



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA
AMBIENTE SOBRE LA
FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS EN
ESPERMATOZOIDE HUMANO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ESMERALDA PÉREZ JIMÉNEZ

TUTOR: Dr. Víctor Manuel Torres Flores

CIUDAD DE MÉXICO SEPTIEMBRE 2018



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**



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.

1. Datos del alumno
Pérez
Jiménez
Esmeralda
5528088188
Universidad Nacional Autónoma de México
Faculta de Ciencias
Biología
099242299

2. Datos del tutor
Dr.
Víctor Manuel
Torres
Flores

3. Datos de sinodal 1
Dra.
María de los Angeles
Aguilar Santamaría

4. Datos de sinodal 2
Dra.
Irma
Jiménez
Morales

5. Datos de sinodal 3
M. en C.
Lizbeth Yessenia
Carrillo
González

6. Datos de sinodal 4
M. en C.
Yadira Libertad
Hernández
Rueda

7. Datos del trabajo escrito
Efecto de la temperatura ambiente sobre la
fosforilación de proteínas en espermatozoide humano
66 p
2018

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Y fue aprobado por las Comisiones de Investigación y de Ética de esta facultad (proyecto 045/2016).

AGRADECIMIENTOS

Institucionales

- *A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una excelente educación mediante sus maestros e investigadores.*
- *A mi director de tesis Dr. Víctor Manuel Torres Flores por sus enseñanzas, indicaciones y comprensión en el desarrollo de este trabajo. Gracias por su apoyo para concluir este proyecto.*
- *A la M. en C. Yadira Libertad Hernández Rueda por su asesoría y entrenamiento en la parte experimental, así como por su constante apoyo, motivación, transmisión de conocimientos, me faltan palabras para agradecerle, sólo me queda decir gracias por tu valiosa amistad.*
- *A la Dra. Ángeles Aguilar por brindarme su apoyo en las correcciones y sugerencias de este trabajo. También por brindarme ánimo y consejos durante estas últimas semanas.*
- *A la Dra. Irma por sus sugerencias y correcciones al trabajo escrito.*
- *A la M. en C. Lizbeth Carrillo por sus sugerencias y correcciones.*
- *A Sergio Galicia Zapatero por su asesoría técnica para la cuantificación celular.*

Personales

- *A mi hija Laila, eres el detonante de mi felicidad y de mi esfuerzo por buscar lo mejor para ti. Aún a tu corta edad, me has enseñado el lado más dulce de la vida, gracias por apoyarme en este proyecto. Te amo.*
- *A mi mamá, por el gran amor que tiene a sus hijos, por el apoyo incondicional que siempre me ha dado, por darme la vida y enseñarme a vivirla, te amo.*
- *A mis hermanos Gerardo, Cristian y Manuela por su cariño, apoyo y compañía en nuestra pequeña familia; a mis sobrinos Melanie e Ian y a Daniel por su inigualable sentido del humor.*
- *A Yadira, Alma, Montserrat, Susana, Violeta y Anuar. Por todas esas charlas, consejos, fiestas y ser parte de mi vida.*
- *Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Gracias a cada uno...*

"Nunca se ha de pensar en toda la calle de una vez, ¿entiendes? Sólo hay que pensar en el paso siguiente, en la inspiración siguiente, en la siguiente barrida. Nunca nada más que en el siguiente". Michael Ende

INDICE

INDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. Morfología y estructura del espermatozoide.....	3
2. Maduración espermática.....	7
2.1 Maduración en el epidídimo.....	8
2.2 Maduración en el Tracto Genital Femenino.....	9
2.2.1 Mecanismos de orientación espermática.....	11
3. Capacitación espermática.....	14
4. Fosforilación de proteínas espermáticas.....	17
II. ANTECEDENTES	21
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Reactivos y medios	27
1.1 Medio de capacitación de espermatozoides.....	27
2. Material Biológico.....	28
2.1 Purificación de los espermatozoides.....	28
3. Análisis de la fosforilación de la tirosina.....	29
3.1 Análisis mediante Western Blot.....	29
3.1.1 Extracción de proteínas mediante sonicación..	29
3.1.2 Determinación de la concentración de proteínas.	
.....	30

3.1.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
3.1.4 Análisis estadístico.....	32
VII. RESULTADOS.....	33
1. Estandarización de la carga de proteína espermática.	33
2. Efecto de la incubación en diferentes temperaturas y tiempos sobre la fosforilación de la tirosina evaluado mediante WB.	34
VIII. DISCUSIÓN.....	38
IX. CONCLUSIÓN.....	41
X. PERSPECTIVAS.....	41
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	42
XII. ANEXOS.....	56
A. Espermatobioscopías de los donadores utilizados en este proyecto, en las que se aprecia que las muestras de los donadores cumplen con los parámetros establecidos como normales por la OMS (OMS, 2010).	56
B. Tablas de ANOVA y pruebas estadísticas.....	57

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Estructura del espermatozoide.....	4
Figura 2. Diagrama que muestra el viaje del espermatozoide desde el órgano reproductor masculino hasta la fecundación en el tracto genital femenino y los procesos asociados durante su trayecto.....	7
Figura 3. Secuencia de los procesos que sufre el espermatozoide en el tracto reproductivo femenino.....	10
Figura 4. Mecanismos de orientación del espermatozoide humano en el tracto genital femenino.....	12
Figura 5. Bases moleculares de la capacitación espermática humanos....	15
Figura 6. Estructura y activación de la proteína quinasa A.....	19
Figura 7. Curva patrón para la medición de proteínas totales de la muestra.....	31
Figura 8. Estandarización de la carga de proteína espermática.....	34
Figura 9. Inmunodetección de la fosforilación de la tirosina mediante western blot en espermatozoides de humano.....	35
Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la fosforilación en residuos de tirosinas en espermatozoides humanos.....	36
Figura 11. Cambio porcentual del efecto de la temperatura sobre la fosforilación en residuos de tirosinas en espermatozoides humanos.....	37
Tabla I. Composición del medio utilizado para la incubación in vitro de los espermatozoides humanos.....	27
Tabla II. Ensayos experimentales.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
[Ca²⁺]_i	Concentración del ión Ca ²⁺ intracelular
[HCO₃⁻]_i	Concentración de bicarbonato intracelular
AMPc:	Monofosfato de adenosina cíclico
ACs	Adenilato ciclasa soluble
BSA:	Albúmina sérica bovina
Ca²⁺:	Ión calcio
Ca_v:	Canales de calcio dependientes de voltaje
CaCl₂:	Cloruro de calcio
HEPES:	N-(2-hidroxietil) piperizina-N'-(ácido 2-etanosulfónico)
HSM:	Medio de Hepes para espermatozoide humano
Mg₂Cl:	Cloruro de magnesio
mM:	Milimolar
mL:	Mililitros
μL:	Microlitros
μm:	Micrometros
μM:	Micromolar
NaCl:	Cloruro de sodio
NaH₂PO₄:	Fosfato ácido de sodio
NaOH:	Hidróxido de sodio
nM:	Nanomolar
pY	Fosforilación en residuos tirosina
Percoll:	Sílica recubierta de polivinilpirrolidona coloidal
pH_i:	pH intracelular
RA:	Reacción acrosomal
rpm:	Revoluciones por minuto

RESUMEN

La capacitación del espermatozoide es un proceso poco conocido, es asociado con modificaciones en la composición de la membrana plasmática, alteraciones en las concentraciones de iones intracelulares, activación de canales iónicos, fosforilación/desfosforilación en residuos de tirosina de proteínas espermáticas. Todos estos procesos son regulados por diferentes vías de señalización, de las cuales varias están en proceso de estudio o se desconocen.

La temperatura es un factor que influye sobre la movilidad, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide. Sin embargo, se encuentra sometida a variaciones durante las condiciones *in vitro*, por lo tanto es importante analizar los efectos de la incubación a temperatura ambiente en el espermatozoide humano (26° C), ya que no ha sido completamente caracterizado.

En esta tesis se realizaron experimentos para evaluar los efectos de la temperatura ambiente sobre la fosforilación en residuos de tirosina en proteínas espermáticas. El análisis de la fosforilación en tirosina fue mediante Western Blot.

Los resultados del presente estudio sugieren que los espermatozoides capacitados *in vitro* a temperatura ambiente (26° C) muestran bajos niveles de fosforilación y no permite una adecuada maduración del espermatozoide.

I. INTRODUCCIÓN

El espermatozoide es una célula especializada y con una capacidad muy limitada para sintetizar proteínas. Casi todos sus transportadores iónicos y proteínas se sintetizan durante el proceso de la espermatogénesis, donde ocurre la diferenciación de las espermatogonias, células progenitoras del espermatozoide (Gilbert, 2006).

El espermatozoide en su camino hacia el ovocito presenta diferentes cambios como son la capacitación, la hiperactivación de la movilidad y la reacción acrosómal (RA). Estos procesos son indispensables para que el espermatozoide pueda fusionarse con el ovocito y fecundarlo. La capacitación ocurre en el tracto genital femenino (TGF) y puede reproducirse *in vitro* en medios fisiológicos que contengan bicarbonato y albúmina. Este proceso dura de 4-6 horas, y durante este periodo ocurren cambios bioquímicos y biofísicos entre los que destacan: un cambio en el potencial de reposo de la membrana celular como resultado de la salida de potasio, eliminación de colesterol por la albúmina estimulando la entrada de bicarbonato y calcio. Estos iones promueven la actividad de la adenilato ciclasa soluble, que produce monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) a partir de AMP. El aumento de AMPc activa a la proteína cinasa A, causando que esta active a la proteína tirosina cinasa. Simultáneamente el pH intracelular (pH_i) aumenta de 6.7 a 6.85 aproximadamente y la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en el reposo aumenta alrededor de 100 nM (Torres-Flores *et al.*, 2011).

También se debe señalar que la reducción del contenido de colesterol resulta en una disminución en la rigidez de la membrana plasmática y re-arreglos y/o modificaciones en el contenido de lípidos y proteínas de esta membrana. Estas alteraciones en las propiedades de la membrana plasmática ocasionan una cascada de mensajeros llevando a la activación de la proteína tirosina (Gilbert, 2003). La fosforilación de la tirosina es un aspecto esencial de la capacitación (Naz & Rajesh, 2004).

La fosforilación de la tirosina está asociada con la maduración del espermatozoide en el epidídimo (Dudiki *et al.*, 2015), en este mismo sitio los espermatozoides contienen grandes cantidades de colesterol en las membranas plasmáticas, lo que ayuda a estabilizarlas (Yanagimachi, 1994).

La temperatura es un factor que influye sobre los procesos relacionados con la fertilización *in vivo*; se han realizado estudios *in vitro* con poblaciones de espermatozoides humanos antes y después de la capacitación a 37° C y no hay cambios significativos entre los parámetros de movilidad. Después de un descenso de la temperatura a 31° C la población capacitada refleja grandes cambios en eventos de hiperactivación. Esto sugiere que la temperatura es un factor de suma importancia para la capacitación del espermatozoide humano (Boryshpolets *et al.*, 2015) y es un factor que influye sobre los procesos relacionados con la fertilización. Sin embargo, el efecto de la incubación a temperatura ambiente en la capacitación del espermatozoide humano no ha sido completamente descrito. El presente estudio pretende profundizar en su efecto en el espermatozoide humano.

A continuación se describen las características morfológicas y estructurales del espermatozoide humano así como la maduración que debe de llevar a cabo para poder fecundar al ovocito.

1. Morfología y estructura del espermatozoide.

El espermatozoide (del griego esperma: semilla, y zóo: animal) es una célula haploide con forma hidrodinámica, genéticamente y morfológicamente diferenciada, que constituye el gameto masculino. Cada célula espermática es el producto final de la gametogénesis. La función del espermatozoide para la cual su organización está adaptada es encontrarse con el ovocito y, fusionándose con él, hacer que éste empiece a desarrollarse y transmitir al embrión en desarrollo los genes paternos (Ganong *et al.*, 2013).

La célula espermática tiene tres regiones altamente diferenciadas y especializadas: cabeza, cuello y un flagelo o cola (Figura 1). A su vez estas partes están divididas en compartimentos celulares, cada uno con su función (Curry & Watson, 1995).

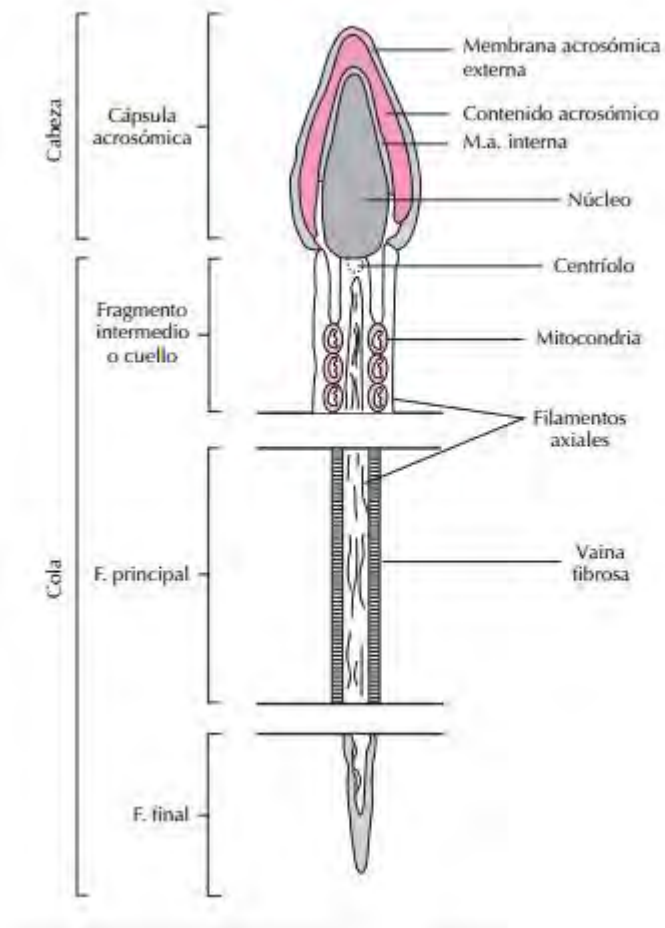


Figura 1. Estructura del espermatozoide. Imagen tomada de Tresguerres *et al.*, 2010.

La principal función de la cabeza es la entrega de la información paterna dentro del ovocito, mientras que la del flagelo es la de proporcionar a la célula movilidad para viajar en el TGF y penetrar la zona pelúcida (Mortimer, 1997).

La cabeza está constituida por el núcleo y el acrosoma, este último es un orgánulo similar a un lisosoma en el cual abundan enzimas hidrolíticas como la acrosina, hialuronidasa y muchas otras hidrolasas y esterases, que participan en la lisis de la zona pelúcida y la penetración de las células que rodean al ovocito; es una caperuza que cubre al núcleo (Tresguerres *et al.*, 2010; Ganong *et al.*, 2013).

El cuello o pieza conectiva es un segmento corto que une a la cabeza con el flagelo, compuesto por una placa basal, el *capitulum* y por la disposición de 9 columnas segmentadas que circundan los dos centriolos, uno de los cuales suele estar fragmentado, y el otro, es el que le va a dar origen a las fibras y microtúbulos del flagelo y va a servir como centro organizativo para la formación del axonema, así como de las columnas segmentadas (Gartner & Hiatt, 2002; Álvarez, 2003). El cuello sirve como conector y pieza articular.

El flagelo es la parte más larga del espermatozoide; está constituido por pieza media, pieza principal y pieza terminal. Los componentes estructurales presentes en el flagelo son el axonema, el complejo mitocondrial, la vaina fibrosa y los filamentos axiales (Tresguerres *et al.*, 2010).

El axonema: está conformado por dos microtúbulos centrales y nueve pares de microtúbulos periféricos (Olivera *et al.*, 2006).

El movimiento flagelar lo genera el axonema, un aparato complejo que se construye a partir de, aproximadamente, 250 proteínas, entre ellas las tubulinas y las dinein-ATPasas (Inaba, 2003). La energía para mover al flagelo proviene del ATP que hidroliza la dineina, una ATPasa que se inactiva a un pH_i de 7.2 (Darszon *et al.*, 2008). Es una maquinaria especializada destinada a la producción de la movilidad eficiente y se ha conservado evolutivamente de protistas a mamíferos (Ciolfis *et al.*, 2016).

La Pieza intermedia: está localizada entre el cuello y la pieza principal, se caracteriza por la presencia de la vaina mitocondrial o complejo mitocondrial, portadora de enzimas oxidativas, tanto de sustancias endógenas (fosfolípidos) como de las exógenas del líquido seminal, así como de enzimas responsables de

la fosforilación oxidativa, constituyendo la central de energía para la propulsión del flagelo. Presenta características funcionales específicas adaptadas para la movilidad del espermatozoide como la resistencia a condiciones hipotónicas y la capacidad de utilizar el lactato como sustrato oxidativo (Olivera *et al.*, 2006; Tresguerres *et al.*, 2010).

La Pieza principal: es el segmento más largo del espermatozoide, está conformada por la continuidad del axonema, así como por la continuidad de siete fibras densas externas presentes en la pieza intermedia, y se diferencia de ésta, porque la vaina mitocondrial es sustituida por una vaina fibrosa rodea a las fibras densas externas y éstas a su vez al axonema (De Jonge & Barratt, 2006).

La vaina fibrosa está compuesta por tres columnas longitudinales que corren a lo largo de la pieza principal. El 50% de las proteínas presentes en esta estructura son las proteínas de anclaje de la cinasa A (AKAPs) en algunas especies; su fosforilación en residuos tirosina se cree que pudiera estar relacionada con su deslizamiento; también la presencia de enzimas glicolíticas (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa-S, hexoquinasa HK1-S, etc.) sostiene la importancia de esta estructura en la movilidad espermática, principalmente en la modulación del plano del batido flagelar (De Jonge & Barratt, 2006; Olivera *et al.*, 2006).

En la pieza principal terminan las fibras densas externas y la vaina fibrosa; y el grosor de esta pieza disminuye en el extremo hacia la pieza terminal.

La Pieza terminal se compone por el axonema central rodeado por plasmalema.

Finalmente el espermatozoide presenta una cubierta externa: la membrana plasmática. Contiene altas concentraciones de fosfolípidos unidos a ácidos grasos insaturados, colesterol así como a ácidos grasos libres y glicolípidos en baja concentración (De Jonge & Barratt, 2006).

Como ya vimos, los espermatozoides son células genética y morfológicamente diferenciadas (Figura 1), sin embargo, recién formados, todavía no poseen movimiento progresivo ni, mucho menos, están preparados para fusionarse con el ovocito, por lo que requieren de un proceso conocido como maduración espermática (Visconti & Kopf, 1998; Tresguerres *et al.*, 2010; De Jonge, 2017).

2. Maduración espermática.

La maduración espermática ha sido definida como el desarrollo de la capacidad de los espermatozoides para fertilizar al ovocito (Cooper, 2007). Inicia en el epidídimo y termina en el TGF (Figura 2) (Breitbart, 2002; Sullivan *et al.*, 2007).

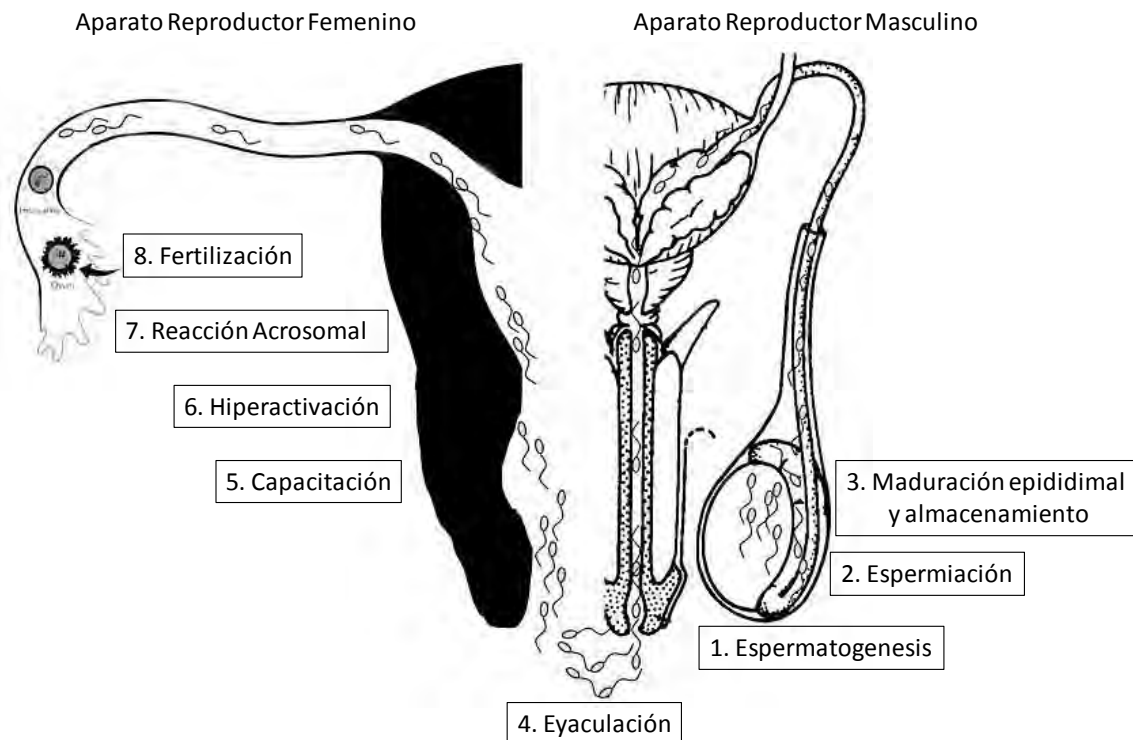


Figura 2. Diagrama que muestra el viaje del espermatozoide desde el órgano reproductor masculino hasta la fecundación en el tracto genital femenino y los procesos asociados durante su trayecto. Imagen tomada de Tresguerres *et al.*, 2010.

2.1 Maduración en el epidídimo.

Los espermatozoides son producidos en los túbulos seminíferos, los cuales representan la mayor parte del tejido testicular. Los túbulos seminíferos confluyen en los conductos de la cabeza del epidídimo, un conducto enrollado que forma una capa exterior en la cápsula de los testículos (Hill *et al.*, 2004), en este lugar adquieren la movilidad y adquieren otros cambios de maduración (Figura 2) (Fox, 2011).

El epidídimo puede dividirse en tres partes: cabeza, cuerpo y cola; se vacía en el conducto deferente que transporta los espermatozoides hasta el conducto eyaculador y termina en la uretra prostática después de haber recibido la confluencia de los conductos de las vesículas seminales. Los espermatozoides son esencialmente inmóviles al final de la espermatogénesis, por lo tanto, su transferencia de los túbulos seminíferos a la red del testículo es pasiva y se debe a la actividad del epitelio ciliado presente en la luz de los conductos y de la musculatura presente en sus paredes. El gameto masculino adquiere la capacidad de mover el flagelo en su tránsito por el epidídimo, pero el movimiento empieza después de la eyaculación (Conti, 2005).

Durante el periodo de almacenamiento, los espermatozoides liberan grandes cantidades de bióxido de carbono y otros productos terminales, ácidos que deprimen intensamente su movilidad (Guyton, 1969). Aunado a esto, una de las funciones principales del epidídimo es la secreción de proteínas llamadas factores descapacitantes, cuya función es evitar que ocurra la reacción acrosomal en el tracto reproductor masculino (Jones, 1998).

La maduración de los espermatozoides ocurre en un periodo aproximado de 10 a 14 días y pueden permanecer almacenados en el epidídimo varios meses, siendo viables. Las glándulas accesorias sexuales secretan la mayoría del líquido seminal, el cual protege al espermatozoide y facilita su movilidad, este fluido es viscoso, alcalino y contiene fructosa, prostaglandinas y proteínas de coagulación.

Estas glándulas incluyen a la vesícula seminal, la próstata y las glándulas bulbouretrales (Jenkins *et al.*, 2007).

Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides adquieren la capacidad para desplazarse en sentido anterógrado (movilidad progresiva) y se da la activación del único grupo de proteínas pertenecientes a la familia CatSper localizadas en el segmento principal del flagelo del espermatozoide. CatSper forma un conducto de calcio, sensible a pH's alcalinos, adquiriendo mayor actividad conforme el espermatozoide pasa del medio ácido de la vagina (pH 5) al moco cervical (pH 8 en promedio) (Ganong *et al.*, 2013).

2.2 Maduración en el Tracto Genital Femenino.

La eyaculación representa la expulsión del semen de la uretra y en la mayoría de los mamíferos son depositados en la vagina (Figura 2). Los espermatozoides llegan a los oviductos (trompas de Falopio) 30 a 60 minutos después de la cópula. En algunas especies, las contracciones de los órganos femeninos facilitan el transporte de los espermatozoides hacia las trompas de Falopio (Ganong, 1990).

Haciendo referencia al ser humano, una vez eyaculados en la mujer, los espermatozoides suben desde el útero hasta el istmo de las trompas uterinas y se someten a capacitación. Desde el istmo, los espermatozoides capacitados se desplazan rápidamente hasta la porción ampular de las trompas uterinas, donde se lleva a cabo la fertilización (Figura 3) (Olivera *et al.*, 2006; Ganong *et al.*, 2013).

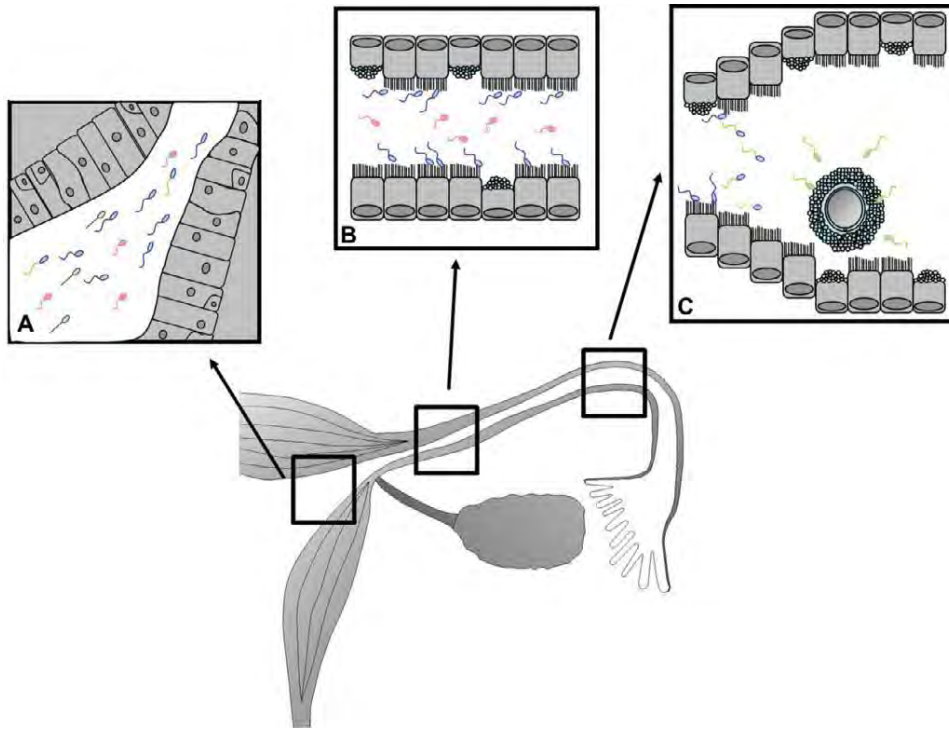


Figura 3. Secuencia de los procesos que sufre el espermatozoide en el tracto reproductivo femenino. A) Después de la eyaculación, una población heterogénea de espermatozoides atraviesa el tracto reproductivo femenino. B) Solo unos pocos espermatozoides logran llegar al oviducto; desde el útero hasta el istmo de las trompas uterinas y se someten a capacitación. C) Durante el tiempo peri-ovulatorio, desde el istmo, los espermatozoides que completan una capacitación se desplazan rápidamente hasta la porción ampular de las trompas uterinas, donde se lleva a cabo la fertilización. Los diferentes colores indican distintos tipos de espermatozoides: muertos (gris), dañado (rojo), normal (azul), hiperactivado (verde-azul) y capacitado (verde). (Imagen tomada de López-Úbeda & Matás, 2015).

La composición alcalina (pH entre 7.3 y 7.7) del fluido seminal ayuda a neutralizar la acidez del tracto reproductor femenino, ya que el moco cervical podría inactivar y matar al gameto masculino. La fructuosa es utilizada por el espermatozoide para la producción de ATP y así generar energía para la locomoción; la prostaglandina contribuye a la movilidad y viabilidad y puede estimular las contracciones del músculo liso dentro del tracto femenino (Jenkins *et al.*, 2007). Están presentes también una serie de enzimas que permiten la coagulación y licuefacción del eyaculado después de su emisión (Conti, 2005). Las proteínas de la coagulación hacen que el semen se coagule después de la eyaculación, pero la acción hidrolítica de fibrinolisisina más tarde hace que el semen coagulado asuma de nuevo una forma más líquida liberando así a los espermatozoides (Fox, 2011).

Mientras los espermatozoides están en el tracto reproductor femenino terminan el proceso de maduración llamado capacitación y el ovocito facilita la fertilización liberando atrayentes químicos, los cuales son reconocidos por el espermatozoide mediante receptores que se encuentran en la membrana celular (Hill *et al.*, 2004).

Durante el proceso de capacitación, el espermatozoide muestra movilidad hiperactivada, en la cual la curvatura del flagelo se vuelve más pronunciada y asimétrica y le permite poder llegar al sitio de la fecundación (Ho & Suarez, 2001).

Como resultado de la capacitación y por ende la hiperactivación de la movilidad, el espermatozoide está preparado bioquímica y morfológicamente para realizar la exocitosis denominada reacción acrosomal (Yanagimachi, 1990), proceso en el que ocurre la fusión de la membrana plasmática con la membrana externa del acrosoma y la liberación eventual del contenido acrosomal (Buffone *et al.*, 2012).

2.2.1 Mecanismos de orientación espermática.

La probabilidad de que un espermatozoide encuentre y fecunde el óvulo femenino *in vivo* es muy baja. Esto se debe, en primer lugar, a que el número de espermatozoides eyaculados que alcanzan el istmo del oviducto es pequeño (Suarez, 2002); en segundo lugar, solo una fracción (10% en los seres humanos) de estos espermatozoides logran ser capacitados, adquiriendo un estado de preparación para la fertilización del ovocito (Cohen *et al.*, 1995; Jaiswal & Eisenbach, 2002); en tercer lugar, el camino que los espermatozoides tienen que recorrer entre el istmo y el sitio de la fertilización es relativamente largo de 3-5 cm en los seres humanos (Tur-Kaspa, 1992). Es por ello, que los espermatozoides no puedan alcanzar el ovocito por coincidencia (Hunter, 1993; Eisenbach & Tur-Kaspa; 1998).

Por lo tanto, se cree que para lograr encontrar al ovocito *in vivo*, los espermatozoides deben de ser guiados por la existencia de mecanismos de orientación espermática en el oviducto. Con base en estudios *in vitro*, se han propuesto tres diferentes mecanismos de orientación, que ocurren en el oviducto: quimiotaxis, reotaxis y termotaxis (Figura 4).

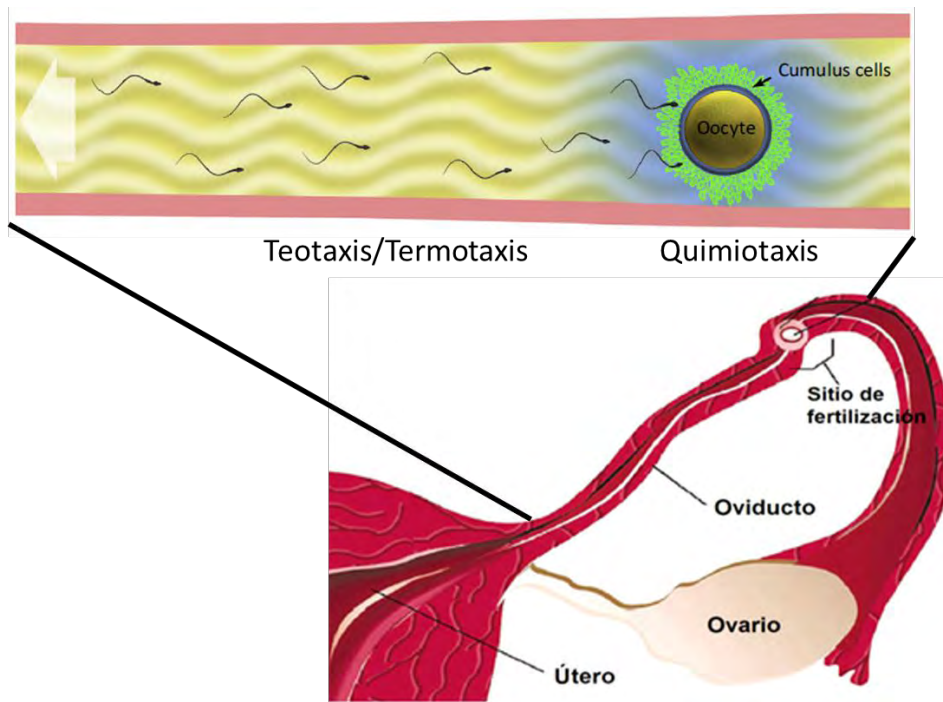


Figura 4. Mecanismos de orientación del espermatozoide humano en el tracto genital femenino. *In vivo*, se sugiere que la aparición de estos mecanismos se da de forma secuencial y sinérgica. (Bahat & Eisenbach, 2006).

Quimiotaxis (dirección química): mecanismo mediante el cual los espermatozoides se mueven como respuesta a un estímulo químico, denominado quimioatrayente, el cual es liberado por el ovocito (demostrado en humanos (Ralt *et al.*, 1994), conejos (Giojalas *et al.*, 2001) y ratones (Oliveira *et al.*, 1999)). Sin embargo, la quimiotaxis por sí sola no puede ser suficiente debido a los movimientos peristálticos del oviducto que pueden prevenir la formación de un gradiente quimioatrayente de largo alcance *in vivo*, restringiendo la quimiotaxis a una distancia corta del ovocito (Eisenbach, 1999).

Reotaxis: desplazamiento hacia o en contra de una corriente de flujo de un fluido (se muestra en ratones y humanos) (Eisenbach, 1999). En ratones hembra se descubrió flujo de fluido oviductal post coito (Miki & Clapham, 2013).

Termotaxis (dirección térmica): desplazamiento hacia o en contra de un gradiente de temperatura, acercándose o alejándose de la fuente de calor (demostrado en conejos, cerdos y humanos). Se propone que este mecanismo puede guiar a los espermatozoides por un gradiente de temperatura en sectores de la trompa de Falopio una vez ocurrida la ovulación. Esta agradable temperatura permite que los espermatozoides vayan hacia el encuentro con el ovocito. Se ha reportado que en la ovulación existe una diferencia de temperatura entre el sitio de depósito de espermatozoides (más frío) y el sitio de la fertilización (más caliente), el gradiente de temperatura está ausente cuando no hay ovulación (Bahat *et al.*, 2003).

Se ha reportado un gradiente de temperatura generado en los oviductos de conejo (David *et al.*, 1972; Bahat *et al.*, 2003) y cerdo (Hunter & Nichol, 1986) en la ovulación.

La diferencia de temperatura es de aproximadamente 2° C en conejos entre el istmo y la unión ampular-ístmica y -0.7° C de diferencia en cerdos apareados entre el istmo y el ámpula (Hunter & Nichol, 1986). Estos hallazgos plantean la posibilidad de que la diferencia de temperatura podría servir como señal para guiar a los espermatozoides al sitio de la fecundación (Hunter, 1998).

Bahat y colaboradores (2003) demostraron que los espermatozoides de conejo y de humanos tienen la capacidad para detectar pequeñas diferencias de temperatura (tan pequeñas como 0.5° C y tal vez, incluso inferiores) y responder a ella. Se infiere que *In vivo* la termotaxis puede ser complementaria a la quimiotaxis, cada mecanismo puede ser funcional en una región donde el otro mecanismo es ineficaz. Una región en la que aparentemente esto ocurre es entre el depósito de espermatozoides ístmica y el sitio de la fertilización, en donde existe un gradiente de temperatura en la ovulación y la quimiotaxis de largo alcance

puede no ocurrir debido a un efecto de mezcla de los movimientos peristálticos del oviducto.

3. Capacitación espermática.

El espermatozoide no puede fertilizar al gameto femenino inmediatamente después de la eyaculación. La capacitación del gameto masculino consiste en cambios metabólicos y estructurales que incluyen el desarrollo de la movilidad hiperactivada (se caracteriza por movimientos pronunciados del flagelo y movimientos laterales de la cabeza), la exocitosis acrosomal o reacción acrosomal (AR) en respuesta a estímulos de la zona pelúcida (ZP) del ovocito, progesterona y fluido folicular (Yanagimachi, 1994). Por lo tanto, la capacitación es, por definición, la adquisición de la capacidad fertilizante (De Jonge, 2017). La movilidad hiperactivada es un patrón requerido por el espermatozoide para penetrar el cumulus y la zona pelúcida del ovocito (Urner & Sakkas, 2003).

Entre los cambios moleculares que ocurren en la capacitación destacan: la concentración de calcio intracelular y otros iones, la composición en la distribución de lípidos, la fosforilación de proteínas, la actividad de quinasas y la remoción de colesterol debido al contenido de albúmina (Figura 5) (Baldi *et al.*, 1996).

La capacitación se caracteriza por la salida de colesterol de la membrana y el ingreso de Ca^{2+} (Luconi *et al.*, 1996) y HCO_3^- al citosol, permitiendo la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y del intercambiador de HCO_3^- , desencadenando la fosforilación en las tirosinas de las proteínas. Este proceso se lleva a cabo en las criptas del istmo, donde se adosan los espermatozoides y termina con la liberación de ellos hacia el ámpula, en este lugar encuentran al ovocito y ocurre el reconocimiento (Olivera *et al.*, 2006). El bicarbonato y el calcio inician numerosas vías de señalización, que causan una serie de cambios

funcionales en la población de espermatozoides (Leahy & Gadella, 2015). Durante la capacitación hay un aumento en el pH intracelular (pH_i), el que se atribuye al anión bicarbonato, el cual presenta concentraciones bajas en el epidídimo y altas en el plasma seminal y oviducto (Figura 5) (Purohit *et al.*, 1999).

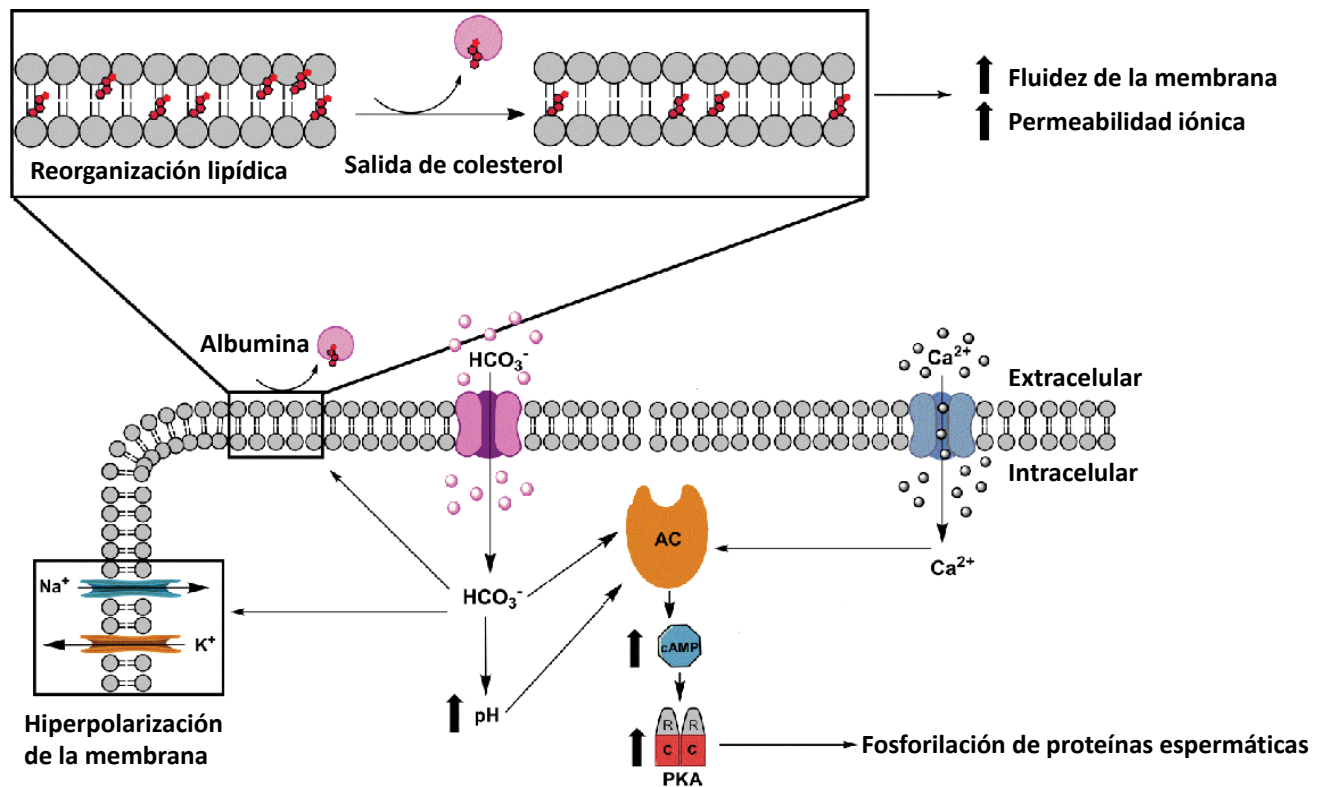


Figura 5. Bases moleculares de la capacitación espermática. La entrada de bicarbonato conduce a la hiperpolarización del potencial de membrana, la activación de la Adenilato ciclasa soluble (ACs) (directa o indirectamente al aumentar el pH) y la reorganización de los lípidos en la membrana (cambian la posición del colesterol a la parte apical). Esto facilita su eliminación al entrar en contacto con albúmina, con lo que se da un aumento en la fluidez de la membrana y promueve la entrada de calcio. El calcio activa la ACs, aumenta la fosforilación de proteínas espermáticas a través de la vía AMPc / PKA (Imagen tomada y modificada de López-Úbeda & Matás, 2015).

La albumina es necesaria para remover el colesterol de la membrana plasmática e inducir la reorganización e intercambio de fluidos. Estos cambios pueden modular el flujo de iones Ca^{2+} y/o HCO_3^- , para activar la Adenilato Ciclasa soluble (ACs) e incrementar los niveles de AMPc. Esta proteína puede activar directamente los canales de cationes del espermatozoide (Catsper) y así incrementarse los niveles de calcio intracelular (Darszon *et al.*, 2011). En humanos, la progesterona activa los Catsper y se facilita la afluencia de Ca^{2+} (Lishko *et al.*, 2011), generando un incremento de fosforilación en tirosina de las proteínas de la pieza principal del flagelo (Sagare-Patil & Modi, 2016).

Los esteroides son un componente vital de la membrana plasmática en células eucariotas, el esteroide celular dominante es el colesterol del que la mayoría (aproximadamente el 90%) se localiza en la membrana y se encuentra de forma libre. El colesterol tiene un efecto estabilizador sobre la membrana plasmática, se encuentra insertado en los espacios intersticiales de la bicapa lipídica con su cuerpo rígido junto a la cola acil grasa de los fosfolípidos vecinos. El flujo de colesterol desde la membrana al ambiente extracelular en presencia de albúmina, permite una mejor fluidez de la membrana y una redistribución lateral del colesterol al borde apical de la cabeza del espermatozoide (Leahy & Gadella, 2015).

La generación de radicales libres y eflujo de colesterol cambian las propiedades mecano-dinámicas de la membrana por oxidación de los lípidos poliinsaturados, generando espacios libres de colesterol. La mayor movilización de iones involucra la afluencia de calcio, potasio, cloruro y bicarbonato, así como el eflujo de zinc. La capacitación espermática en los mamíferos está acompañada de una hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide (Zeng *et al.*, 1995), resultando en cambios en la actividad de los canales iónicos y transportadores encargados de controlar el flujo iónico (Salicioni *et al.*, 2007). En los espermatozoides se caracterizan varios canales que incluyen: canales de calcio dependientes de voltaje tipo T, calcio-ATPasas, bomba de intercambio $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{Na}^+]$, intercambiador de bicarbonato y cloruro (Purohit *et al.*, 1999).

Además existe una relación entre la capacitación espermática y la fosforilación sobre residuos de tirosina de muchas proteínas de la membrana plasmática de varias especies incluyendo a los humanos (Marín-Briggiler *et al.*, 2002). Cambios en los niveles de segundos mensajeros como AMPc y Ca^{2+} pueden desencadenar una serie de señales intracelulares, tales como la disminución de la fosforilación de tirosinas y de este modo modificar las funciones del espermatozoide (He *et al.*, 2016).

4. Fosforilación de proteínas espermáticas.

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes presentes en la célula, son la expresión final de la mayoría de los genes y desempeñan múltiples funciones. Las cadenas polipeptídicas se modifican después de sintetizarse para regular la actividad de la proteína; por ejemplo, a algunos aminoácidos como la tirosina se les puede añadir un fosfato al grupo hidroxilo. Las modificaciones como ésta crean residuos cargados negativamente que pueden entonces unirse iónicamente a otras moléculas.

La fosforilación de las proteínas es un evento de modificación post-traducciona que actúa como uno de los mecanismos de regulación de la célula (Naz *et al.*, 2004). Es un medio de regulación en prácticamente todos los procesos metabólicos de las células eucariotas. Es un evento complejo que envuelve varias señales transmembranales e intracelulares, considerando que la fosforilación de proteínas es el resultado de un equilibrio entre fosforilación/ desfosforilación y los cambios de temperatura podrían afectar directamente este balance (Marín-Briggiler *et al.*, 2002).

La fosforilación y desfosforilación de las proteínas en el aminoácido tirosina ha estado implicada en la regulación de una gran variedad de funciones celulares como la regulación del crecimiento, proceso de adhesión celular, cambios en el

citoesqueleto, así como en el ciclo celular o exocitosis (Gilbert, 2006). El proceso de fosforilación es extremadamente importante para regular muchas actividades celulares mediante la acción de enzimas denominadas quinasas. Éstas últimas, transfieren grupos fosfato desde el ATP a otras proteínas, como consecuencia de la fosforilación, cambia el comportamiento de la proteína implicada (Klug *et al.*, 1999). La fosforilación de la tirosina (TP, por sus siglas en inglés *Tyrosine Phosphorylation*) está ligada desde hace unos años a los procesos de capacitación e hiperactivación en los espermatozoides de numerosos mamíferos: bovinos (Galantino-Homer *et al.*, 1997), murinos (Visconti & Kopf, 1998), porcinos (Tardif *et al.*, 2001) y humanos (Leclerc *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 2011; Sati *et al.*, 2014).

El incremento en la TP está regulada por una vía dependiente de AMPc que involucra a las proteínas quinasas A (PKA) (Klug *et al.*, 1999), cada proteína consta de las subunidades reguladora (R) y catalítica (C); la unión de AMPc a las subunidades reguladoras, permite la liberación de las cadenas C, en ese momento la PKA se encuentra activa (Figura 6) (Battaner, 1993), en ese estado de activación fosforilan residuos específicos de serina, treonina y tirosina. La estimulación de la subunidad catalítica de PKA permite la interacción con el andamio de proteínas, de la familia AKAP (Luconi *et al.*, 2005).

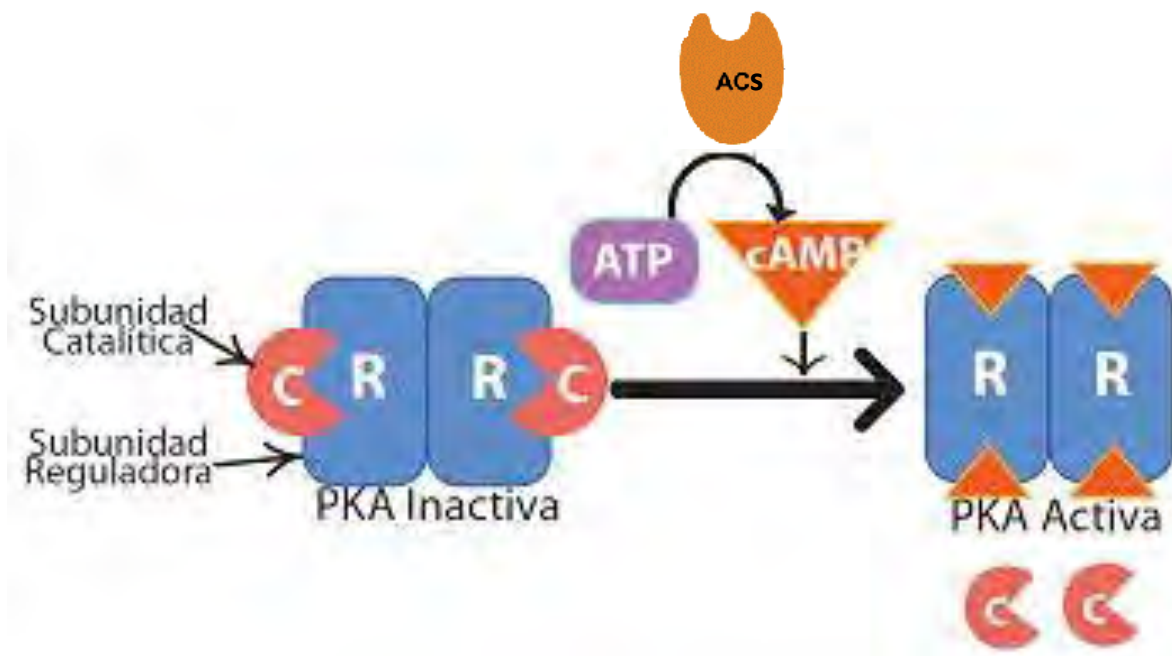


Figura 6. Estructura y activación de la proteína quinasa A. A bajas concentraciones de AMPc, la holoenzima permanece intacta y las subunidades catalíticas permanecen unidas a las subunidades reguladoras. A altas concentraciones de AMPc, éste se une a las subunidades reguladoras. Al unirse provoca un cambio conformacional en las subunidades reguladoras que sueltan las subunidades catalíticas exponiendo así el sitio activo. Imagen tomada y modificada de Martínez *et al.*, 2010.

Las AKAPs son proteínas de anclaje y pertenecen a una familia de proteínas de andamiaje, que permiten una vía de señalización común para diferentes funciones. Tienen una capacidad para ensamblar complejos multiproteicos y relacionar diferentes vías de señalización, presentan una secuencia de reconocimiento que se une a las subunidades reguladoras de la PKA (dominio R2D2) (Vizel *et al.*, 2015). Las primeras proteínas identificadas como sustrato para fosforilación de tirosina fueron las proteínas de anclaje quinasa-A (AKAP3 y AKAP4) en espermatozoide humano. La proteína AKAP4 está presente únicamente en células espermatozooides y predomina en la vaina fibrosa del flagelo (Naresh *et al.*, 2015a).

La fosforilación de tirosina durante la capacitación en el espermatozoide humano es dependiente de la vía de señalización AMPc-PKA (Figura 6) (Galantino *et al.*, 1997). En esta vía el bicarbonato HCO_3^- presente en el tracto reproductor femenino, estimula la actividad de la Adenilato Ciclasa Soluble (ACs), la cual se

encuentra asociada con diferentes orgánulos celulares, para difundir y sintetizar AMPc en el sitio donde se localiza su proteína diana PKA. Esta última fosforila a las Proteínas de Anclaje Quinasa A (AKAP), presentes en la vaina fibrosa del flagelo (Luconi *et al.*, 2005), como AKAP82 y FSP95, fosfoproteínas más prominentes durante la capacitación; otras proteínas como CABYR localizada en la vaina fibrosa de la pieza principal del flagelo, al ser fosforiladas en tirosina adquieren la capacidad de unir calcio durante la capacitación, lo secuestran y liberan en la pieza principal estableciendo una unión entre la fosforilación de tirosina y calcio (Urner *et al.*, 2003).

Varias regiones de la membrana de los espermatozoides humanos se someten a TP durante la capacitación y la unión a la zona pelúcida. Los cambios de fosforilación son dependientes del tiempo y la reacción se inicia en la punta del flagelo y se propaga hacia el cuello durante la capacitación. Estos resultados se observan a partir de la primera hora en capacitación, y son más marcados a las cuatro horas (Sati *et al.*, 2014, Naresh *et al.*, 2015 b). Las proteínas fosforiladas en tirosina se localizan en diferentes compartimentos del espermatozoide durante la capacitación y la interacción con el ovocito (Urner *et al.*, 2003). Los diferentes compartimentos se someten a una secuencia específica de fosforilación durante la capacitación y tras la unión a la zona pelúcida (Sakkas *et al.*, 2003).

En algunos trabajos se muestran proteínas intensamente fosforiladas de 107 y 95 kDa (Torres-Flores *et al.*, 2008) después de 4 horas de incubación en medio de capacitación y podrían corresponder a patrones de fosfoproteínas de espermatozoide humano durante la capacitación de 97 y 75 kDa, previamente reportados por Luconi y colaboradores (1996).

II. ANTECEDENTES

Mahi y Yanagimachi en 1973 realizaron experimentos para analizar los efectos de la temperatura en espermatozoides de hámster dorado, los incubaron en un rango de 16 a 42° C y evaluaron la movilidad, reacción acrosomal y supervivencia, destacando que a 37° C se activan inmediatamente y presentan un mayor porcentaje sobre la reacción acrosomal.

Diez años después Lenz y colaboradores en 1983 analizaron los efectos de la temperatura sobre la reacción acrosomal de espermatozoides de bovinos. En sus resultados la RA y la viabilidad espermática fueron dañadas a 40° C, las temperaturas inferiores a 35° C no mejoraron en el parámetro evaluado. Pero 38° C fue la temperatura óptima para la reacción. A partir de estos resultados se concluyó que eventos que ocurren antes y durante la fertilización son sensibles a la temperatura.

Green y Watson en el 2001, realizaron experimentos con espermatozoides de jabalí, capacitados en medio fisiológico durante 2 horas a 39° C y se compararon con muestras congeladas a 5° C (100 min.) y recalentadas a temperatura fisiológica (39° C) durante 10 min; evaluaron los efectos de la temperatura sobre las proteínas fosforiladas en tirosina y concluyeron que la incubación *in vitro* a menor temperatura de 39° C es insuficiente para inducir los cambios de una capacitación. Cuatro años después, Bravo y cols. (2005) analizaron espermatozoides de jabalí incubados por 1 ó 4 horas a 39° C en medio de capacitación; los compararon con muestras congeladas a 5° C y recalentadas durante 10 min a 39° C, evaluaron la fosforilación en tirosina y el estado de capacitación. Encontraron una relación directa entre capacitación y la fosforilación de tirosina en proteína.

En cuanto a los espermatozoides humanos, algunos informes han descrito cómo la temperatura influye sobre la movilidad espermática, en la reacción acrosomal, y en la capacidad del espermatozoide para penetrar el ovocito. Considerándola un factor importante para la maduración del gameto masculino.

En el trabajo de Lefièvre y cols. (2002), se incubaron espermatozoides humanos a 37° C durante varios periodos de tiempo en condiciones de capacitación y no capacitación, se evaluó la actividad de PKA y fosfodiesterasa (PDE). Sus resultados indican una actividad alta de la PKA (reguladora de la fosforilación de tirosina en proteínas) en espermatozoides capacitados en comparación con los no capacitados durante la incubación de 3 horas. En el mismo año, Marín-Briggiler y cols. incubaron espermatozoides humanos capacitados durante 18 horas a 20 y 37° C, evaluaron hiperactivación, fosforilación de la proteína tirosina y reacción acrosomal. Llegando a la conclusión de que el espermatozoide humano a temperatura ambiente (20° C) no se capacita; sin embargo este efecto de bloqueo no afecta a la reacción del acrosoma cuando los espermatozoides son expuestos nuevamente a 37° C.

Boryshpolets y cols. en 2015 realizaron una investigación donde analizaron el comportamiento de los espermatozoides humanos expuestos a termotaxis; las muestras de espermatozoides humanos fueron sometidas a un cambio de temperatura rápido (31 a 37° C en 40 segundos), y se les realizó un análisis cuantitativo de los parámetros de movilidad y cambios en la dirección del flagelo; antes, durante, y después del cambio de temperatura. En sus resultados destacan que los espermatozoides tienen alta sensibilidad a los cambios de temperatura durante la capacitación (incubación durante 2 hrs). En el mismo año, Ruth Vizel y cols. trabajaron con espermatozoides de bovino, para demostrar la importancia de la fosforilación de proteínas, en este caso, los resultados sugieren una correlación entre la reacción acrosomal y el nivel de fosforilación de tirosina.

Experimentos más recientes como el de Naresh (2016), donde sometieron a espermatozoides de búfalo al enfriamiento (4° C) y criopreservación, observando un incremento gradual dependiente del tiempo de la fosforilación de tirosina de

varias proteínas; comparado con espermatozoides de eyaculado fresco y capacitados a 38° C. Estos resultados sugieren que las diferencias de temperatura inducen cambios, sin llegar a una capacitación verdadera.

En trabajos previos ha sido reportado que la temperatura es un factor que influye sobre la fosforilación de proteínas de espermatozoides de hámster (Visconti *et al.*, 1999), jabalí (Green *et al.*, 2001) y equinos (De Andrade *et al.*, 2012).

Todos estos estudios concluyen que la temperatura es un factor que influye sobre la movilidad, capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide. En humano, se reporta una temperatura corporal de 37° C (Hansen, 2009). Sin embargo, el efecto de la incubación en los espermatozoides humanos capacitados a temperatura ambiente no ha sido totalmente descrito, y la mayoría de los experimentos han sido realizados en animales de experimentación y pocos con espermatozoides humanos. Es importante destacar que la fosforilación en tirosina de las proteínas espermáticas es asociada con la capacitación y movilidad en el espermatozoide (Mandal *et al.*, 1999) y por ende, la pérdida o daño en alguno de estos factores espermáticos afecta la fertilidad (Hernández-Matos & Delgado-Roche, 2010), se han reportado alteraciones en la fosforilación de tirosina en sujetos subfértiles, indicando su papel fisiológico en la fertilización (Buffone *et al.*, 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

La temperatura es uno de los factores ambientales que más afectan el comportamiento animal y la fisiología, debido a que tiene un efecto modulador y la termorregulación es un mecanismo que los organismos usan para mantener sus funciones vitales e independientes de los cambios de temperatura (Reyes *et al.*, 2009).

Entre las variaciones de temperatura, el choque térmico induce una amplia variedad de procesos biológicos, entre ellos, altera la fosforilación de algunas proteínas celulares y eleva el nivel de fosforilación en tirosina (Kim *et al.*, 2002). Lefièvre y cols. (2002) reportan una alta actividad en PKA durante la capacitación *in vitro* del espermatozoide humano a 37° C en contraste con los no capacitados. La proteína quinasa es reguladora de la fosforilación de tirosina en proteínas espermáticas, y se considera un aspecto esencial de la capacitación (Naz *et al.*, 2004). Los eventos relacionados con la capacitación son regulados por múltiples cascadas de señalización y la fosforilación en tirosina está involucrada en varias vías de señalización (Kwon *et al.*, 2014).

Díaz en el 2015 realizó experimentos con espermatozoides de humano capacitados en medio fisiológico durante diferentes intervalos de tiempo a 37° C y temperatura ambiente. Evaluó los efectos de la temperatura sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular, pH_i y movilidad. Sus resultados indican que la temperatura ambiente no presentó un efecto negativo sobre las poblaciones de espermatozoides capacitados *in vitro* en la concentración de Ca^{2+} intracelular, pH_i y en la movilidad total; sugiriendo que los espermatozoides humanos pueden ser incubados y capacitados a temperatura ambiente.

La movilidad está relacionada con la fosforilación en tirosina de proteína la cual se correlaciona con la temperatura y esto, a su vez es dependiente del tiempo. Los espermatozoides humanos normalmente son incubados a 37° C, en experimentos *in vitro*, frecuentemente son sometidos a cambios de temperatura

ambiental del laboratorio durante la manipulación de la muestra, se desconoce el efecto sobre la fosforilación en tirosina en espermatozoide capacitado a temperatura ambiente.

Por lo que es importante considerar el efecto de la incubación *in vitro* a temperatura ambiente del laboratorio en la capacitación del espermatozoide humano, para una mejor comprensión de su fisiología.

IV. HIPÓTESIS

Con base en que a temperatura de 26° C los espermatozoides humanos conservan la motilidad, la concentración de Ca^{2+} intracelular es óptima y ocurre la capacitación, se esperaría que la fosforilación de los residuos de tirosina en las proteínas espermáticas también se llevara a cabo de manera apropiada.

V. OBJETIVOS

General:

Evaluar la fosforilación en residuos de tirosina en proteínas espermáticas a temperatura ambiente del laboratorio (26° C) en espermatozoides humanos.

Particulares:

- Estandarización de la carga de proteína mediante la elaboración de un gel de acrilamida teñido con azul de coomasse.
- Determinar el efecto de incubación a temperatura ambiente (26° C) de espermatozoides humanos sobre la fosforilación en residuos de tirosina evaluada mediante Western Blot (WB).
- Analizar los efectos de la temperatura ambiente (26° C) sobre la fosforilación en residuos de tirosina en proteínas espermáticas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y medios.

1.1 Medio de capacitación de espermatozoides.

La capacitación se realizó *in vitro*, bajo protocolos establecidos; se llevó a cabo mediante la incubación de los espermatozoides en medios definidos y bajo condiciones determinadas que mimetizan el ambiente oviductual (Visconti *et al.*, 2011). Estos medios llevan en su composición sustratos energéticos como el piruvato, lactato y glucosa, una fuente proteica, la cual es usualmente albúmina, HCO_3^- y el Ca^{2+} (Visconti & Kopf, 1998).

En la tabla I se muestra el medio que se utilizó para la incubación de los espermatozoides humanos, con buffer de HEPES diseñado por Suárez y colaboradores (1986). Todos los reactivos se obtuvieron de Sigma o Merck.

Tabla I. Composición del medio utilizado para la incubación *in vitro* de los espermatozoides humanos.

Medio para espermatozoides humanos capacitados (HSMcap)	
COMPONENTES	CONCENTRACION (mM)
NaCl	117.5
KCl	8.6
CaCl ₂	2.5
NaH ₂ PO ₄	0.3
MgCl ₂	0.49
Piruvato de sodio	0.3
Lactato de sodio	19
Glucosa	2
NaHCO ₃ ⁻	25
Hepes	15
albúmina sérica bovina	3 mg/ml
se ajustó a pH 7.6 con NaOH	

2. Material Biológico.

Se utilizaron 6 muestras de semen humano de donadores sanos (ver Anexo A), entre los 22 y 30 años de edad, las muestras se recogieron por masturbación con tres días de abstinencia sexual. Los donadores conocieron y firmaron una carta de consentimiento informado sobre el uso experimental de su muestra, autorizada por las Comisiones de investigación y de Ética de la Facultad de Medicina, que a su vez sigue los lineamientos de la Convención de Helsinki sobre el correcto manejo de muestras provenientes de humanos.

2.1 Purificación de los espermatozoides.

Las muestras fueron seleccionadas según las indicaciones de la Organización Mundial de la Salud, es decir, con parámetros normales, de acuerdo con los siguientes criterios: concentración $\geq 20 \times 10^6$ M/ml; movilidad $> 50\%$ y con una morfología $>14\%$ de espermatozoides normales (OMS, 2010). Una vez colectada la muestra, se incubó por 40 minutos a 37° C para su licuefacción.

Con el objetivo de obtener los espermatozoides vivos de la muestra, se realizó la separación de los espermatozoides del plasma seminal mediante gradientes discontinuos de percoll. El semen se colocó sobre un gradiente de 1 mL de percoll al 75 % y 1 mL de percoll al 50 % y se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 minutos en tubos cónicos de 15 mL (Linares-Hernández *et al.*, 1988). La pastilla de espermatozoides se separó y se lavó con medio HSM mediante centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos.

Después se llevaron a cabo los tratamientos correspondientes, cada muestra fue dividida en 5 fracciones iguales y se agruparon en tres lotes: a) muestras en medio de capacitación, b) muestras capacitadas incubadas a 37° C y c) muestras capacitadas incubadas a temperatura ambiente (26° C). Las concentraciones de los espermatozoides fueron ajustadas a 20×10^6 células/mL. Para cada grupo se realizaron las siguientes mediciones 1) basal (medio de

capacitación a 0 h), 2) 2 y 4 h en medio de capacitación a 37° C y 3) 2 y 4 h en medio de capacitación a 26° C (Tabla II).






		a		b	
	Basal (Control)	37°C		26°C	
Tiempo (h)	0 h	4 h	2 h	4 h	2 h
					

Tabla II. Ensayos experimentales. Tratamiento y protocolo

3. Análisis de la fosforilación de la tirosina.

La fosforilación de la tirosina se estudió mediante Western blot.

3.1. Análisis mediante Western Blot

3.1.1. Extracción de proteínas mediante sonicación.

Una vez realizados los tratamientos, los espermatozoides se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se le añadieron aproximadamente 50 µL de amortiguador de lisis en proporción 1:1, cuya composición química consiste en: Tris-HCL al 62.5 mM, glicerol 25 % a pH 7.6, SDS 2 % a pH 6.8.

Posteriormente las muestras se sonicaron por 10 minutos con la inclusión de la muestra en hielo durante este proceso, para evitar el calentamiento de la misma. Después las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se almacenó a -70° C hasta su utilización.

3.1.2. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas totales de las muestras se determinó por el método de Bradford (1976). Es una técnica sensible (2.5-20 µg de proteína/ml) fundamentada en el cambio de color del Azul Brillante de coomassie G-250. La interacción entre los grupos aniónicos del colorante y los grupos amino de las proteínas forma complejos y causa el cambio de color de marrón-naranja (protonado) a un color azul intenso (no protonado). El complejo presenta una absorbancia máxima a 595 nm, que es proporcional a la concentración de proteína contenida en la muestra.

Previamente a la determinación de la concentración de proteínas, se realizó una curva estándar de albúmina:

	Blanco	1	2	3	4	5	6	Muestra problema
µg/µL	0	1	2	4	6	8	10	-----
H2OµL	100	90	80	60	40	20	0	-----
Alb. µL	0	10	20	40	60	80	100	-----
Total µL	100	100	100	100	100	100	100	25
Bradford µL	1000							

Para cuantificar la proteína de la muestra problema, solo se colocaron 25 µL de la muestra y 1 mL de reactivo Bradford:

Reactivo Bradford	PARA 50 mL	PARA 100 mL
Azul de coomassie G250	5 mg	10 mg
Etanol	2.5 mL	5 mL
Ac. fosfórico	5 mL	10 mL
Agua bidestilada o Mili Q	Aforar a 50	Aforar a 100

Se incubaron las muestras por 5 min en oscuridad y posteriormente se llevó a cabo el registro de la absorbancia en una longitud de onda 595 nm, se realizó el cálculo mediante la ecuación de la recta. Se consideran valores fiables cuando se obtiene un valor de $r^2 \geq 0.989$ (Figura 7).

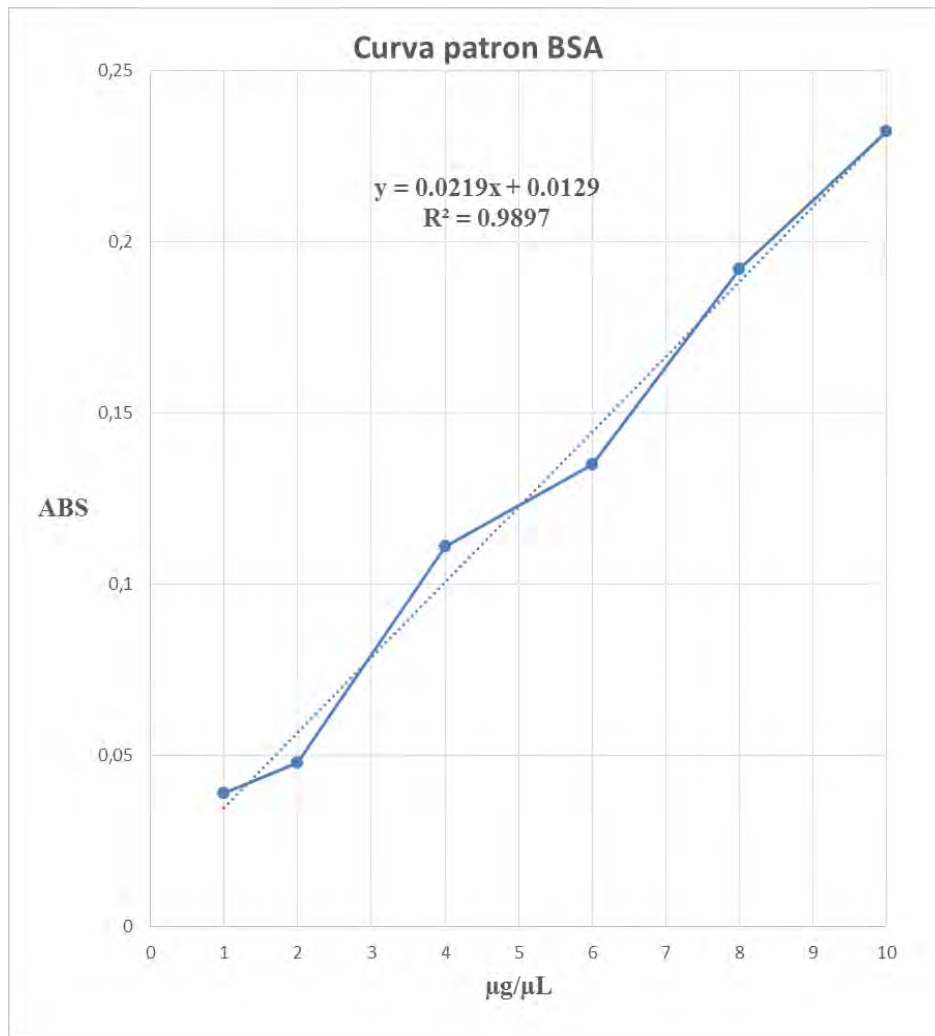


Figura 7: Curva patrón para la medición de proteínas totales de la muestra.

3.1.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras (20 µg de proteína total equivalentes a 3×10^6 /mL) se diluyeron hasta un volumen final de 30 µL en tampón de carga (Laemmli, 1970). La separación de las proteínas se realizó por medio de electroforesis en SDS-PAGE (en un gel al 12 %), se transfirieron electroforéticamente a la membrana de nitrocelulosa. Ésta se incubó en leche descremada en polvo (Svelty®, Nestle™) al 3 % PBS durante la noche a 4° C. Posteriormente se incubó con anticuerpo anti-fosfotirosina (Anti-fosfotirosina monoclonal PY-20; número de catálogo A4595, Sigma-Aldrich, USA) a la dilución (1: 2000) acoplado con peroxidasa (Sigma) durante 6 horas. La membrana se lavó tres veces durante 10 min cada una con PBS-Tween (0,05%) y luego con PBS. Se empleó como control el marcador de peso molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein de 6 a 180 kDa. Además, se realizó la detección de β-tubulina en la misma membrana para corroborar la homogeneidad de la carga total de proteínas. Las proteínas fosforiladas en los residuos tirosina se detectaron con Immobilon™ Western Chemiluminiscent HRP (Horseradish Peroxidase) substrate, Millipore Corp. Para el revelado se utilizaron placas radiográficas Kodak Biomax light® que capturan la actividad quimioluminiscente se revelaron en un tiempo de 1 a 5 minutos con revelador Kodak PROFESSIONAL D-76 para películas, en dilución 1: 6, paso seguido las placas se fijaron con Kodak FIXER PROFESSIONAL solución según la recomendación del fabricante y para finalizar se enjuagaron con agua desionizada 30 segundos. Las placas radiográficas obtenidas se analizaron con el software ImageJ. Los resultados se graficaron con el programa Origin 7.0 SRO v7.0220 (B220).

3.1.4. Análisis estadístico.

Todos los datos se expresan como media ± error estándar (ES). Se aplicó una ANOVA y una prueba de Tukey; los valores de $P < 0.05$ fueron aceptados como diferencias significativas de acuerdo a los datos obtenidos de cada experimento. El análisis de los datos se realizó con el software STATISTICA (data analysis software system) versión 7.

VII. RESULTADOS

1. Estandarización de la carga de proteína espermática.

Con el objeto de seleccionar la concentración adecuada para una mejor visualización de la fosforilación de tirosina en proteínas espermáticas, se probaron concentraciones diferentes de espermatozoides humanos.

En las pruebas se utilizó un SDS-PAGE al 12 %, teñido con azul de Coomassie. En la figura 8 se observan los registros de las proteínas de diferentes cantidades de espermatozoides; 0.5×10^6 (carril A), 1×10^6 (carril B), 2×10^6 (carril C), 3×10^6 (carril D), 4×10^6 (carril E) y 5×10^6 (carril F). En todos los carriles es posible detectar la presencia de células, aunque en algunos casos la manifestación es difusa como se muestra en el carril A y B; en contraste con los carriles C, D, E y F, donde se observa la existencia de proteína espermática con una mayor visibilidad. Decidimos utilizar la concentración de 3 millones de espermatozoides (equivalente a $20 \mu\text{g}$ de proteína total) para los siguientes experimentos de detección de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, debido a que mostraron un buen margen de medición y visibilidad.

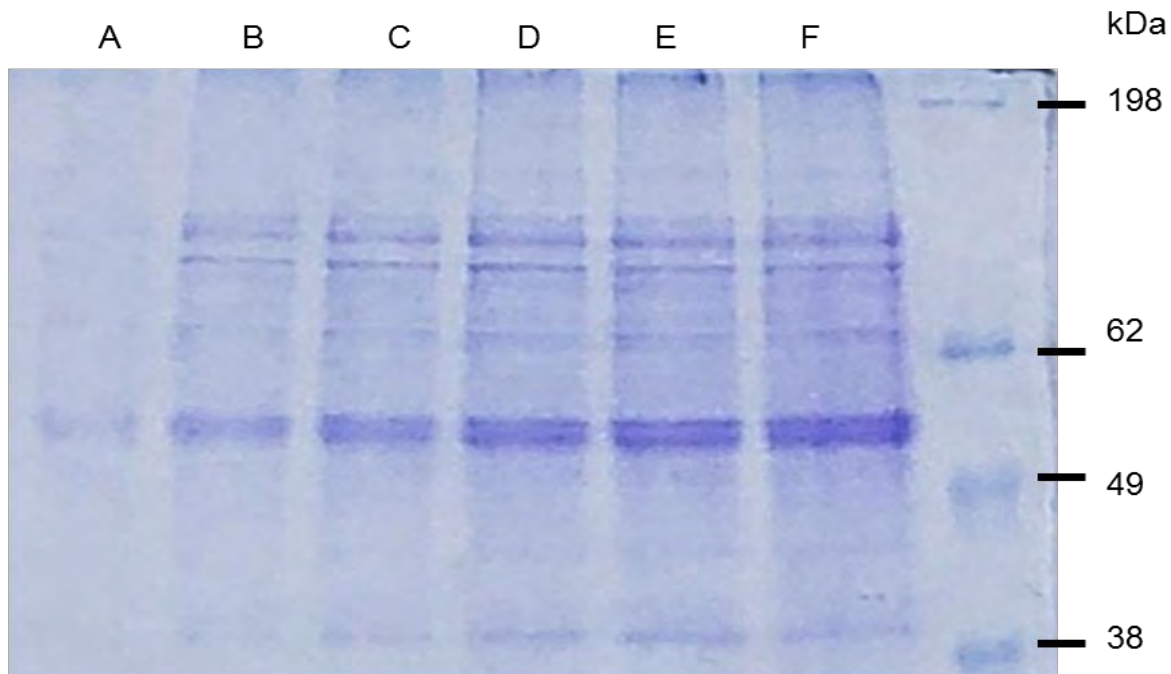


Figura 8. Estandarización de la carga de proteína espermática. Gel SDS-PAGE comparativo de diferentes concentraciones celulares. El carril A: 0.5 millones de células; carril B: 1 millón de células; carril C: 2 millones de células; carril D: 3 millones de células, carril E: 4 millones de células y carril F: 5 millones de células. Los resultados son representativos de experimentos independientes (n=6).

2. Efecto de la incubación en diferentes temperaturas y tiempos sobre la fosforilación de la tirosina evaluado mediante WB.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la temperatura sobre la fosforilación de la tirosina se incubaron espermatozoides de humano a 26° C y 37° C durante diferentes tiempos (hora) de incubación en medio de capacitación. Se observó un incremento en los niveles de la fosforilación en residuos de tirosina en proteínas espermáticas, en comparación con células no capacitadas (NC), es decir, en tiempo 0 h (Figura 9, comparar carril 1 con carriles 2-5), tal como se ha reportado en trabajos previos (Liang *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016; López-Torres *et al.*, 2017).

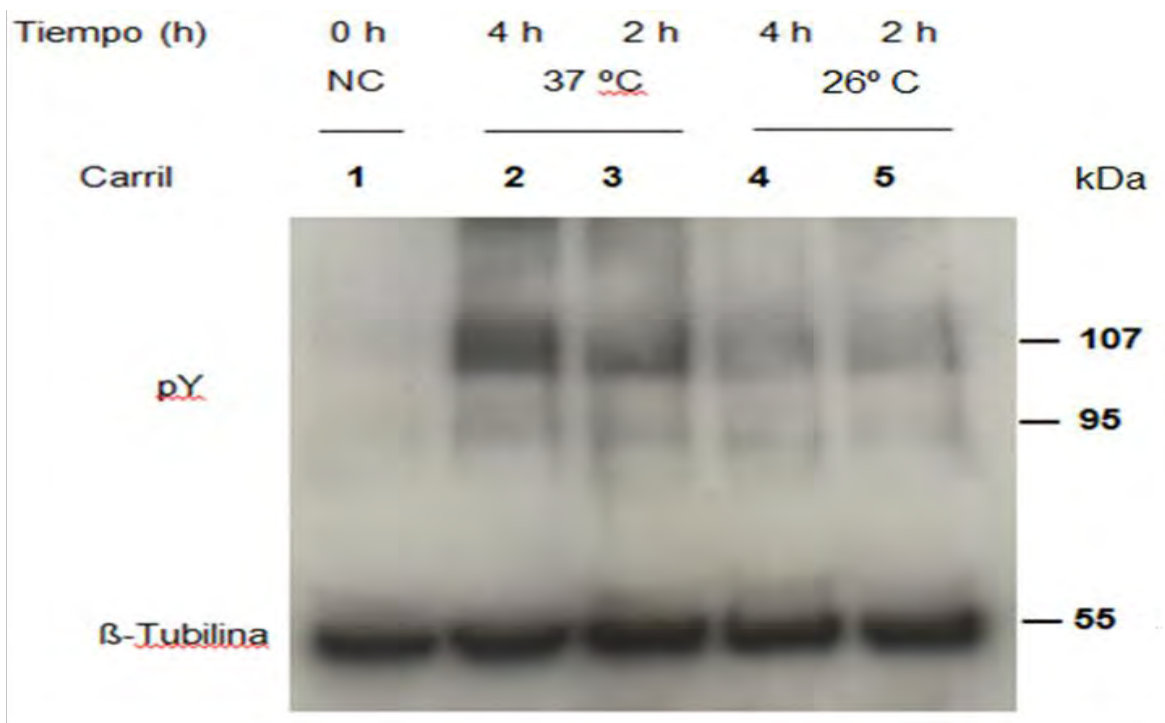


Figura 9. Inmunodetección de la fosforilación de la tirosina mediante western blot en espermatozoides de humano. Los espermatozoides fueron incubados por 2 o 4 h a 37 °C (carriles 2-3) y por 2 o 4 h a 26 °C en medio de capacitación (carriles 4-5). Las bandas de las proteínas fosforiladas están indicadas a la derecha. Para propósitos comparativos, las proteínas cargadas fueron corroboradas con β -tubulina, sin observarse diferencias significativas. Gel representativo de una n de 6.

En la figura 9, se pueden observar las bandas correspondientes a dos proteínas de aproximadamente 95 y 105 kDa con fosforilación basal en tiempo 0 h (carril 1). Como se esperaba, bajo condiciones de capacitación; la intensidad de estas dos bandas de proteínas se incrementó después de las 2 h de incubación, se puede observar en los tratamientos diferencias significativas en las bandas fosforiladas (Figura 9 y 10; Anexo B) (Liang *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016; López-Torres *et al.*, 2017).

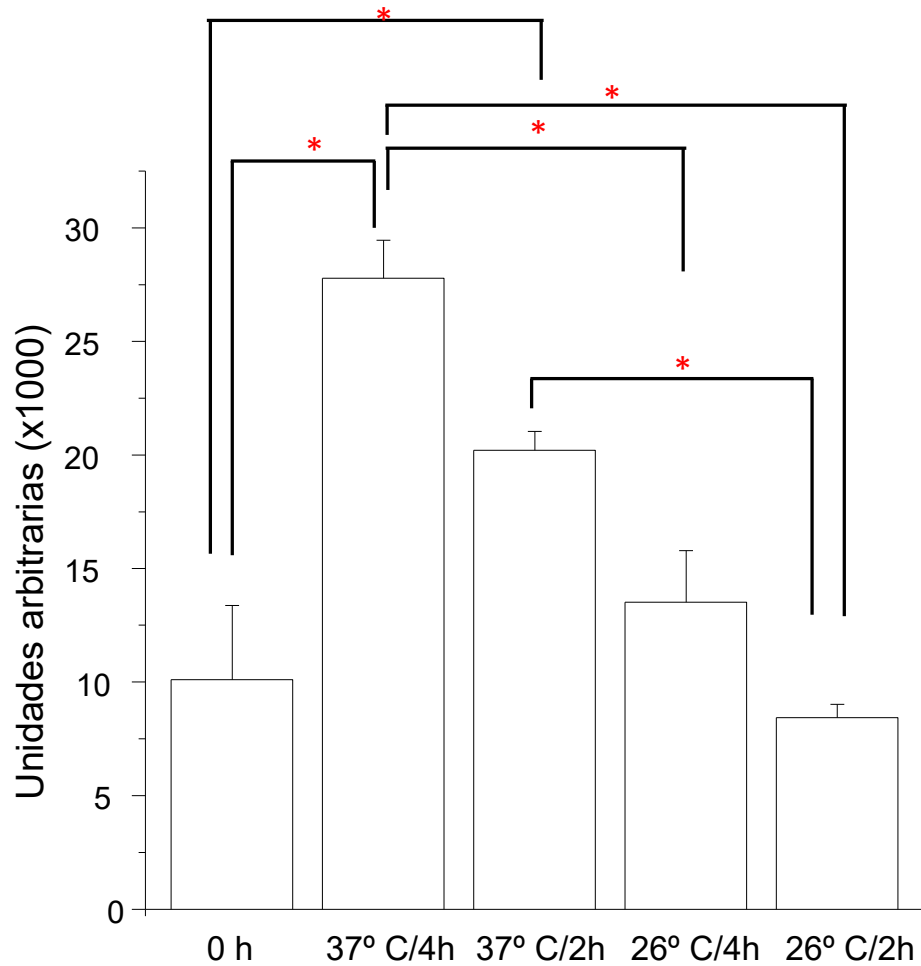


Figura 10. Efecto de la temperatura sobre la fosforilación en residuos de tirosinas en espermatozoides humanos. Los espermatozoides fueron incubados por 2 o 4 h a 37° C en medio de capacitación y por 2 o 4 h a 26° C en medio de capacitación. Para cada uno de los experimentos (n=6) se escanearon las transferencias y se analizó la intensidad de las bandas usando Image J. Las barras representan la media \pm ES. Los asteriscos (*) muestra las diferencias significativas $p < 0.05$ entre los tratamientos.

Podemos observar una mayor intensidad de las bandas (Figura 9) en el tratamiento a 37° C, tanto a 2 h de incubación como a 4 h, lo que se interpreta como un incremento del 200 % (carril 3, 2 h) y de un 275 % (carril 2, 4 h) en la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, siendo diferentes significativamente con el tiempo de 0 h.

En el caso de la incubación a temperatura ambiente solo se dio un incremento del 83.6 % durante 2 h (carril 5), mientras que para 4 h el incremento fue del 134 % con relación a los espermatozoides a 0 h no mostrando diferencias significativas (carril 1) (Figura 9 y 11). Estos datos concuerdan con Visconti y cols. (1995, 1999); Tardif y cols. (2001); Pommer y cols. (2003) y Grasa y cols. (2006) que han reportado un incremento tiempo-dependiente en la fosforilación de tirosinas con el estado de capacitación de los espermatozoides y parece ser un prerrequisito para que un espermatozoide sea capaz de fecundar (Urner *et al.*, 2001).

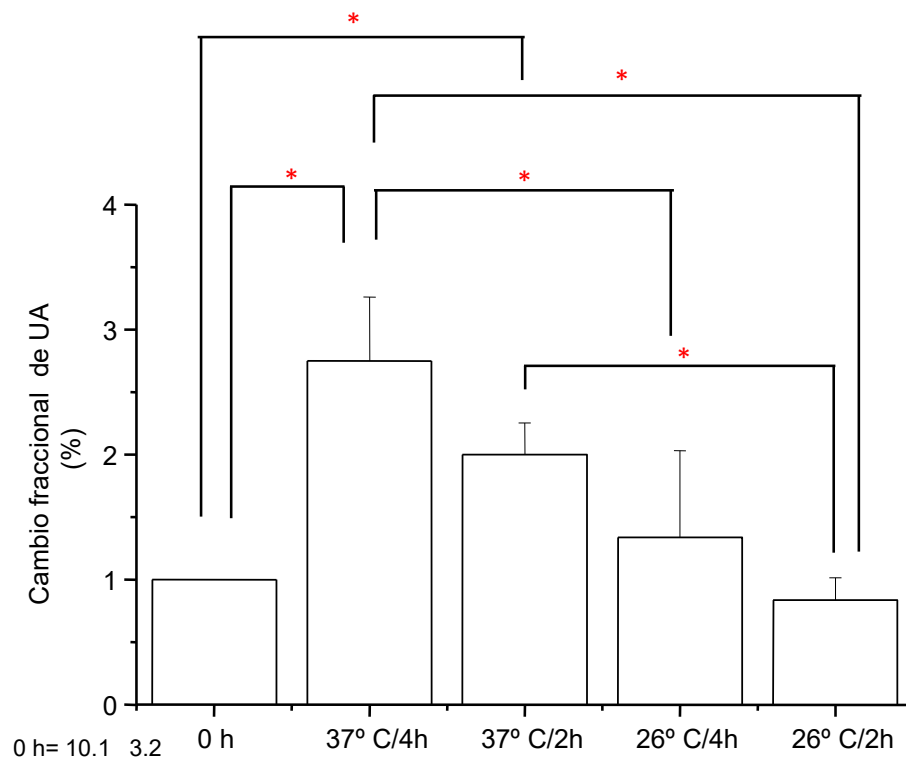


Figura 11. Cambio porcentual del efecto de la temperatura sobre la fosforilación en residuos de tirosinas en espermatozoides humanos. Las barras representan la media \pm ES. Los asteriscos (*) muestra las diferencias significativas $p < 0.05$ entre los tratamientos.

Por otra parte, los espermatozoides capacitados a 37° C mostraron diferencia significativa con los incubados a temperatura ambiente del laboratorio (26° C) en un periodo de 2 h y 4 h, mostrando que la incubación a temperatura ambiente tiene un efecto negativo en la capacitación de los espermatozoides.

VIII. DISCUSIÓN

En los espermatozoides humanos la fosforilación de tirosina es un proceso esencial para las funciones del espermatozoide: capacitación, movilidad y reacción acrosomal, procesos que serán indispensables para que el espermatozoide pueda alcanzar y penetrar al ovocito y es una característica de las células capacitadas (Visconti *et al.*, 1995; 1999; Tardif *et al.*, 2001; Pommer *et al.*, 2003; Grasa *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2016 y Alonso *et al.*, 2017).

En esta tesis la capacitación *in vitro* fue conseguida por la incubación de los espermatozoides en medio de capacitación y no ocurrió cuando se reemplazó por un medio sin suplementar (datos no mostrados). Los efectos de los cambios de temperatura sobre la fosforilación en residuos de tirosina en proteínas espermáticas, fue por lo tanto realizado en un medio de capacitación que contenía BSA y NaHCO₃, dos componentes absolutamente requeridos para la capacitación (Yanagimachi, 1994; Visconti *et al.*, 1995; 1999 y Urner *et al.*, 2003).

Los resultados del presente estudio sugieren que es necesaria una temperatura de incubación adecuada para la expresión de la capacidad fertilizante *in vitro* del espermatozoide humano ya que, aunque se registró fosforilación en los residuos de tirosina de las proteínas espermáticas, no fue suficiente para lograr la capacitación de los gametos masculinos. (Harrison, 2004; Áviles, 2011; Torres-Fuentes, 2015) que se considera prerrequisito para que un espermatozoide sea capaz de fecundar (Si *et al.*, 1997; Urner *et al.*, 2001). Es probable que el equilibrio de la fosforilación a cargo de las cinasas se haya alterado y que, debido a que la temperatura no fue óptima, las enzimas no hayan podido reestablecerlo. Este resultado concuerda con lo reportado por otros autores que han registrado un incremento importante en la fosforilación de tirosina de proteínas espermáticas durante la capacitación.

La relación entre la capacitación y la fosforilación sobre residuos de tirosina de proteínas espermáticas ha sido reportada en varias especies de mamíferos

(Harrison, 2004; Áviles, 2011; Torres-Fuentes, 2015). Durante la capacitación existe un incremento importante en la fosforilación de tirosina de proteínas espermáticas que es iniciado por la activación de PKA (Visconti *et al.*, 1995), este incremento se ha reportado como un prerrequisito para que un espermatozoide sea capaz de fecundar (Urner *et al.*, 2001). La PKA fosforila varias proteínas diana que inician varias vías de señalización (Salicioni *et al.*, 2007), entre estas se encuentra la fosforilación en residuos de tirosina, el cuál, es un evento tardío que depende de la presencia de albúmina, Ca^{2+} y NaHCO_3^- en un medio de capacitación (Ickowicz *et al.*, 2012).

Se sabe que la iniciación y mantenimiento de la movilidad en el espermatozoide involucra la fosforilación de proteínas del espermatozoide y la movilidad es altamente regulada por una cascada de fosforilación/desfosforilación, eventos que afectan la actividad de las cinasas. Las proteínas de anclaje cinasa- A (AKAPs), son un componente principal de la envoltura fibrosa de la pieza principal, son las proteínas más prominentemente fosforiladas en residuos de tirosina e involucradas en la movilidad e hiperactivación del espermatozoide, sin embargo la caracterización completa aún no es clara (Jha *et al.*, 2002; Ficarro *et al.*, 2003). Se han reportado proteínas fosforiladas en tirosina, durante la reacción acrosomal (14-200 kDa) (Naz, 1996) y en la zona de unión (Baldi *et al.*, 2000).

En el trabajo reportado por Díaz en el 2015, se concluye que los espermatozoides humanos pueden ser capacitados e incubados a temperatura ambiente para evitar los cambios de temperatura en las preparaciones *in vitro*. Se reporta la concentración de Ca_i^{2+} en espermatozoide capacitados a temperatura ambiente del laboratorio (25 – 28° C) y a 37° C, con un incremento gradual, alcanzando un nivel máximo de concentración en un periodo de 4 h. No se registraron cambios significativos entre las diferentes temperaturas utilizadas.

Sin embargo, al considerar los criterios estándar para identificar hiperactivación como velocidad curvilínea (VCL), Linealidad (L) y Amplitud lateral de la cabeza (ALH) (Mortimer, 1990), se observan diferencias significativas entre los

tratamientos con diferentes temperaturas, encontrándose un decremento en la velocidad.

En este trabajo se reportan datos que indican cambios significativos entre los tratamientos a diferentes temperaturas y tiempos durante la incubación. Hay que hacer notar las diferencias de la fosforilación en tirosina de las proteínas en los espermatozoides humanos capacitados a temperatura ambiente del laboratorio (26° C) (134 %) en contraste con los capacitados a 37° C (275 %) durante 4 h. La disminución de la fosforilación en los espermatozoides incubados a 26° C durante 4 h, está relacionada con el decremento de la velocidad de nado del espermatozoide; dato que concuerda con resultados descritos en otros espermatozoides de mamíferos (Alonso *et al.*, 2017).

Sí se puede observar una ligera fosforilación de la tirosina en los espermatozoides incubados a 26° C pero en menor proporción con respecto a la reportada a 37° C, y no se observó diferencia con el tiempo inicial (0 h). Los resultados de estos experimentos sugieren que los espermatozoides humanos deben ser incubados a 37° C durante 4 h, para alcanzar los valores óptimos de una capacitación verdadera.

Los logros reportados muestran que la temperatura es un factor que influye sobre los procesos de fosforilación en los residuos de tirosina en las proteínas espermáticas, un proceso esencial para que se lleve a cabo la capacitación de los espermatozoides humanos y adquieran la capacidad de fecundar al ovocito. El modelo de exposición a temperatura ambiente contribuye al entendimiento del proceso de capacitación.

Se sugiere realizar experimentos con periodos de incubación menos prolongados a temperatura ambiente, para verificar los parámetros esenciales de una capacitación óptima y así contribuir al conocimiento de la fisiología del espermatozoide humano.

IX. CONCLUSION

1. La concentración adecuada para una mejor visualización de la fosforilación de tirosina en proteínas espermáticas es de 3 millones de espermatozoides, equivalentes a 20 μg de proteína total.
2. La incubación de espermatozoides humanos a temperatura ambiente del laboratorio (26° C) muestran bajos niveles de fosforilación y no permite una adecuada maduración del espermatozoide.
3. Existe una estrecha relación entre la fosforilación en los residuos de tirosina y la movilidad en los espermatozoides capacitados.

X. PERSPECTIVAS

- Analizar los efectos de la temperatura ambiente sobre la reacción acrosomal.
- Realizar mediciones sobre la nitrosilación de proteínas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Alonso, C.A., Osycka-Salut, C.E., Castellano, L., Cesari, A., Di Siervi, N., Mutto, A., Johannisson, A., Morrell, J., Davio, C. & Perez-Martinez, S. (2017). Extracellular AMPc activates molecular signalling pathways associated with sperm capacitation in bovine. *Mol Human Reprod.* 23(8): 521-534.

Álvarez, L.C. (2003). Tesis Doctoral. Análisis Integrado de Morfología y movilidad espermática humana con el uso del Sperm Class Analyzer. Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Universidad de Valencia. 170 pp.

Amaral, A., Castillo J., Ramalho-Santos, J. & Oliva, R. (2014). The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human Reproduction Update.* 20 (1): 40-62.

Áviles-López, K.G. (2011). Tesis Doctoral. Estudio de la funcionalidad espermática, interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 258 pp.

Bahat, A., Tur-Kaspa, I., Gakamsky, A., Giojalas, L.C. & Breitbart, H. (2003). Thermotaxis of mammalian sperm cells: a potential navigation mechanism in the female genital tract. *Nat Med.* 9: 149-50.

Bahat, A. & Eisenbach, M. (2006). Sperm thermotaxis. *Mol cell Endocrinol.* 252 (1-2): 115-9.

Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C. & Forti, G. (1996). Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodeling pathways. *Frontiers in Bioscience.* 1: 189-205.

Battaner, A.E. (1993). *Biomoléculas*. Universidad de Salamanca. pp: 178-239.

Boryshpolets, S., Pérez-Cerezalez, S. & Eisenbach, M. (2015). Behavioral mechanism of human sperm in thermotaxis: a role for hyperactivation. *Hum Reprod*. 30(4): 884-892.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.

Bravo, M.M., Aparicio, I.M., García-Herreros, M., Gil, M.C., Peña, F.J. & García-Marín, L.J. (2005). Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 71(1): 88-96.

Breitbart, H. (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular y Cellular Endocrinology*. 187: 139-144.

Buffone, M.G., Verstraeten, S.V., Calamera, J.C. & Doncel, G.F. (2009). High cholesterol content and decreased membrane fluidity in human spermatozoa are associated with protein tyrosine phosphorylation and functional deficiencies. *J Androl*. 30: 552–8.

Buffone, M.G., Ijiri, T.W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H.K. & Gerton, G.L. (2012). Heads or tails? Structural events and molecular mechanism that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev*. 79: 4-18.

Ciolfis, S., Mencarelli, C. & Dallai, R. (2016). The evolution of sperm axoneme structure and the dynein heavy chain complement in cecidomid insects. *Asian J. Andrology*. 73(4): 209-218.

Cohen, A.D., Tur-Kaspa, I., Dor, J., Mashiach, S. & Eisenbach M. (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* pp: 11039-11043.

Conti, F. (2005). *Fisiología Médica*. McGraw-Hill Interam. España.

Cooper, T.G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl*. 533-539.

Curry, M.R. & Watson P.F. (1995). Sperm structure and function. *Gametes: The spermatozoon*. Cambridge University Press. 3: 45-69.

Darszon, A. (2008). Canales, iones y como el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo e: López-Munguía A. Una ventana al quehacer científico. Instituto de Biotecnología de la UNAM 25 aniversario, cap. 3 México D.F. UNAM pp. 29-42.

Darzon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. & Treviño, C.L. (2011). Calcium channels in the development, maturation , and function of spermatozoa. *Physiol Rev*. 91: 1305-1355.

David, A., Vilensky, A. & Nathan, H. (1972). Temperature changes in the different parts of the rabbit's oviduct. *Int J Gynaec Obstet*. 10: 52-6.

De Andrade, A.C., Gilli, Z., Carvalho, C., Nascimento, J., Fernandes, B., Kitamura, M. & Paes, A. (2012). Post-thaw addition of seminal plasma reduce tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce peroxidation. *Theriogenology*. 77: 1866-1872.

De Jonge, C. & Barratt, L.R. (2006). The sperm cell. *Reproduction. Maturation. Fertilization. Regeneration*. Cambridge. University Press. 372 pp.

De Jonge, C. (2017). Biological basis for human capacitation- revisited. Human reproduction update. 23: 1-17.

Díaz, R.Z., (2015). Tesis de licenciatura. Efecto de la temperatura en la capacitación de los espermatozoides humanos. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. 68 pp.

Dudiki, T., Kadunganattil, S., Ferrara, J.K., Kline, D.W. & Vijayaraghavan, S. (2015). Changes in Carboxy Methylation and Tyrosine Phosphorylation of Protein Phosphatase PP2A are associated with Epididymal Sperm Maturation and Motility. Plos One 10(11): 1-18.

Eisenbach, M. (1999). Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. Dev. Genet. 25: 87–94.

Eisenbach, M. & Tur-Kaspa, I. (1999). Do human eggs attract spermatozoa? Bioessays. 21: 203–10.

Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J.A., Shabanowitz, J., Herrs, J., Hunt, D. & Visconti, P.E. (2003). Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm. J. Biological Chemistry. 278 (13): 11579-11589.

Fox, S.I. (2011). Fisiología Humana. McGraw-Hill Interam. New York. U.S.A.

Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E. & Kopf G.S. (1997). Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation during Bovine Sperm Capacitation by a Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Pathway. Biology of Reproduction. 56: 707-719.

Ganong, F.W. (1990). *Fisiología Médica. El manual moderno*. San Francisco, California.

Ganong, F.W., Barret, K.E., Barman, S.M. & Boitano S. (2013). *Fisiología Médica*. McGraw-Hill Lange. San Francisco, California.

García- Vázquez, A., Gadea, J., Matas, C. & Holt, W. (2016). Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian Journal of Andrology*. 18: 844–850.

Gartner, P.L & Hiatt, L.J. (2002). *Texto Atlas de Histología*. McGraw-Hill. Baltimore, Maryland.

Gilbert, F.S. (2006). *Biología del desarrollo. Médica panamericana*. Buenos Aires, Argentina.

Giojalas, L.C., Fabro, G., Eisenbach, M., & Rovasio, R.A. (2001). Capacitated and chemotactic rabbit spermatozoa appear to be shortly available around ovulation. *J Androl*. 22 (3): 1-43.

Grasa, P., Cebrian-Perez, J.A., & Muino-Blanco, T. (2006). Signal transduction mechanisms involved in in vitro ram sperm capacitation. *Reproduction*; 132:721–732.

Green, C.E. & Watson P.F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*. 122: 889-898.

Guyton, C.A. (1969). *Fisiología Humana*. Interamericana. Barcelona, España.

Hansen, P. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc.* 364: 3341-3350.

Harrison, R.A. (2004). Rapid PKA- catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol Reprod Dev.* 67: 337-352.

He, Y., Zou, Q., Chen, H., Weng, S., Luo, T. & Zeng, X. (2016). Lead inhibits human sperm functions by reducing the levels of intracellular calcium, cAMP, and tyrosine phosphorylation. *Tohoku J. Exp.Med.* 238: 295-303.

Hernández- Matos, Y., Delgado-Roche, L. & López-Pérez, R. (2010). Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de endocrinología y Nutrición.* 18 (3): 153-158.

Hill, W.R., Wyse, G.A. & Anderson, M. (2004). *Animal physiology.* Sinauer Associates. Sunderland, Massachussets.

Hunter, R.H. (1993). Sperm: egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. *Mol Reprod Dev.* 35: 324–7.

Hunter, R.H. (1998). Sperm–epithelial interactions in the isthmus and ampulla of the Fallopian tubes and their ovarian control. In: Lauria, A., Gandolfi, F., Enne, G., Gianaroli, L. *Gametes: Develoment and Function.* Serono Symposia. Rome. pp 355–367.

Hunter, R.H. & Nichol, R.A. (1986). Preovulatory temperature gradient between the isthmus and ampulla of pig oviducts during the phase of sperm storage. *J Reprod Fertil.* 77: 599-606.

Ickowicz, D., Finkelstein, M. & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology.* 14: 816-821.

Inaba, K. (2003). Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zool. Sci.* 20, 1043-1056.

Jenkins, W.G., Kemnitz, P.C. & Tortora, J.G. (2007). *Anatomy and Physiology from Science to Life*. Wiley. Texas, U.S.A.

Jha, K. N. & Shivaji, S. (2002). Identification of the major tyrosine phosphorylated protein of capacitated hamster spermatozoa as a homologue of mammalian sperm a kinase anchoring protein. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 258–270.

Jones, R. (1998). Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *Reprod Fert Suppl.* 53: 73-84

Kim, H., Song, E. & Lee, K. (2002). Proteomic Analysis of Protein Phosphorylation in Heat Shock Response and Thermotolerance. *The Journal of Biological Chemistry.* 277 (28): 23193-23207.

Klug, S.W. & Cummings, R.M. (1999). *Conceptos de Genética*. Prentice Hall. España.

Kwon, W., Saidur, R.M. & Pang, M. (2014). Diagnosis and Prognosis of Male Infertility in Mammal: The Focusing of Tyrosine Phosphorylation and Phosphotyrosine. *Journal of Proteome.* 13: 4505- 4517.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Leahy, T. & Gadella, B.M. (2015). New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian Journal of Andrology.* 17: 561-567.

Leclerc, P. de Lamirande & Gagnon, C. (1996) Cyclic adenosine 3', 5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biology of Reproduction*; 55: 684–695.

Lefièvre, L., Jha, K., De la Mirande, E. & Visconti, P. (2002). Activation of Protein Kinase A During Human Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. *Journal of Andrology*. 23 (5): 709- 716.

Lenz, R.W., Ball, G.D., Leibfried, M.L., Ax, R.L. & First, N.L. (1983). In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol. Reprod.* 29: 173–179.

Liang, X., Xia, Z., Yan, J., Wang, Y., Xue, S. & Zhang, X. (2016). Quercetin inhibits human sperm functions by reducing sperm $[Ca^{2+}]$ and tyrosine phosphorylation. *Pak. J. Pharm. Sci.* Vol. 29 (6): 2391-2396.

Linares-Hernández, L., Guzmán-Grenfell, A.M., Hicks-Gómez, J.J. & González-Matínez, M.T. (1988). Voltage dependent calcium influx in human sperm assessed by simultaneous detection of intracellular calcium and membrane potential. *Biochim Biophys.* 1372: 1-12.

Lishko, P.V., Botchkina, I.L. & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature*. 471:387–392.

López-Torres, A.S., González-González, M.E., Mata-Martínez, E., Larrea, F., Treviño, L.C. & Chirinos, M. (2017). Luteinizing hormone modulates intracellular calcium, protein tyrosine phosphorylation and motility during human sperm capacitation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 483: 834-839.

López-Úbeda, R. & Matás, C. (2015). An Approach to the Factors Related to Sperm Capacitation Process. *Andrology -Open Access*. 4. 10.4172/2167-0250.1000128.

Luconi, M., Baldi, E., Krausz, C. & Forti, G. (1996). Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *BiolReprod* 55: 207-216.

Luconi, M., Porazzi, I., Ferruzzi, P., Marchiani, S., Forti, G. & Baldi, E. (2005). Tyrosine Phosphorylation of the A Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate. *Biology of Reproduction*. 72: 22–32.

Martínez, J. G. & Pardo, C.S. (2010). Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. *Acta Biol. Colomb.* 15(2): 3-24.

Mahi, C.A. & Yanagimachi, R. (1973). The effects of temperature, osmolality and hydrogen ion concentration on the activation and acrosome reaction of golden hamster spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 35 (1): 55-66.

Mandal, A., Naaby-Hansen, S., Wolkowicz, M.J., Klotz, K., Shetty, J., Retief, J.D., Coonrod, S.A., Kinter, M., Sherman, N., Cesar, F., Flickinger, C.J. & Herr, J.C. (1999). FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biol Reprod* 61(5): 1184-1197.

Marín-Briggiler, C. L., Tezón, J. G., Miranda, P. V. & Vázquez-Levin M. H. (2002). Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril.* 77(2): 252-259.

Miki, K. & Clapham, D.E. (2013). Rheotaxis guides mammalian sperm. *Curr Biol.* 23: 443-52.

Mortimer, S.T. (1990). Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *Journal Andrology.* 11(3): 195-203.

Mortimer, S.T. (1997). Critical Review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update.* 3(5): 403-439.

Naresh, S. & Atreja, S.K. (2015a). The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology* (70): 211-216.

Naresh, S. & Atreja, S.K. (2015b). Actin Polymerization: An event regulated by tyrosine phosphorylation during buffalo sperm capacitation. *Reprod Domest Anim.* (50): 1047 -1053.

Naresh, S. (2016). Effect of cooling (4 °C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosin phosphorylation in buffalo spermatozoa. *Cryoiology.* 72: 7-13.

Naz, R. & Rajesh, P. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/ acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2 (75): 1-12.

Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., Giraldo, C. (2006). El espermatozoide desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19 (4): 426- 436.

OMS. (2010). Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Edit. Médica Panamericana. España.

Pérez- Cerezales, S., Boryshpolets, S., Oshri, A., Brandis, A., Nevo, R., Kiss, V. & Eisenbach, M. (2015). Involvement of opsin in mammalian sperm thermotaxis. Sci. Rep. 5: 1-18 pp.

Pommer, A.; Rutllant, J.; Meyers, S.A. (2003). Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. Biol. Reprod. 68: 1208 –1214.

Purohit, B.S., Laloraya, M. & Kumar, P.G. (1999). Roles of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. Asian J Androl. 1: 95-107.

Ralt, D., Manor, M., Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I. & Ben-Shlomo, I. (1994). Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. Biol. Reprod. 50: 774-85.

Reyes, I. (2009). Tesis de maestría. Temperatura preferida, termotolerancia y consumo de oxígeno en juveniles de botete diana (*Sphoeroides annulatus*, Jenyns 1842). CICESE. 35 pp.

Sagare-Patil, V. & Modi, D. (2016). Identification of motility-associated progesterone -responsive differentially phosphorylated proteins. Reprod Fertil Dev. 29(6): 1115-1129.

Sakkas, D., Leppens-Luiser, G., Lucas, H., Chardonnens, D., Campana, A., Franken, D.R. & Urner, F. (2003). Localization of Tyrosine Phosphorylated Proteins in Human Sperm and Relation to Capacitation and ZonaPellucida Binding. Biology of reproduction. 68: 1463-1469.

Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J., & Visconti, P.E. (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Supple* 65, 245-259.

Sati, L., Cayli, S., Delpiano, E., Sakkas, D. & Huszar G. (2014). The Pattern of Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm in Response to Binding to ZonaPellucida or Hyaluronic Acid. *Reprod Sci.* 21 (5): 573-581.

Si, Y. (1999). Hiperactivación of hamster sperm motility by temperature-dependent tyrosine phosphorylation of an 80 kDa protein. *Biol. Reprod.* 61: 247-52.

Suarez, S.S. (2002). Gamete transport. In: Hardy, D.M., *Fertilization*. Academic Press, San Diego, pp. 3–28.

Suarez, S.S. (2008). Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int J Dev Biol.* 52: 455-462.

Sullivan, R., Frenette, G. & Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl.* 9: 483-491.

Tardif, S., Dube, C., Chevalier, S., Bailey, J.L. (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod;* 65: 784–792.

Torres-Flores, V.M., Hernández-Rueda, Y.L., Neri-Vidaurre, P., Jiménez-Trejo, F., Calderón-Salinas, V., Molina-Guarneros, J. & González-Martínez, M. (2008). Activation of Protein Kinase a Stimulates the Progesterone-Induced Calcium Influx in Human Sperm Exposed to the Phosphodiesterase Inhibitor Papaverine. *Journal of Andrology.* 29 (5): 549-557.

Torres-Flores, V.M. (2011). Tesis de Doctorado. El aumento del sodio intracelular inducido por la eliminación de calcio externo regula la movilidad del espermatozoide humano. Facultad de Ciencias. UNAM. 79 pp.

Torres-Fuentes, J. L. A. (2015). Tesis de Doctorado. Participación de los canales formados por Pannexinas en la fisiología del espermatozoide del ratón. Pontificia Universidad Católica de Chile. 200 pp.

Tresguerres, A.F., Ariznavarreta, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Escrich, E., Gil-Loyzaga, P., Lahera, V., Mora, F. & Tamargo, J. (2010). Fisiología Humana. McGraw-Hill Interam. España.

Tur-Kaspa, I. (1992). Pathophysiology of the Fallopian tube. In: Gleicher N. Tubal Catheterization. Wiley-Liss, New York. pp. 5–14.

Urner, F. & Sakkas, D. (2003). Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction*. 125: 17-26.

Vigil, P., Valdés Undurraga I., Del Río J. & Cortés, M. (2015). El espermatozoide en su recorrido a través del tracto reproductor femenino. *Int. J. Med. Surg. Sci.* 2 (4): 643-662.

Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P. & Kopf, G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 121: 1129-1137.

Visconti, P. & Kopf, G. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1-6.

Visconti, P.E., Ning, X., Fornés, W.M., Álvarez, G.J., Stein, P., Connors, A.S. & Kopf, S.G. (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental Biology*. 214: 429-443.

Visconti, P.E., Krapf, D., De la Vega-Beltrán, J.L., Acevedo, J.J. & Darzon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* 13: 395-405.

Vizel, R., Hillman, P., Iclowicz, D. & Breitbart, H. (2015). AKAP3 degradation in sperm capacitation is regulated by its tyrosine phosphorylation. *Biochimica et Biophysica*. 1850: 1912-1920.

Yanagimachi, R. (1990). Capacitation and the acrosome reaction. *Gamete Physiology*. 1- 31.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York.

Zeng, Y., Clark, E.N. & Florman, H.M. (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev Biol* 171: 554-563.

XII. ANEXOS

Anexo A. Espermatobioscopías de los donadores utilizados en este proyecto, donde se corrobora que las muestras de los donadores cumplen con los parámetros establecidos como normales por la OMS (2010).



Anexo B. Tablas de ANOVA y pruebas estadísticas.

Los valores en color rojos, en cada una de las tablas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos analizados.

ANOVA para evaluar el efecto de la temperatura sobre la fosforilación en residuos en tirosina de proteínas espermáticas.

Analysis of Variance (Fosforilación)					
Marked effects are significant at $p < .05000$					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	7.695015E+0	1	7.695015E+0	326.823	0.00000
"Var1"	1.526951E+0	4	3.817377E+0	16.213	0.00000

Tukey HSD test; Variable: Var 1 (Fosforilación)						
Marked differences are significant at $p < .05000$						
Cell No.	Var1	{1} 10105.	{2} 27785.	{3} 20213.	{4} 13523.	{5} 8452.8
1	cnt		0.00014	0.01084	0.74008	0.97546
2	37 4f	0.00014		0.08207	0.00039	0.00013
3	37 2f	0.01084	0.08207		0.15172	0.00262
4	26 4f	0.74008	0.00039	0.15172		0.39063
5	26 2f	0.97546	0.00013	0.00262	0.39063	