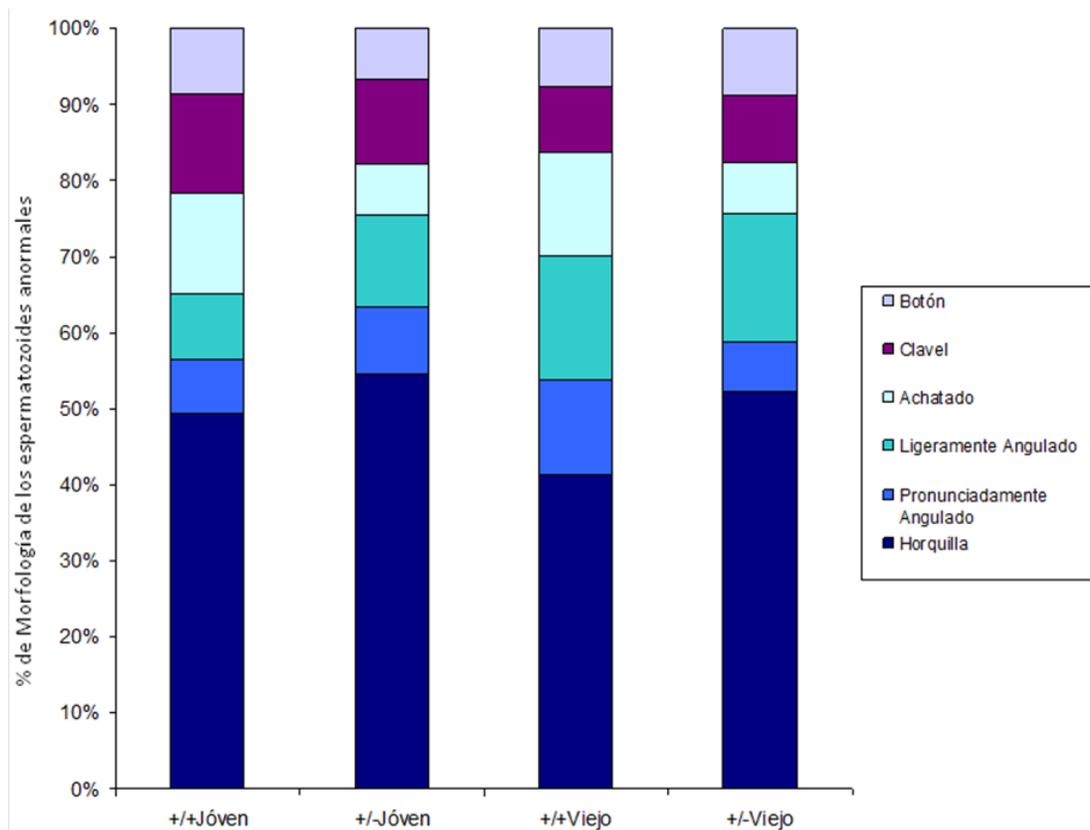


Figura 19. Porcentaje de las morfologías de los espermatozoides anormales en cada población. Dentro de las morfologías observadas y cuantificadas no existió un aumento específico para alguna de las poblaciones estudiadas. Abreviación de la clasificación morfológica, en el caso de anomalías en la cabeza: Botón (B), Clavel (C), Achatada (A), en el caso del flagelo: Ligeramente Angulado (LA), Pronunciadamente Angulado (PA), Horquilla (HO). (n=3 ratones por genotipo, 400 espermatozoides por ratón).

Movilidad

De los parámetros obtenidos a través de CASA analizamos tres principales tipos de velocidad: VCL, VAP y VSL (Figura 9). Existió una diferencia significativa en el promedio de VCL en el caso de los ratones jóvenes silvestres con respecto a los viejos silvestres y de los ratones jóvenes mutantes con respecto a los viejos silvestres, siendo la media de los primeros 135 $\mu\text{m/s}$, 122 $\mu\text{m/s}$ en el caso de los segundos, y 134 $\mu\text{m/s}$ en el caso de los terceros. No existen diferencias significativas entre los ratones *LPP3^{Stw03/+}* jóvenes y viejos al ser comparadas las distribuciones poblacionales de la VCL, siendo la media de los segundos, 130 $\mu\text{m/s}$. Esta observación indica que la VCL se redujo de manera significativa, únicamente en los espermatozoides obtenidos a partir de los ratones viejos silvestres (Figura 20, A).

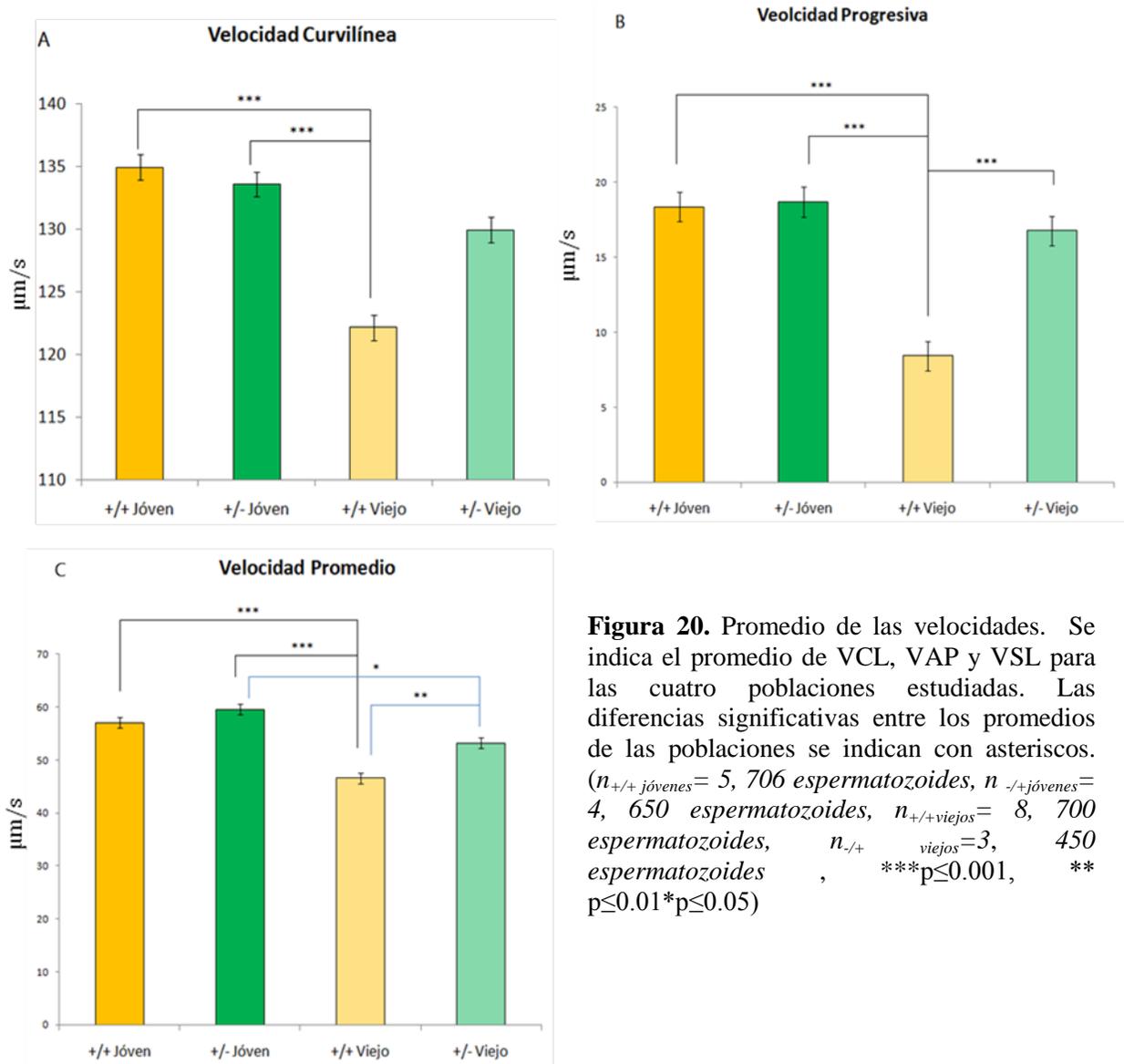


Figura 20. Promedio de las velocidades. Se indica el promedio de VCL, VAP y VSL para las cuatro poblaciones estudiadas. Las diferencias significativas entre los promedios de las poblaciones se indican con asteriscos. ($n_{+/+ \text{ jóvenes}} = 5, 706$ espermatozoides, $n_{-/+ \text{ jóvenes}} = 4, 650$ espermatozoides, $n_{+/+ \text{ viejos}} = 8, 700$ espermatozoides, $n_{-/+ \text{ viejos}} = 3, 450$ espermatozoides, $***p \leq 0.001$, $**p \leq 0.01$, $*p \leq 0.05$)

La VSL de las dos poblaciones de ratones jóvenes no fue significativamente diferente entre sí, siendo aproximadamente 18 $\mu\text{m/s}$ para los ratones jóvenes silvestres y 19 $\mu\text{m/s}$ para el grupo de ratones $LPP3^{Stw03/+}$ $\mu\text{m/s}$. En el caso de los ratones viejos $LPP3^{Stw03/+}$, la media fue de 17 $\mu\text{m/s}$ y tampoco hubo diferencias significativas con respecto a los dos grupos de ratones jóvenes. Sin embargo, sí encontramos una diferencia significativa al ser comparada la VSL de este grupo con la de los ratones silvestres viejos, la cual fue de 8 $\mu\text{m/s}$ y la de los dos grupos de ratones jóvenes (Figura 20, B).

En cuanto a las medidas poblacionales de VAP, no existieron diferencias significativas entre la distribución de los ratones $LPP3^{Stw03/+}$ jóvenes con respecto a los ratones jóvenes silvestres, siendo las medias poblacionales 57 $\mu\text{m/s}$ en el primer caso y 60 $\mu\text{m/s}$ en el segundo. Sin embargo al comparar la VAP de la población de ratones viejos silvestres y de ratones $LPP3^{Stw03/+}$ viejos se encontraron diferencias significativas con respecto a los grupos jóvenes y entre ellos mismos, siendo la media de los primeros 47 $\mu\text{m/s}$ y 53 $\mu\text{m/s}$ en el caso del segundo (Figura 20, C).

En cuanto al porcentaje de células inmóviles detectada en las cuatro poblaciones estudiadas, no hubo una diferencia significativa, siendo el porcentaje de células inmóviles en los distintos grupos un total de 7-9% de la muestra.

No encontramos diferencias significativas en cuanto al porcentaje de espermatozoides hiperactivados dentro de las cuatro poblaciones estudiadas (Figura 21). Sin embargo se observa una tendencia a que este porcentaje disminuya en la población de espermatozoides conforme la edad de los ratones aumenta.

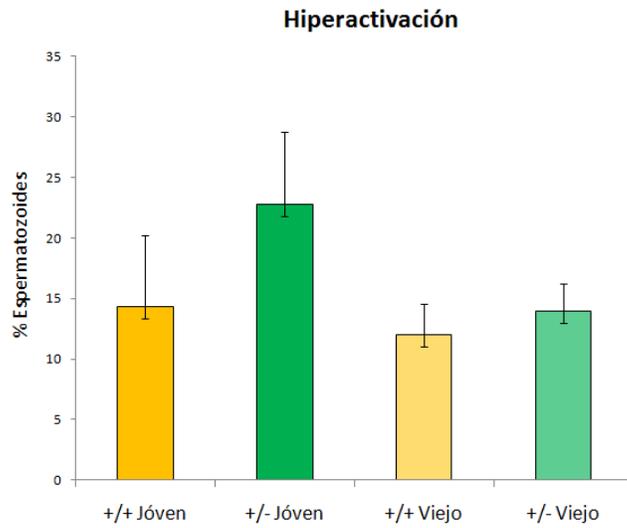


Figura 21. Porcentaje de espermatozoides hiperactivados en las cuatro poblaciones de ratones estudiadas. No encontramos diferencias significativas a pesar de que se observa que el porcentaje tiende a disminuir en el caso de los grupos viejos. $n_{+/+ \text{ jóvenes}} = 5$ ratones, 706 espermatozoides, $n_{+/- \text{ jóvenes}} = 4$ ratones, 650 espermatozoides, $n_{+/+ \text{ viejos}} = 8$ ratones, 700 espermatozoides, $n_{+/- \text{ viejos}} = 3$ ratones, 450 espermatozoides.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los datos generales medidos en las cuatro poblaciones estudiadas indican que no existen diferencias significativas entre éstas, a excepción del peso total, en el que se detectó un peso significativamente menor en el caso de los ratones jóvenes de la cepa *LPP3^{Stw03/+}*, sin embargo el hecho de presentar un menor peso total que el resto de los grupos no pareció afectar ni al peso testicular, ni a la concentración de espermatozoides obtenida a partir del nado hacia arriba, por lo que esta característica no está directamente vinculada con aspectos de la fertilidad.

En el caso de la RA, tampoco se observaron diferencias significativas entre las poblaciones. Sin embargo, se encontró que la RA espontánea tendía a aumentar en los grupos de ratones viejos y la RA inducida por ZP se reducía en los mismos grupos.

El patrón de expresión de LPP3 indica que esta proteína no se encuentra en los espermatozoides maduros pero podría tener un papel importante durante la maduración de los mismos. El hecho de que se haya encontrado señal positiva al realizar inmunocitoquímicas con poblaciones de células espermátogénicas, es consistente con experimentos realizados previamente, en los que se utilizó el mismo anticuerpo para observar la expresión de esta proteína, mediante inmunohistoquímicas en cortes de diversos tejidos (Figura 22).

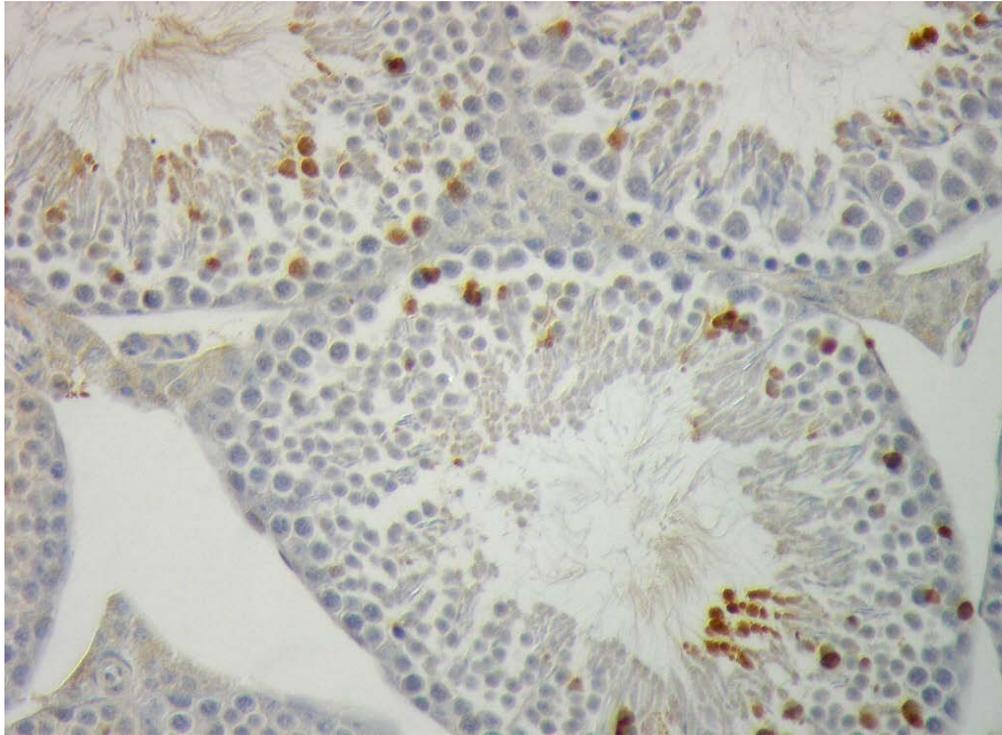


Figura 22. *Inmunohistoquímica de túbulos seminíferos.* Tinción con inmunoperoxidasa utilizando el anticuerpo LPP3 producido por Escalante-Alcalde, datos no publicados.

Una de las anomalías en los espermatozoides, causadas por fallas durante la maduración es la teratospermia (alto porcentaje de espermatozoides deformes).

A pesar de que se encontró el mayor porcentaje de espermatozoides deformes en la población de los ratones $LPP3^{Stw03/+}$ viejos, éste no sobrepasa los porcentajes normales de espermatozoides con cabezas deformes, encontrados en experimentos previos: 18.7% en ratones con 3 meses, 19.1% en ratones de 6 meses y 38.5% en ratones de 15 meses (Ohta *et al.* 2009). Existen estudios más recientes, acerca de la morfología en relación con la edad, en los que se ha mostrado que para la línea de ratones BALB/c, existen hasta un 40% de células con cabezas ligeramente deformes y 15.6 % con cabeza pronunciadamente deformes en ratones de casi 3 meses de edad, curiosamente estos porcentajes se mantienen constantes en ratones de 6 y 10 meses (Ohta *et al.*, 2009). El estudio mencionado indicaría que, en algunas líneas de ratones, es normal llegar a

encontrar cerca del 10% de espermatozoides con deformaciones pronunciadas en la cabeza y cerca del 40% de espermatozoides con deformaciones ligeramente pronunciadas en la cabeza.

Con el fin de verificar si esta tendencia existe o es solamente un artefacto, se debería aumentar la n de estos experimentos, puesto que solamente fueron utilizados tres ratones como representantes de la población de $LPP3^{Stw03/+}$ viejos.

En cuanto a los parámetros de velocidad registrados a través de CASA, se esperaba encontrar diferencias significativas entre los ratones jóvenes y viejos de la línea $LPP3^{Stw03/+}$, dada la posibilidad de que una subpoblación de espermatozoides se viera afectada al acrecentarse la edad de los miembros de la línea. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de ratones mutantes estudiados en cuanto a VCL y VSL.

En el caso de los dos parámetros mencionados, sí se detectó una diferencia significativa al ser comparadas las distribuciones de VCL de los ratones viejos silvestres con los dos grupos de jóvenes. Sin embargo no existió diferencia entre la de los dos últimos con respecto a los ratones viejos $LPP3^{Stw03/+}$. Lo anterior indica que los espermatozoides de la población de ratones viejos $LPP3^{Stw03/+}$ presentan una VCL similar a la de los jóvenes $LPP3^{Stw03/+}$ por lo que la calidad de los espermatozoides, evaluada a través de este parámetro, es la misma en los dos grupos. En cuanto a VSL, observamos que la única diferencia significativa existió entre el grupo de ratones viejos silvestres con respecto al resto de las poblaciones estudiadas.

La reducción de VCL y VSL en el caso de los ratones viejos silvestres podría deberse a que en este grupo se incluyeron algunos ratones de más de un año como controles, edad con la que no contaba ninguno de los miembros del grupo de ratones viejos mutantes. Incluir las medidas de la población de espermatozoides de los ratones mayores a un año pudo haber sesgado la distribución debido a una reducción de la VCL causada por la edad avanzada de los ratones control utilizados.

En el caso de VAP observamos diferencias significativas en las distribuciones de los grupos de ratones viejos con respecto a la de los jóvenes y también entre los dos grupos de ratones viejos. Así que esta diferencia podría deberse al envejecimiento principalmente.

En las cuatro poblaciones estudiadas tampoco se observaron diferencias significativas ni en el porcentaje de células inmóviles cuantificado por muestra ni en el porcentaje de espermatozoides hiperactivados.

LPP3 no se expresa en el espermatozoide maduro del ratón pero sí en las células espermatogénicas, lo que sugiere su participación en procesos relacionados con la maduración del espermatozoide.

Existe un fenómeno llamado haploinsuficiencia, definido como el fenotipo que surge en un organismo diploide cuando se pierde la copia funcional de un gen. Existen líneas de ratones que presentan un fenotipo de infertilidad debido a la haploinsuficiencia, producto de la mutación de genes que codifican para protaminas, proteínas importantes durante la condensación del material genético, que es empaquetado al madurar el espermatozoide (Cho *et al.*, 2001).

No se encontraron anomalías en los espermatozoides de los ratones $LPP3^{Stw03/+}$, las cuales se debieran específicamente a la disminución en el nivel de expresión de la LPP3, es decir, no se produce un fenotipo celular de haploinsuficiencia al ser truncado uno de los alelos de LPP3.

La observación empírica, por la cual se planteó la realización de los experimentos presentados en esta tesis, consistía en que al aumentar la edad de los ratones $LPP3^{Stw03/+}$ la transmisión del transgen se veía comprometida y como consecuencia las camadas obtenidas a partir de estas cruzas no cumplían con la proporción mendeliana esperada, siendo la mayoría de las crías silvestres. A pesar de que se asumió que el problema podría estar vinculado con el envejecimiento de los ratones machos, las hembras utilizadas en estas cruzas generalmente tenían la misma edad que los machos, es decir, ambos

progenitores tenían más de seis meses en la mayoría de los casos en los que se observó este fenómeno.

Por lo tanto, el problema de la carencia de transmisión del transgen al acrecentarse la edad de los ratones, podría estar vinculado a las hembras de la línea $LPP3^{Stw03/+}$ y no a los machos, como se pensó en un inicio. Lo anterior podría explicar el hecho de que no hayan sido encontradas diferencias significativas relevantes en los experimentos realizados. Una forma sencilla de detectar si el fenotipo se debe a una deficiencia al acrecentarse la edad de los machos o de las hembras, sería cruzar con los machos envejecidos únicamente hembras jóvenes y observar si la descendencia es o no mayoritariamente silvestre en estos casos.

Otra posibilidad que explicaría por qué no se encontraron diferencias significativas en los distintos estudios realizados con espermatozoides, sería porque los espermatoцитos primarios en los que $LPP3$ no está expresándose, no sobrevivan hasta llegar a ser espermatozoides maduros cuando los ratones envejecen. Esta hipótesis involucraría que la disminución en la expresión de $LPP3$ sólo afecta a los espermatoцитos portadores del alelo $LPP3^{Stw}$ al envejecer los ratones, quizá por la conjunción de múltiples factores metabólicos, consecuencia del envejecimiento.

Cabe mencionar que la construcción del alelo $LPP3^{Stw03}$ involucra la presencia del cassette de resistencia PGKneo. Se ha reportado previamente que la presencia de PGKneo, tras la recombinación homóloga, puede llegar a tener un efecto tóxico dependiendo de la región genómica en la cual se encuentre el transgen, incluso llegando a producir letalidad embrionaria (Scacheri et al., 2001), este fenómeno no es bien comprendido pero existen dos posibilidades A) que se produzca una proteína aberrante o B) un transcrito aberrante, los cuales tienen un efecto tóxico en la célula.

Si el cassette de resistencia se está expresando en los espermatoцитos secundarios portadores del transgen, podría tener un efecto tóxico en éstos, el cual podría hacerse evidente conforme la edad del ratón aumenta, debido a la muerte celular paulatina de los

espermatozoides que presentan la construcción. Esta hipótesis también explicaría la ausencia de descendencia mutante al envejecer la población de ratones, pero tendría que verificarse.

PERSPECTIVAS

-Aumentar la n de los experimentos en el caso de la población $LPP3^{Stw03/+}$ vieja para observar si las tendencias se vuelven diferencias significativas.

-Realizar cruces utilizando ratones viejos $LPP3^{Stw03/+}$ con hembras jóvenes para verificar que el fenotipo observado se debe a un defecto que presentan los machos.

- Realizar estudios de fertilización *in vitro* con poblaciones de espermatozoides silvestres y óvulos de hembras $LPP3^{Stw03/+}$

-Verificar si existen otras líneas de ratones que presenten la construcción pGKneo en las que ocurra lo mismo al envejecer los progenitores.

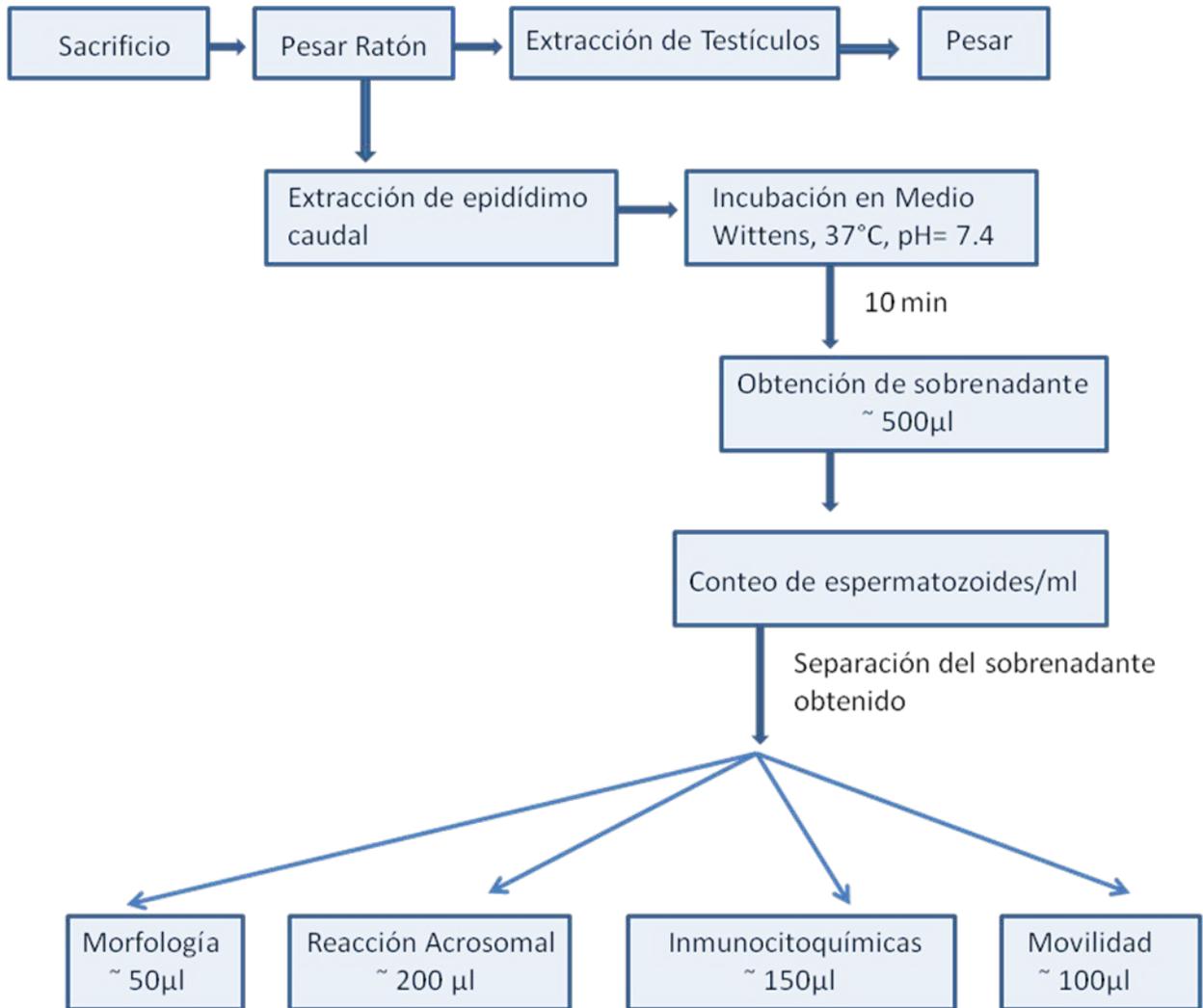
FUENTES CONSULTADAS

- Borg, C. L., Wolski, K. M., Gibbs, G. M., & O'Bryan, M. K. (n.d.). Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a "non-performer". *Human reproduction update*. doi: 10.1093/humupd/dmp032.
- Bray, C., Son, J.-H., Kumar, P., & Meizel, S. (2005). Mice deficient in CHRNA7, a subunit of the nicotinic acetylcholine receptor, produce sperm with impaired motility. *Biology of reproduction*, 73(4), 807-14. doi: 10.1095/biolreprod.105.042184.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, P. W. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (Third Edit., p. 1616). Garland Publishing Inc.
- Chen, Q., Peng, H., Lei, L., Zhang, Y., Kuang, H., Cao, Y., et al. (2010). Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration. *Cell research*, 1-12. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/cr.2010.169.
- Cho, C., Willis, W. D., Goulding, E. H., Jung-ha, H., Choi, Y.-chul, Hecht, N. B., et al. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Science And Technology*, 28(may), 82-86.
- Cooke, H. J., & Saunders, P. T. K. (2002, October). Mouse models of male infertility. *Nature reviews. Genetics*. doi: 10.1038/nrg911.
- Evans, J. P., Hardy, D. M., & Storey, B. T. (2005). Sperm – Egg Interactions : Sperm – Egg Binding in Mammals. *Reproduction*, 1-12. doi: 10.1038/npg.els.0004206.
- Ford, W. C. L. (2006). Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Human reproduction update*, 12(3), 269-74. doi: 10.1093/humupd/dmi053.
- Ho, H. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*, 122(4), 519-526. doi: 10.1530/reprod/122.4.519.
- Humtsoe, J. O., Bowling, R. a, Feng, S., & Wary, K. K. (2005). Murine lipid phosphate phosphohydrolase-3 acts as a cell-associated integrin ligand. *Biochemical and biophysical research communications*, 335(3), 906-19. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.157.
- Jungnickel, M. K., Marrero, H., Birnbaumer, L., Lemos, J. R., & Florman, H. M. (2001). Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biology*, 3(May), 499-502.

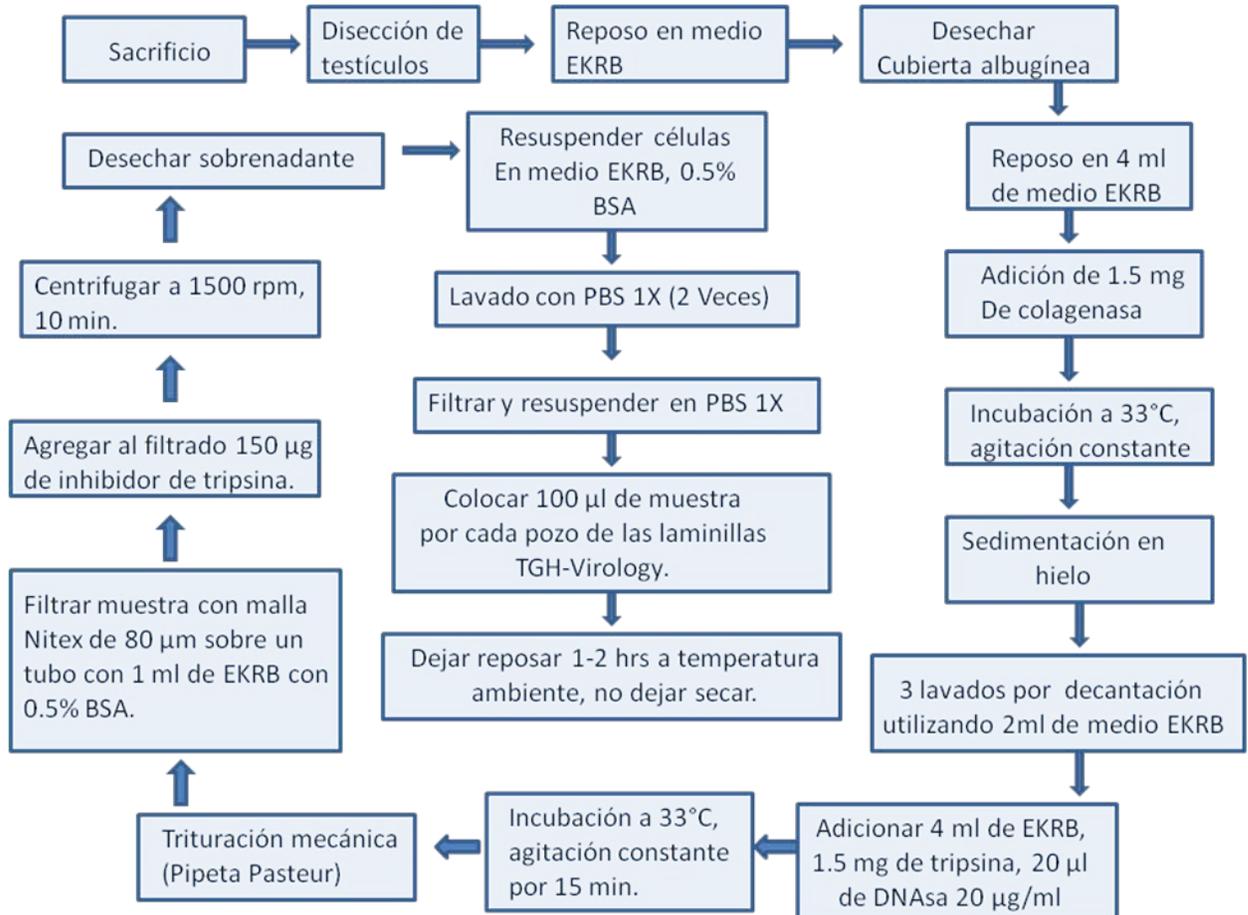
- Ohta, H., Sakaide, Y., & Wakayama, T. (2009). Age- and substrain-dependent sperm abnormalities in BALB/c mice and functional assessment of abnormal sperm by ICSI. *Human reproduction (Oxford, England)*, 24(4), 775-81. doi: 10.1093/humrep/den456.
- Oliva, R., & Castillo, J. (2011). Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian journal of andrology*, 13(1), 24-30. doi: 10.1038/aja.2010.65.
- Scacheri, P. C., Crabtree, J. S., Novotny, E. a, Garrett-Beal, L., Chen, a, Edgemon, K. a, et al. (2001). Bidirectional transcriptional activity of PGK-neomycin and unexpected embryonic lethality in heterozygote chimeric knockout mice. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 30(4), 259-63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536432>.
- Sciorra, V. a, Daar, I., Spiegel, S., Morris, A. J., & Stewart, C. L., with Jr-Gang-Cheng. (2003). The lipid phosphatase LPP3 regulates extra-embryonic vasculogenesis and axis patterning. *Development (Cambridge, England)*, 130(19), 4623-37. doi: 10.1242/dev.00635.
- Sigal, Y. J., McDermott, M. I., & Morris, A. J. (2005). Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions. *The Biochemical journal*, 387(Pt 2), 281-93. doi: 10.1042/BJ20041771.
- TITLE: Calcium channels in the development, maturation and function of spermatozoa
AUTHORS: Alberto Darszon, Takuya Nishigaki, Carmen Beltran and Claudia L. Treviño. (n.d.). *Channels*.
- Wary, K. K., & Humtsoe, J. O. (2005). Anti-lipid phosphate phosphohydrolase-3 (LPP3) antibody inhibits bFGF- and VEGF-induced capillary morphogenesis of endothelial cells. *Cell communication and signaling : CCS*, 3, 9. doi: 10.1186/1478-811X-3-9.

ANEXOS

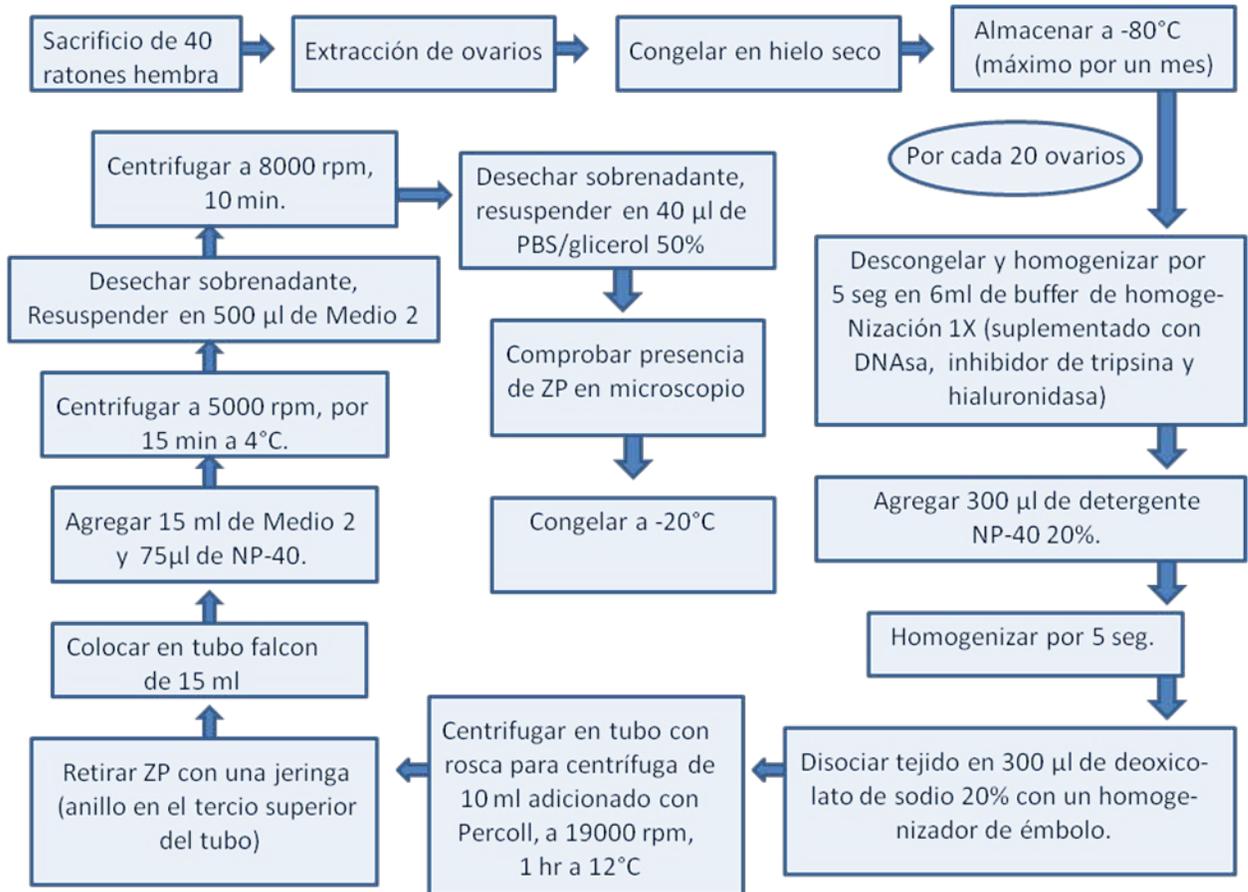
ANEXO I: OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES



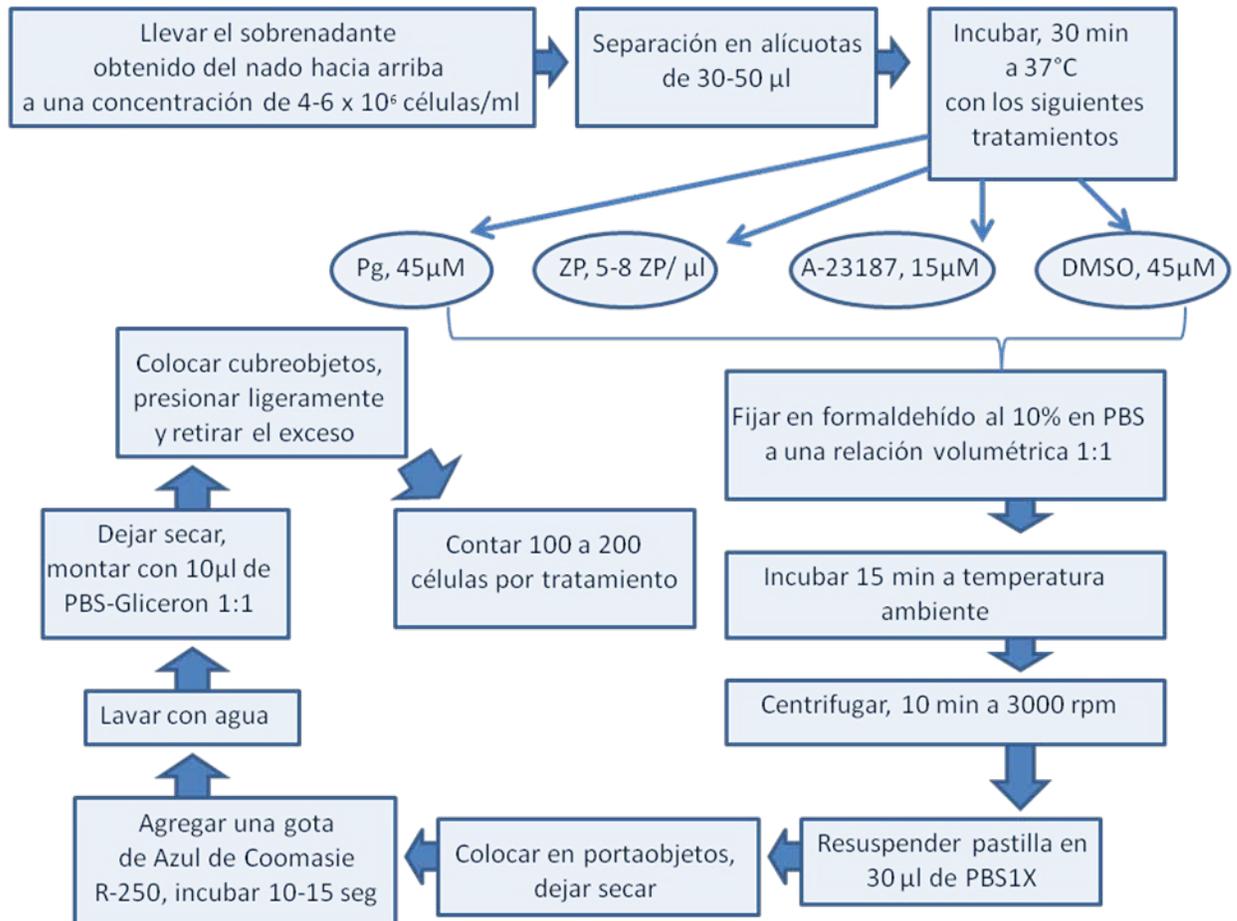
ANEXO II. OBTENCIÓN DE CÉLULAS ESPERMATOGÉNICAS



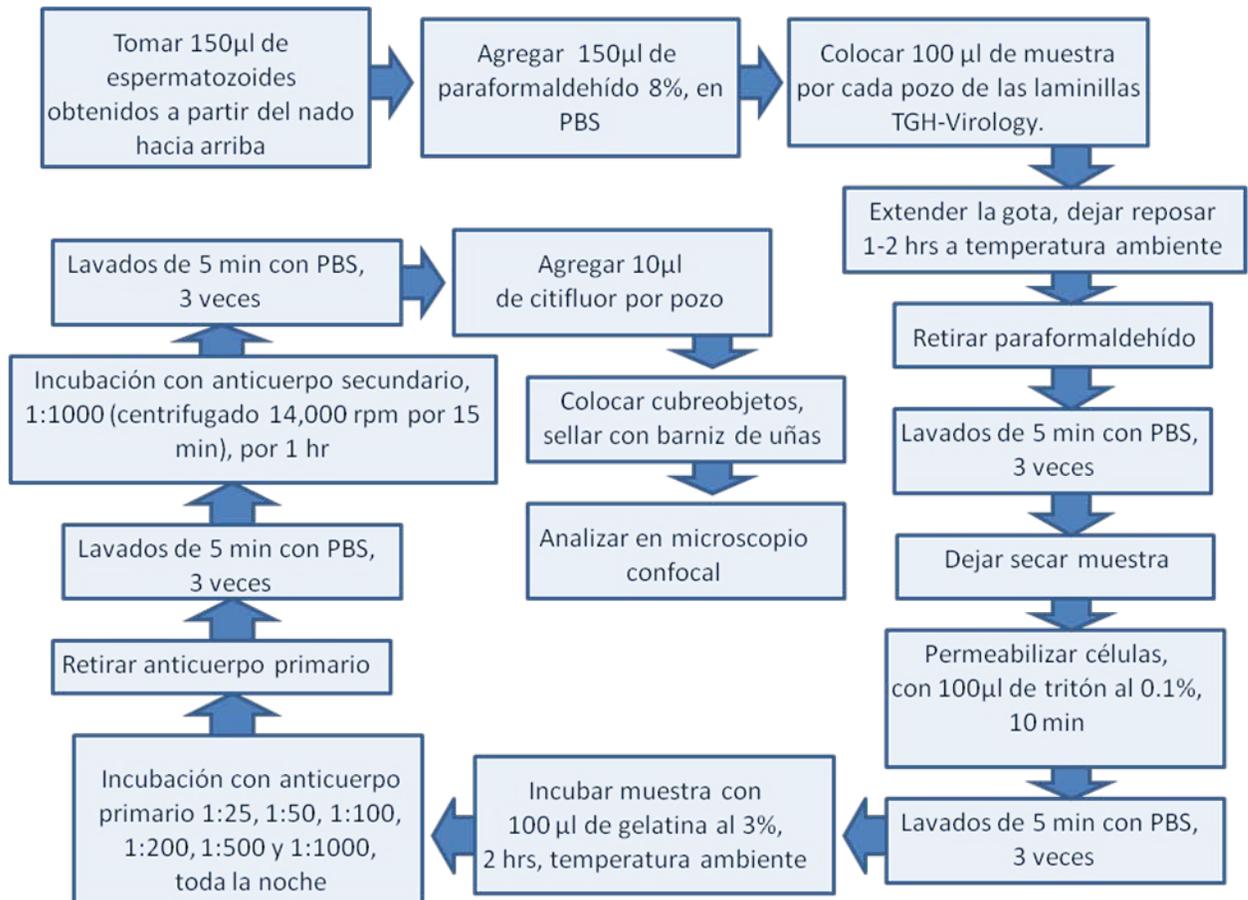
ANEXO III. PURIFICACIÓN DE ZONA PELÚCIDA (ZP) DE RATÓN



ANEXO IV. ENSAYOS DE REACCIÓN ACROSOMAL



ANEXO V. INMUNOCITOQUÍMICAS



ANEXO VI. MORFOLOGÍA

