



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Evaluación del efecto de la desestabilización de la actina de la teca perinuclear en el espermatozoide criopreservado del verraco, sobre la fosforilación de proteínas y distribución del fosfatidil inositol bifosfato

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
José Mauricio Duma Pauta

TUTORA:
Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dr. Noé Orlando Juárez López
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Dr. José Alfredo Medrano Hernández
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd Mx. Febrero, 2022.



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.

Dedicatoria

A mi querido padre Manuel, quien desde niño me educó con valores y siempre busco propender a mi superación personal. A mis hermanas Claudia, Lorena y Dalila por el ejemplo, la influencia positiva y el aliento motivacional en los momentos difíciles.

A la memoria de mi madre Carmen Emilia, por todos los sacrificios realizados en su momento, por el apoyo incondicional, y porque siempre creyó en mí. Culminar con éxito esta maestría solo representa un fruto más que ella sembró hace 26 años.

A mis buenos amigos, colegas y docentes, quienes desde diferentes áreas profesionales buscan contribuir con el desarrollo de una sociedad en beneficio del país.

Con mucho cariño para ustedes.

Agradecimiento

Mi agradecimiento sincero a todas las personas que contribuyeron y apoyaron el desarrollo de este trabajo de investigación, mis estudios de maestría y mi estancia en este país desde diferentes ámbitos.

Primeramente, agradezco a la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, mi tutora de tesis, por compartir sus conocimientos y su experiencia, por ser mi guía y apoyarme a superar los obstáculos de este trayecto. A todos los compañeros/as del Departamento de Morfología de la FMVZ-UNAM y en especial mención a Lorena Sánchez y Mariana Trigo, mi enorme agradecimiento a ustedes por enseñarme y ser mis maestras en el adiestramiento de las técnicas en el laboratorio de investigación. Al Dr. Noé Orlando Juárez, Dra. Rosa María Viguera, Dr. Oscar Gutiérrez, Dr. Alfredo Medrano y más profesionales externos por su predisposición, por su paciencia desinteresada y por ser pilares fundamentales en el desarrollo y culminación del trabajo de investigación.

Con la misma gratitud, a los docentes que aportaron con su conocimiento en diferentes temáticas para fortalecer mi crecimiento profesional en este increíble programa de maestría. De igual manera a la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Departamento de Morfología por el apoyo y las facilidades brindadas que me permitieron satisfactoriamente cursar mis estudios y desarrollar con éxito mis actividades de investigación en el laboratorio, a pesar de las restricciones derivadas de la pandemia. Además, un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca recibida (CVU: 1049176), al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)- DGAPA de la UNAM IN219717 por ayudarme a alcanzar mis metas.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco infinitamente a mi familia, especialmente a mi padre y mis hermanas que me apoyaron desde el momento que decidí realizar mis estudios de posgrado y experimentar una vida distinta fuera de mi país. Su amor, su cariño y sus consejos siempre fue mi motivación y se convirtió en mi fortaleza porque este camino no fue nada fácil; sin embargo, al final la experiencia que me llevo es extraordinaria y enriquecedora tanto profesional como cultural.

Resumen

La criopreservación del semen es una de las biotecnologías utilizadas para la reproducción asistida; sin embargo, los espermatozoides de verraco son altamente sensibles al proceso de congelación-descongelación. Se ha señalado que las criolesiones afectan a la teca perinuclear e involucran a varias proteínas y moléculas que cumplen roles importantes durante la capacitación y la reacción acrosomal. El objetivo del presente estudio fue evaluar si existe una relación entre el efecto de la desestabilización de la actina de la teca perinuclear de los espermatozoides criopreservados de verraco sobre la fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas y la distribución del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂). Mediante inmunocitoquímica se evaluaron el patrón de fosforilación de proteínas, la distribución del PIP₂, y la localización de gelsolina, SRC y PLC- ζ en los subdominios de la cabeza y flagelo de espermatozoides frescos y congelados-descongelados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal. Además, se realizó western blot y co-inmunoprecipitación para confirmar la presencia de estas proteínas en la teca perinuclear y determinar la interacción entre estas moléculas. Se encontró que la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas incremento significativamente en la región acrosomal y segmento ecuatorial después de la capacitación. En los espermatozoides criopreservados la fosforilación de proteínas en estos mismos subdominios fue significativamente mayor en comparación con los espermatozoides frescos. Por su parte, la gelsolina se translocó desde el flagelo a la región acrosomal después de la capacitación favorecida por el incremento de la distribución del PIP₂ en la cabeza espermática. La SRC en espermatozoides frescos y criopreservados se observó principalmente en el segmento ecuatorial y la región acrosomal, subdominios principales que coinciden con los sitios donde se detectaron proteínas fosforiladas. La PLC- ζ en espermatozoides frescos antes de la capacitación se detectó principalmente en la región acrosomal y migró a la región postacrosomal después de la capacitación y reacción acrosomal, desde donde es probable que libere esta proteína. No obstante, en espermatozoides criopreservados la PLC- ζ antes de la capacitación *in vitro* ya se encontraba en la región postacrosomal, probablemente relacionado con la disminución de la integridad acrosomal después de la descongelación. Mediante western blot se confirmó la presencia de la gelsolina, la SRC y la PLC- ζ en los extractos de proteína de la teca perinuclear. Además, se encontró que gelsolina-SRC y gelsolina-PLC- ζ co-inmunoprecipitan en espermatozoides frescos y criopreservados. Como conclusión, la desestabilización de la actina de la teca perinuclear del espermatozoide criopreservado de verraco está relacionada con el aumento de la fosforilación de proteínas y los cambios de localización de SRC y PLC- ζ en los espermatozoides criopreservados. La disminución de la distribución de PIP₂ en la membrana plasmática afectó la translocación de gelsolina a la cabeza espermática durante la capacitación.

Palabras clave: crioconservación, capacitación, reacción acrosomal, fosforilación de proteínas, gelsolina, fosfatidil inositol 4,5 bifosfato, tirosina quinasa SRC, fosfolipasa C- ζ .

Abstract

Semen cryopreservation is one of the biotechnologies used for assisted reproduction; however, boar spermatozoa are highly sensitive to the freeze-thaw process. Cryoinjuries have been reported to affect the perinuclear theca and involve several proteins and molecules that play important roles during capacitation and acrosomal reaction. The aim of the present study was to evaluate whether there is a relationship between the effect of actin destabilization of perinuclear theca of cryopreserved boar spermatozoa on the phosphorylation of tyrosine residues in proteins and the distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). By immunocytochemistry, the pattern of protein phosphorylation, distribution of PIP₂, and localization of gelsolin, SRC and PLC- ζ in the head and flagellum subdomains of fresh and frozen-thawed uncapacitated, capacitated and capacitated with acrosomal reaction spermatozoa were evaluated. In addition, western blotting and co-immunoprecipitation were performed to confirm the presence of these proteins in the perinuclear theca and to determine the interaction between these molecules. It was found that the phosphorylation of tyrosine residues in proteins increased significantly in the acrosomal region and equatorial segment after capacitation. In cryopreserved spermatozoa, protein phosphorylation in these same subdomains was significantly higher compared to fresh spermatozoa. Gelsolin was translocated from the flagellum to the acrosomal region after capacitation by the increase in distribution of PIP₂ in the sperm head. SRC in fresh and cryopreserved spermatozoa was observed mainly in the equatorial segment and the acrosomal region, major subdomains that coincide with the sites where phosphorylated proteins were detected. PLC- ζ in fresh spermatozoa before capacitation was detected mainly in the acrosomal region and migrated to the postacrosomal region after capacitation and acrosomal reaction, from where it is likely to release this protein. However, in cryopreserved spermatozoa PLC- ζ before in vitro capacitation was already in the postacrosomal region, probably related to decreased acrosomal integrity after thawing. By western blotting, the presence of gelsolin, SRC and PLC- ζ in perinuclear theca protein extracts was confirmed. Furthermore, gelsolin-SRC and gelsolin-PLC- ζ were found to coimmunoprecipitate in fresh and cryopreserved spermatozoa. As a conclusion, destabilization of perinuclear theca actin of cryopreserved boar spermatozoa is related to increased protein phosphorylation and localization changes of SRC and PLC- ζ in cryopreserved spermatozoa. Decreased distribution of PIP₂ in the plasma membrane affected the translocation of gelsolin to the sperm head during capacitation.

Keywords: cryopreservation, capacitation, acrosomal reaction, protein phosphorylation, gelsolin, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, SRC tyrosine kinase, phospholipase C- ζ .

Índice Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Morfología de los espermatozoides.....	4
2.1.1 El espermatozoide	4
2.1.2 Características y parámetros del semen de verraco.....	4
2.1.3 Morfología espermática	4
2.2 Eventos fisiológicos del espermatozoide.....	5
2.2.1 Capacitación espermática.....	5
2.2.2 Reacción acrosomal	6
2.3 Teca perinuclear de los espermatozoides	7
2.3.1 Estructura y funciones de la teca perinuclear espermática	7
2.3.2 Composición de la teca perinuclear	8
2.3.3 Biogénesis de la teca perinuclear espermática.....	9
2.3.4 Destino de la TP después de la fertilización	10
2.4 Crioconservación de espermatozoides y desafíos actuales	10
2.4.1 Principios de las criolesiones espermáticas durante la congelación y descongelación	10
2.5 Proteínas y moléculas de interés de la TP y la membrana plasmática del espermatozoide	13
2.5.1 Actina.....	13
2.5.2 Gelsolina.....	14
2.5.3 Fosfoinosítidos: PIP2.....	17
2.5.4 Tirosina quinasa SRC.....	20
2.5.5 Fosfolipasa C ζ	24
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPOTESIS	29
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general:	29
5.2 Objetivos específicos:	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Colección de semen y evaluación seminal.....	30
6.2 Evaluación de la motilidad espermática	30
6.3 Determinación de la concentración espermática.....	30
6.4 Procesamiento del semen fresco para congelación.....	31

6.4.1	Preparación de diluyentes de congelación	31
6.4.2	Adición de diluyentes de congelación	32
6.5	Descongelación de pajillas y evaluación	33
6.6	Capacitación espermática y reacción acrosomal	33
6.7	Inmunocitoquímica	34
6.8	Extracción de proteínas de la teca perinuclear.....	36
6.9	Western blot	37
6.10	Co-inmunoprecipitación	39
6.11	Tinciones de evaluación espermática	40
6.11.1	Vitalidad espermática: Eosina-nigrosina.....	40
6.11.2	Integridad acrosomal: Azul de Comassie	40
6.12	Análisis estadístico.....	43
7.	RESULTADOS.....	45
7.1	Evaluación espermática	45
7.2	Inmunocitoquímica	48
7.3	Western Blot.....	66
7.4	Co-inmunoprecipitación.....	71
8.	DISCUSIÓN	75
9.	CONCLUSIONES.....	91
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
11.	APÉNDICES Y ANEXOS.....	103

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema de los subdominios de la cabeza del espermatozoide, la TP y las capas citoplasmáticas.	9
Figura 2: Estructura de la actina y filamento de actina.....	14
Figura 3: Estructura molecular esquemática de la gelsolina.	15
Figura 4: Estructura molecular del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato.....	18
Figura 5 : Estructura de dominios de la familia de las quinasas SRC.	21
Figura 6 : Estructura de dominios de la PLC- ζ	25
Figura 7: Espermatozoides de verraco teñidos con eosina-nigrosina.	45
Figura 8: Espermatozoides de verraco teñidos con azul de comassie.....	47
Figura 9: Patrones de localización de las proteínas fosforiladas en tirosina	49
Figura 10: Patrones de localización de gelsolina	53
Figura 11: Distribución del PIP ₂ en espermatozoides de verraco.	56

Figura 12: Patrones de localización de la tirosina cinasa SRC.	60
Figura 13: Patrones de localización de la PLC- ζ	63
Figura 14: Análisis western blot de gelsolina: espermatozoides frescos.	67
Figura 15: Análisis western blot de gelsolina: espermatozoides descong.	67
Figura 16: Análisis western blot de SRC: espermatozoides frescos.	68
Figura 17: Análisis western blot de SRC: espermatozoides descong.	69
Figura 18: Análisis western blot de PLC- ζ : espermatozoides frescos.	70
Figura 19: Análisis Western blot de PLC- ζ : espermatozoides descong.	71
Figura 20: Co-inmunoprecipitación gelsolina-SRC: frescos.	72
Figura 21: Co-inmunoprecipitación gelsolina-SRC: descongelados.	72
Figura 22: Co-inmunoprecipitación gelsolina-PLC- ζ : frescos.	73
Figura 23: Co-inmunoprecipitación gelsolina-PLC- ζ : descongelados.	74

Índice de Tablas

Tabla 1: Composición del diluyente de congelación.	32
Tabla 2: Localización de las proteínas fosforiladas: espermatozoides frescos	50
Tabla 3: Localización de las proteínas fosforiladas en espermatozoides descongelados.	51
Tabla 4 : Comparación de la localización de las proteínas fosforiladas en tirosina entre espermatozoides frescos y congelados-descongelados.	52
Tabla 5: Localización de gelsolina en espermatozoides frescos.	53
Tabla 6: Localización de gelsolina en espermatozoides descongelados.	54
Tabla 7: Comparación de la localización de gelsolina entre espermatozoides frescos y descongelados.	55
Tabla 8: Distribución de PIP2 en espermatozoides frescos.	57
Tabla 9: Distribución de PIP2 en espermatozoides descongelados.	58
Tabla 10: Comparación de la distribución de PIP2 entre espermatozoides frescos y descongelados.	59
Tabla 11: Localización de SRC en espermatozoides frescos.	60
Tabla 12: Localización de SRC en espermatozoides descongelados.	61
Tabla 13: Comparación de la localización de SRC entre espermatozoides frescos y descongelados.	62
Tabla 14: Localización de PLC- ζ en espermatozoides frescos.	63
Tabla 15: Localización de PLC- ζ en espermatozoides descongelados.	65
Tabla 16: Comparación de la localización de la PLCZ entre espermatozoides frescos y descongelados.	66

Índice de Gráficas

Gráfica 1: Porcentaje de espermatozoides vivos: frescos y descongelados. ...	46
Gráfica 2: Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto: frescos y descongelados de verraco..	47

Abreviaturas y siglas usadas

TP: Teca perinuclear.

PIP₂: Fosfatidil inositol (4-5) bifosfato

SRC: tirosina quinasa c-SRC

PLC- ζ : Fosfolipasa C- ζ

FNC: Espermatozoides frescos no capacitados

FC: Espermatozoides frescos capacitados

FRA: Espermatozoides frescos capacitados con reacción acrosomal

DNC: Espermatozoides descongelados no capacitados

DC: Espermatozoides descongelados capacitados

DRA: Espermatozoides descongelados capacitados con reacción acrosomal

RA: reacción acrosomal

g: gramo

mg: miligramo

μ g: microgramo

μ l: microlitro

M: molar

μ M: micromolar

μ m: micra

mA: miliamperios

V: voltios

h: horas

min: minutos

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

PVDF: membranas fluoruro de polivinilideno

TALP: Tyrode-albúmina-lactato-piruvato

BSA: Albúmina sérica bovina

DPBS: Solución buffer fosfato de Dulbecco.

PBS: solución tamponada fosfato salina

TBS: solución salina tamponada con Tris

Tween-20: monolaurato de polioxietilensorbitano

Tris: tris(hidroximetil) aminometano o Tampón Tris

DTT: Ditiotreitól

1. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen es una biotecnología que se utiliza para facilitar el almacenamiento y el transporte a largo plazo de los espermatozoides, mejorar la eficiencia de la gestión de los recursos genéticos y ha sido especialmente importante la inseminación artificial de animales domésticos, incluida la especie porcina (Watson, 2000). Sin embargo, durante el proceso de congelación-descongelación los espermatozoides del verraco son muy susceptibles a diversas tensiones, mismas que les producen daños ultraestructurales, moleculares, bioquímicos y funcionales (Holt, 2000b). Es por esa razón que la eficiencia de la crioconservación en la especie porcina aún es menor que la que se puede obtener en otras especies, como el bovino. Adicionalmente, la eficiencia de las metodologías de crioconservación aplicadas a los espermatozoides es extremadamente variable incluso dentro los mismos individuos. Todo esto ha constituido un obstáculo enorme para que los espermatozoides criopreservados en la especie porcina puedan utilizarse en granjas comerciales a gran escala (Yeste, 2016).

A pesar de los esfuerzos realizados en los últimos años para mejorar las técnicas de crioconservación de semen de verraco, en la especie porcina por lo general, no más del 50% de los espermatozoides sobreviven a la criopreservación (Hezavehei et al., 2018; Johnson et al., 2000). Además, las células espermáticas sobrevivientes tienen una esperanza de vida más corta, ya que pueden tener daño en los orgánulos y las membranas, lo que reduce su eficiencia biológica, la actividad cinética durante la capacitación y reacción acrosomal y su potencial de fertilización (Bailey et al., 2000). Debido a esto, un cierto porcentaje de espermatozoides puede mostrar cambios prematuros (patrones de motilidad, redistribución de Ca^{2+} , desestabilización de la membrana, aumento de la fosforilación de proteínas en tirosina etc.) colectivamente llamados "cambios similares a la capacitación" o "criocapacitación" (Bailey et al., 2000; Tardif et al., 2001).

Los principales criodaños que ocurren durante el proceso de congelación-descongelación son producidos por factores como el shock térmico, la formación de cristales de hielo intracelulares, la deshidratación, el aumento de la

concentración de sales y el shock osmótico. Estos factores alteran las membranas plasmática, mitocondrial, el núcleo, el acrosoma, la estructura del citoesqueleto flagelar y de la cabeza del espermatozoide y en particular la teca perinuclear (Gutiérrez-Pérez et al., 2011).

La teca perinuclear (TP), es la principal estructura citoesqueletica de la cabeza espermática y contiene entre sus proteínas, al citoesqueleto de actina, el cual tiene funciones importantes en el mantenimiento estructural de la cabeza del espermatozoide y la estabilidad y protección del núcleo (Mújica et al., 2003). La TP está implicada en la fusión y activación del óvulo y tiene una participación crucial en el espermatozoide durante procesos como la capacitación y la exocitosis acrosómica. Además, en el flagelo la presencia de actina interviene en la regulación de la motilidad espermática, todo ello por su capacidad de polimerización y despolimerización que permite una remodelación dinámica del citoesqueleto bajo la regulación de una serie de proteínas accesorias, como la gelsolina (Breitbart & Finkelstein, 2018).

La gelsolina es una proteína desestabilizadora del citoesqueleto de actina, ya que corta los microfilamentos ensamblados (Finkelstein et al., 2010). En el espermatozoide, la localización y estado de actividad de esta proteína de corte de actina es muy importante durante el proceso de capacitación y posteriormente durante la reacción acrosomal. Esta proteína se inhibe/inactiva durante la capacitación al unirse al fosfatidilinositol-4-5 bifosfato (PIP_2) y por fosforilación en tyr-438 por la tirosina cinasa de la familia SRC, permitiendo la polimerización de la actina (Corte et al., 1999). Sin embargo, previo a la reacción acrosomal, luego de la hidrólisis de PIP_2 por la fosfolipasa C (PLC) y por su desfosforilación por la tirosina fosfatasa, la gelsolina que se localiza en la cabeza del espermatozoide es activada y liberada al citosol para la fragmentación de la actina-F, permitiendo con ello la reacción acrosomal (Breitbart & Finkelstein, 2015).

Otra de las proteínas que se encuentra en la TP es la Fosfolipasa C zeta (PLC- ζ) específica de espermatozoides, propuesta como el factor espermático activador del óvulo durante la fertilización de los mamíferos. Se considera que es el estímulo fisiológico responsable de generar las oscilaciones de calcio (Ca^{2+})

que inducen la activación del óvulo y el desarrollo embrionario temprano (Saleh et al., 2020). Se ha evidenciado en los espermatozoides humanos que los cambios en los patrones de localización de la PLC- ζ tienen como consecuencia una menor activación del óvulo, una de las causas de infertilidad (Heytens et al., 2009).

Por otra parte, la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es un evento de modificación postraduccional de las proteínas que permite regular diferentes procesos fisiológicos como la capacitación y la reacción acrosomal de los espermatozoides, lo que incluye la actividad de proteínas citoesqueleticas y de señalización (Urner & Sakkas, 2003). Desafortunadamente los procedimientos de congelación-descongelación modifican o dañan el citoesqueleto de la cabeza espermática, alteran la fosforilación de proteínas en tirosina y es posible que estén relacionados con los cambios en la localización de proteínas en los diferentes subdominios del espermatozoide criopreservado (Breitbart & Finkelstein, 2018).

Por lo tanto, en la presente investigación se evaluó el efecto de la desestabilización de la actina de la teca perinuclear en el espermatozoide criopreservado del verraco, sobre la fosforilación de proteínas y distribución del fosfatidil inositol bifosfato, esto permitió tener un mejor entendimiento de los cambios moleculares que se producen durante la crioconservación y que afectan el comportamiento fisiológico del espermatozoide criopreservado y reducen su supervivencia o su potencial de fertilización.

2. ANTECEDENTES

2.1 Morfología de los espermatozoides

2.1.1 El espermatozoide

El espermatozoide es una célula haploide que constituye el gameto masculino. Tiene una alta dinámica, aún después de la espermatogénesis continua con una serie de remodelaciones y adaptaciones inducidas por la interacción con su entorno: epidídimo, oviducto y vestiduras del óvulo (França et al., 2005)

2.1.2 Características y parámetros generales del semen y los espermatozoides de verraco

La evaluación espermática se realiza para verificar la calidad seminal y algunas características individuales de los espermatozoides. En el verraco adulto el volumen del eyaculado generalmente es de 150 a 200 ml con una concentración de espermatozoides de 200 a 300 millones/ml. En una muestra seminal normal el porcentaje de espermatozoides móviles se encuentra entre el 50 y el 80% y las morfoanomalías entre el 1-5%. (Hafez, 2002). Adicionalmente, el espermatozoide de verraco tiene una longitud total de 50-60 μm , de la cual 38-43 μm corresponden al flagelo, mientras que la cabeza tiene una longitud de 8.5 μm por 3 μm de ancho (Pesch & Bergmann, 2006).

2.1.3 Morfología espermática

El espermatozoide de verraco adquiere sus principales características durante el proceso de espermatogénesis (espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis), pero luego de la espermiación presenta cambios de estructura durante su paso por el epidídimo y al llegar al oviducto sufre una serie de remodelaciones ultraestructurales. Para su estudio, el espermatozoide se divide en 3 regiones: cabeza, pieza de conexión o cuello y flagelo o cola (Pesch & Bergmann, 2006).

La cabeza espermática es una estructura de apariencia piriforme, de tipo espatulado y con forma oval; básicamente está conformada por el acrosoma y el núcleo rodeados por la membrana plasmática. El núcleo espermático tienen una cromatina altamente condensada contenida en la con la teca perinuclear que lo

rodea, mientras que el acrosoma es una gran vesícula que contiene un arsenal de enzimas que participan en la reacción acrosomal (Pesch & Bergmann, 2006). La cabeza del espermatozoide a su vez se divide en tres regiones basada en las diferencias en composición y función de la membrana plasmática. Estas regiones o “dominios” corresponden a: 1) la región acrosomal, el área cubierta por el acrosoma, 2) el segmento ecuatorial, el área donde se inserta el acrosoma) y 3) el área postacrosomal, la zona que solo presenta membrana plasmática (Gadella et al., 2008).

El cuello o pieza de conexión mide aproximadamente 1 μm y constituye un segmento ultracorto de conexión entre la cabeza y el flagelo del espermatozoide. Se encuentra unido anteriormente a la placa basal del núcleo y posteriormente a las fibras densas externas del flagelo. Está compuesto por los cuerpos laminares, columnas segmentadas y una estructura citoesquelética densa y fibrosa llamada "*capitulum*". Junto al *capitulum* se encuentran los centríolos proximal y distal. El cuello sirve como conector y pieza articular (Pesch & Bergmann, 2006).

El flagelo es la parte de mayor longitud del espermatozoide, consta de las piezas media, principal y terminal. La pieza media mide cerca de 5 μm y se caracteriza por la presencia de la vaina mitocondrial que rodea el complejo axonemal y las fibras densas externas (ODF). La pieza principal mide 30 μm y contiene internamente el axonema que está encerrado por ODF y vainas fibrosas longitudinales, orientadas circunferencialmente que terminan a 9-10 μm de la punta de la cola (Pesch & Bergmann, 2006). La pieza terminal es el segmento corto y delgado, donde se pierde la estructura de microtubulos del axonema, las vainas fibrosas y las fibras densas externas desaparecen. Los microtubulos que permanecen están rodeados de membrana plasmática (Nicander & Bane, 1962).

2.2 Eventos fisiológicos del espermatozoide

2.2.1 Capacitación espermática

La capacitación de los espermatozoides representa uno de los pasos finales de la maduración. Es un prerequisite para que los espermatozoides de mamíferos sean competentes para poder experimentar la reacción acrosomal, fusionarse y

fertilizar al óvulo. Ocurre *in vivo* en el tracto reproductor de la hembra o *in vitro* después de la incubación en un medio definido (Tardif et al., 2001). Involucra cambios fisiológicos y bioquímicos que incluyen la eliminación de colesterol de la membrana plasmática, lo cual aumenta su permeabilidad y fluidez. Posteriormente se producen modificaciones en los niveles de iones intracelulares e hiperpolarización de la membrana plasmática con la entrada al espermatozoide a través de los canales de membrana Catsper y NBC, de Ca^{2+} y bicarbonato (HCO_3^-) presentes en el líquido seminal al espermatozoide a través (Jin & Yang, 2017). La entrada del HCO_3^- activa los sistemas de mensajeros secundarios, incluida la adenilciclase soluble (sAC,) que cataliza la síntesis de AMPc que a su vez activa a la proteína quinasa A (PKA). La activación de esta quinasa promueve la fosforilación de sustratos proteicos en residuos de tirosina, serina y treonina. Estas fosforilaciones de proteínas intracelulares específicas son un regulador esencial para que los espermatozoides tengan la capacidad de reconocer el óvulo, unirse a la zona pelúcida, experimentar la reacción acrosomal e iniciar la fecundación (Jin & Yang, 2017; Zigo et al., 2020).

Durante la capacitación de los espermatozoides también se produce aumento del pH intracelular (pHi), remodelación del citoesqueleto de actina mediado por la polimerización de los filamentos de actina, hiperactivación de la motilidad caracterizada por un movimiento vigoroso y asimétrico del flagelo y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) como elementos de transducción de señales que activan los mecanismos intracelulares (Bragado et al., 2012; O'Flaherty et al., 2006).

2.2.2 Reacción acrosomal

La reacción acrosomal es un proceso exocítico organizado y progresivo que experimentan los espermatozoides capacitados e implica múltiples fusiones de la membrana acrosómica externa con la membrana plasmática suprayacente, resultando en la exposición y liberación del contenido enzimático del acrosoma al medio extracelular, lo que es esencial para la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida del óvulo (Del Río et al., 2007). Las enzimas acrosómicas hidrolíticas como la hialuronidasa y acrosina permiten al espermatozoide pasar entre las células del *cumulus* que rodean al óvulo y cortar una hendidura estrecha

en la matriz de la zona pelúcida, suficiente para que el gameto acceda a la membrana plasmática del óvulo, a la cual se fusiona, desencadenando los eventos que constituyen la fertilización (Pesch & Bergmann, 2006). Una vez que ha reaccionado el acrosoma, la vida útil de los espermatozoides es corta y, si no se produce pronto la fertilización, el espermatozoides muere (Del Río et al., 2007).

La cascada bioquímica que conduce a la reacción del acrosoma (RA) inicia tras la unión de los espermatozoides capacitados a la zona pelúcida del óvulo, esto causa un aumento rápido y alto en la concentración de Ca^{2+} dentro del espermatozoide y la activación de mecanismos de señalización. La fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bisfosfato (PIP_2) para producir inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) y resulta en la liberación de p-gelsolina. La gelsolina sufre desfosforilación y activación, lo que permite mediar la conversión de actina-F en actina-G. Por otro lado, el IP_3 activa canales de Ca^{2+} en la membrana acrosómica externa, lo que reduce las concentraciones del Ca^{2+} intra-acrosomal, lo que lleva a la activación de los canales de Ca^{2+} dependiente de Ca^{2+} en la membrana plasmática. Esto causa un aumento adicional del Ca^{2+} intracelular, que junto con el DAG activan a la proteína quinasa C (PKC) que media la reacción acrosomal (Breitbart & Finkelstein, 2015).

2.3 Teca perinuclear de los espermatozoides

2.3.1 Estructura y funciones de la teca perinuclear espermática

La teca perinuclear de los espermatozoides (TP) es una cápsula citoesquelética de proteínas citosólicas y nucleares que rodea completamente el núcleo de los espermatozoides mamíferos, excepto en la región de la implantación de la cola (R. Oko & Maravei, 1994). En un principio la TP se conocía como sustancia perinuclear o matriz perinuclear al ser detectada por microscopía electrónica como un material electrodensito, con apariencia fibrillogranular que rodeaba al núcleo (Mújica et al., 2003; Sutovsky et al., 2003).

La TP constituye una estructura rígida que da forma a la cabeza espermática, protege el DNA de lesiones mecánicas, físicas y químicas durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo y durante el transporte y la fertilización

de los espermatozoides en el sistema reproductor femenino. Además, la TP está involucrada en funciones espermáticas importantes, como la formación de dominios funcionales de la membrana plasmática y la penetración del espermatozoide en el óvulo durante el proceso de fertilización. Posteriormente, participa en la descondensación del material genético y la formación del pronúcleo masculino una vez que la TP se ha dispersado (Richard Oko & Sutovsky, 2009). Debido a la localización de esta estructura citoesqueletica se ha establecido que la TP asegura la estabilidad del acrosoma y participa en su ensamblaje (Alvarez et al., 2009).

La TP también es considerada un reservorio de moléculas de señalización. Se han encontrado proteínas integrales únicas de la teca que participan en la activación del óvulo, la defensa anti-poliespermia y el desarrollo embrionario temprano, tales como la PLC- ζ , que se liberan en el citoplasma del óvulo cuando la TP se dispersa en la fertilización (Richard Oko et al., 2017). La PLC- ζ presente en la TP se ha propuesto como el factor soluble responsable de la activación del óvulo (Saunders et al., 2002).

2.3.2 Composición de la teca perinuclear

La teca perinuclear se puede dividir tanto estructural como composicionalmente en las regiones subacrosomal y postacrosomal (Mújica et al., 2003). Apicalmente, la TP reside entre la membrana acrosómica interna y la envoltura nuclear que forma la capa subacrosómica (SAL) o perforatorio, mientras que caudalmente, reside entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear que conforma la lámina o envoltura post-acrosómica (PAS) o calix. (**Figura 1**). La capa subacrosomal de la TP se continua con la parte de la capa periacrosomal externa, que se intercala entre la membrana acrosómica externa y la membrana plasmática en la región ecuatorial (Richard Oko & Sutovsky, 2009).

Rodeando la región apical de la vaina postacrosomal, la TP tiene una subestructura (sTP), que desaparece tempranamente durante la fertilización, lo que podría ser usado como un marcador temprano de la disrupción de la teca (Juárez Mosqueda & Mújica, 1999). En el caso del espermatozoide del verraco la subestructura de la TP consta de proyecciones que se asemejan a grecas rodeando la cabeza del esperma. La sTP persiste en los espermatozoides

capacitados, pero desaparece en los gametos que reaccionaron el acrosoma (Barrientos et al., 2009). La sTP también sufre alteraciones en su integridad y está ausente en espermatozoides que fueron congelados (Gutiérrez-Pérez et al., 2011). Por lo tanto, la TP puede sufrir cambios estructurales durante la capacitación y la reacción del acrosoma (Juárez Mosqueda & Mújica, 1999). La evaluación de esta estructura brinda información relevante de los efectos causados por la crioconservación sobre el citoesqueleto y su relación con la integridad acrosomal de los espermatozoides (Arancibia Salinas et al., 2007).

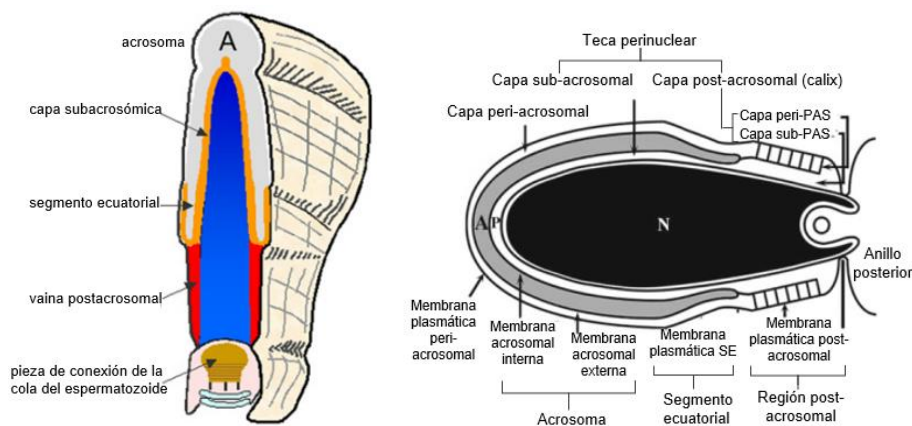


Figura 1: Esquema de los subdominios de la cabeza del espermatozoide, la TP y las capas citoplásmicas. A: acrosoma, SAL: capa subacrosomal, ES: segmento ecuatorial, PAS: vaina postacrosomal, CP: pieza de conexión de la cola del esperma. Adaptado de: (Richard Oko & Sutovsky, 2009; Toshimori, 2009).

La composición molecular de la TP consiste en diversas proteínas agrupadas en tres clases: estructurales, de señalización y de tipo histonas. Algunas de las proteínas más estudiadas son la actina, calicina, espectrina, ciclina I y II, y proteínas de la vía de señalización de la tirosina de la familia SRC, incluidas PT32 y c-Yes (Sutovsky et al., 2003).

2.3.3 Biogénesis de la teca perinuclear espermática

La deposición y ensamblaje de las proteínas de la TP comienza en la etapa de espermátida redonda de las espermiogénesis y ocurre en dos distintas fases. La capa subacrosomal (SAL) de la TP se deriva principalmente de las vesículas secretoras del aparato de Golgi que se forman a partir de la secreción de varios gránulos pro-acrosómicos durante la primera fase de la formación del acrosoma. La SAL es también conocida como acroplaxoma por ser la estructura de anclaje de la vesícula acrosómica o capuchón acrosomal a la envoltura nuclear anterior (Richard Oko et al., 2017). Por su parte, la formación de la vaina postacrosomal

(PAS) de la TP surge principalmente de proteínas que son producidas en el lóbulo citoplasmático de la espermátida elongada, que viajan tanto a PAS como al segmento ecuatorial (ES) durante el descenso caudal del manchete microtubular durante la elongación de la espermátida (Richard Oko & Sutovsky, 2009).

2.3.4 Destino de la TP después de la fertilización

La TP se disuelve rápidamente en el citoplasma del huevo durante la entrada de la cabeza del espermatozoide, en la etapa temprana de la fertilización, previo a la activación del huevo. Su eliminación precede a la reconstitución de una nueva envoltura nuclear con complejos de poros nucleares funcionales, además su solubilización permite el desarrollo normal del pronúcleo después de la fertilización (Juárez Mosqueda & Mújica, 1999; Sutovsky et al., 2003).

2.4 Crioconservación de espermatozoides y desafíos actuales

La crioconservación o congelación es el método más eficaz para la conservación a largo plazo de espermatozoides de mamíferos. Sin embargo, los procedimientos de congelación-descongelación pueden afectar la función y la supervivencia de los espermatozoides y disminuir el rendimiento reproductivo (Yeste, 2016). Los enfoques actuales de la crioconservación intentan conocer a profundidad los cambios moleculares que ocurren en la ultraestructura del espermatozoide durante el proceso de congelación-descongelación, para optimizar los protocolos de crioconservación y mejorar la tasa de vitalidad (Bonet et al., 2013).

2.4.1 Principios de las criolesiones espermáticas durante la congelación y descongelación

Las criolesiones causantes del daño celular que ocurren durante el proceso de congelación-descongelación son cambios físicos que afectan la estabilidad celular y de manera específica la integridad de la membrana plasmática, de la membrana mitocondrial, del acrosoma, del núcleo, del citoesqueleto y de otros componentes celulares importantes, como la teca perinuclear (Brien et al., 2019).

Uno de los desafíos para las células durante la crioconservación es el sobre enfriamiento que ocurre cuando la temperatura decrece por debajo de 0°C y alcanza el rango de letalidad entre - 15°C y - 60°C, donde se produce el cambio de fase del agua intracelular y extracelular (Gao & Critser, 2000). El agua extracelular se congela, mientras que el contenido intracelular no lo hace al mismo tiempo, ya que permanece temporalmente sin congelar y sobreenfriada porque la membrana funciona como una barrera que impide que el cristal extracelular continúe creciendo hacia el interior de manera continua (Yeste, 2016).

La velocidad de enfriamiento es un factor importante para aliviar la formación de cristales de hielo y reducir el impacto de las bajas temperaturas en la integridad celular. Si la velocidad de enfriamiento es muy rápida el agua intracelular no fluye completamente hacia el exterior, por lo que al congelarse el interior de las células se congela y forman cristales de hielo en el citoplasma, lo que da como resultado las criolesiones (Muldrew & McGann, 1994). Por el contrario, si la velocidad de enfriamiento es muy lenta la mayor parte del agua sale y se concentran los solutos intracelulares. Las células se deshidratan, los orgánulos y la membrana experimentan una contracción de su volumen y queda expuestas a una elevada concentración intracelular de solutos antes que se alcance la temperatura a la que todos los componentes de la solución se solidifican (punto eutéctico). Esto afecta los complejos lípido-proteína, desnaturaliza las macromoléculas e induce una fusión irreversible de la membrana (Yeste, 2016). La elevada concentración intracelular de solutos también provoca cambios en la osmolaridad. El estrés hipertónico resultante puede cambiar el equilibrio electrolítico y esto puede llevar a que las células se hinchen más allá de su volumen isotónico normal, lo que puede provocar la lisis celular durante la descongelación (Gao & Critser, 2000).

En criobiología se establece la teoría de los dos factores por los que ocurren las criolesiones: 1) debido a la formación letal de hielo intracelular a alta velocidad de enfriamiento y 2) debido a la concentración de solutos / electrolitos, deshidratación celular y reducción de la fracción no congelada en el espacio extracelular en baja velocidad de enfriamiento. La velocidad de congelación debe ser lo suficientemente lenta para permitir la salida de agua al exterior y evitar la

formación de hielo intracelular, y lo suficientemente rápida para evitar que se forme hielo en el interior de la célula y para minimizar los criodañños debidos a una elevada concentración de solutos / electrolitos (Mazur et al., 1972).

Otro cambio físico importante que ocurre durante la crioconservación es la transición de fases que sufren los lípidos de la membrana plasmática. En un estado fisiológico normal, la membrana se encuentra en un estado laminar como liquido cristalino. Al bajar la temperatura, los lípidos sufren alteraciones en las fases físicas. La reducción de los movimientos laterales de los fosfolípidos de la membrana que se produce cuando las temperaturas son inferiores a 5°C disminuye la fluidez de la membrana, lo que eventualmente da como resultado una transición de la fase líquida a la fase de gel y la membrana se vuelve rígida y poco elástica (Holt, 2000b).

Los diferentes lípidos de membrana presentan diferentes temperaturas de transición; algunos fosfolípidos insaturados se gelifican antes que otros y se producen separaciones de fases. Después de la gelificación las proteínas integrales de la membrana se agrupan irreversiblemente por la separación de las fases lipídicas, los lípidos de la membrana se reestructuran y se liberan algunas moléculas de colesterol (Vadnais & Althouse, 2011). Como resultado de estas alteraciones estructurales, se produce una alteración de las interacciones entre lípidos y proteínas, y algunas proteínas, como los canales iónicos, se translocan y/o pierden su función (Johnson et al., 2000). Esto hace que la membrana plasmática se desestabilice y pierda su permeabilidad selectiva, aumentando así la entrada de iones, como Ca^{2+} y bicarbonato, desde el espacio extracelular, lo que afecta la homeostasis (Watson, 2000). Estos cambios inducidos por la congelación son conocidos como criocapacitación o cambios similares a la capacitación (Leahy & Gadella, 2011).

Por otra parte, la composición y propiedades biofísicas de las membranas plasmáticas están relacionados con la sensibilidad celular a los procedimientos de crioconservación (Bonet et al., 2013). La membrana plasmática de los espermatozoides de verraco es rica en fosfolípidos insaturados y pobre en moléculas de colesterol que aportan rigidez y estabilidad, y esto favorece la alta

sensibilidad de los espermatozoides de verraco a los daños inducidos por el shock térmico (Maldjian et al., 2005).

Además, la supervivencia de los espermatozoides después de la crioconservación no solo implica criolesiones durante la congelación, sino también durante la descongelación ya que una lenta descongelación da como resultado la recristalización, mientras que una tasa rápida de descongelación puede producir estrés osmótico. El incremento osmótico en el citoplasma provoca que el agua entre y altere la membrana plasmática (Holt, 2000a).

2.5 Proteínas y moléculas de interés de la TP y la membrana plasmática del espermatozoide

2.5.1 Actina

La actina es una proteína del citoesqueleto que tiene una alta dinámica en el espermatozoide de los mamíferos y ejerce una participación crucial en los procesos de capacitación, reacción acrosomal, y motilidad espermática (Breitbart & Finkelstein, 2015; Clarke et al., 1982). Esta proteína puede estar presente como un monómero (actina-G o globular) o como parte de un polímero llamado actina-F (actina filamentosa) (**Figura 2**). El ensamblaje, la organización y la dinámica de la red de actina están controlados por la actividad de proteínas asociadas o de unión a actina, como la gelsolina (Romarowsky et al., 2016). La polimerización de actina es un proceso en el que unidades de actina globular, en presencia de ATP, se conectan entre sí para crear actina filamentosa (Pollard et al., 2000). La polimerización de la actina tiene lugar durante la capacitación espermática, mientras que antes de la reacción acrosomal ocurre una rápida despolimerización de la actina-F. El incremento de actina-F en la cabeza espermática crea una barrera física entre la membrana acrosómica externa y la membrana plasmática suprayacente, lo que previene una exocitosis acrosómica espontánea (Breitbart & Finkelstein, 2018). Los filamentos de actina inhiben el flujo osmótico de agua a través de una membrana semipermeable en proporción a la concentración del filamento (Ito et al., 1992). El aumento de actina-F durante la capacitación depende de la inactivación de la gelsolina por unión al fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP₂) y su fosforilación en tirosina 438 por las proteínas quinasas de la familia SRC (Breitbart & Finkelstein, 2015).

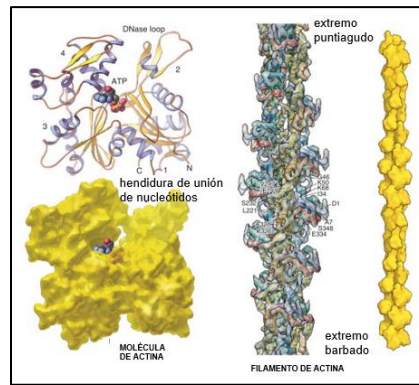


Figura 2: Estructura de la molécula de actina y filamento de actina. Adaptado: (Pollard, 2017).

Con referencia a la localización en el espermatozoide, se ha identificado actina en la cabeza del espermatozoide, principalmente en región ecuatorial y post-acrosomal y adicionalmente en el flagelo del espermatozoide (Fouquet & Kann, 1992). En algunos estudios ultraestructurales se ha detectado actina en la teca perinuclear de espermatozoides de verraco, la misma que luego de proceso de congelación-descongelación presenta alteraciones en su patrón de localización, así como en su estado de agregación y esto influye en los procesos de capacitación y reacción acrosomal (Gutiérrez-Pérez et al., 2011). Por otra parte, es posible que las alteraciones en el citoesqueleto de actina sean las responsables de la baja tasa de supervivencia y fertilidad de los espermatozoides después de la congelación-descongelación en esta especie (Barrientos et al., 2009; Vincent et al., 1990). De igual forma, durante la criopreservación de otros tipos celulares se ha encontrado que por efecto de la baja temperatura, los filamentos de actina del citoesqueleto se despolimerizan y se pierde el equilibrio entre la actina globular y filamentosa (Vincent et al., 1990).

2.5.2 Gelsolina

Generalidades y funciones de la gelsolina sobre la actina

Gelsolina es una proteína altamente conservada que pertenece a la superfamilia de proteínas de unión a actina (ABPs) que se expresa en todas las células eucariotas (Pollard, 2017). Esta proteína se descubrió en macrófagos como un factor que induce la transformación gel-sol de los filamentos de actina (Ono, 2007). En presencia de concentraciones micromolares de calcio la gelsolina corta los filamentos de actina ensamblados y cubre el extremo más, o de crecimiento rápido, de los filamentos libres o recién cortados, evitando así la

adición de monómeros de actina y la polimerización (Finkelstein et al., 2010). En el espermatozoide esta proteína está implicada en la regulación de la motilidad, en la transducción de señales y en los reordenamientos dinámicos de la arquitectura citoesquelética (Finkelstein et al., 2013; McGough et al., 2003).

Estructura y acción

Gelsolina tiene un peso molecular de 90-92 kDa y consta de seis segmentos o dominios repetidos (S1-S6), cada uno de aproximadamente 120 residuos de longitud que están conectados por regiones enlazadoras de diferentes longitudes (**Figura 3**), (Corte et al., 1999). En su estructura tridimensional se han identificado regiones de unión de actina, calcio y fosfolípidos ácidos reguladores, como como el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) (Dos Remedios et al., 2003). La unión de PIP₂ a la región entre S1 y S2 libera a la gelsolina de los filamentos de actina, proporcionando sitios libres para el ensamblaje de la actina-F, favoreciendo la polimerización (Finkelstein et al., 2010).

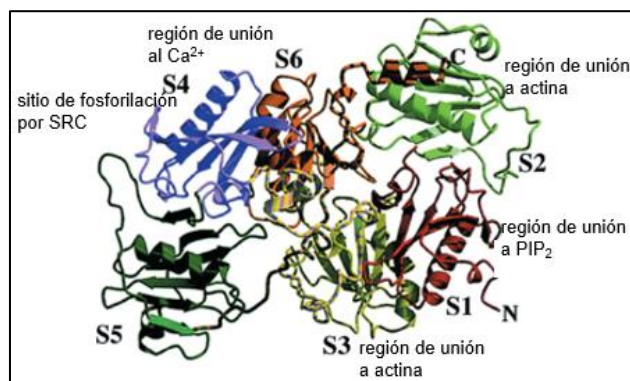


Figura 3 : Estructura molecular esquemática de la gelsolina. En rojo S1 extremo NH₂, S2 en amarillo, S3 en verde, y S4 -S6 en verde y dorado. Adaptado: (Sun et al., 1999).

Dinámica de la gelsolina de acuerdo al estado fisiológico de los espermatozoides

Durante la capacitación se requiere polimerización de actina en los espermatozoides, pero antes de la reacción acrosomal la actina-F debe dispersarse. Por este motivo, la gelsolina, una proteína que corta la actina se localiza en la fracción de actina-G antes de la capacitación, mientras que al final de la capacitación, la gelsolina se localiza en la fracción de actina-F (Breitbart & Finkelstein, 2015). Durante la capacitación espermática incrementan las

concentraciones de gelsolina en la cabeza del espermatozoide de forma concomitante con el aumento de actina-F, mientras que en el flagelo la gelsolina disminuye de manera significativa (Finkelstein et al., 2010).

Importancia de la translocación de la gelsolina

La translocación de la gelsolina de la cola a la cabeza se requiere por dos razones: 1) La localización de la gelsolina con su sustrato actina-F en la cabeza del espermatozoide permite una dispersión eficiente de la actina-F, que es un paso necesario que debe ocurrir antes de la reacción acrosomal (Brener et al., 2003), y 2) La exclusión de la gelsolina de la cola previene la despolimerización de actina-F, como consecuencia la F-actina aumenta en el flagelo de los espermatozoides durante la capacitación y se cree que es necesaria para el desarrollo de la hiperactivación de la motilidad (Breitbart & Finkelstein, 2015; Finkelstein et al., 2010). También se conoce que la inhibición de la síntesis de PIP_2 previene la translocación de la gelsolina a la cabeza, mientras que el aumento de la síntesis de PIP_2 lo mejora significativamente (Breitbart & Finkelstein, 2015).

Por otra parte, el calcio intracelular también participa en la translocación de la gelsolina a la cabeza, ya que induce cambios conformacionales de la proteína de su forma compacta a una forma más abierta y expone los sitios activos para interactuar con la actina (Ashish et al., 2007).

Control de la actividad de gelsolina

Para que se lleve a cabo exitosamente la polimerización de actina durante el proceso de capacitación la gelsolina debe mantenerse inactiva (Finkelstein et al., 2013). La inactivación de la gelsolina durante la capacitación se produce por dos mecanismos: 1) por su unión a PIP_2 y 2) mediante la fosforilación en tyr-438 por la tirosina quinasa de la familia SRC. Además, la unión de PIP_2 a gelsolina interfiere con la actividad de esta proteína evitando su actividad de corte sobre los filamentos de actina (Corte et al., 1999; Finkelstein et al., 2010).

La activación de la gelsolina en espermatozoides capacitados ocurre antes de la reacción del acrosoma y depende de varios factores, entre ellos la presencia de calcio, pH bajo, la liberación de los fosfoinosítidos, la acción de fosfatasa y la

actividad de fosfolipasas. De tal manera que las concentraciones de calcio relativamente bajas causan cambios conformacionales en el extremo C de la gelsolina, que exponen su sitio de unión a la F-actina, mientras que las concentraciones más altas de calcio causan un segundo cambio conformacional que expone el sitio catalítico. Luego actúan tirosinas fosfatasa que desfosforilan los sitios fosforilados por SRC que la mantienen inhibida (Finkelstein et al., 2013).

Particularmente, la liberación de gelsolina unida a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) ocurre mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC γ), que hidroliza al PIP₂ y forma el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (Corte et al., 1999). La PLC, al producir la hidrólisis de PIP₂ en el espermatozoide, media la despolimerización de la actina, además esta enzima requiere de la elevación de calcio intracelular para su activación. Todos estos eventos en conjunto permiten la activación de la gelsolina, que rápidamente se une a los filamentos de actina y los corta, provocando la despolimerización de la actina F, un evento previo a la exocitosis del acrosoma (Finkelstein et al., 2010). Experimentalmente se ha demostrado que la actividad de corte de la gelsolina y su estado de fosforilación se ven fuertemente afectadas por los niveles del PIP₂ en la membrana celular (Wang et al., 2016).

2.5.3 Fosfoinosítidos: PIP₂

Los fosfoinosítidos (PPIs) son glicerofosfolipidos que contienen inositol y tienen numerosas variables de grupos fosfato en sus grupos principales. Los PPIs son moléculas multifacéticas que desempeñan un papel crucial en la regulación de muchas funciones celulares, tales como la dinámica de la actina, la señalización, el tráfico intracelular, la regulación de los canales iónicos, la dinámica de la membrana, la transducción de señales y la adhesión de la célula a la matriz extracelular. Un elemento central de estos procesos celulares es el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP₂) (Mandal, 2020). El PIP₂ un polifosfoinosítido que constituye una de las siete posibles isoformas de los PPIs, se caracteriza por contener dos grupos fosfato conectados al anillo del inositol en la posición 4 y 5 (**Figura 4**). El peso molecular de esta molécula es de 74 kDa. La síntesis de PIP₂ ocurre por fosforilación de PI₅P que esta mediada por fosfatidil inositol 4

quinasa (PI₄K) (Etkovitz et al., 2007). PIP₂ es el principal fosfoinosítido en células mamíferas, comprende el 1% del contenido total de los fosfolípidos de la membrana plasmática y participa en las vías de señalización fundamentales que regulan el ensamblaje citoesquelético y otras funciones celulares (Breitbart & Finkelstein, 2015). A pesar de que el PIP₂ solo representa una pequeña porción de la membrana total, juega un papel fundamental en la biología celular al regular los complejos multiprotéicos (Fatunmbi et al., 2020).

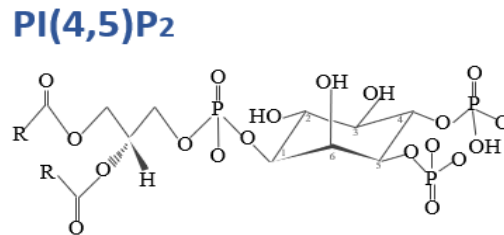


Figura 4 : Estructura molecular del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato. Adaptado: (Wang et al., 2012).

PIP₂ y el control del citoesqueleto de actina

El PIP₂ desempeña un rol en la organización y ensamblaje del citoesqueleto al interactuar con numerosas proteínas diferentes, entre ellas proteínas de unión a actina como la gelsolina, formina, cofilina, profilina, filamina, WASP y otras, que controlan la organización dinámica de la red de actina (Mandal, 2020). PIP₂ inactiva principalmente a proteínas de unión a actina que inhiben la polimerización de la misma y activa proteínas que impulsan el ensamblaje de los filamentos de actina (Janmey et al., 2019).

PIP₂ controla la actividad de gelsolina, cuando este fosfoinosítido de membrana se une a los dominios de interacción con PIP₂ y permite que la proteína de corte se libere del filamento y exponga los sitios para el ensamblaje de la actina (Breitbart & Finkelstein, 2015). Se han caracterizado tres sitios de unión de PIP₂ para gelsolina, dos de los sitios de unión compiten con los sitios de actina-F y actina-G (Mandal, 2020).

Además, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato promueve la fosforilación de la gelsolina por la tirosina quinasa c-SRC. Experimentalmente se conoce que la fosforilación de gelsolina y otras proteínas de unión a actina en ausencia de fosfolípidos es débil, mientras que cuando se incubaba con PIP₂ se produce una inducción muy fuerte de la incorporación de fosfato, es decir la gelsolina al

interactuar con los fosfolípidos se convierte en un mejor sustrato para ser fosforilada. De tal manera que mejora la fosforilación de gelsolina a mayor presencia de PIP₂ (Corte et al., 1999), por el contrario se reduce la translocación y la fosforilación / inhibición de tyr-438 de gelsolina cuando disminuye los niveles de PIP₂ (Breitbart & Finkelstein, 2015).

PIP₂ durante la capacitación espermática y reacción acrosomal

El PIP₂ es esencial durante la capacitación, considerando que la motilidad hiperactivada está mediada por la polimerización de actina dependiente de la actividad de la fosfolipasa D (PLD), lo que está regulado por la intercomunicación entre las proteínas quinasas A y C (PKA / PKC). PIP₂ es un cofactor para la activación de PLD, regulando así el reordenamiento citoesquelético de la actina (Breitbart & Finkelstein, 2015; Etkovitz et al., 2007).

El PIP₂ también sirve como precursor de dos segundos mensajeros: el diacilglicerol y el IP₃ producidos por su hidrólisis. El diacilglicerol activa a la PKC, que a su vez está involucrada en la polimerización de la actina y la reacción acrosómica. Por su parte, el IP₃ moviliza Ca²⁺ de las reservas intracelulares y está involucrado en la regulación de las concentraciones del calcio intracelular en los espermatozoides. Otras proteínas presentes en los espermatozoides en la que el PIP₂ sirve como efector y que participan en la regulación de la capacitación y la reacción acrosomal son el sustrato de cinasa C rico en alanina miristoilada (MARCKS), y el PI3K (Breitbart & Finkelstein, 2015).

Distribución del PIP₂ en membranas celulares

Aunque el nivel promedio del PIP₂ en las membranas celulares de mamíferos es del 1%, se sabe que PIP₂ tiene una distribución heterogénea en las bicapas lipídicas y coexiste entre proteínas y lípidos (Bucki et al., 2019). Mediante el uso de anticuerpos anti-PIP₂ se conoce que PIP₂ está altamente enriquecido en la membrana plasmática dentro de dominios secuestrados de PIP₂ que tienen un tamaño aproximado de 73 nm (Fatunmbi et al., 2020). La carga negativa del PIP₂ juega un papel crucial en la interacción con las proteínas intracelulares unidas a la membrana (Mandal, 2020).

Los niveles de PIP₂ en la membrana se alteran rápidamente por la actividad de las cinasas y fosfatasa dirigidas por fosfoinosítidos (Mandal, 2020). La capacidad del PIP₂ para regular el ensamblaje de actina en la membrana depende no solo de las concentraciones de PIP₂, sino también de su distribución y organización dentro de la bicapa. Se cree que el colesterol tiene efectos sobre la agrupación de PIP₂ y, por lo tanto, la orientación de las bicapas podría mediar indirectamente en las interacciones de PIP₂-proteína (Fatunmbi et al., 2020). Es decir, no sólo la cantidad del fosfoinosítido altera la gelsolina libre o unida a actina en las células, sino que también la distribución de PIP₂ y la presencia de colesterol controlan la actividad de la gelsolina (Wang et al., 2016).

Durante la capacitación aumentan los niveles de PIP₂ en la cabeza espermática simultáneamente al aumento de F-actina y gelsolina, pero existe una disminución en la cola del espermatozoide. La elevación de PIP₂ en la cabeza mantiene la gelsolina inactiva y permite el ensamblaje de F-actina; mientras que la disminución de gelsolina en la cola permite el mantenimiento de niveles altos de F-actina en esta estructura, que es esencial para el desarrollo de la motilidad hiperactivada (Breitbart & Finkelstein, 2015). De tal manera que la cinética de la síntesis e hidrólisis de PIP₂, y su distribución dentro de la bicapa lipídica controlan la dinámica del citoesqueleto de actina (Janmey et al., 2019).

2.5.4 Tirosina quinasa SRC

La SRC es el miembro más representativo de las quinasas de la familia SRC (SFKs), un grupo de tirosina quinasas que se expresan en todas las células de mamíferos y que están involucradas en varios procesos celulares fundamentales, como la interacción célula-célula, el ciclo celular, la proliferación, migración, adhesión, diferenciación, supervivencia y apoptosis (Bagnato et al., 2020). En espermatozoides la tirosina quinasa SRC está involucrada en la capacitación, en la regulación de la reacción acrosomal (Varano et al., 2008), al afectar la fosforilación en tirosina de proteínas específicas y el influjo de calcio inducido por la progesterona (Bragado et al., 2012).

Miembros de la familia SFKs

La familia de las SFKs son un grupo de tirosina quinasas no receptoras que constan de once miembros, entre los cuales la SRC es la enzima prototipo. Los miembros del grupo principal son: c-SRC, c-Yes, Fyn, Fgr, Blk, Hck, Lck y Lyn que están estrechamente relacionados, mientras que Frk, Srm y Brk constituyen un grupo relacionado más lejanamente (Parsons & Parsons, 2004). En espermatozoides porcinos se han identificado Lyn y c-Yes y dos isoformas activas, denominadas SFK1 y SFK2, detectadas mediante anticuerpos específicos que reconoce tirosina fosforilada (Bragado et al., 2012). c-Yes además se ha detectado en la teca perinuclear y participa en la capacitación espermática y la reacción acrosomal (Sutovsky et al., 2003).

Estructura

La c-SRC tiene un peso molecular de 59-66 kDa y consta de cuatro dominios de homología SRC (SH) consecutivos: SH-4 es un dominio único intrínsecamente desordenado, una región de unión a la membrana en su extremo N-terminal, que puede miristoilarse y/o palmitoilarse para permitir la localización de la proteína en la membrana (Varano et al., 2008). SH-2 y SH-3 son dominios reguladores que preceden a un gran dominio catalítico C-terminal (SH-1) que contiene residuos de tirosina importantes para la modulación de la cinasa, incluido un sitio de fosforilación autoinhibitorio característico (**Figura 5**) (Bagnato et al., 2020).

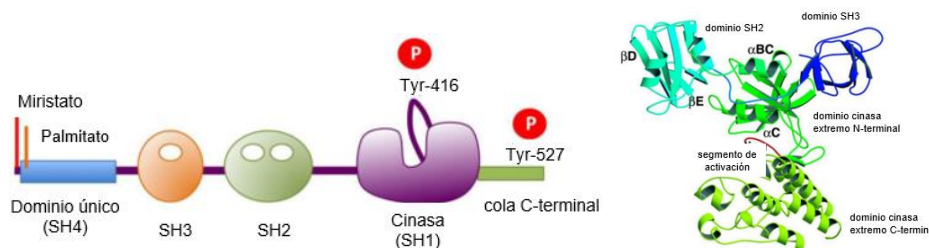


Figura 5 : Estructura de dominios de la familia de las quinasas SRC. Adaptado: (Okada, 2012).

Localización de SRC en los espermatozoides

La SRC se ha detectado en la región acrosómica (Lawson et al., 2008), en el segmento ecuatorial y en la región post acrosomal de la cabeza, cuello y en todo el flagelo de los espermatozoides humanos (Varano et al., 2008). Esta tirosina quinasa está también asociada con la membrana plasmática (Leclerc & Goupil, 2002) y con elementos citoesqueléticos como la teca perinuclear. La localización de la SRC en la cabeza del espermatozoide es similar a la localización de

gelsolina durante la capacitación, lo que explica su interacción y su función inactivante. Además, mediante inmunohistoquímica en secciones de testículos humanos se ha encontrado que la SRC se expresa durante la espermatogénesis desde el estadio de espermátidas redondas y alargadas en forma de media luna que rodean el núcleo, lo que sugiere una asociación con estructuras acrosómicas o su presencia dentro del acrosoma (Lawson et al., 2008).

Actividad de SRC durante la capacitación

Durante la capacitación de los espermatozoides la activación de la proteína quinasa A (PKA) fosforila a SRC en tyr-416. Este residuo se localiza dentro del bucle de activación y su fosforilación permite la apertura del sitio catalítico de la enzima, lo que conduce a la autofosforilación e induce la actividad cinasa (Breitbart & Finkelstein, 2015; Finkelstein et al., 2010). La activación de SRC también requiere Ca^{2+} (Lawson et al., 2008). Cuando SRC está activa fosforila a gelsolina en tyr-438, que está ubicada en el segmento 4 de la proteína (Corte et al., 1999). Mediante esta fosforilación inhibitoria, sumada al secuestro de gelsolina por el PIP_2 , la gelsolina se inactiva, se libera de los filamentos de actina y aumenta la polimerización de actina-F (Finkelstein et al., 2010). También es posible que SRC medie directamente la formación de F-actina al inhibir la proteína fosfatasa Ser/Thr PP1 (Breitbart & Finkelstein, 2015; Brener et al., 2003). Por lo tanto, la actividad de SRC regula el proceso de polimerización de actina durante la capacitación de los espermatozoides (Rotfeld et al., 2014). No obstante, la actividad cinasa de la SRC además de la gelsolina fosforila numerosas proteínas del espermatozoide, incluyendo entre otras a una enolasa, HSP90, tubulina y dineína (Baker et al., 2006).

Experimentalmente la formación de F-actina, la fosforilación de proteínas asociadas a la capacitación, la motilidad y la hiperactivación pueden ser bloqueadas inhibiendo la actividad de SRC con SU6656, lo que sugiere que la activación de SRC durante la capacitación es indispensable para la inhibición de gelsolina y el aumento de actina-F (Finkelstein et al., 2013).

Actividad de SRC en la regulación de la reacción acrosomal

También se ha demostrado que la SRC está involucrada en la regulación de la reacción acrosomal. Durante la capacitación se estimula la actividad de la SRC, pero al final de la capacitación y previo a la ocurrencia de la reacción acrosomal se produce la inhibición de SRC, que junto a la acción de otros mecanismos activan a la gelsolina lo que contribuye a la dispersión de actina-F, que es necesaria para que ocurra la reacción del acrosoma. La inhibición de SRC en condiciones de capacitación aumenta la reacción acrosomal de los espermatozoides y disminuye el contenido de actina-F (Bragado et al., 2012).

De tal manera que la activación de SRC durante la capacitación, es indispensable para evitar la reacción espontánea del acrosoma, es decir funciona como un mecanismo regulador para asegurar que los espermatozoides capacitados permanezcan en este estado hasta que los agonistas fisiológicos induzcan la reacción del acrosoma en el momento adecuado (Bragado et al., 2012).

Fosforilación de proteínas en los espermatozoides

La fosforilación de proteínas en residuos de serina, treonina y tirosina asociados con la capacitación constituye un tipo de modificación postraduccional importante que regula eventos celulares de los espermatozoides, como la motilidad (Leclerc & Goupil, 2002) y la hiperactivación del espermatozoide (Mitchel et al., 2008). El aumento de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina ocurre en condiciones fisiológicas durante la capacitación espermática y depende directamente de las actividades concertadas de las proteínas tirosina quinasas PTK (SRC) y las proteínas tirosina fosfatasas (PTP) (Lawson et al., 2008).

La fosforilación de proteínas en tirosina ocurre en diferentes compartimentos y regiones de la cabeza y flagelo de los espermatozoides (Lawson et al., 2008). En la cabeza espermática: la región acrosomal y el segmento ecuatorial son las principales regiones donde el contenido de fosfotirosina de las proteínas incrementa y están relacionados con la capacitación, la exocitosis acrosómica y es esencial para la unión de los espermatozoides con la zona pelúcida del óvulo en mamíferos (Varano et al., 2008); mientras que en el cuello y la pieza principal

del flagelo el incremento de la fosforilación está implicado en el aumento de la motilidad hiperactivada (Lawson et al., 2008).

Sin embargo, se ha demostrado que el estrés térmico durante la crioconservación de los espermatozoides puede alterar la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que también estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y provoca un aumento de la fosforilación de las proteínas en tirosina (Jin & Yang, 2017). Se cree también que el aumento de las proteínas fosforiladas en tirosina resulta de la activación de las proteínas tirosina quinasas y la inactivación de las proteínas tirosina fosfatasas (Visconti & Kopf, 1998). El plasma seminal contiene fosfatasas ácidas que mantienen desfosforiladas las proteínas de los espermatozoides, por lo que una de las funciones del plasma seminal es mantener los espermatozoides en un estado no capacitado (Cross, 1996). No obstante, eliminar el plasma seminal en el procesamiento para la criopreservación podría conducir a un desbalance en la proporción de quinasas y fosfatasas y tener como resultado alteraciones en el estado de fosforilación de las proteínas del espermatozoide (Kumaresan et al., 2011). Además, se ha sugerido que el estado de fosforilación de proteínas en tirosina podría usarse como marcador para evaluar la “criocapacitación” del espermatozoide de verraco (Green & Watson, 2001).

2.5.5 Fosfolipasa C ζ

La fosfolipasa C-zeta (PLC- ζ) es una proteína citosólica específica de los testículos, descubierta en el año 2002 (Saunders et al., 2002). PLC- ζ se ha identificado en varias especies, incluyendo los espermatozoides porcinos (Yoneda et al., 2006). Desde su descubrimiento y cada vez más a través del estudio molecular y la evidencia clínica se considera como una fuerte candidata para considerarse el factor derivado del espermatozoide que provoca el estímulo fisiológico que desencadena las oscilaciones de Ca^{2+} necesarias para la activación del óvulo (Amdani et al., 2016; Anifandis et al., 2019) y el desarrollo embrionario temprano durante la fertilización de los mamíferos (Saleh et al., 2020). Se ha encontrado que durante la espermatogénesis del cerdo y otros mamíferos el ARNm de PLC- ζ se expresa desde el estadio de espermátida redonda y se traduce en la espermátida elongada (Young et al., 2009). Además,

la PLC- ζ se integra como parte del acrosoma durante la fase de Golgi de la espermiogénesis humana (Aarabi et al., 2012).

Estructura de la PLC- ζ

En el espermatozoide de verraco la PLC- ζ tiene un peso molecular promedio de 72 kDa (~70-75 kDa). A nivel del segmento ecuatorial la cuantificación de PLC- ζ reveló que contiene típicamente 10 fg/pL de la proteína (Fujimoto et al., 2004). Estructuralmente la PLC- ζ es la isoenzima de la familia de las PLCs más pequeña identificada en mamíferos (Saleh et al., 2020). La estructura de la PLC- ζ consiste de cuatro dominios de mano EF en tándem en el extremo N, los dominios catalíticos X e Y en el centro de la molécula, seguidos de un solo dominio C2 en el extremo C (**Figura 6**). Todos estos dominios son comunes a las otras isoformas de PLC (β , γ , δ , ϵ y η); no obstante, la PLC- ζ carece de un dominio de homología de pleckstrina (PH) N-terminal (Nomikos et al., 2011). Los dominios catalíticos X e Y están separados por un segmento corto, el enlazador XY, que a través de su carga neta positiva juega un papel importante en dirigir a PLC- ζ a las membranas intracelulares para interactuar con su sustrato cargado negativamente el PIP₂ o experimentalmente a liposomas que contienen niveles casi fisiológicos de PIP₂ (Nomikos et al., 2011, 2017).

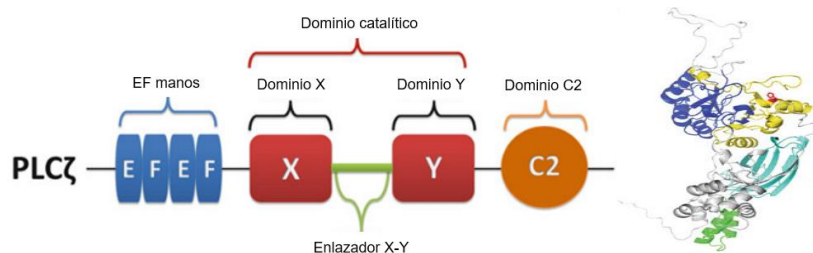


Figura 6: Ilustración esquemática de la estructura de dominio de la PLC- ζ (verde: manos EF, azul: dominio catalítico X, amarillo: dominio catalítico Y, y cian: dominio C2. Adaptado: (Kashir, Jones, et al., 2012).

Los dominios catalíticos X e Y son responsables de la hidrólisis del PIP₂ (Young et al., 2009). Las manos EF son motivos de unión a Ca²⁺ y en la PLC- ζ tienen alta sensibilidad en comparación con las otras PLC presentes en las células somáticas (Fujimoto et al., 2004), lo que permite que PLC- ζ esté activa con niveles de Ca²⁺ en reposo dentro del citosol del óvulo, una vez que PLC- ζ entra después de la fusión del espermatozoide (Hachem et al., 2017). Todas estas características bioquímicas de PLC- ζ contribuyen a su potencia única para

estimular las oscilaciones de Ca^{2+} dentro de los óvulos de mamíferos (Kashir, Jones, et al., 2012; Nomikos et al., 2017).

Papel propuesto de PLC- ζ en la activación del óvulo

Estudios en mamíferos han señalado que la activación del óvulo es provocada por una fosfolipasa C específica liberada por los espermatozoides denominada PLC- ζ (Saunders et al., 2002). El mecanismo de la PLC- ζ para la activación del óvulo comienza luego de la fusión del espermatozoide con el óvulo, donde PLC- ζ se introduce y difunde desde el espermatozoide fertilizante hacia el ooplasma (Saunders et al., 2007). En el óvulo la PLC- ζ estimula la vía de señalización de fosfoinosítidos, hidrolizando vesículas que contienen PIP_2 (Karl Swann & Lai, 2016; Yu et al., 2012). Esto genera inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3) y diacilglicerol (DAG). El InsP3 se une a los receptores de InsP3 (InsP3R) del retículo endoplásmico, provocando la liberación de Ca^{2+} (Nomikos, 2015). El calcio libre activa CaMKII (Calcio/Calmodulina-dependiente de protein kinasa II) e inhibe al LCR: factor citostático (CSF). Esta inhibición libera al complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC) y degrada los niveles de Ciclina BI del complejo MPF (factor promotor de la maduración) compuesto por CDK1 (Ciclina-dependiente de kinasa I) y Ciclina B1. La reducción de Ciclina B1 inactiva MPF provocando la liberación del óvulo de la detención meiótica. Simultáneamente, el Ca^{2+} liberado también inactiva a la MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), permitiendo la formación del pronúcleo. Por su parte, el DAG activa la vía de la PKC (Protein Kinasa C) y traduce las señales de Ca^{2+} en respuestas celulares como la liberación de gránulos corticales (Amdani et al., 2016).

Importancia de la PLC- ζ en la fertilización

La importancia de la PLC- ζ como el factor fisiológico en la activación del óvulo ha sido confirmada en estudios que describen fenotipos de ratón “knock-out” de PLC- ζ , donde se mostró que espermatozoides que carecen de PLC- ζ funcional no logran inducir la liberación de Ca^{2+} cuando se microinyectaron en huevos de ratón mediante ICSI (inyección Intracitoplasmática) (Shannalee R. Martinez, Maresha S. Gay, 2016). Por otro lado, la inyección de proteína o ARNm de PLC- ζ recombinante de ratón en ovocitos induce oscilaciones de Ca^{2+} idénticas a las observadas en la fertilización (Saunders et al., 2002). Además, la ausencia o

deficiente concentración de PLC- ζ es posible que aumente la poliespermia. (Saunders et al., 2007).

En humanos se ha destacado la importancia crucial de la PLC- ζ en la fertilización al asociar las deficiencias (Heytens et al., 2009), mutaciones (Escoffier et al., 2016), anormalidades en su estructura (Torra-Massana et al., 2019), expresión y patrón de localización de la PLC- ζ con ciertas formas de infertilidad por factor masculino (Saleh et al., 2020), considerando que la PLC- ζ es el estímulo fisiológico primario que desencadena el patrón específico de oscilaciones de Ca^{2+} , asegurando la monospermia, la activación exitosa del óvulo y el desarrollo embrionario temprano (K. Swann et al., 2006; Karl Swann, 2018).

Localización de la PLC- ζ en los espermatozoides

La PLC- ζ se ha identificado en espermatozoides de numerosas especies, incluyendo el bovino (Mejía-Flores et al., 2017), porcino (Kaewmala et al., 2012; Nakai et al., 2011); equino (Bedford-Guaus et al., 2011); ratón (Fujimoto et al., 2004; Saunders et al., 2002; Young et al., 2009) y humanos (Grasa et al., 2008; Kashir et al., 2013). Generalmente aparece localizada en distintas regiones subcelulares de la cabeza del espermatozoide: región acrosomal, segmento ecuatorial, región post acrosomal y consistentemente en la cola en todas las especies (Kashir et al., 2017). Además, la PLC- ζ sufre cambios dinámicos durante la capacitación y la reacción del acrosoma (Young et al., 2009).

En los espermatozoides de verraco, la PLC- ζ se ha detectado principalmente en regiones acrosomales y post-acrosomales de la cabeza (Nakai et al., 2011) y también en el flagelo (Kaewmala et al., 2012). Además se ha demostrado que la PLC- ζ está presente dentro del componente de la vaina post-acrosómica de la TP (Fujimoto et al., 2004). La localización post-acrosomal constituye el dominio que ingresa al óvulo y se pone rápidamente en contacto con el ooplasma después de la fusión de gametos, lo que concuerda con su papel de agente endógeno de activación del óvulo, dado que esta es la región en la que estudios previos han predicho que se ubicará el factor de activación endógeno del óvulo transmitido por espermatozoides de mamíferos (Sutovsky et al., 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La crioconservación de semen de verraco sigue suponiendo una limitación tecnológica importante para el desarrollo de la reproducción de esta especie, lo que determina que debe realizarse un nuevo enfoque en el ámbito de la criobiología espermática que permitan conocer y entender con mayor profundidad los cambios moleculares y bioquímicos que ocurren en los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación para obtener mejores resultados y proporcionarles así mayor crio-resistencia a estas células.

Desafortunadamente los espermatozoides porcinos son extremadamente sensibles a la criopreservación y sufren daños estructurales y bioquímicos que luego del proceso de congelación-descongelación acortan la vitalidad y disminuyen la capacidad fecundante (Medrano et al., 2009). Una de las lesiones criogénicas importantes involucra el citoesqueleto de la cabeza espermática representado por la teca perinuclear (Benítez et al., 2008; Maldjian et al., 2005), que tiene un rol esencial dentro de la fisiología espermática por su constitución de proteínas de tipo estructural y de señalización (Amdani et al., 2016). El proceso de crioconservación produce desestabilización de la actina y esta alteración de sus proteínas puede tener efectos importantes en los procesos de capacitación y reacción acrosomal (Barrientos et al., 2009).

Por lo tanto, comprender los cambios en los procesos fisiológicos del espermatozoide de verraco, como la fosforilación de proteínas, la distribución del fosfatidil inositol bifosfato o las alteraciones en la localización de las proteínas del citoesqueleto y aquellas que participan en la fertilización, que se producen por efectos de la crioconservación permitiría proveer información relevante para consolidar nuevos enfoques sobre la congelación-descongelación de las células y ayudaría a establecer mejores protocolos para la crioconservación de espermatozoides, biotecnología necesaria en cualquier sistema de explotación para mejorar la eficiencia reproductiva de esta especie.

4. HIPOTESIS

Existen cambios en la distribución de las proteínas fosforiladas en tirosina, así como del fosfatidil inositol bifosfato y otras proteínas (gelsolina, tirosina cinasa SRC y fosfolipasa C- ζ) relacionados con la desestabilización del citoesqueleto de actina de la teca perinuclear en los espermatozoides criopreservados de verraco sometidos a capacitación y reacción acrosomal *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general:

Evaluar en los espermatozoides criopreservados de verraco si además de la desestabilización de la actina de la teca perinuclear se modifica la distribución de las proteínas fosforiladas en tirosina y la del fosfatidil inositol bifosfato durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal.

5.2 Objetivos específicos:

1. Conocer la distribución del fosfatidil inositol bifosfato en los espermatozoides frescos y criopreservados antes y después de los procesos de capacitación y reacción acrosomal.
2. Determinar la localización y cantidad relativa de gelsolina de la teca perinuclear en espermatozoides frescos y criopreservados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal.
3. Valorar la localización y cantidad relativa de PLC- ζ de la teca perinuclear en espermatozoide frescos y criopreservados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal.
4. Evaluar la localización y cantidad relativa de SRC en espermatozoides frescos y criopreservados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal.
5. Investigar la interacción entre, gelsolina-SRC, gelsolina-PIP₂ y gelsolina y PLC- ζ .

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colección de semen y evaluación seminal

Se obtuvieron mediante la técnica de mano con guante eyaculados de verracos clínicamente sanos pertenecientes al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción porcina (CEIEPP) de la Facultad de Medicina y Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los eyaculados fueron diluidos 1:1 (v:v) con Androhep® Plus y transportados al Laboratorio de Morfología de la FMVZ-UNAM dentro de una caja térmica comercial de poliuretano para transportar el semen a temperatura de 23 °C.

6.2 Evaluación de la motilidad espermática

Una vez que las muestras de semen estuvieron en el laboratorio se procedió en primer lugar a evaluar la motilidad progresiva de los espermatozoides. Para este procedimiento se tomaron alícuotas de 10 µl y se colocaron sobre portaobjetos atemperados a 37 °C, luego se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40X y se realizó la evaluación del movimiento rectilíneo progresivo de los espermatozoides, al cual se calculó un porcentaje.

6.3 Determinación de la concentración espermática

Para determinar la concentración espermática se realizó una dilución 1:20 mezclando 500 µl Tritón X-100 al 1% (Merck®) y 25 µl de muestra de semen. Luego se colocó 10 µl sobre la superficie de cada uno de los dos lados de la cámara de Neubauer. Se efectuó el conteo de 5 cuadros de la cámara de Neubauer en un Microscopio Leica DM500. Se obtuvo la media y se aplicó la fórmula de concentración espermática: [número de espermatozoides x factor de dilución (21) x dimensión de la cámara (10 000) x número de cuadrantes contados (5)] para conocer el número de espermatozoides por mililitro (ml) de semen.

También se valoró la morfología para determinar morfoanomalías espermáticas, procedimiento que se realizó de manera simultánea durante el conteo en el hematocitómetro. Adicionalmente, de cada grupo experimental se evaluó la viabilidad de los espermatozoides por la tinción eosina-nigrosina y la integridad

acrosomal mediante la tinción azul de Comassie, siguiendo las técnicas de laboratorio estándar que se describirán más adelante.

Los eyaculados con menos del 85 % de motilidad progresiva o con más de 15 % de anomalías fueron descartados del estudio.

6.4 Procesamiento del semen fresco para congelación

El semen se dividió en dos partes: la primera fracción fue congelada y la otra parte se utilizó como semen fresco. De tal manera que las muestras fueron analizadas en dos etapas: antes de la congelación y después de la congelación.

La muestra de semen se lavó por centrifugación a 1500 rpm durante 10 min para retirar el diluyente de transporte y el plasma seminal. Posteriormente, los espermatozoides se resuspendieron en el diluyente de conservación MR-A®3, KUBUS a una concentración de 300×10^6 células /ml. Luego se dividió en dos porciones de acuerdo al estado de conservación del semen de verraco asignado: frescos y congelados-descongelados, los cuales más adelante, luego de procedimientos *in vitro* adicionales, se subdividieron en los siguientes subgrupos que corresponden a diferentes estados fisiológicos de los espermatozoides:

- Semen fresco: espermatozoides frescos no capacitados.
- Semen fresco: espermatozoides frescos capacitados.
- Semen fresco: espermatozoides frescos capacitados con RA.
- Semen descongelado: espermatozoides descongelados no capacitados.
- Semen descongelado: espermatozoides descongelados capacitados.
- Semen descongelado: espermatozoides descongelados capacitados con RA

Para realizar el proceso de congelación se utilizó el protocolo propuesto por Barrientos et al. (2009). Este protocolo a dos tiempos comprende una fase de refrigeración y una fase de glicerolización que se describe a continuación:

6.4.1 Preparación de los diluyentes de congelación

Para realizar la congelación de los espermatozoides de verraco previamente se prepararon los diluyentes de congelación de acuerdo al número de pajillas a congelar y el volumen de las mismas (0.5 ml). La formulación de diluyentes designados como diluyente A (fracción sin glicerol) y diluyente B (fracción con glicerol) contenían los ingredientes que se muestran en la **Tabla 1**. Una vez

adicionados los ingredientes en agua desionizada c.b.p, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. La pastilla formada se eliminó, luego se ajustó el pH (6.8–7.4) con un potenciómetro y se aforó con agua desionizada c.b.p al volumen final. El diluyente A preparado se mantuvo a 16°C y el diluyente B a 5°C hasta su uso.

Tabla 1: Composición del diluyente de congelación.

Diluyente A

	Volumen preparado: 15 ml
Dextrosa (g)	1.197
Yema de huevo 20 % (ml)	3
Gentamicina (ml)	0.15
Agua desionizada cbp. (ml)	15

Diluyente B

	Volumen preparado: 15 ml
Dextrosa (g)	1.197
Yema de huevo 20 % (ml)	3
Gentamicina (ml)	0.15
Glicerol (3 %)	0.45
Agua desionizada cbp. (ml)	15

6.4.2 Adición de los diluyentes de congelación

Con base a la concentración espermática calculada, la concentración de espermatozoides por cada pajilla (150×10^6 espermatozoides) y el volumen disponible de los diluyentes A y B preparados, se realizaron los cálculos para conocer el volumen de muestra de semen disponible para congelar. Este volumen de semen se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos y la pastilla obtenida se resuspendió añadiendo el diluyente A, fracción sin glicerol (1/2 del diluyente total A+B). Inmediatamente la muestra de semen luego de ser resuspendida en el diluyente A se mantuvo a temperatura de 16 °C durante 1h 30 min para su estabilización y más tarde en refrigeración a temperatura de 5 °C durante 2 h.

Transcurrido este tiempo de enfriamiento, o fase de refrigeración, se añadió el diluyente B (fracción con glicerol) en 5 tiempos (5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 50 %) con intervalo de 10 minutos entre cada adición. Este proceso de glicerolización se realizó en refrigeración a una temperatura de 4 °C. Al completar la adición del diluyente B la muestra de semen ajustada a una concentración de 150×10^6 espermatozoides/ml se colocó en pajillas de 0.5 ml claramente identificadas y se

sellaron con alcohol polivinílico. Las pajillas a continuación fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido (-130 a -150 °C) durante 20 min dentro de sus gobelets en una caja de poliuretano con una distancia de 18 - 20 cm del espejo de nitrógeno líquido y finalmente fueron almacenadas en el tanque de nitrógeno líquido (-196 °C) hasta el momento de la descongelación.

6.5 Descongelación de pajillas y evaluación

Transcurrido el tiempo mínimo de almacenamiento (15 días) se realizó la descongelación de las pajillas congeladas. Para el proceso de descongelación las pajillas fueron sumergidas en baño María a 37 °C por 30 segundos. Inmediatamente los espermatozoides se reconstituyeron en diluyente MR-A®3, KUBUS en una dilución 1:6 (v:v) y se incubó a 37 °C por 10 min. Para retirar el diluyente de congelación se realizaron tres lavados por centrifugación en MR-A®3, a 3000 rpm por 3 min. La muestra espermática obtenida fue utilizada para los procedimientos posteriores.

6.6 Capacitación espermática y reacción acrosomal

Las muestras de espermatozoides frescos y congelados-descongelados (300 x 10⁶ células) fueron divididas en dos alícuotas. La primera alícuota (100 x 10⁶ células/ml) fue designada como espermatozoides frescos o congelados-descongelados no capacitados (espermatozoides no tratados) y fueron resuspendidos en diluyente MR-A®3. La segunda alícuota (200 x 10⁶ células/ml) fue utilizada para incubar a los espermatozoides e inducir la capacitación *in vitro* y la reacción acrosomal de los espermatozoides frescos o congelados-descongelados de verraco. Estos grupos se denominaron espermatozoides capacitados y capacitados con reacción acrosomal respectivamente.

Antes de la incubación, los espermatozoides frescos y congelados-descongelados fueron purificados pasando por un gradiente de densidad de Ficoll al 20 % (Sigma®) en diluyente MR-A®3 para asegurar que solo las células vivas e integras fueran empleadas en los ensayos experimentales. El mismo procedimiento se realizó posteriormente con los espermatozoides frescos y congelados-descongelados no capacitados. Los espermatozoides colocados en el gradiente de Ficoll al 20 % fueron centrifugados a 2500 rpm durante 10 min a

temperatura ambiente, luego se realizaron 3 lavados por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min y la pastilla se resuspendió en diluyente MR-A®3 entre lavados.

Las muestras de espermatozoides frescos y congelados-descongelados posterior al enriquecimiento de las células vivas para inducir la capacitación *in vitro* y la reacción acrosomal previamente se ajustaron a una concentración de 100×10^6 células/ml y luego se incubaron en medio de capacitación TALP (modified HEPES-buffered Tyrode's médium, Cell and Molecular Technologies, Levallete, NJ), (1ml de medio de capacitación / 25×10^6 células). El medio HEPES-Tyrode-albumina-lactato-piruvato contenía: NaCl: 116.0 mM, KCl: 3.1 mM, NaHCO₃: 15.0 mM (J.T. Baker®), NaH₂PO₄: 0.3 mM (Merck®), lactato de sodio: 21.7 mM, MgSO₄: 0.4 mM, CaCl₂H₂O: 4.5 mM, HEPES: 20.0 mM, Rojo fenol: 20 ug/ml, Piruvato de sodio: 1.0 mM (Sigma Aldrich®), BSA: 3 mg/ml, glucosa: 5.00 mM (Amresco®) y gentamicina: 100 ug/ml (Tornel Laboratorios®); pH 7.4 y 270-290 mosmol. La incubación se llevó a cabo durante 2 h a 38 °C, 5% de CO₂, y 100 % de humedad relativa para conseguir la capacitación *in vitro* y 4 h para inducir la reacción acrosomal de los espermatozoides de verraco.

Las muestras de espermatozoides tanto frescos como congelados-descongelados de cada uno de los grupos experimentales: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal fueron procesados y asignados para los diferentes procedimientos que incluyen la inmunocitoquímica, la extracción de proteínas de la teca perinuclear usada para la técnica de western blot, la co-inmunoprecipitación y la evaluación espermática de la vitalidad y el estado acrosomal.

6.7 Inmunocitoquímica

Para la inmunocitoquímica previamente se prepararon las laminillas donde se realizó un círculo para la colocación de la muestra de espermatozoides, se lavaron y se dejaron secar al ambiente. Las muestras de espermatozoides ajustada a una concentración de 100×10^6 células/ml de cada grupo experimental frescos o congelados-descongelados en los diferentes estados fisiológicos, se fijaron con paraformaldehído al 4 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.76 mM KH₂PO₄, 17.4 mM

Na₂HPO₄). Luego se extendieron mediante frotis en laminillas portaobjetos de microscopio, se realizó la hidratación de las células mediante pases rápidos en un gradiente descendente de alcohol etílico: 100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 % y agua destilada. Se dibujó una circunferencia con un marcador hidrófobo (Liquid-repellent Slide Marker Pen, NewComerSupply®) alrededor de la muestra e inmediatamente se colocó 100 µl de solución para permeabilizar (Triton X-100 al 0.2 %, Tween 20 al 0.1 % en PBS) y se mantuvieron en agitación por 20 min. Transcurrido este tiempo se realizaron lavados con PBS, PBS-Tween (Tween 20 al 0.1 % en PBS) y PBS. A continuación, se añadió 100 µl de solución de peróxido al 3 % (peróxido de hidrogeno H₂O₂) y se dejó actuar por 10 min. Este procedimiento se realizó por tres veces con lavados entre cada uno. Posteriormente se colocó 100 µl del bloqueador de proteínas Background Sniper (Kit comercial, Biocare Medical®) y se mantuvieron en agitación por 10 min. Este procedimiento se realizó por cuatro veces. Luego, las muestras se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios apropiados: anti-fosfotirosina (p-Tyr PY20, sc-508, Santa Cruz Biotechnology, INC®. dilución 1:50), anti-gelsolina (Gelsolin c-20, sc-6406, Santa Cruz Biotechnology, INC®. dilución 1:25); anti-PIP₂ (PIP₂ 2c-11, sc-53412, Santa Cruz Biotechnology, INC. dilución 1:50); anti-SRC (SRC, SAB4502845, Sigma-Aldrich®, dilución 1:100) y anti-PLC-ζ (PLCZ1, OABF01559, Aviva Systems Biology®, dilución 1:100), excepto en las laminillas del control negativo donde se colocó bloqueador de proteína Background Sniper (Biocare Medical®).

Después de la incubación con el anticuerpo primario, se lavaron las laminillas en PBS, PBS-Tween, TBS rojo fenol, PBS. Enseguida se colocó 50 µl de la solución de peróxido al 3% y se incubó por 10 min. Luego se añadió 50 µl del Trekkie Universal Link (Biocare Medical®) o goat anti-mouse IgG-HRP, dilución 1:100 (Sigma®) utilizado como anticuerpo secundario biotinilado y se dejó incubar durante 30 minutos. Al finalizar se efectuó el lavado como ha sido descrito. Inmediatamente se colocó en cada una de las muestras 50 µl de Trek Avidin HRP Label (Biocare Medical®) que contiene estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) y se incubaron por 20 min. A continuación, se adicionaron 60 µl del cromógeno preparado (Betazoid DAB Chromogen) diluido en Betazoid DAB Sustrate Buffer (Biocare Medical®) y se incubó durante

5 min, de tal forma que los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron utilizando el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa (LSAB) con tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina como sustrato cromogénico.

Luego las muestras se tiñeron con 50 µl de hematoxilina por 1 min. Al finalizar el tiempo de tinción las laminillas se lavaron en agua destilada y seguidamente fueron deshidratadas por pases rápidos en concentraciones ascendentes de alcohol etílico: 70 %, 80 %, 90 %, 96 % y 100%. Finalmente, las laminillas se lavaron en xilol al 60% para retirar el marcador hidrófobo e inmediatamente sobre la muestra se colocó una gota de resina sintética (HYCEL®) que se cubrió con una lámina portaobjetos. Todas las laminillas se dejaron secar al ambiente durante 24 h hasta su observación.

La inmunocitoquímica se evaluó usando un microscopio Leica DMLS a 1000 aumentos de magnificación (lente objetivo 100X) que estaba acoplado a una cámara digital Leica DMLS y un software de visualización XL View, versión 6.2.4.5 para la observación de la coloración marrón correspondiente a la localización de las proteínas y moléculas específicas en los diferentes subdominios del espermatozoide. Se efectuó el conteo de 100 espermatozoides por laminilla.

6.8 Extracción de proteínas de la teca perinuclear

Las muestras de espermatozoides ajustadas a una concentración de 200×10^6 células /ml de cada grupo experimental frescos o congelados-descongelados en los diferentes estados fisiológicos (NC, C, RA) fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C por 3 veces y luego fueron resuspendidos en 1 ml de DPBS + Inhibidores de fosfatasa (Phosphatase Inhibitor Cocktail tablets-Phosphostop®, Roche Diagnostics) y proteasas (Phosphatase Inhibitor Cocktail tablets Complete®, Roche Diagnostics). Inmediatamente los espermatozoides fueron sonicados (QSonica Sonicators, Q125, Churchill Hill Road Newton, CT) a 65% de amplitud durante 10 segundos por tres veces para facilitar la separación de cabezas y colas de los espermatozoides. La muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min y la pastilla fue lavada tres veces en 1 ml de DPBS + Inhibidores de fosfatasa (Phosphostop®) y proteasas (Complete®) entre lavados, recuperando con ello las cabezas espermáticas localizadas en el

sedimento o pastilla. Posteriormente la muestra fue tratada con 65 μ l de Brij 36-T al 10 % y se incubó por 45 segundos a 4 °C, luego se centrifugo a 3000 rpm durante 5 min por dos veces y la pastilla se resuspendió en 1 ml de DPBS + Inhibidores de fosfatasas (Phosphostop®) y proteasas (Complete®) entre lavados. Nuevamente la muestra se resuspendió en 1ml de DPBS + Inhibidores de fosfatasas (Phosphostop®) y proteasas (Complete®) y fue tratada con 65 μ l Brij 36-T 10 % y 75 μ l de Dithiothreitol 50 mM (DTT). Se incubó durante 30 min a 4 °C. Por último, las muestras fueron centrifugadas a 13500 rpm durante 15 min a 4 °C. Para la precipitación de las proteínas extraídas, los sobrenadantes fueron recuperados, previamente muestras alícuotas fueron tomadas para la cuantificación de proteínas y el resto adicionados con 1 ml acetona fría y mantenidos en congelación por 24 h. Las pastillas obtenidas fueron fijadas en paraformaldehído 4 % y refrigeradas. Las proteínas precipitadas con acetona fueron obtenidas por centrifugación a 13500 rpm durante 15 min a 4°C. La pastilla formada se resuspendió en 20 μ l de agua ultrapura y se les adicionó amortiguador de carga (Loading buffer: 2x Laemmli buffer: 4% SDS 10%, 2-mercaptoethanol, 20% glicerol 0.004% azul de bromophenol, 0.125 M Tris-HCl) en una dilución 1:1 e inmediatamente las muestras se hirvieron a 95 °C durante 5 min.

La evaluación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de absorción a través de la medición de la absorbancia UV utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®) acoplado a un software ND-1000V3.5.2. Las proteínas precipitadas fueron posteriormente separadas en geles SDS-PAGE y transferidas a membranas PVDF para la inmunodetección de las proteínas en estudio.

6.9 Western blot

Para la inmunodetección, se utilizó una concentración de 30 μ g/ μ l de proteína. Las muestras experimentales y el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad®) fueron corridas en SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 10 %, amortiguador de corrida (Running buffer: Tris/glicina/SDS: 25 mM Tris, 190 mM glicina, 0.1 % SDS), durante 2 h 30 min, inicialmente con un voltaje de 90 voltios (V) y finalizando con 110 V. Luego las

proteínas separadas en los geles se electrotransfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno o PVDF (Transfer membrane - Inmobilon® - P) durante 2 h a 250 miliamperios (mA). (Transfer buffer: 25 mM Tris, 190 mM glicina, 20 % metanol).

Una vez transferidas las proteínas, los sitios no específicos de las membranas se bloquearon por incubación en albumina al 0.5 % en solución salina tamponada con Tris (TBS: NaCl 150 mM, 100 mM Tris-HCl, pH 7.6) suplementada con monolaurato de polioxietilensorbitano al 0,1 % (Tween 20, Merck®) durante 1 h. Posteriormente, las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación con el anticuerpo primario específico: anti-gelsolina (Gelsolin c-20, sc-6406, Santa Cruz Biotechnology, INC®; dilución 1:100), anti-SRC (SRC, SAB4502845, Sigma-Aldrich®; dilución 1:500) y anti-PLC- ζ (PLCZ1 antibody OABF01559, Aviva Systems Biology®; dilución 1:200); en solución de bloqueo (albumina 0.5 % + TBS-Tween).

Al siguiente día las membranas se lavaron cinco veces con TBS-Tween, luego se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación con 2 ml del anticuerpo secundario: IgG anti-goat o anti-rabbit (2° Antibody Solution Alk Phos. conjugated) del Kit comercial Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection System de Novex®; o goat anti-mouse IgG-HRP, dilución 1:100 (Sigma®) y se lavaron nuevamente. Por último, las membranas se procesaron para revelar las bandas positivas de las proteínas, para ello se añadió el sustrato de quimioluminiscencia (Chemiluminescent Substrate-CDP Star®) del Kit comercial Western Breeze Chemiluminescent Immunodetection System de Novex® y se expusieron a películas Kodak BioMax XAR film (Kodak®) durante 5-10 min para su detección. Las películas posteriormente se procesaron en solución de revelado (Processing Chemicals KODAK D-19 Developer- Sigma®) y solución de fijación (Processing Chemicals KODAK Rapid Fixer- Sigma®) para su visualización. La intensidad de las bandas obtenidas se analizó por densitometría (OD: densidad óptica) utilizando el software ImageJ (Versión. 1.8.0_172, National Institutes of Health), el mismo que permite la medición de perfiles de densidad, alturas pico, así como la intensidad pico (promedio de la OD banda, INT) o el volumen (promedio de la OD la banda

multiplicado por su área, INT x mm²) de la banda del peso molecular esperado (Gassmann et al., 2009). Los resultados obtenidos se transformaron en porcentajes de densidad que representan la cantidad relativa de la proteína.

Las membranas además se despojaron mediante lavados en buffer stripping (10 % SDS, 0.5 M Tris - HCl, pH 6.8, 0.1 % 2-mercaptoetanol y agua ultrapura) y se volvieron a sondar luego de la incubación con anticuerpos primarios específicos. anti-gelsolina, anti-SRC y anti-PLC- ζ . Se utilizaron 30 μ g/ μ l de extracto de proteína de cerebro de rata como control positivo. Para el análisis y evaluación se realizaron tres replicas.

6.10 Co-inmunoprecipitación

Los espermatozoides no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal, tanto frescos como congelados-descongelados, fueron igualmente tratados para la extracción de proteínas de la TP. Una vez concentradas y cuantificadas las proteínas obtenidas, se tomaron 300 μ g de extracto proteico de cada grupo experimental y se incubó con 5 μ l del anticuerpo a precipitar: gelsolina (Gelsolin antibody OAAD00157) en buffer PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.76 mM KH₂PO₄, 17.4 mM Na₂HPO₄) durante toda la noche a 4 °C, sobre una plataforma basculante giratoria. Luego se añadió 10 μ l de Proteína G Plus/Proteína A agarosa (Calbiochem®) y nuevamente se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación.

Los inmunoprecipitados o complejos anticuerpo-Proteína G Plus/Proteína A agarosa fueron recuperados por centrifugación a 2500 rpm por 6 min a 4°C. Posteriormente el sedimento se lavó 3 veces por centrifugación a 2500 rpm por 5 min en buffer PBS. Después del lavado final, se eliminó el sobrenadante y el sedimento o pellet se resuspendió en 40 μ l de Buffer de muestra de electroforesis o amortiguador de carga. A continuación, las muestras se hirvieron durante 5 min y se almacenaron en congelación (-20 °C) hasta su análisis mediante SDS-PAGE y western blot para revelar las proteínas o moléculas co-inmunoprecipitadas. Se uso como control positivo las preparaciones totales de la proteína extraída de la TP de la cabeza de los espermatozoides de verraco.

6.11 Tinciones de evaluación espermática

6.11.1 Vitalidad espermática: Eosina-nigrosina

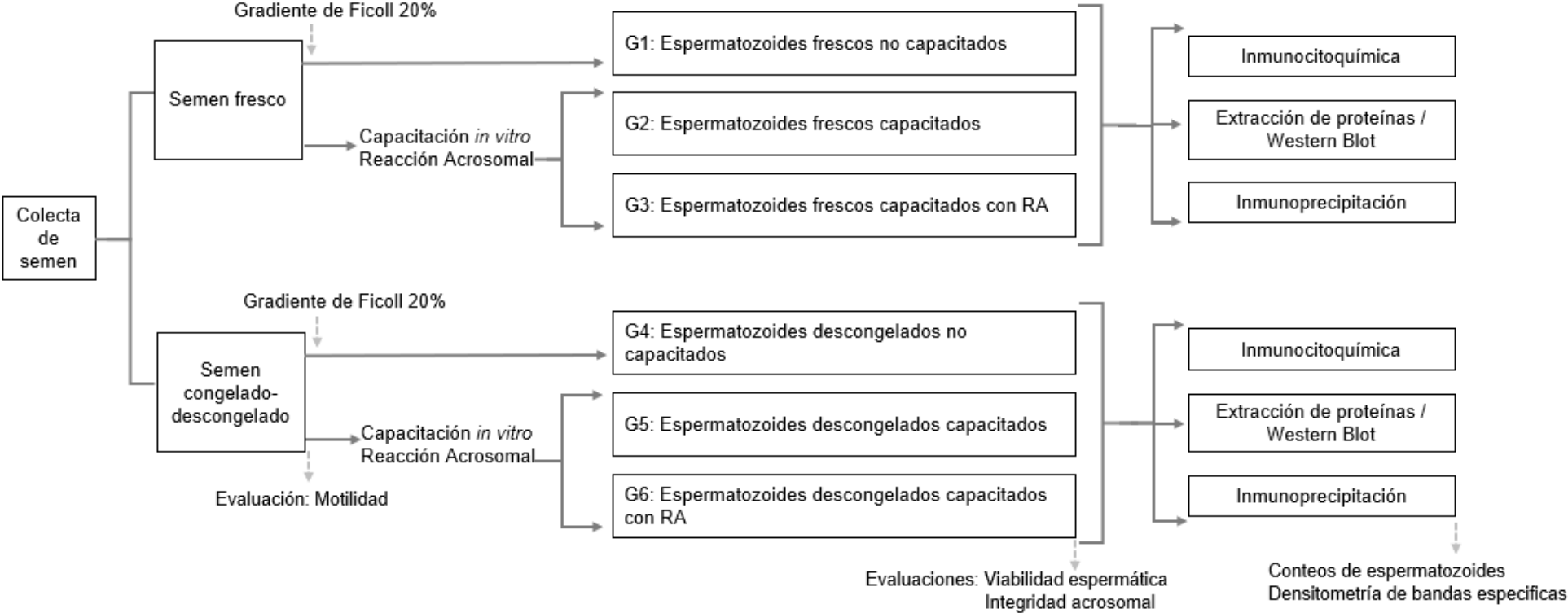
Para evaluar la vitalidad espermática se tomaron 10 μl de la tinción eosina-nigrosina (eosina 1 %, nigrosina 10 %, HYCEL®) y se mezcló con 40 μl de la muestra espermática ajustada a una concentración de 35×10^6 células /ml de cada grupo experimental, frescos o congelados-descongelados en los diferentes estados fisiológicos (NC, C, RA). Inmediatamente la muestra espermática se incubó por 5 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo se colocó una gota de 10 μl sobre portaobjetos y se realizó un frotis. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente para su posterior observación y lectura en un microscopio Leica DM500 con un lente objetivo 40x. Para la evaluación e interpretación se contaron 100 células y se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos, ya que éstos no se tiñeron, mientras que los espermatozoides muertos se tiñeron de color lila o rosado debido a que su membrana estaba dañada.

6.11.2 Integridad acrosomal: Azul de Comassie

Para evaluar la integridad del acrosoma la muestra de espermatozoides se ajustó a una concentración de 35×10^6 células /ml de cada grupo experimental frescos o congelados-descongelados en los diferentes estados fisiológicos (NC, C, RA). La muestra espermática se fijó con 100 μl de paraformaldehído al 4 % durante 15 min, luego se lavó por centrifugación a 3000 rpm/ 4 min durante 3 veces y se resuspendido con 100 μl medio DPBS (Gibco® by life Technologies) entre lavados. Después de la tercera centrifugación finalmente se resuspendió el pellet en 80 μl de Cloruro de amonio (50mM). A continuación, se colocó una gota de 10 μl sobre laminillas portaobjetos y se realizó el frotis. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente fueron sumergidas durante 10 min en un vaso copplin que contenía la tinción azul de Comassie (azul brillante G-250 0.1%, metanol 50 %, ácido acético glacial 100 % y agua bidestilada cbp.) posteriormente las laminillas se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al ambiente para su posterior observación y lectura en un microscopio Leica DM500 con un lente objetivo 40X. Para la evaluación e interpretación se contaron 100 células. La prueba azul de Comassie clasifica la integridad acrosomal como: integra (acrosoma bien definido intensamente teñido), dañada (acrosoma

difusamente teñido, con pérdida de continuidad y/o pérdida de material) y ausente (ausencia definitiva del acrosoma). Las dos pruebas de tinción para la evaluación espermática se hicieron por duplicado para cada grupo experimental.

Esquema de la Metodología de Investigación



6.12 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del factor estado fisiológico de los espermatozoides frescos y congelados-descongelados en las variables respuesta: patrón de fosforilación de proteínas en tirosina y localización de gelsolina, PIP₂, PLC-ζ, en los diferentes subdominios de la cabeza y el flagelo, se aplicó un diseño de un factor completamente aleatorizado como se describe en el siguiente arreglo:

Estado fisiológico de los espermatozoides frescos y congelados-descongelados					
Frescos No capacitados	Frescos Capacitados	Frescos Capacitados con RA	Descongelados No capacitados	Descongelados Capacitados	Descongelados Capacitados con RA
5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas
5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas
5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas
5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas	5 replicas

El análisis del modelo se realizó con la librería ez 4.4-0 (Analysis and Visualization of Factorial Experiments) del software estadístico R 3.6.2. El modelo se describe a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + \Phi_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_i : es la variable respuesta;

μ : es la media general;

Φ_j : es el efecto fijo del j-ésimo grupo (j= frescos no capacitados, frescos capacitados, frescos capacitados con RA, descongelados no capacitados, descongelados capacitados y descongelados capacitados con RA);

ϵ_{ij} : es el error aleatorio que se distribuye como una $N(0,1)$.

Se realizó el Análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existe evidencia estadística de un efecto del factor. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Fisher-LSD con ajuste de Bonferroni para el p-value. Se probaron los supuestos de normalidad, linealidad, heteroscedasticidad, datos influyentes, etc., con apoyo de la librería glmA 1.0.0.3 (Global Validation of Linear Models Assumptions), implementada en R.

Adicionalmente, para la técnica de western blot con los resultados de la densitometría (densidad óptica del área las bandas positivas) medidas a través del software ImageJ (Versión. 1.8.0_172, National Institutes of Health), de las bandas específicas correspondientes a las proteínas: gelsolina, tirosina cinasa SRC y fosfolipasa C- ζ , se realizó el Análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba Tukey para la comparación de medias. El modelo estadístico usado se presenta a continuación:

$$Y_{ij} = \mu + \Phi_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_i : es la variable respuesta;

μ : es la media general;

Φ_j : es el efecto fijo del j-ésimo grupo (j= frescos no capacitados, frescos capacitados, frescos capacitados con RA y en otro orden, descongelados no capacitados, descongelados capacitados, descongelados capacitados con RA);

ϵ_{ij} : es el error aleatorio que se distribuye como una $N \sim (0,1)$.

Se probaron los supuestos de normalidad y heteroscedasticidad.

En todas las pruebas se usó una $\alpha=0.05$, nivel de significancia. Para el análisis se usó el software estadístico R 3.6.2. (R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (URL <https://www.R-project.org/>). Finalmente, todas las gráficas se realizaron con el software GraphPad Prism Versión 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

7. RESULTADOS

Se obtuvieron en total seis muestras de eyaculados de tres verracos diferentes identificados como Bertrand, Lucky y Hemdalt (dos eyaculados por cada verraco) con una concentración espermática promedio de 380×10^6 células/ml, las mismas que fueron congeladas y utilizadas en fresco para los procedimientos posteriores: evaluación espermática, inmunocitoquímica, extracción de proteínas de la teca perinuclear para western blot y co-inmunoprecipitación que se describirán a continuación.

7.1 Evaluación espermática

Motilidad y morfología espermática

El porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides evaluada inmediatamente después que el semen fresco de los tres verracos llegó al laboratorio fue del 90 %; mientras que la motilidad progresiva promedio de los espermatozoides congelados-descongelados fue del 15 %. Además, se observaron muy pocos defectos en la morfología de los espermatozoides como presencia de gotas citoplasmáticas proximales y pieza intermedia doblada, pero fue menor al 1%.

Vitalidad de los espermatozoides frescos y congelados-descongelados en diferentes estados fisiológicos

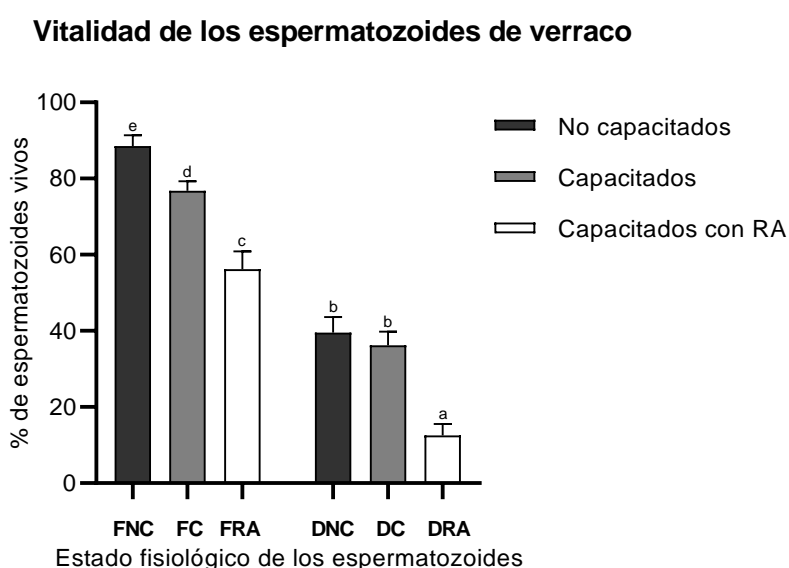
La evaluación de los espermatozoides de verraco teñidos con eosina-nigrosina (**Figura 7**) reveló lo siguiente. En los espermatozoides frescos el porcentaje de espermatozoides vivos se redujo significativamente ($p < 0.05$) después de la capacitación, y aún más después de la reacción acrosomal (**Gráfica 1**).



Figura 7: Espermatozoides de verraco teñidos con eosina-nigrosina: blancos= vivos; rosados= muertos. (Aumento 40X).

En los espermatozoides criopreservados se determinó que antes y después de la capacitación el porcentaje de viabilidad de las células espermáticas fue similar, pero disminuyó significativamente en los espermatozoides descongelados con reacción acrosomal.

Además, cuando se compararon los espermatozoides frescos con los espermatozoides congelados-descongelados en el mismo estado fisiológico, se observó que los espermatozoides criopreservados, tanto no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal habían reducido significativamente la viabilidad (**Gráfica 1**).



Gráfica 1: Porcentaje de espermatozoides vivos: frescos y congelados-descongelados de verraco. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

Integridad acrosomal de los espermatozoides frescos y congelados-descongelados en diferentes estados fisiológicos

Inicialmente, también se evaluó la integridad acrosomal de los espermatozoides de verraco a través de la tinción azul de Comassie (**Figura 8**). Se encontró que el 95.3 % de los espermatozoides frescos no capacitados mantenían el acrosoma intacto, mientras que en los espermatozoides frescos capacitados disminuyó al 84.8 %. La pérdida del acrosoma fue más evidente en los espermatozoides capacitados con reacción acrosomal, donde disminuyó significativamente el porcentaje de espermatozoides que mantenían el acrosoma intacto al 63.8 % (**Gráfica 3**).

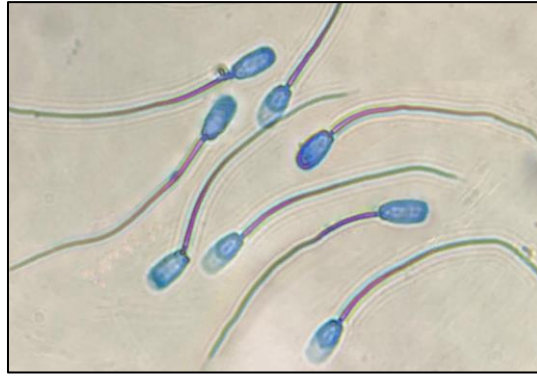
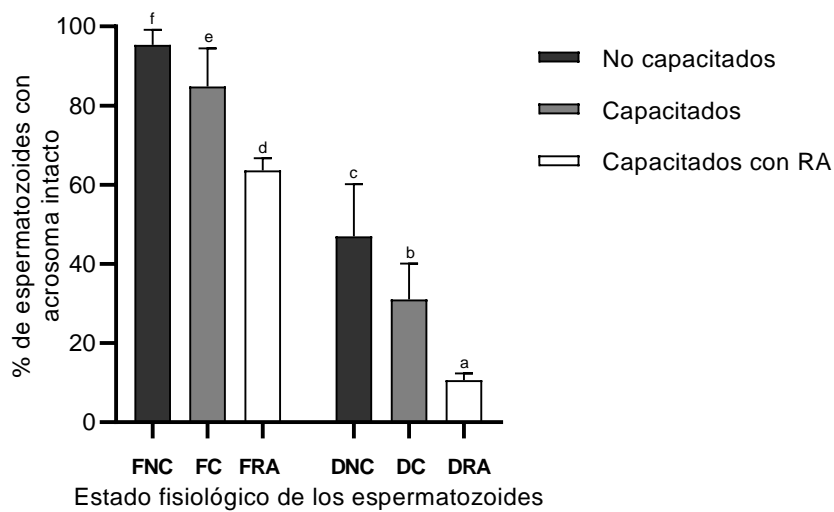


Figura 8: Espermatozoides de verraco teñidos con azul de comassie: acrosoma azul= intactos; acrosoma blanco= reaccionado. (Aumento 40X).

La evaluación de la integridad acrosomal luego de la crioconservación mostró que el 47 % de los espermatozoides descongelados no capacitados mantenían el acrosoma intacto, pero disminuyó significativamente después de la capacitación y la reacción acrosomal.

También, cuando comparamos la integridad acrosomal de los espermatozoides frescos con los espermatozoides congelados-descongelados en el mismo estado fisiológico, se observó que posterior a la crioconservación se habían reducido significativamente el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (**Gráfica 2**).

Integridad acrosomal de los espermatozoides de verraco



Gráfica 2: Porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto: frescos y congelados-descongelados de verraco. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

7.2 Inmunocitoquímica

Para esta técnica se realizaron 5 réplicas, que corresponden al número de laminillas que se prepararon para su observación. Dado que los espermatozoides frescos y congelados-descongelados se evaluaron en tres estados fisiológicos diferentes: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal y adicionalmente se preparó una laminilla como control negativo (espermatozoides sin exposición al anticuerpo específico) por cada antígeno o molécula a detectar se observaron 40 laminillas (20 de espermatozoides frescos y 20 de espermatozoides congelados-descongelados), esto significa que en total se evaluaron 200 laminillas.

A continuación, con la finalidad de investigar el efecto que tuvo el estado fisiológico del espermatozoide (capacitación y reacción acrosomal) en la fosforilación de proteínas en tirosina y la localización de gelsolina, PIP₂, tirosina cinasa SRC y PLC- ζ en los diferentes subdominios de la cabeza y el flagelo, primero se identificaron y se agruparon los subdominios del espermatozoide en cuatro patrones de localización individuales para cada molécula a detectar; posteriormente, se evaluó la proporción de células que mostraron cada patrón de localización en muestras de espermatozoides: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal. Para cuantificar las diferencias de las medias cada patrón de localización se comparó entre los tres diferentes estados fisiológicos. Se analizaron individualmente el patrón de fosforilación de proteínas en tirosina, la distribución de PIP₂ y la localización de gelsolina SRC y PLC- ζ en espermatozoides: frescos y en espermatozoides criopreservados.

Asimismo, para evaluar el efecto que tuvo la crioconservación y la desestabilización de la actina de la teca perinuclear sobre el patrón de fosforilación de proteínas en tirosina, la distribución de PIP₂ y la localización de gelsolina, SRC y PLC- ζ en los espermatozoides de verraco se realizó la comparación de las medias cada uno de sus patrones de localización establecidos entre espermatozoides frescos y espermatozoides congelados-descongelados.

Fosforilación de proteínas en tirosina

Localización de las proteínas fosforiladas en tirosina en espermatozoides frescos: no capacitados (FNC), capacitados (FC) y capacitados con reacción acrosomal (FRA)

La detección de la fosforilación de proteínas mediante inmunocitoquímica en los espermatozoides frescos mostró que estas se localizan predominantemente en el patrón de localización correspondiente a la región acrosomal y el segmento ecuatorial (**Figura 9**), subdominios del espermatozoide donde se observó un incremento significativo de la proporción de células que se inmunomarcaron con el anticuerpo anti-fosfotirosina después de la capacitación, en comparación con los espermatozoides no capacitados y persistió con una media similar después de la reacción acrosomal (**Tabla 2**).

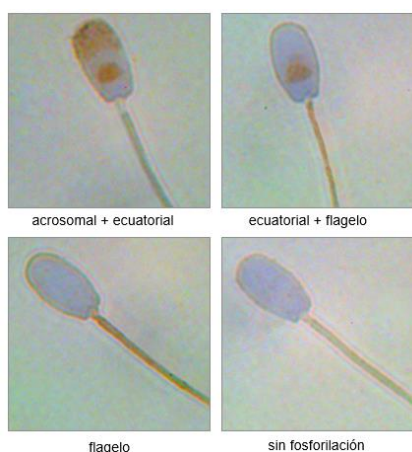


Figura 9: Patrones de localización de las proteínas fosforiladas en tirosina en espermatozoides de verraco

Por el contrario, la subpoblación de espermatozoides que se inmunomarcaron en el patrón de localización que contenía al segmento ecuatorial y el flagelo disminuyó significativamente en espermatozoides capacitados y con una media similar en espermatozoides que experimentaron la reacción del acrosoma. Por otro lado, en el patrón de localización que comprendía solo el flagelo no se evidenciaron cambios significativos, dado que las medias fueron similares después de la capacitación y la reacción acrosomal.

Tabla 2: Localización de las proteínas fosforiladas en tirosina en espermatozoides frescos de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización proteínas fosf-tyr	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados FNC (%)	Capacitados FC (%)	Capacitados con reacción acrosomal FRA (%)
Acrosomal + ecuatorial	57.8 ± 3.96 ^a	70.2 ± 6.53 ^b	66.6 ± 5.73 ^b
Ecuatorial + flagelo	28.6 ± 5.03 ^b	19.0 ± 6.20 ^a	23.2 ± 5.89 ^{ab}
Flagelo	9.0 ± 2.55	6.2 ± 1.92	7.6 ± 2.41
Sin fosforilación	4.6 ± 3.36	4.6 ± 1.82	2.6 ± 2.07

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a \text{ FLSD}$.

Localización de las proteínas fosforiladas en tirosina en espermatozoides descongelados: no capacitados (DNC), capacitados (DC) y capacitados con reacción acrosomal (DRA)

En los espermatozoides criopreservados igualmente se evaluaron los cambios en la fosforilación de proteínas en tirosina antes y después de la capacitación y en espermatozoides que habían experimentado la exocitosis del acrosoma. El análisis mostró que en el principal patrón de localización de las proteínas fosforiladas en los espermatozoides congelados-descongelados nuevamente correspondía a la región acrosomal y el segmento ecuatorial. Los espermatozoides descongelados no capacitados se inmunomarcaron principalmente en estas regiones de la cabeza espermática y este porcentaje aumentó significativamente ($p < 0.05$) después de la capacitación *in vitro*, manteniéndose en una proporción similar luego de la reacción acrosomal.

Asimismo, se observaron cambios significativos en la localización de proteínas fosforiladas el segmento ecuatorial + flagelo (**Figura 9**), donde la proporción de células que marcaron en este patrón de localización disminuyó luego de la capacitación, en comparación con los espermatozoides no capacitados, (**Tabla 3**).

Tabla 3: Localización de las proteínas fosforiladas en tirosina en espermatozoides congelados-descongelados de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización proteínas fosf-tyr	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados DNC (%)	Capacitados DC (%)	Capacitados con reacción acrosomal DRA (%)
Acrosomal + ecuatorial	67.2 ± 3.70 ^a	75.0 ± 4.06 ^b	68.8 ± 4.26 ^{ab}
Ecuatorial + flagelo	21.0 ± 5.29 ^b	12.6 ± 3.44 ^a	17.4 ± 3.51 ^{ab}
Flagelo	8.6 ± 3.13	10.0 ± 1.22	11.2 ± 2.39
Sin fosforilación	3.2 ± 2.17	2.4 ± 1.52	2.6 ± 1.82

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD.

Dado que la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en los espermatozoides de verraco se ha asociado con la criocapacitación; a continuación, se realizó la comparación de la localización de las proteínas fosforiladas en tirosina entre espermatozoides frescos y espermatozoides congelados-descongelados. El análisis evidenció un incremento significativo de la fosforilación de proteínas en los espermatozoides criopreservados no capacitados en la región acrosomal y en el segmento ecuatorial. En cambio, la fosforilación en la región ecuatorial y el flagelo en los espermatozoides frescos no capacitados fue significativamente mayor que la de los espermatozoides criopreservados no capacitados.

Tanto después de la capacitación espermática como de la reacción acrosomal de los espermatozoides de verraco se observaron aumentos significativos de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en el flagelo de los espermatozoides congelados-descongelados en comparación con los espermatozoides frescos, (**Tabla 4**).

Tabla 4 : Comparación de la localización de las proteínas fosforiladas en tirosina entre espermatozoides frescos y congelados-descongelados de verraco.

Localización gelsolina	No capacitados (%)	
	FNC	DNC
Acrosomal + ecuatorial	57.8 ± 3.96 ^a	67.2 ± 3.70 ^b
Ecuatorial + flagelo	28.6 ± 5.03 ^b	21.0 ± 5.29 ^a
Flagelo	9.0 ± 2.55	8.6 ± 3.13
Sin fosforilación	4.6 ± 3.36	3.2 ± 2.17
	Capacitados (%)	
	FC	DC
Acrosomal + ecuatorial	70.2 ± 6.53	75.0 ± 4.06
Ecuatorial + flagelo	19.0 ± 6.20	12.6 ± 3.44
Flagelo	6.2 ± 1.92 ^a	10.0 ± 1.22 ^b
Sin fosforilación	4.6 ± 1.82	2.4 ± 1.52
	Capacitados con reacción acrosomal (%)	
	FRA	DRA
Acrosomal + ecuatorial	66.6 ± 5.73	68.8 ± 4.2
Ecuatorial + flagelo	23.2 ± 5.89	17.4 ± 3.51
Flagelo	7.6 ± 2.41 ^a	11.2 ± 2.39 ^b
Sin fosforilación	2.6 ± 2.07	2.6 ± 1.82

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD.

Gelsolina

Localización de gelsolina en espermatozoides frescos: no capacitados (FNC), capacitados (FC) y capacitados con reacción acrosomal (FRA)

La **Tabla 5** resume las diferencias de medias encontradas en la localización de la proteína gelsolina (**Figura 10**) comparadas entre los tres estados fisiológicos (FNC, FC, FRA). Estos datos indicaron que el estado fisiológico de los espermatozoides influyó en la localización de la gelsolina.

En espermatozoides no capacitados gelsolina se detectó principalmente en el flagelo y en la región acrosomal, mientras que en espermatozoides capacitados la gelsolina aumentó significativamente en la región acrosomal y disminuyó en el flagelo. Por su parte, en los espermatozoides capacitados que experimentaron la reacción acrosomal, la presencia de gelsolina en el flagelo se incrementó,

retornado a niveles similares a los que tenía antes de la capacitación, con la correspondiente disminución significativa ($p < 0.05$) en la región acrosómica.

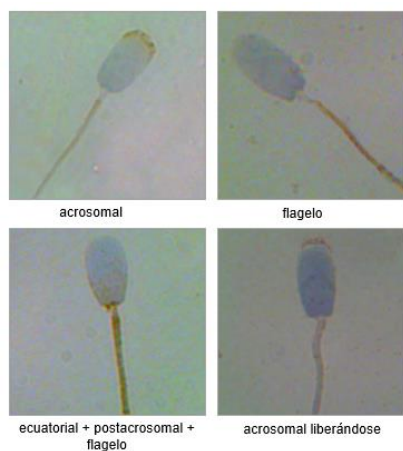


Figura 10: Patrones de localización de gelsolina en espermatozoides de verraco

Adicionalmente, se observó en los espermatozoides de verraco un patrón de gelsolina característico que se denominó: acrosomal liberándose, cuya localización fue observada en una proporción mucho mayor en espermatozoides con el acrosoma reaccionado en comparación con los espermatozoides frescos no capacitados y capacitados.

De tal manera que, se evidenció que en los espermatozoides frescos de verraco la capacitación *in vitro* y la exocitosis acrosómica inducen cambios en la localización de gelsolina principalmente es la región acrosomal de la cabeza espermática y el flagelo.

Tabla 5: Localización de gelsolina en espermatozoides frescos de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización gelsolina	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados FNC (%)	Capacitados FC (%)	Capacitados con reacción acrosomal FRA (%)
Acrosomal	33.8 ± 3.90 ^b	51.2 ± 8.79 ^c	24.2 ± 2.39 ^a
Flagelo	50.4 ± 8.11 ^b	30.2 ± 8.35 ^a	48.8 ± 9.09 ^b
Ecuatorial+post-acrosomal+flagelo	13.4 ± 5.02	15.6 ± 7.70	19.8 ± 11.65
Acrosomal liberándose	2.4 ± 0.89 ^a	3 ± 1.0 ^a	7.2 ± 3.70 ^b

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto

$|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a \text{ FLSD}$.

Localización de gelsolina en espermatozoides descongelados: no capacitados (DNC), capacitados (DC) y capacitados con reacción acrosomal (DRA)

El análisis cuantitativo de la localización de la gelsolina en espermatozoides descongelados de verraco evidenció diferencias significativas únicamente en el patrón de localización correspondiente a la región acrosomal. Se observó una disminución significativa en los espermatozoides descongelados capacitados con reacción acrosomal en comparación con los espermatozoides descongelados no capacitados.

Los otros tres patrones de localización mostraron una frecuencia de detección de gelsolina similares después de la capacitación y la exocitosis acrosómica sin diferencias estadísticas ($p > 0.05$), (**Tabla 6**).

Tabla 6: Localización de gelsolina en espermatozoides congelados- descongelados de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización gelsolina	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados DNC (%)	Capacitados DC (%)	Capacitados con reacción acrosomal DRA (%)
Acrosomal	17.8 ± 7.79 ^b	12.8 ± 5.67 ^{ab}	6.6 ± 1.52 ^a
Flagelo	33.6 ± 3.26	44.4 ± 12.18	42 ± 11.33
Ecuatorial+postacrosomal+flagelo	44.0 ± 7.84	40.6 ± 6.58	47.6 ± 9.13
Acrosomal liberándose	4.6 ± 2.89	2.2 ± 1.79	3.8 ± 3.11

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD.

A continuación, para conocer el efecto de la crioconservación y la desestabilización del citoesqueleto de actina de la TP sobre la localización de la gelsolina en los diferentes subdominios del espermatozoide, se compararon las medias encontradas de los diferentes patrones de localización entre espermatozoides frescos y espermatozoides descongelados en los tres estados fisiológicos. El análisis demostró que existen diferencias en los tres principales patrones de localización de gelsolina: acrosomal, ecuatorial + postacrosomal + flagelo y solo flagelo.

En el patrón de localización correspondiente a la región acrosomal la detección de gelsolina fue notablemente mayor en espermatozoides frescos en los tres estados fisiológicos en comparación con los espermatozoides descongelados, lo que evidencia claramente una reducción marcada de esta proteína en la región acrosómica en los espermatozoides criopreservados, concomitante con el incremento dramático en las regiones posteriores de la cabeza del espermatozoide, tal como se evidenció en la región ecuatorial + postacrosomal + flagelo en los espermatozoides descongelados, cuyas medias fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) en comparación con los espermatozoides frescos. La variación en estos dos patrones de localización de gelsolina evidencia principalmente alteraciones en la translocación de gelsolina a la región acrosomal durante la capacitación de los espermatozoides congelados-descongelados (**Tabla 7**).

Tabla 7: Comparación de la localización de gelsolina entre espermatozoides frescos y congelados-descongelados de verraco

Localización gelsolina	No capacitados (%)	
	FNC	DNC
Acrosomal	33.8 ± 3.90 ^b	17.8 ± 7.79 ^a
Flagelo	50.4 ± 8.11 ^b	33.6 ± 3.26 ^a
Ecuatorial+postacrosomal+flagelo	13.4 ± 5.02 ^a	44 ± 7.84 ^b
Acrosomal liberándose	2.4 ± 0.89	4.6 ± 2.89
	Capcitados (%)	
	FC	DC
Acrosomal	51.2 ± 8.79 ^b	12.8 ± 5.67 ^a
Flagelo	30.2 ± 8.35 ^a	44.4 ± 12.18 ^b
Ecuatorial+postacrosomal+flagelo	15.6 ± 7.70 ^a	40.6 ± 6.58 ^b
Acrosomal liberándose	3 ± 1.0	2.2 ± 1.79
	Capcitados con reacción acrosomal (%)	
	FRA	DRA
Acrosomal	24.2 ± 2.39 ^b	6.6 ± 1.52 ^a
Flagelo	48.8 ± 9.09	42 ± 11.33
Ecuatorial+postacrosomal+flagelo	19.8 ± 11.65 ^a	47.6 ± 9.13 ^b
Acrosomal liberándose	7.2 ± 3.70	3.8 ± 3.11

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD

Fosfatidilinositol (4-5) bifosfato: PIP₂

Distribución del fosfatidil inositol (4-5) bifosfato en espermatozoides frescos: no capacitados (FNC), capacitados (FC) y capacitados con reacción acrosomal (FRA).

Uno de los elementos importantes evaluados en esta investigación es la localización y distribución del fosfatidil inositol (4-5) bifosfato (**Figura 11**) en la membrana plasmática de los espermatozoides de verraco, considerado que el PIP₂ es un fosfoinosítido crucial en la fisiología espermática. La **Tabla 8** resume las diferencias de las medias encontradas en los diferentes patrones de localización del PIP₂ en los tres estados fisiológicos (FNC, FC y FRA) de los espermatozoides frescos de verraco.



Figura 11: Distribución del PIP₂ en espermatozoides de verraco.

Los resultados evidenciaron diferencias estadísticas en los dos principales patrones de localización. El PIP₂ en la región acrosomal incrementó significativamente luego de la capacitación espermática y más tarde disminuyó en espermatozoides con reacción acrosomal.

En el patrón de localización “solo flagelo” también se encontraron cambios en la detección de PIP₂ cuando se compararon las medias de los tres estados fisiológicos. Disminuyó después de la capacitación de los espermatozoides, mientras que en espermatozoides con reacción acrosomal incremento significativamente ($p < 0.05$).

Tabla 8: Distribución de PIP₂ en espermatozoides frescos de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización PIP ₂	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados FNC (%)	Capacitados FC (%)	Capacitados con reacción acrosomal FRA (%)
Acrosomal	24.2 ± 3.42 ^b	29.6 ± 6.66 ^c	10.4 ± 4.16 ^a
Ecuatorial+postacrosomal+flagelo	33 ± 15.02	38.8 ± 8.41	30.6 ± 5.55
Ecuatorial+ flagelo	5.4 ± 1.52	4.2 ± 0.84	7 ± 1.58
Flagelo	37.4 ± 14.24 ^b	27.4 ± 3.78 ^a	52 ± 4.47 ^c

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a \text{ FLSD}$.

Distribución del fosfatidil inositol 4-5 bifosfato en espermatozoides descongelados: no capacitados (DNC), capacitados (DC) y capacitados con reacción acrosomal (DRA).

El análisis de la distribución del PIP₂ en los espermatozoides congelados-descongelados evidenció cambios significativos únicamente en dos patrones de localización establecidos para este fosfoinosítido (**Tabla 9**). En el segmento ecuatorial + región postacrosomal + flagelo se encontró que en los espermatozoides criopreservados después de la capacitación la frecuencia de detección de PIP₂ fue similar a los datos observados antes de la capacitación, pero disminuyó significativamente en espermatozoides que alcanzaron la reacción acrosomal.

Por el contrario, en el patrón de localización “solo flagelo” la inmunodetección del PIP₂ disminuyó después de la capacitación *in vitro*, pero volvió a elevarse en espermatozoides con reacción acrosomal. Además, la detección del PIP₂ en la región acrosomal no experimentó cambios significativos, dado que los niveles de este fosfoinosítido en la membrana plasmática fueron bajos desde antes de la capacitación de los espermatozoides (**Tabla 9**).

Tabla 9: Distribución de PIP₂ en espermatozoides congelados-descongelados de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización PIP ₂	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados DNC (%)	Capacitados DC (%)	Capacitados con reacción acrosomal DRA (%)
Acrosomal	7.8 ± 1.79	5.6 ± 2.89	3.6 ± 2.30
Ecuatorial+postacrosomal+flagelo	47.4 ± 4.83 ^{ab}	50.4 ± 4.10 ^b	39.6 ± 0.05 ^a
Ecuatorial+ flagelo	4.2 ± 3.11	5.8 ± 2.49	4.8 ± 1.48
Flagelo	40.6 ± 7.64 ^a	38.2 ± 3.77 ^a	52 ± 2.0 ^b

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD

Cuando se compararon las medias en los diferentes patrones de localización establecidos para PIP₂ entre los espermatozoides frescos y descongelados se evidenció que luego de la crioconservación la distribución de PIP₂ había cambiado. Se observó en los espermatozoides criopreservados en los tres estados fisiológicos (no capacitados, capacitados y capacitados con RA) una reducción significativa en la detección de PIP₂ en el patrón de localización de la región acrosomal en comparación con los espermatozoides frescos.

Por el contrario, en el patrón de localización: ecuatorial + postacrosomal + flagelo antes y después de la capacitación la detección de PIP₂ fue menor en espermatozoides frescos en comparación con los espermatozoides descongelados, (**Tabla 10**).

Tabla 10: Comparación de la distribución de PIP₂ entre espermatozoides frescos y congelados-descongelados de verraco

Localización PIP ₂	No capacitados (%)	
	FNC	DNC
Acrosomal	24.2 ± 3.42 ^b	7.8 ± 1.79 ^a
Ecuatorial + postacrosomal + flagelo	33 ± 15.02 ^a	47.4 ± 4.83 ^b
Ecuatorial+ flagelo	5.4 ± 1.52	4.2 ± 3.11
Flagelo	37.4 ± 14.24	40.6 ± 7.64
	Capcitados (%)	
	FC	DC
Acrosomal	29.6 ± 6.66 ^b	5.6 ± 2.89 ^a
Ecuatorial + postacrosomal + flagelo	38.8 ± 8.41 ^a	50.4 ± 4.10 ^b
Ecuatorial+ flagelo	4.2 ± 0.84	5.8 ± 2.49
Flagelo	27.4 ± 3.78 ^a	38.2 ± 3.77 ^b
	Capcitados con reacción acrosomal (%)	
	FRA	DRA
Acrosomal	10.4 ± 4.16 ^b	3.6 ± 2.30 ^a
Ecuatorial + postacrosomal + flagelo	30.6 ± 5.55	39.6 ± 3.05
Ecuatorial+ flagelo	7 ± 1.58	4.8 ± 1.48
Flagelo	52 ± 4.47	52 ± 2.0

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD.

Tirosina quinasa SRC

Localización de la tirosina cinasa SRC en espermatozoides frescos: no capacitados (FNC), capacitados (FC) y capacitados con reacción acrosomal (FRA)

Este estudio además evaluó los patrones de localización de la proteína tirosina quinasa SRC, importante regulador de la capacitación y la reacción acrosomal. Además, se observó como esta enzima cambia su localización de acuerdo al estado fisiológico del espermatozoide. Se encontraron cuatro sitios de localización en los que predominaron la marca para la SRC en el espermatozoide (**Figura 12**).

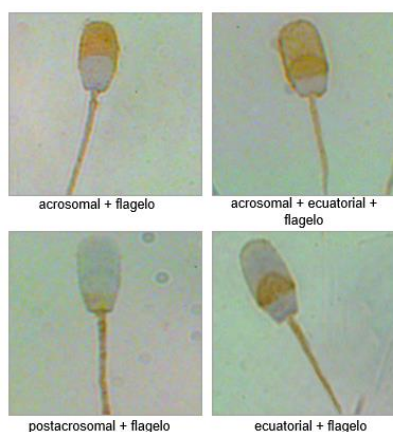


Figura 12: Patrones de localización de la tirosina cinasa SRC en espermatozoides de verraco

En los espermatozoides frescos antes de la capacitación la SRC se localizó principalmente en el patrón que comprendía la región acrosomal, segmento ecuatorial y el flagelo, en estos mismos sitios se mantuvo en niveles similares después de la capacitación, pero disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en espermatozoides capacitados con reacción acrosomal.

Otro patrón de localización en el que se determinaron cambios significativos fue el denominado ecuatorial + flagelo, muy característico por la marca intensa en forma de media luna en el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide. En este patrón de localización se observó que los espermatozoides de verraco que experimentaron la reacción del acrosoma incrementaron significativamente la marca para la SRC en comparación con espermatozoides capacitados y no capacitados (**Tabla 11**).

Tabla 11: Localización de la tirosina quinasa SRC en espermatozoides frescos de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización SRC	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados FNC (%)	Capcitados FC (%)	Capcitados con reacción acrosomal FRA (%)
Acrosomal + flagelo	8.6 ± 3.05	7.4 ± 2.30	11.6 ± 0.89
Acrosomal + ecuatorial + flagelo	78.6 ± 4.04 ^b	74.8 ± 3.70 ^b	51 ± 7.18 ^a
Post acrosomal + flagelo	0.8 ± 0.84	1.4 ± 0.89	2.4 ± 0.55
Ecuatorial + flagelo	12 ± 5.15 ^a	16.4 ± 1.67 ^a	35 ± 6.82 ^b

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a \text{ FLSD}$.

Localización de la tirosina cinasa SRC en espermatozoides descongelados: no capacitados (DNC), capacitados (DC) y capacitados con reacción acrosomal (DRA)

En espermatozoides descongelados la evaluación de la localización de SRC posterior a la inmunocitoquímica mostró que su principal sitio de detección se encontraba en el patrón de localización: acrosomal + ecuatorial + flagelo. Cuando se compararon sus medias entre los diferentes estados fisiológicos se encontró que la frecuencia de detección de SRC se mantenía similar antes y después de la capacitación; sin embargo, en espermatozoides con acrosoma reaccionado se redujo significativamente la frecuencia de detección de este patrón de localización.

El patrón de localización de la SRC en las regiones post acrosomal + flagelo en los espermatozoides descongelados fue el menos frecuente comparado con los otros patrones de localización, pero después de la capacitación espermática y la reacción acrosomal de los espermatozoides la inmunodetección de SRC en este patrón aumento significativamente, lo que indica que el aumento de SRC se limitó a los grupos que fueron incubados en medio de capacitación (**Tabla 12**).

Tabla 12: Localización de la tirosina quinasa SRC en espermatozoides congelados-descongelados de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización de SRC	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados DNC (%)	Capcitados DC (%)	Capcitados con reacción acrosomal DRA (%)
Acrosomal + flagelo	10.2 ± 3.42	11.2 ± 4.71	10 ± 3.67
Acrosomal + ecuatorial + flagelo	65.6 ± 2.70 ^b	61.4 ± 2.30 ^{ab}	57.4 ± 2.30 ^a
Post acrosomal + flagelo	1.4 ± 1.67 ^a	3.8 ± 2.68 ^b	4.4 ± 2.30 ^b
Ecuatorial + flagelo	22.8 ± 3.83	23.6 ± 3.36	28.2 ± 3.56

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a \text{ FLSD}$.

Al realizar la comparación de los cuatro patrones de localización de la tirosina quinasa SRC entre espermatozoides frescos y espermatozoides descongelados para conocer si el proceso de crioconservación y la desestabilización del

citoesqueleto de actina de la TP influyó en los cambios de localización de esta proteína. Además, se evidenció que el patrón de localización acrosomal + ecuatorial + flagelo fue el principal sitio de localización de SRC tanto en espermatozoides frescos como para espermatozoides descongelados. Sin embargo, antes y después de la capacitación la media de espermatozoides frescos que inmunomarcaron SRC en la región acrosomal + ecuatorial + flagelo fue significativamente mayor en comparación a los espermatozoides congelados-descongelados (**Tabla 13**).

El segundo patrón de localización, que comprende el segmento ecuatorial y el flagelo, incrementó significativamente en los espermatozoides criopreservados antes y después de la capacitación, aunque esta dinámica se revirtió en los espermatozoides descongelados con reacción acrosomal, donde la frecuencia de detección fue significativamente menor. El incremento de SRC en el segmento ecuatorial en los espermatozoides descongelados ocurrió de forma concomitante con la reducción de esta proteína en la región acrosomal.

Tabla 13: Comparación de la localización de la tirosina quinasa SRC entre espermatozoides frescos y congelados-descongelados de verraco

Localización SRC	No capacitados (%)	
	FNC	DNC
Acrosomal + flagelo	8.6 ± 3.05	10.2 ± 3.42
Acrosomal + ecuatorial + flagelo	78.6 ± 4.04 ^b	65.6 ± 2.70 ^a
Post acrosomal + flagelo	0.8 ± 0.84	1.4 ± 1.67
Ecuatorial + flagelo	12 ± 5.15 ^a	22.8 ± 3.83 ^b
	Capcitados (%)	
	FC	DC
Acrosomal + flagelo	7.4 ± 2.30	11.2 ± 4.71
Acrosomal + ecuatorial + flagelo	74.8 ± 3.70 ^b	61.4 ± 2.30 ^a
Post acrosomal + flagelo	1.4 ± 0.89 ^a	3.8 ± 2.68 ^b
Ecuatorial + flagelo	16.4 ± 1.67 ^a	23.6 ± 3.36 ^b
	Capcitados con reacción acrosomal (%)	
	FRA	DRA
Acrosomal + flagelo	11.6 ± 0.89	10 ± 3.67
Acrosomal + ecuatorial + flagelo	51 ± 7.18 ^a	57.4 ± 2.30 ^b
Post acrosomal + flagelo	2.4 ± 0.55	4.4 ± 2.30
Ecuatorial + flagelo	35 ± 6.82 ^b	28.2 ± 3.56 ^a

Los valores indican la media ± desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD.

Fosfolipasa C- ζ (PLC- ζ)

Localización de la PLC- ζ en espermatozoides frescos: no capacitados (FNC), capacitados (FC) y capacitados con reacción acrosomal (FRA)

Al identificar la localización de la PLC- ζ en los espermatozoides de verraco, se establecieron cuatro patrones de localización (**Figura 13**), los mismos que se compararon de acuerdo al estado fisiológico del espermatozoide para conocer los cambios durante la capacitación y la reacción acrosómica.

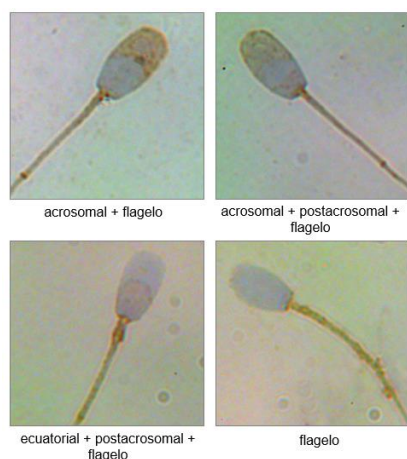


Figura 13: Patrones de localización de la PLC- ζ en espermatozoides de verraco

La **Tabla 14** muestra las diferencias de medias encontradas en la detección de PLC- ζ para los cuatro patrones de localización en diferentes estados fisiológicos de los espermatozoides frescos de verraco. Luego de la inmunocitoquímica se evidenció que en los patrones de localización: acrosomal + flagelo y acrosomal + postacrosomal + flagelo, la PLC- ζ disminuyó progresivamente a medida que los espermatozoides se capacitaban y experimentaron la reacción acrosomal, mientras que en la región ecuatorial + post acrosomal + flagelo y solamente flagelo, la PLC- ζ incrementó significativamente ($p < 0.05$).

En los espermatozoides frescos de verraco antes de la capacitación la PLC- ζ se localizó principalmente en la región acrosomal + flagelo y acrosomal + postacrosomal + flagelo, mientras que después de la capacitación y de la inducción de la reacción acrosomal su presencia en estos dos patrones de localización disminuyó significativamente, pero aumento de forma significativa en la región ecuatorial + post acrosomal + flagelo y solo flagelo. En todos los estados fisiológicos se mantuvo presencia de PLC- ζ en el flagelo (**Tabla 14**).

Tabla 14: Localización de PLC- ζ en espermatozoides frescos de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización PLC- ζ	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados FNC (%)	Capacitados FC (%)	Capacitados con reacción acrosomal FRA (%)
Acrosomal + flagelo	59.8 \pm 7.33 ^c	50.8 \pm 4.82 ^b	28 \pm 6.17 ^a
Acrosomal + postacrosomal + flagelo	28.2 \pm 6.01 ^c	17.4 \pm 3.36 ^b	7.2 \pm 2.95 ^a
Ecuatorial + postacrosomal + flagelo	6.2 \pm 4.82 ^a	18.4 \pm 6.43 ^b	46.8 \pm 7.19 ^c
Flagelo	5.8 \pm 3.11 ^a	13.4 \pm 1.52 ^b	18 \pm 3.81 ^c

Los valores indican la media \pm desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD.

Localización de la PLC- ζ en espermatozoides descongelados: no capacitados (DNC), capacitados (DC) y capacitados con reacción acrosomal (DRA)

En los espermatozoides de verraco sometidos al procedimiento de crioconservación la PLC- ζ se encontraba predominantemente en la región postacrosomal, segmento ecuatorial y el flagelo desde antes de la capacitación, y ese patrón se mantuvo con frecuencia similar en espermatozoides capacitados y espermatozoides capacitados con reacción acrosomal. En los tres tipos de espermatozoides este patrón fue más frecuente que cualquiera de los otros tres patrones de localización de PLC- ζ .

Como se evidencia en la **Tabla 15**, en los cuatro patrones de localización se encontraron cambios significativos al comparar las medias entre estados fisiológicos, pero estas diferencias se limitaron entre espermatozoides descongelados no capacitados y espermatozoides descongelados capacitados con reacción acrosomal.

Tabla 15: Localización de PLC- ζ en espermatozoides congelados-descongelados de verraco: no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal

Localización PLC- ζ	Estado fisiológico de los espermatozoides		
	No capacitados DNC (%)	Capacitados DC (%)	Capacitados con reacción acrosomal DRA (%)
Acrosomal + flagelo	12 \pm 2.65 ^b	7.8 \pm 1.30 ^{ab}	4.8 \pm 0.84 ^a
Acrosomal + postacrosomal + flagelo	9.2 \pm 2.77 ^b	6.6 \pm 1.82 ^{ab}	4.4 \pm 1.14 ^a
Ecuatorial + postacrosomal + flagelo	70.2 \pm 4.09 ^a	76 \pm 3.39 ^{ab}	77.8 \pm 4.32 ^b
Flagelo	8.6 \pm 1.52 ^a	9.6 \pm 3.44 ^{ab}	13 \pm 3.54 ^b

Los valores indican la media \pm desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD.

Para conocer los cambios y el efecto de la crioconservación y la desestabilización del citoesqueleto de actina sobre la localización de PLC- ζ se realizó la comparación de las medias de los cuatro patrones de localización establecidos para esta proteína entre espermatozoides frescos y espermatozoides descongelados de verraco. El análisis estadístico mostró que antes y después de la capacitación en los espermatozoides congelados-descongelados la detección de PLC- ζ en los patrones: acrosomal + flagelo y acrosomal + postacrosomal + flagelo había disminuido significativamente en comparación a la proporción que se había encontrado en espermatozoides frescos.

La disminución de PLC- ζ en la región acrosomal en los espermatozoides descongelados sucedió de forma concomitante con el aumento de la detección de PLC- ζ en el patrón: ecuatorial + post-acrosomal + flagelo, donde se observó un incremento dramático tanto en espermatozoides descongelados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal y significativamente mayor al observado en espermatozoides frescos (**Tabla 16**).

Tabla 16: Comparación de la localización de la PLCZ entre espermatozoides frescos y congelados-descongelados de verraco

Localización PLC- ζ	No capacitados (%)	
	FNC	DNC
Acrosomal + flagelo	59.8 \pm 7.33 ^b	12 \pm 2.65 ^a
Acrosomal + postacrosomal + flagelo	28.2 \pm 6.01 ^b	9.2 \pm 2.77 ^a
Ecuatorial + postacrosomal + flagelo	6.2 \pm 4.82 ^a	70.2 \pm 4.09 ^b
Flagelo	5.8 \pm 3.11	8.6 \pm 1.52
	Capcitados (%)	
	FC	DC
Acrosomal + flagelo	50.8 \pm 4.82 ^b	7.8 \pm 1.30 ^a
Acrosomal + postacrosomal + flagelo	17.4 \pm 3.36 ^b	6.6 \pm 1.82 ^a
Ecuatorial + postacrosomal + flagelo	18.4 \pm 6.43 ^a	76 \pm 3.39 ^b
Flagelo	13.4 \pm 1.52	9.6 \pm 3.44
	Capcitados con reacción acrosomal (%)	
	FRA	DRA
Acrosomal + flagelo	28 \pm 6.17 ^b	4.8 \pm 0.84 ^a
Acrosomal + postacrosomal + flagelo	7.2 \pm 2.95	4.4 \pm 1.14
Ecuatorial + postacrosomal + flagelo	46.8 \pm 7.19 ^a	77.8 \pm 4.32 ^b
Flagelo	18 \pm 3.81 ^b	13 \pm 3.54 ^a

Los valores indican la media \pm desviación estándar.

Promedios que no comparten literal en la misma fila son estadísticamente diferentes por obtener un valor absoluto $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \geq a$ FLSD.

7.3 Western Blot

Identificación de gelsolina en espermatozoides frescos y descongelados de verraco

El análisis de western blot de gelsolina de las muestras obtenidas de espermatozoides frescos detectó una banda principal de ~90 kDa, que es el peso molecular esperado para esta proteína en las preparaciones de los tres grupos experimentales (**Figura 14**), lo que confirmó la presencia de gelsolina en la teca perinuclear de los espermatozoides de verraco. Posteriormente, la evaluación de la densidad óptica del área de las bandas positivas, también conocida como intensidad, evidenció una disminución significativa después de la capacitación espermática, misma que se mantuvo hasta después de la reacción acrosomal. Estos hallazgos muestran que se libera la gelsolina en la cabeza espermática luego de la reacción acrosomal.

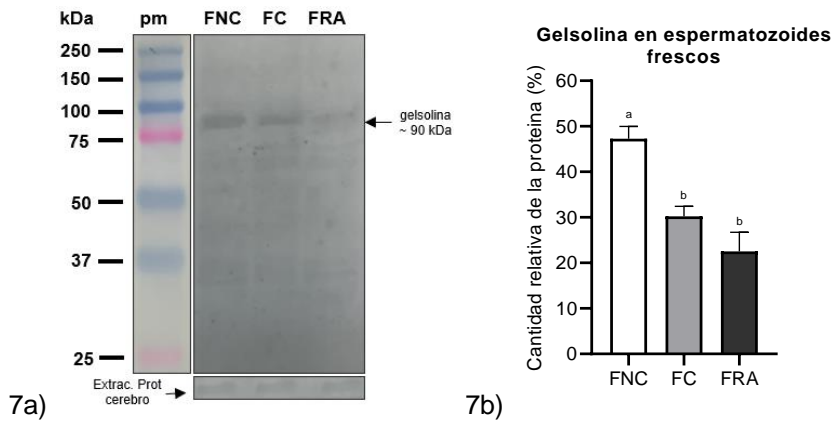


Figura 14: a) Análisis western blot de gelsolina detectada en muestras de proteína extraídas de la TP de espermatozoides frescos de verraco no capacitados, capacitados y capacitados con RA. Se indica una banda específica correspondiente a gelsolina de ~90 kDa. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa la cantidad relativa de la proteína en los tres grupos experimentales. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Por su parte, la densidad óptica del área las bandas identificadas para gelsolina (~90 kDa) en muestras extraídas de la cabeza de espermatozoides congelados-descongelados fue similar antes y después de la capacitación y en espermatozoides con reacción acrosomal. A pesar de no encontrarse un cambio significativo en la intensidad de las bandas y por consiguiente en la concentración relativa de la proteína al comparar entre los tres estados fisiológicos, como se ilustra en la **Figura 15**, se detectó la presencia de gelsolina en los lisados celulares extraídos de la TP de la cabeza de los espermatozoides descongelados de verraco de los tres grupos experimentales.

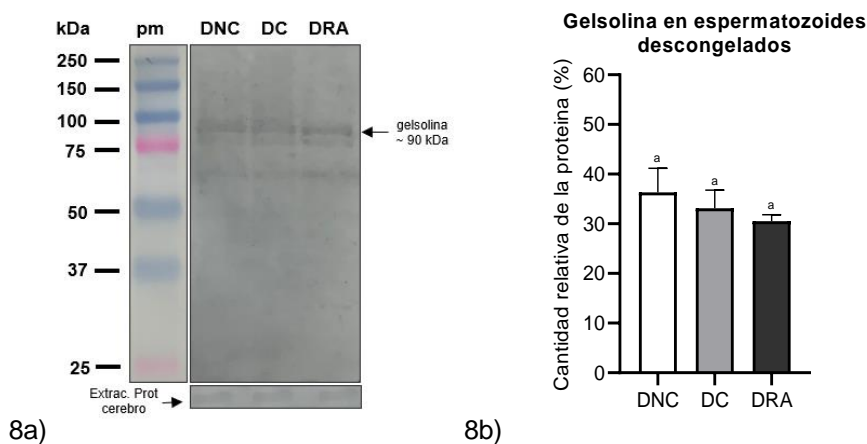


Figura 15: a) Análisis western blot de gelsolina detectada en muestras de proteína extraídas de la TP de espermatozoides descongelados de verraco no capacitados, capacitados y capacitados con RA. Se indica una banda principal correspondiente a gelsolina de ~90 kDa. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa la cantidad relativa de la proteína en los tres grupos experimentales. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Identificación de SRC en espermatozoides frescos y descongelados de verraco

La tirosina cinasa SRC fue identificada en los extractos de proteína obtenidos de la TP de la cabeza de los espermatozoides de verraco tal como se había predicho, aproximadamente en un peso molecular de ~59 kDa, detectado luego que las preparaciones de proteína de la TP se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizaron por western blot.

Como se muestra en la **Figura 16** el análisis de la densitometría de las bandas reveladas para SRC determinó un incremento significativo en la densidad óptica del área de la marca correspondiente a las muestras obtenidas de espermatozoides frescos capacitados. Por consiguiente, estos resultados evidencian que la cantidad relativa de la tirosina cinasa SRC aumentó durante la capacitación espermática, momento donde ejerce su actividad principal de fosforilación en tirosina sobre proteínas específicas en la cabeza de los espermatozoides. Sin embargo, más tarde en las muestras obtenidas de espermatozoides frescos con reacción acrosomal la intensidad de la banda disminuyó significativamente hasta un nivel similar al encontrado antes de la capacitación, datos que indirectamente muestran la disminución de la actividad de esta cinasa

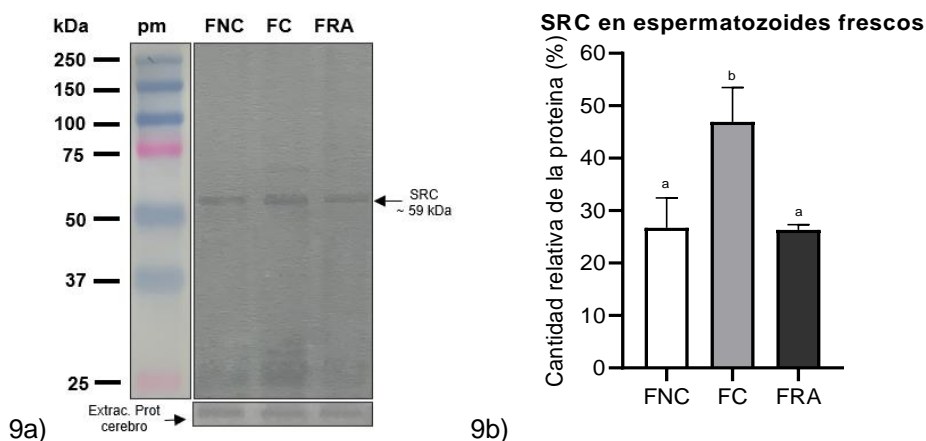


Figura 16: a) Análisis western blot de la tirosina quinasa SRC detectada en muestras de proteína extraídas de la TP de espermatozoides frescos de verraco no capacitados, capacitados y capacitados con RA. Se indica una banda principal correspondiente a gelsolina de ~59 kDa. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa la cantidad relativa de la proteína en los tres grupos experimentales. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Siguiendo el mismo procedimiento, en los espermatozoides descongelados de verraco, para investigar si la actividad de SRC cambia luego de la crioconservación o está influenciada por el estado fisiológico de los espermatozoides, se realizó el análisis por western blot utilizando anticuerpos anti-SRC para comparar la presencia y cantidad relativa de SRC en la TP de poblaciones de espermatozoides descongelados no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal.

Los resultados indicaron que la cantidad relativa de la tirosina cinasa SRC cuantificada de acuerdo a la densidad óptica del área de las bandas identificadas para esta proteína fue similar antes y después de la capacitación in vitro y en espermatozoides que alcanzaron la reacción acrosomal. Estos resultados muestran que en los espermatozoides criopreservados de verraco la cantidad relativa de SRC no se vio significativamente influenciada por el estado de capacitación de los espermatozoides (**Figura 17**).

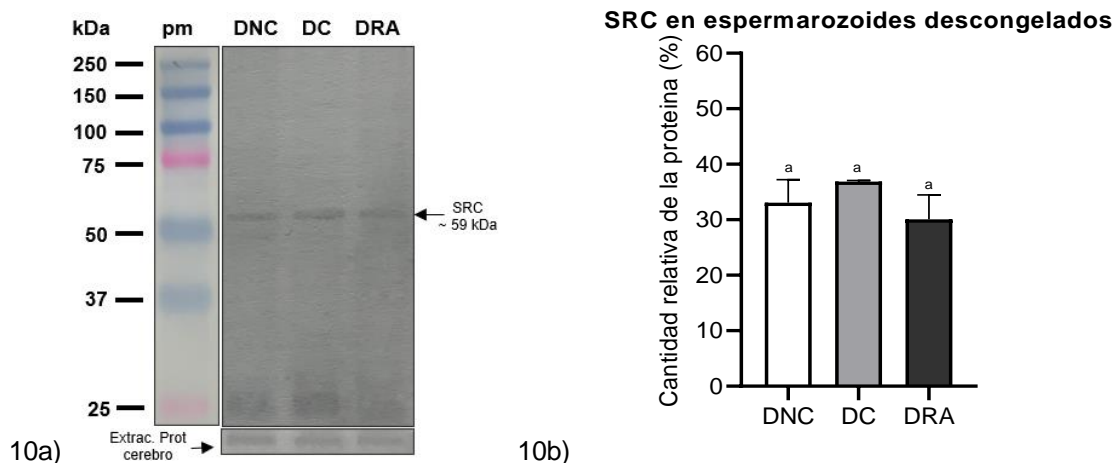


Figura 17: a) Análisis western blot de la tirosina quinasa SRC detectada en muestras de proteína extraídas de la TP de espermatozoides frescos de verraco no capacitados, capacitados y capacitados con RA. Se indica una banda principal correspondiente a gelsolina de ~59 kDa. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa la cantidad relativa de la proteína en los tres grupos experimentales. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Identificación de PLC- ζ en espermatozoides frescos y descongelados de verraco

El sondeo de la membrana PVDF empleando anticuerpos anti-PLC- ζ reveló una banda principal en la región de un peso molecular de ~72 kDa, que correspondía

a PLC- ζ (**Figura 18**), tal como se predijo sobre la base de los datos existentes de esta proteína en los espermatozoides de verraco.

A continuación, el análisis de la densidad óptica del área de las bandas individuales en los tres estados fisiológicos indicó que las marcas de la proteína detectada como PLC- ζ extraída de la teca perinuclear de células no capacitadas fue significativamente mayor en comparación con las marcas detectadas en las muestras de espermatozoides capacitados y con reacción acrosomal, donde la mancha fue evidentemente menos intensa.

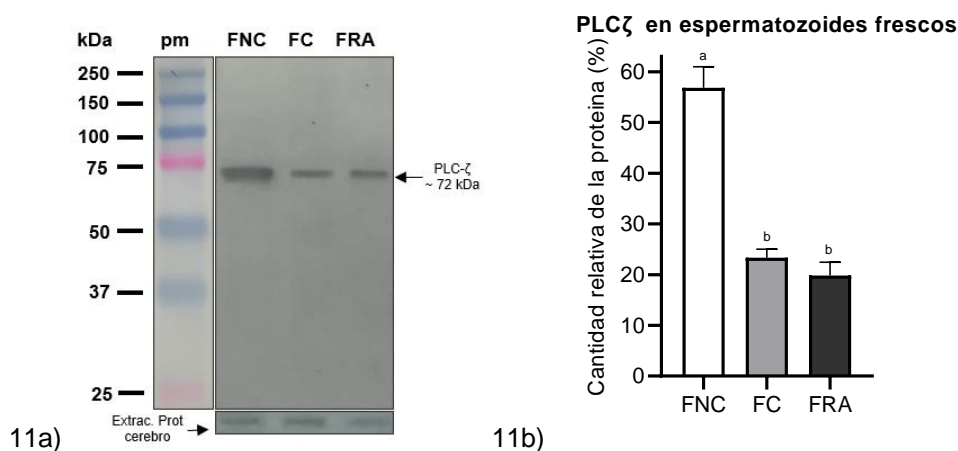


Figura 18: a) Análisis western blot de PLC- ζ detectada en muestras de proteína extraídas de la TP de espermatozoides frescos de verraco no capacitados, capacitados y capacitados con RA. Se indica una banda principal correspondiente a gelsolina de ~72 kDa. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa la cantidad relativa de la proteína en los tres grupos experimentales. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

A continuación, en las muestras extraídas de la TP de la cabeza de los espermatozoides congelados-descongelados no capacitados, capacitados y espermatozoides con reacción acrosomal, de igual manera el análisis de western blot después de SDS-PAGE detectó la presencia de PLC- ζ como una banda específica en un peso molecular de ~72 kDa, tal como se muestra en la **Figura 19**.

La evaluación posterior de la densitometría indicó que la intensidad en las bandas fue similar antes y después de la capacitación espermática, pero disminuyó significativamente en las muestras que habían sido extraídas de la TP de espermatozoides que experimentaron la reacción acrosomal. Estos hallazgos nuevamente evidencian que la cantidad relativa de PLC- ζ en los

espermatozoides se reduce luego de la reacción acrosomal, cuya pérdida supondría la liberación de esta proteína o estaría relacionado a la pérdida de la integridad acrosomal de los espermatozoides criopreservados.

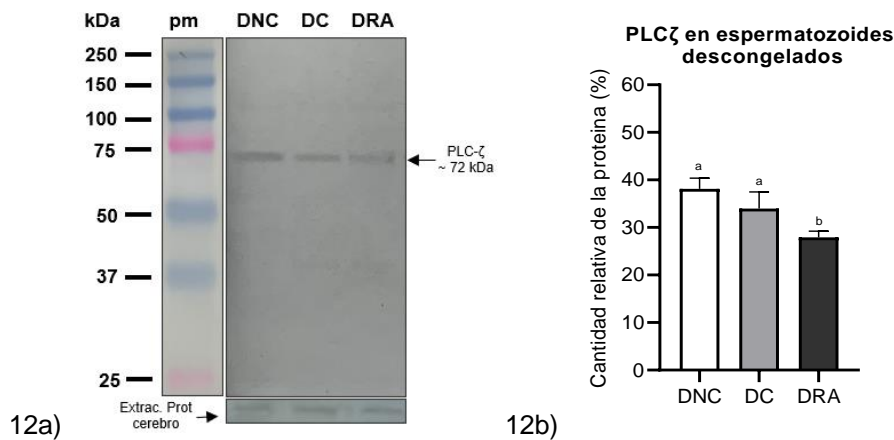


Figura 19: a) Análisis Western blot de PLC-ζ detectada en muestras de proteína extraídas de la TP de espermatozoides descongelados de verraco no capacitados, capacitados y capacitados con RA. Se indica una banda principal correspondiente a gelsolina de ~72 kDa. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa la cantidad relativa de la proteína en los tres grupos experimentales. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$

7.4 Co-inmunoprecipitación

Co- inmunoprecipitación gelsolina-SRC

Habiendo confirmado la existencia de gelsolina y SRC en las muestras de proteína extraídas de la TP de la cabeza de los espermatozoides de verraco; a continuación, buscamos estudiar y confirmar si gelsolina co-inmunoprecipita junto con SRC, la cinasa responsable de la fosforilación e inactivación de gelsolina durante la capacitación. Para lograr esto, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-gelsolina para inmunoprecipitar la gelsolina y otras proteínas de unión a gelsolina asociadas en las fracciones de la TP de la cabeza de los espermatozoides, luego los inmunoprecipitados obtenidos se revelaron mediante western blot con anticuerpos dirigidos contra SRC.

Los resultados indicaron que estas dos proteínas co-inmunoprecipitan en los espermatozoides frescos y congelados-descongelados de verraco (**Figura 20 y 21**); sin embargo, el grado de interacción entre gelsolina y SRC está influenciado por el estado fisiológico de los espermatozoides. De acuerdo a la intensidad de las bandas que representa la proteína SRC de ~59 kDa, se encontró que la interacción fue más fuerte antes de la capacitación, donde se observó una banda

principal de mayor intensidad, pero se disminuyó significativamente después de la capacitación *in vitro* y posterior a la reacción acrosomal de los espermatozoides. En esta última el grado de interacción parece ser muy débil dado que se observó una banda positiva de muy baja intensidad. Por lo tanto, estos resultados confirman que gelsolina y la tirosina cinasa SRC interaccionan estrechamente en la teca perinuclear de la cabeza espermática, pero se reduce luego de la capacitación y la reacción acrosomal.

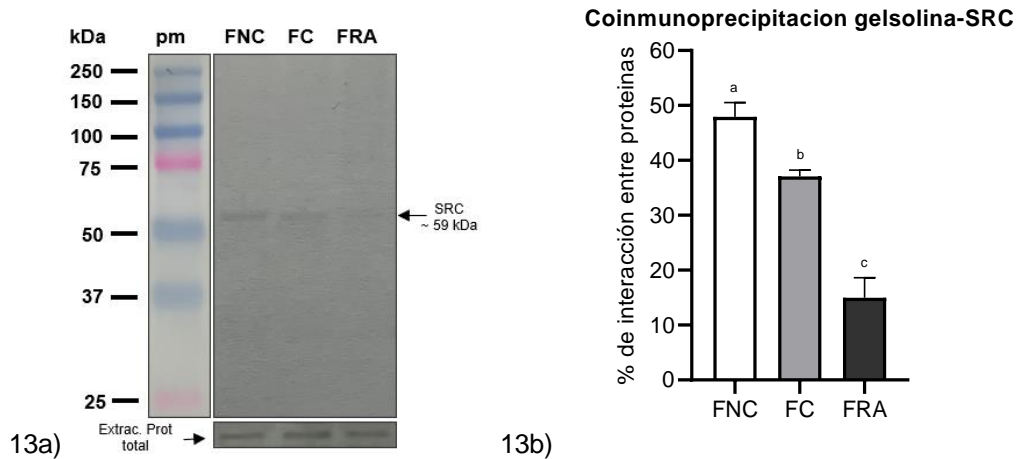


Figura 20: a) Co-inmunoprecipitación gelsolina-SRC en espermatozoides frescos. Análisis western blot de los complejos inmunoprecipitados: muestras de proteína de la TP + Proteína A/G agarosa conjugadas con anticuerpos anti-gelsolina y revelados con anticuerpos anti-SRC. Se muestra la banda positiva correspondiente a SRC de ~59 kDa que confirma la interacción con gelsolina. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa el nivel de interacción gelsolina-SRC. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

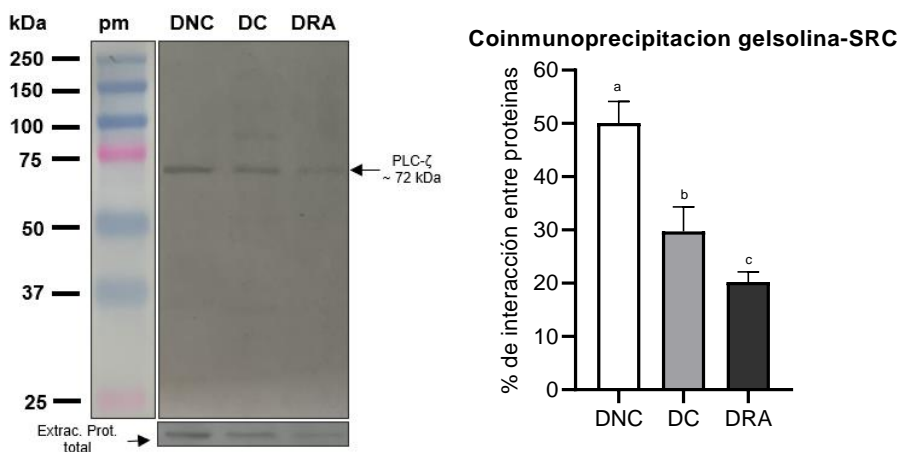


Figura 21: a) Co-inmunoprecipitación gelsolina-SRC en espermatozoides congelados-descongelados. Análisis western blot de los complejos inmunoprecipitados: muestras de proteína de la TP + Proteína A/G agarosa conjugadas con anticuerpos anti-gelsolina y revelados con anticuerpos anti-SRC. Se muestra la banda positiva correspondiente a SRC de ~59 kDa que confirma la interacción con gelsolina. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa el nivel de interacción gelsolina-SRC. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Co-inmunoprecipitación gelsolina - PLC-ζ

Para evaluar la interacción e investigar si PLC-ζ participa en cascadas de señalización junto con gelsolina en los espermatozoides de verraco frescos y criopreservados, las muestras de proteína extraídas de TP se co-inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-gelsolina y Proteína G Plus/Proteína A agarosa, luego los inmunocomplejos recuperados se analizaron por western blot usando anticuerpos policlonales anti-PLC-ζ.

Usando esta técnica de co-inmunoprecipitación encontramos que los anticuerpos dirigidos contra PLC-ζ reconocieron una banda de baja intensidad de aproximadamente ~72 kDa (**Figura 22**), correspondiente a la proteína PLC-ζ en porcinos. Curiosamente, en los inmunoprecipitados obtenidos de espermatozoides frescos, la interacción entre las proteínas gelsolina y PLC-ζ medida de acuerdo a la densitometría de las bandas reveladas para la proteína PLC-ζ fue similar en los tres estados fisiológicos y no se observó cambios significativos en la intensidad de las bandas después de la capacitación y la reacción acrosomal.

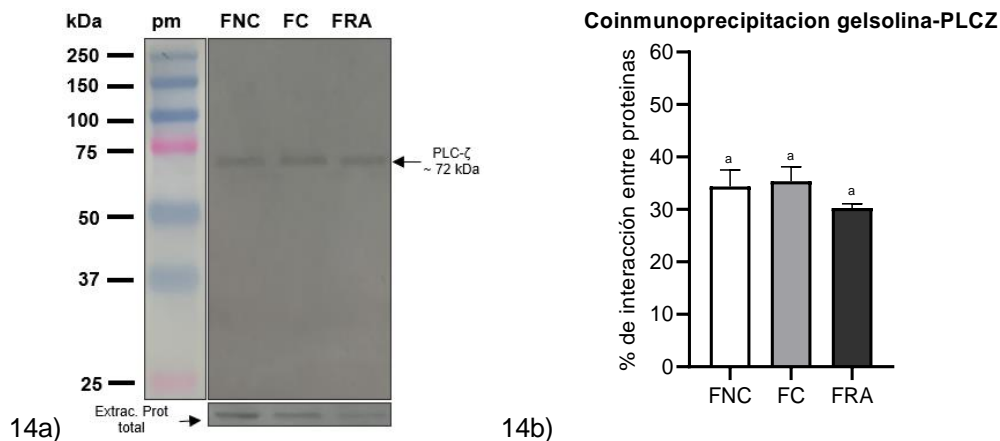


Figura 22: a) Co-inmunoprecipitación gelsolina-PLC-ζ en espermatozoides frescos. Análisis western blot de los complejos inmunoprecipitados: muestras de proteína de la TP + Proteína A/G agarosa conjugadas con anticuerpos anti-gelsolina y revelados con anticuerpos anti- PLC-ζ. Se muestra la banda positiva correspondiente a Src de 72 kDa que confirma la interacción con gelsolina. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa el nivel de interacción gelsolina-PLC-ζ. Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

No obstante, el grado de interacción entre estas proteínas en los inmunoprecipitados obtenidos de espermatozoides congelados-descongelados disminuyó significativamente después de la capacitación *in vitro* y la reacción

acrosomal, en este último grupo correspondiente a espermatozoides con el acrosoma reaccionado el grado de interacción parece ser muy débil dado que se visualizó una banda principal que representaba la proteína PLC- ζ de muy baja intensidad (**Figura 23**).

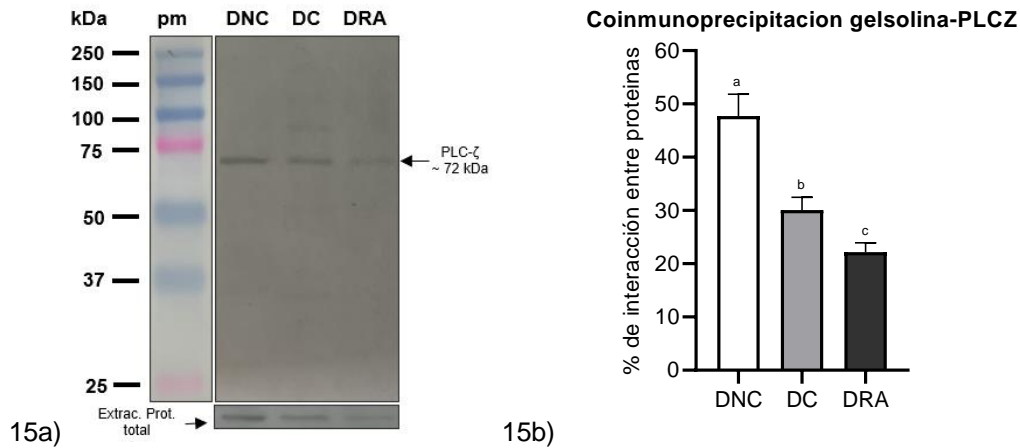


Figura 23: a) Co-inmunoprecipitación gelsolina-PLC- ζ en espermatozoides descongelados. Análisis western blot de los complejos inmunoprecipitados: muestras de proteína de la TP + Proteína A/G agarosa conjugadas con anticuerpos anti-gelsolina y revelados con anticuerpos anti- PLC- ζ . Se muestra la banda positiva correspondiente a Src de 72 kDa que confirma la interacción con gelsolina. b) Gráfica de barras de la densitometría de las bandas que representa el nivel de interacción gelsolina- PLC- ζ . Los datos están expresados en términos de porcentajes de densidad relativa del área de las bandas. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$.

Co-inmunoprecipitación gelsolina-PIP₂

Por el contrario, cuando los inmunocomplejos obtenidos con anticuerpos anti-gelsolina se revelaron mediante análisis western blot con un anticuerpo dirigido contra PIP₂, no se identificaron bandas en la región de la membrana (~74 kDa) de los tres grupos experimentales, peso molecular donde se esperaban que se localizaría esta molécula.

Es posible que la falta de la marca de PIP₂ podría deberse a la pérdida de la membrana plasmática de los espermatozoides durante la sonicación y el tratamiento posterior con detergentes realizada para exponer la TP, considerando que PIP₂ es un fosfoinosítido de membrana.

8. DISCUSIÓN

Desestabilización de la actina de la teca perinuclear en los espermatozoides criopreservados del verraco

Es ampliamente conocido que la crioconservación de los espermatozoides de verraco induce cambios en la localización y el estado de agregación de proteínas como la actina (Gutiérrez-Pérez et al., 2011), la cual está implicada en la estabilización de la teca perinuclear (Juárez Mosqueda & Mújica, 1999; Mújica et al., 2003). En espermatozoides frescos la actina se encuentra principalmente en el segmento ecuatorial, pero disminuye significativamente en este sitio en espermatozoides criopreservados, lo que indica que algunas proteínas experimentan redistribución en respuesta a la criopreservación (Flores et al., 2010). Basado en estos antecedentes, es posible que exista una relación entre la desestabilización de la actina de la teca perinuclear y la fosforilación de proteínas en tirosina, la distribución del fosfatidilinositol bifosfato y el cambio de localización de proteínas citoesqueleticas y de señalización en los espermatozoides criopreservados. En este estudio se buscó dilucidar estos cambios moleculares.

Fosforilación de proteínas en tirosina en espermatozoides de verraco frescos y criopreservados

La fosforilación de proteínas en los espermatozoides constituye un evento de modificación postraducciona de las proteínas que permite a la célula controlar diversos procesos celulares (Urner & Sakkas, 2003). En los espermatozoides de verraco, la capacitación induce la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en diferentes subdominios de la cabeza y el flagelo, lo que es necesario para iniciar la unión del espermatozoide con la zona pelúcida del ovulo, la inducción de la reacción del acrosoma y el desarrollo de la motilidad hiperactivada (Tardif et al., 2001). En nuestro estudio mediante la evaluación realizada por inmunocitoquímica identificamos que luego de la capacitación espermática aumentó significativamente la fosforilación de proteínas en tirosina principalmente en la región acrosomal y en el segmento ecuatorial, regiones de la cabeza que constituyen la ubicación apropiada para las moléculas que participan en la capacitación (Bailey et al., 2005). Además, nuestros hallazgos

son similares a los de un estudio anterior realizado en espermatozoides humanos capacitados *in vitro*, donde se observó mediante inmunofluorescencia que en el casquete acrosomal, el segmento ecuatorial, y la pieza principal del flagelo, incrementó la señal inmunorreactiva que identificaba proteínas fosforiladas en tirosina (Sati et al., 2014).

Asimismo, una investigación previa en espermatozoides de verraco no capacitados identificó proteínas fosforiladas en tirosina inmunolocalizadas en el centro de la cabeza, en la región ecuatorial y marcados de manera brillante en la región acrosómica después de 3 h de incubación *in vitro* en medio de capacitación (Tardif et al., 2001). Se ha demostrado un aumento de la fosforilación de tirosina de p20, p93 y p175 (Kaláb et al., 1998). Esto demuestra y confirma junto con los resultados de nuestro estudio que el contenido de proteínas fosforiladas aumenta durante la capacitación.

Para apoyar estos hallazgos, otra investigación en espermatozoides de verraco utilizando anticuerpos anti-fosfotirosina específicos examinó los cambios en la fosforilación de proteínas en tirosina y encontró que existe una correlación positiva significativa entre los niveles de fosforilación en tirosina y el porcentaje de espermatozoides capacitados (Bravo et al., 2005). Durante la capacitación se ha detectado en la cabeza del espermatozoide el aumento de la fosforilación del complejo "p32", compuesto por varias fosfoproteínas-tirosina (Bailey et al., 2005) y ACRBP (proteína de unión a acrosina), necesarias para la inducción de la capacitación y la reacción acrosomal (Kato et al., 2021).

Otra proteína regulada por fosforilación en el espermatozoide, que además en nuestra investigación fue identificada en la TP, es la gelsolina, proteína que participa en la dinámica del citoesqueleto de la teca perinuclear y su actividad se inactiva por fosforilación durante la capacitación y se activa antes de la reacción del acrosoma (Finkelstein et al., 2010). Por esta razón, el aumento de la fosforilación de proteínas en tirosina juega un papel importante en la regulación de varios procesos celulares de los espermatozoides mamíferos (Tardif et al., 2001).

El enfriamiento y la criopreservación de los espermatozoides de verraco inducen modificaciones bioquímicas no reguladas similares a la capacitación, tales como

el aumento de la fosforilación de proteínas en tirosina en una subpoblación de espermatozoides (Bailey et al., 2000), tal como lo observamos en nuestra investigación después de la descongelación de los espermatozoides por el aumento de la fosforilación de proteínas en la región acrosomal, segmento ecuatorial y el flagelo.

El incremento de la fosforilación de proteínas en los espermatozoides criopreservados de verraco podría deberse a que estas células son altamente sensibles al choque térmico, por lo que el enfriamiento a 5 °C y el aumento de la permeabilidad de la membrana celular puede elevar la concentración intracelular de Ca^{2+} , HCO_3 y especies reactivas de oxígeno (ROS) en el medio lo que activa la vía sAC/PKA y esto conduciría el aumento de la fosforilación de proteínas en tirosina, similar a las que ocurren durante la capacitación verdadera, proceso conocido como “criocapacitación” (Tardif et al., 2001). En espermatozoides de verraco, por ejemplo, se conoce que la fosforilación de tirosina de p32 incrementa después de la congelación-descongelación (Kumaresan et al., 2011).

También se ha indicado que las proteínas espermáticas de verracos individuales con buena capacidad de congelación del semen exhiben un bajo nivel de fosforilación de tirosina después de congelación-descongelación, en comparación con verracos que muestra poca capacidad de congelación del semen. (Wysocki et al., 2009). Por lo tanto, estos cambios inducidos por la criopreservación podrían contribuir a explicar la reducida capacidad fertilizante de los espermatozoides congelados-descongelados.

Localización de la gelsolina y distribución del PIP_2

La identificación, localización, fosforilación y el rol que cumple la proteína gelsolina en los espermatozoides antes de la fertilización se conoce principalmente por los estudios desarrollados en espermatozoides humanos (Finkelstein et al., 2010), y de cobayos (Cabello et al., 2003), mientras que existe escasa información en espermatozoides de verraco, especie de interés en esta investigación.

Según el estudio realizado por Finkelstein et al. (2010), mediante inmunocitoquímica y western blot se encontró que el principal sitio de localización

de la gelsolina en espermatozoides antes de la capacitación es el flagelo, mientras que después de la capacitación es la cabeza espermática. Otro estudio ha observado que antes de la capacitación la gelsolina se colocaliza con la fracción de actina-G y casi no hay actina-F en la cabeza del espermatozoide, ya que la mayor parte se localiza en la pieza media de la cola; mientras que después de la capacitación aumenta la gelsolina en la cabeza y se colocaliza con la fracción de actina-F donde favorece su despolimerización (Breitbart & Finkelstein, 2015).

Los datos de nuestra investigación están de acuerdo con estos estudios previos. En espermatozoides frescos de verraco, antes de la capacitación la gelsolina se localizó principalmente en el flagelo y en menor proporción en la región acrosomal, segmento ecuatorial y región postacrosomal; mientras que después de la capacitación incrementó significativamente en la región acrosomal de la cabeza y disminuyó en el flagelo. Adicionalmente, para apoyar esta información confirmamos la presencia de gelsolina de ~90 kDa mediante western blot en las preparaciones de proteínas extraídas de la TP de la cabeza de los espermatozoides, similar a las bandas encontradas en preparaciones obtenidas de cabezas y flagelos de espermatozoides humanos (Finkelstein et al., 2010).

De tal forma, considerando la evidencia científica demostrada por la información de los estudios anteriores, sumado a los resultados de nuestra investigación, existe certeza suficiente de que la gelsolina sufre un proceso activo de translocación durante la capacitación, desde el flagelo hacia las regiones anteriores de la cabeza espermática, principalmente a la región acrosomal, donde es requerida para la despolimerización de la actina-F, un paso previo y necesario para la ocurrencia de la exocitosis del acrosoma (Finkelstein et al., 2010). Por lo tanto, demostramos que hay un claro efecto del estado fisiológico del espermatozoide para el cambio de localización de la gelsolina.

La translocación de gelsolina a la cabeza espermática también parece estar relacionada con la motilidad. Se ha observado que espermatozoides con alta motilidad después de la capacitación tienen bajos niveles de gelsolina en la cola, ya que la mayor parte se ha translocado a la cabeza. La disminución de gelsolina

en el flagelo previene la despolimerización de la actina-F, que es importante para el desarrollo de la motilidad hiperactivada (Finkelstein et al., 2013).

Sin embargo, en espermatozoides congelados-descongelados de verraco no se evidenció dicha translocación de la gelsolina hacia la región acrosomal, al contrario, en espermatozoides criopreservados observamos que el principal sitio de localización de gelsolina fue el flagelo, segmento ecuatorial y la región postacrosomal. Claramente estos resultados comparados con espermatozoides frescos de este mismo estudio muestran una baja proporción de gelsolina en la región acrosomal y mayor en el segmento ecuatorial y región postacrosomal después del proceso de congelación-descongelación en los espermatozoides capacitados. Por consiguiente, con base a estos resultados, consideramos que la traslocación de la gelsolina en los espermatozoides descongelados fue ineficiente. Es probable que estos espermatozoides hayan experimentado una criocapacitación prematura durante la congelación acompañado de alteraciones en el citoesqueleto de actina de la TP, lo que conduciría a este cambio prematuro de la localización de gelsolina únicamente hacia regiones posteriores del espermatozoide. El bajo porcentaje de gelsolina en la región acrosomal también podría indicar una disminución de la integridad acrosomal de los espermatozoides ya esta proteína podría haberse liberado durante una reacción acrosomal espontánea.

No obstante, es lógico considerar que la translocación de la gelsolina durante la capacitación de los espermatozoides no depende de sí misma, sino de su interacción con otras moléculas, tales como el fosfoinosítido de membrana fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (PIP_2) (Finkelstein et al., 2013) y la presencia de calcio (Ashish et al., 2007). En nuestro estudio, cuando evaluamos la distribución del PIP_2 en los espermatozoides frescos, observamos que después de la capacitación se incrementó significativamente la presencia de PIP_2 en la región acrosomal, mientras que en el segmento ecuatorial y la región postacrosomal, con excepción del flagelo, se mantuvieron casi similares a lo observado antes de la capacitación.

La distribución y dinámica del PIP_2 en los espermatozoides frescos de verraco está en concordancia con los resultados observados por Finkelstein *et al.* (2013)

en su estudio realizado en espermatozoides humanos, donde se indicó que los niveles de PIP₂ aumentaron en la cabeza y disminuyeron en la cola durante la primera hora de capacitación *in vitro*, y más tarde regresaron a un nivel basal (Finkelstein et al., 2013). Asimismo, en un estudio realizado en espermatozoides de bovino se demostró que durante la capacitación existe una elevación del PIP₂, misma que mejoró la formación de actina-F, considerando que PIP₂ es un cofactor para la activación de fosfolipasa D, la que es esencial para la polimerización de la actina (Hodgkin et al., 2000; Pertile et al., 1995).

Por lo tanto, consideramos que el incremento de PIP₂ en los espermatozoides frescos de verraco durante la capacitación ocurrió debido al aumento de su síntesis favorecida por la integridad de la membrana plasmática. Esta molécula a su vez favoreció la traslocación de gelsolina a la cabeza espermática desde el flagelo, tal como lo sugirieron Finkelstein *et al.* (2013), quienes determinaron que el PIP₂ se une a la gelsolina y la actina-F, y que la translocación de gelsolina dependió del aumento del PIP₂ que ocurrió de manera simultánea a la elevación de actina-F durante la capacitación. Adicionalmente, se conoce que la unión del PIP₂ a gelsolina no solo favorece su translocación a la cabeza espermática, sino que la unión PIP₂-gelsolina, junto con la fosforilación de gelsolina por la tirosina cinasa SRC (Corte et al., 1999) controla su estado de activación, manteniendo a esta proteína en un estado inactivo durante la capacitación para permitir el ensamblaje de actina-F y solo se libera del secuestro de PIP₂ al final de la capacitación, antes de la reacción del acrosoma por la activación de la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza al PIP₂ (Breitbart & Finkelstein, 2015). Del mismo modo, el incremento de gelsolina en el flagelo observado en espermatozoides frescos de verraco con reacción acrosomal puede ser explicado por la existencia de una translocación reversa de gelsolina desde la cabeza al flagelo luego de la liberación de gelsolina unida al PIP₂ (Finkelstein et al., 2010).

Sin embargo, en la cabeza de los espermatozoides descongelados no se observó un aumento significativo del PIP₂ después de la capacitación; al contrario, los niveles del PIP₂ en la región acrosomal se mantuvieron bajos desde

antes de la capacitación y posteriormente disminuyó significativamente en el segmento ecuatorial y la región post-acrosomal.

Estos resultados nos conducen a pensar que durante el proceso de congelación-descongelación, al ocurrir alteraciones en la membrana plasmática y pérdida de la integridad acrosomal, se afecta la síntesis y distribución de PIP₂ en la cabeza espermática. La reducción de los niveles de PIP₂ disminuiría la translocación efectiva de gelsolina a la cabeza del espermatozoide. También es probable que la fosforilación de proteínas haya sido afectada, considerando que la fosforilación inhibitoria en tirosina-438 de la gelsolina por SRC se reduce cuando los niveles de PIP₂ son bajos (Finkelstein et al., 2013). Esta idea se refuerza por resultados de un estudio desarrollado en espermatozoides humanos en el que se comprobó que la reducción de la síntesis de PIP₂ inhibe la polimerización de la actina, la motilidad espermática y la translocación de gelsolina a la cabeza, mientras que el incremento de PIP₂ mejora todas estas actividades y aumenta significativamente la translocación de gelsolina a la cabeza (Breitbart & Finkelstein, 2015).

Es por esta razón que consideramos que la distribución del PIP₂ en la membrana celular juega un rol importante en la fisiología espermática y fundamentalmente en la regulación del ensamblaje del citoesqueleto de actina, ya que regula la fosforilación y la motilidad como ha sido descrito en espermatozoides y otros tipos de células por varios estudios anteriores (Fatunmbi et al., 2020; Finkelstein et al., 2013; Mandal, 2020).

Localización de la tirosina quinasa SRC

Por otra parte, en nuestra investigación, dada la importancia que tiene la tirosina quinasa de la familia SRC por su papel en la fosforilación sobre proteínas específicas, consideramos relevante su identificación, conocer los cambios que sufre en su localización y la interacción con otras proteínas. No cabe duda que la SRC en los espermatozoides está relacionada con la regulación de la capacitación y la reacción acrosomal (Mitchel et al., 2008), sobre todo por su papel inhibitorio por fosforilación de la actividad de la proteína de corte gelsolina durante la capacitación (Corte et al., 1999). Se ha identificado SRC en espermatozoides de varias especies: ratón (Baker et al., 2006), humano (Mitchel

et al., 2008; Varano et al., 2008) y verraco (Bragado et al., 2012), por técnicas de inmunocitoquímica y western blot.

La función que desempeña SRC sobre gelsolina podría ser explicada por los resultados obtenidos en este estudio mediante inmunocitoquímica y co-inmunoprecipitación de gelsolina-SRC, considerando que después de la capacitación tanto de los espermatozoides frescos como de los descongelados se detectó una alta frecuencia de la marca para SRC en la cabeza espermática, principalmente en la región acrosomal e incluso una mayor intensidad en el segmento ecuatorial. La reducción de la inmunolocalización de SRC en la región acrosomal de los espermatozoides con acrosoma reaccionado probablemente se deba a que esté ligada con el decremento de la actividad cinasa de esta enzima, lo que permitiría que la gelsolina se active. Adicionalmente, mediante western blot en espermatozoides de verraco confirmamos el incremento de la cantidad relativa de SRC de ~59 kDa durante la capacitación y una disminución en espermatozoides que alcanzaron la reacción acrosomal.

Anteriormente se ha observado que la fosforilación de gelsolina por SRC aumenta hasta las 3 h de incubación en condiciones de capacitación y luego disminuye (Finkelstein et al., 2013). Es por esto que en nuestro estudio en espermatozoides frescos y descongelados de verraco comprobamos que gelsolina y SRC co-inmunoprecipitan, lo que indica que existe una interacción entre estas dos moléculas que se hace más fuerte durante la capacitación espermática, tal como se había descrito en un estudio anterior (Finkelstein et al., 2010). El incremento de la actividad cinasa de SRC y de la cantidad de la enzima durante la capacitación depende de su fosforilación en tyr-416 (Varano et al., 2008) y es seguida de un aumento en el contenido de F-actina (Breitbart & Finkelstein, 2018).

De igual manera, la distribución del PIP₂ en la membrana juega un rol fundamental en la interacción gelsolina-SRC, ya que el aumento de la síntesis del PIP₂, tal como fue observado en espermatozoides frescos de verraco capacitados, incrementa la fosforilación de gelsolina, mientras que la disminución de la síntesis de PIP₂ o el incremento de sus hidrolisis reduce la

fosforilación (Finkelstein et al., 2013). Esto evidencia que la distribución del PIP₂ en los espermatozoides dicta el grado de fosforilación de la gelsolina.

Con referencia a su identificación y localización en espermatozoides porcinos, en un estudio desarrollado por Bragado et al. (2012) se identificó mediante western blot a dos miembros de la familia SRC: Lyn y c-Yes y dos isoformas activas, denominadas SFK1 y SFK2, que fueron detectadas con anticuerpos específicos por su fosforilación en tyr416 en lisados de espermatozoides (Bragado et al., 2012). Asimismo, de estos miembros, c-Yes es uno de los más importantes, porque constituye una de las proteínas de señalización que se han detectado en la membrana plasmática (Lawson et al., 2008), donde está asociada con elementos citoesqueléticos, como la teca perinuclear del espermatozoide, que cumplen un rol durante la capacitación espermática y la reacción acrosomal (Sutovsky et al., 2003). En nuestro estudio, considerando la especificidad del anticuerpo anti-SRC utilizado para la detección, identificamos mediante western blot en los extractos de proteínas de la teca perinuclear de la cabeza de los espermatozoides frescos y descongelados de verraco c-SRC, también conocido como kinase-SRC o p60-SRC como una banda principal de ~59 kDa y bandas de menor intensidad con pesos moleculares inferiores a los predichos para SRC, que podrían corresponder a otras isoformas de SRC o productos de su degradación.

En humanos, donde se ha estudiado más detalladamente la tirosina quinasa SRC, el análisis western blot de los lisados celulares extraídos de la cabeza de espermatozoides han detectado bandas de ~70 kDa (Varano et al., 2008), ~66 kDa (Kumar & Meizel, 2005) y ~60 kDa (Mitchel et al., 2008), correspondientes a c-SRC, con variaciones en la concentración relativa de proteína en diferentes tiempos de incubación en medio de capacitación *in vitro*. En otras especies, como el hámster, se han identificado otros miembros de la familia SRC en su forma fosforilada, tales como: Y418 y pYes y en menor medida pLCK, localizada en la región acrosomal, con un patrón de expresión similar tanto en espermatozoides no capacitados como en capacitados (Singh et al., 2017).

Es importante también anotar que en espermatozoides humanos la SRC detectada en la región acrosomal de la cabeza espermática comparte sitios de

localización con gelsolina durante la capacitación, lo que explica su interacción y su función inactivante (Lawson et al., 2008). Esto es similar a lo que se observó en este estudio en los espermatozoides capacitados de verraco, donde SRC y gelsolina se localizaban principalmente en la región acrosomal. Además, estos resultados demuestran que la localización de la tirosina quinasa SRC en espermatozoides frescos y criopreservados coincidió con los principales subdominios de la cabeza espermática, tales como la región acrosomal y el segmento ecuatorial, donde se observó predominantemente la fosforilación de proteínas en tirosina durante la capacitación y la reacción acrosomal.

Otro estudio en espermatozoides humanos no capacitados y capacitados ha identificado la SRC mediante inmunocitoquímica principalmente en la región postacrosomal, segmento ecuatorial de la cabeza, cuello, pieza media del flagelo (Varano et al., 2008) o en dominios subcelulares compatibles con un papel de fosforilación en tirosina de proteínas específicas (Mitchel et al., 2008).

Por otra parte, la detección de SRC en el segmento ecuatorial y la región acrosomal fue menor en espermatozoides congelados-descongelados de verraco, lo que indica que la distribución de esta cinasa también fue afectada por la crioconservación. Sin embargo, no existen antecedentes previos sobre alteraciones en la localización de SRC en espermatozoides después de la congelación. Experimentalmente solo se ha confirmado que la incubación de espermatozoides con inhibidores de tirosina quinasa disminuyó el porcentaje de espermatozoides capacitados y podría prevenir que ocurra el proceso de reacción acrosomal, dado que se ven afectadas todas las proteínas que son reguladas por fosforilación y que participan en múltiples procesos fisiológicos (Bravo et al., 2005; Finkelstein et al., 2010).

Localización e identificación de PLC- ζ

Por último, otra proteína importante que fue evaluada en el contexto de este estudio corresponde a la fosfolipasa C- ζ , proteína de señalización que se ha encontrado en la TP de la cabeza de los espermatozoides de mamíferos y se considera como la molécula responsable de generar las oscilaciones de calcio durante la fertilización (Fujimoto et al., 2004; K. Swann et al., 2006). Por esta razón, la identificación de su localización en los subdominios del espermatozoide

y el conocer las proteínas con las que interactúa tiene trascendental importancia para entender la fisiología del espermatozoide. En esta investigación se estudió esta enzima en los espermatozoides de verraco y se contrastó su localización y rol en diferentes especies, incluido los espermatozoides de humano.

En los espermatozoides frescos de verraco, al evaluar la localización de PLC- ζ antes de la capacitación, encontramos que los principales patrones que se inmunomarcaron fueron: acrosomal + flagelo y acrosomal + postacrosomal + flagelo. Sin embargo, después de la capacitación y la reacción acrosomal se redujo significativamente la proporción de espermatozoides con estos patrones y se incrementó en el segmento ecuatorial + postacrosomal + flagelo y solo flagelo. Nuestros resultados confirman los hallazgos anteriores en espermatozoides de porcino, en donde se detectó por inmunofluorescencia a la PLC- ζ en la región postacrosomal y el flagelo antes de la fertilización (Nakai et al., 2011). Al mismo tiempo, nuestros datos son consistentes con el papel fisiológico propuesto para la PLC- ζ , considerando que esta proteína localizada en el segmento ecuatorial y la región postacrosomal de los espermatozoides podría corresponder a la molécula de señalización que se libera desde el espermatozoide y que está implicada en la activación del ovulo durante la fertilización, de ahí su ubicación estratégica en estas regiones.

Para reforzar lo anteriormente mencionado, dentro del espermatozoide de ratón al momento de la fertilización se ha detectado a la PLC- ζ en una banda postacrosomal en la TP, que es señalada como la primera parte de la cabeza del espermatozoide en entrar al óvulo después de la fusión de los gametos (Fujimoto et al., 2004). Este hallazgo, junto con un estudio inicial que comprobó que las fracciones de extracto de espermatozoides que contenían PLC- ζ fueron capaces de inducir la liberación de Ca^{2+} en el huevo (Saunders et al., 2002) permitió proponer a la PLC- ζ como el factor espermático soluble activador del óvulo en mamíferos (SOAF).

Considerando la localización de PLC- ζ en la TP es posible pensar que los cambios que ocurren en la estructura del citoesqueleto de actina que constituye la TP de la cabeza de los espermatozoides de verraco durante la capacitación están relacionados con la preparación de PLC- ζ para su liberación y activación

del óvulo luego de la reacción del acrosoma. Todo esto se evidenciaría como cambios de localización de la proteína en la cabeza espermática. Por el contrario, en los espermatozoides criopreservados, estos cambios en la localización de PLC- ζ sucederían de manera prematura, dado que después de la descongelación observamos que el principal sitio de localización de PLC- ζ fue la región postacrosomal, incluso desde antes de haber sido incubados en medio de capacitación. La disminución de PLC- ζ en la región acrosomal de los espermatozoides descongelados posiblemente este asociado con la pérdida de la integridad acrosomal y las alteraciones en estructuras internas como la TP, lugar donde se ha detectado esta proteína.

Cuando se comparó la localización de PLC- ζ de espermatozoides de verraco con otras especies en las que se ha identificado, parece ser que esta proteína generalmente se encuentra localizada en diferentes subdominios de la cabeza del espermatozoide y la pieza media del flagelo, incluso podría tener roles funcionales diferentes por cada localización específica, como lo sugirió Kashir *et al.* (2014). Los estudios previos han demostrado diferencias específicas por especies en la localización de PLC- ζ (Yoon & Fissore, 2007). Además, la PLC- ζ sufre redistribución o cambios dinámicos en su patrón de localización durante la capacitación y la reacción acrosomal. (Grasa *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2009).

En espermatozoides de porcino se ha identificado mediante inmunofluorescencia una señal inmunorreactiva fuerte en la regiones acrosomal y post-acrosomal y una señal fluorescente débil en el flagelo, especialmente en el cuello (Kaewmala *et al.*, 2012; Nakai *et al.*, 2011). Mediante western blot se ha determinado que la teca perinuclear es el sitio principal de localización de la PLC- ζ de porcino de ~72 kDa (Fujimoto *et al.*, 2004; Kashir *et al.*, 2018); tal como lo identificamos en nuestro estudio junto con su disminución en la concentración relativa en la TP de la cabeza de espermatozoides luego de la capacitación y la reacción acrosomal. Además, la estructuración de dominio de PLC- ζ de los espermatozoides de verraco es idéntica a la de PLC- ζ de humanos y ratones (Yoneda *et al.*, 2006). En humanos se han identificado varias isoformas de PLC- ζ de ~70 kDa (Fujimoto *et al.*, 2004; Gresset & Harden, 2012; Kashir *et al.*, 2018); ~74 y 100 kDa (Grasa *et al.*, 2008); y en ratones ~74 kDa (Saunders *et al.*, 2002).

En espermatozoides equinos frescos la PLC- ζ de ~73 kDa se ha observado en la región que recubre el acrosoma, en el segmento ecuatorial, en la pieza de conexión entre la cabeza y la pieza media y en la pieza principal del flagelo, patrón de localización que se mantiene hasta después de la capacitación. Sin embargo, luego de la inducción de la exocitosis acrosómica existe pérdida de PLC- ζ sobre la región acrosómica (Bedford-Guaus et al., 2011). Estos hallazgos muestran que la localización de PLC- ζ en los espermatozoides no capacitados y después de la reacción del acrosoma coinciden con lo observado en espermatozoides de verraco. No obstante, en nuestro estudio hubo claras diferencias en la localización de PLC- ζ después de la capacitación, marcada por un decremento significativo en la región acrosomal. Es probable que la pequeña proporción de PLC- ζ que se mantiene en la región acrosómica podría desempeñar un papel en la regulación de la exocitosis acrosómica, mientras que la PLC- ζ postacrosomal estaría implicada en la activación del óvulo, como se ha predicho en otras especies (Young et al., 2009).

Cuando comparamos la localización de la PLC- ζ en espermatozoides de verraco con la de la PLC- ζ de humanos, es notable que las investigaciones sobre esta proteína son numerosas por su asociación con la infertilidad masculina (Heytens et al., 2009; Kashir et al., 2013; Kashir, Konstantinidis, et al., 2012); pero también existe una amplia variabilidad en los resultados. Se han identificado tres localizaciones distintas de PLC- ζ en las regiones acrosomal, ecuatorial y post-acrosomal de la cabeza del espermatozoide y adicionalmente en el flagelo. Además, estas localizaciones se han observado en combinaciones entre las 4 diferentes regiones (Amdani et al., 2016). Lo más destacado es que se ha encontrado que la criopreservación tiene efectos perjudiciales significativos sobre las concentraciones relativas de la PLC- ζ en los espermatozoides humanos (Kashir et al., 2011).

La reducción de PLC- ζ tiene a su vez implicaciones en la activación deficiente del huevo dado que afecta la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Kashir et al., 2011). En nuestro estudio la PLC- ζ de la TP de la cabeza de espermatozoides criopreservados detectada por western blot se identificó en bandas de menor intensidad en comparación con las detectadas en

espermatozoides frescos, lo que evidenció una disminución de la concentración relativa de la proteína.

Grasa *et al.* (2008) para identificar a la PLC- ζ en el espermatozoide, determinó 4 patrones de localización: acrosomal + ecuatorial; solo ecuatorial; ecuatorial y postacrosomal y solo postacrosomal, observando que antes de la capacitación el 84.4% de los espermatozoides mostraron PLC- ζ en la región ecuatorial, y en el 35,3% de ellos también se encontró en el acrosoma. Después de la capacitación se produjo un incremento de PLC- ζ en la región postacrosomal (58%), lo que coincidió con una disminución en la región acrosomal. Además, el aumento de PLC- ζ en la región post-acrosómica fue aún más pronunciada en los espermatozoides con reacción acrosomal (65%). Al contrastar nuestros resultados con este estudio coincidimos en esta dinámica de la PLC- ζ por el incremento en la región postacrosomal y la disminución en la región acrosomal luego de la capacitación, pero diferimos en las proporciones que se encontraron en el segmento ecuatorial, ya que en espermatozoides de verraco fueron más bajas.

En otro estudio realizado por Young *et al.* (2009). en espermatozoides de ratón, se planteó la interrogante de conocer si el estado fisiológico del espermatozoide influye sobre los cambios de localización de PLC- ζ , comprobándose que después de la capacitación y la reacción acrosomal la PLC- ζ aumentó en la región postacrosomal en comparación con los espermatozoides no capacitados, en los que se encontró una señal para esta proteína en la región acrosomal (Young *et al.*, 2009).

Claramente al contrastar los dos estudios anteriores, ambos coinciden en el aumento de la cantidad de proteína PLC- ζ en la región post-acrosomal de la cabeza espermática, sitio donde se ha predicho que se localiza el factor espermático activador del óvulo (Amdani *et al.*, 2016). Estos cambios en la localización de PLC- ζ durante la capacitación y la RA pueden estar influenciados por varios factores. Lo más probable es que se deban a un movimiento real de la proteína para su liberación desde la TP hacia el óvulo para facilitar su activación después de la fusión de los gametos (Fujimoto *et al.*, 2004). El aumento de PLC- ζ postacrosomal se explicaría por una interacción con otras

proteínas, como la actina, como se sugirió en espermatozoides de bovino, considerando que la dinámica del citoesqueleto de actina podría estar controlando la migración de PLC- ζ durante la capacitación y conducir a su liberación parcial durante la reacción acrosomal (Mejía-Flores et al., 2017). Esta investigación además concuerda en el aumento de PLC- ζ en la región postacrosomal en espermatozoides capacitados y aquellos que experimentaron la exocitosis acrosómica.

Evaluación espermática

La evaluación del semen generalmente está basada en el examen microscópico de la motilidad, vitalidad y la integridad acrosomal de los espermatozoides. En este estudio el porcentaje de motilidad promedio en los espermatozoides frescos de verraco se encontró dentro de los parámetros considerados normales para la especie 85-90% (Hafez, 2002). No obstante, el porcentaje de motilidad progresiva después de la crioconservación disminuyó notablemente al 15%. Este decremento de la motilidad post descongelación se ha observado comúnmente en porcinos, incluso hasta un rango del 3-9%, y comúnmente está asociada a los daños físicos de las células (Li et al., 2018).

La evaluación del porcentaje de vitalidad espermática en los espermatozoides frescos claramente obtuvo un mayor porcentaje de células vivas en comparación con los espermatozoides descongelados. Es bien conocido que los espermatozoides de verraco son altamente sensibles al almacenamiento congelado debido a que tienen una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana plasmática y bajo colesterol. Mediante diferentes técnicas de evaluación de la viabilidad en estudios previos se ha determinado que luego de la criopreservación disminuye al 48.6% (Martecikova et al., 2010), 42.2% (Gutiérrez Pérez et al., 2009), y 32% (Trzcińska et al., 2015) de viabilidad, porcentajes muy similares a los resultados de nuestro estudio, confirmando que entre el 40-50% de los espermatozoides de verraco no sobreviven después de la criopreservación (Jovicic et al., 2020).

Con referencia a la integridad acrosomal, un porcentaje superior al 85% de los espermatozoides frescos de verraco, antes y después de la capacitación mantuvieron un acrosoma intacto, porcentaje que disminuyó después de la

inducción de reacción acrosomal, mostrando que la incubación *in vitro* realmente indujo este proceso exocítico del acrosoma. Por el contrario, después de la congelación-descongelación la integridad acrosomal de los espermatozoides se redujo casi a la mitad (47,0%), (**Gráfica 4**). La disminución significativa del número de espermatozoides que mantenían el acrosoma intacto posiblemente está relacionada con la criocapacitación prematura, la ocurrencia una reacción acrosómica espontánea durante la incubación o posiblemente debido a traumas físicos adicionales durante las manipulaciones involucradas con la capacitación *in vitro*, el paso de los espermatozoides por ficoll y los tratamientos posteriores.

Al contrastar nuestros datos con otros estudios, existe evidencia suficiente que confirma una disminución significativa de la integridad acrosomal de los espermatozoides de verraco después de la crioconservación. Se ha indicado que el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma integro luego de la descongelación se reduce a 34,9% (Barrientos et al., 2009), 27.6% (Arancibia Salinas et al., 2007) y 19% (Gutiérrez Pérez et al., 2009).

9. CONCLUSIONES

La desestabilización de la actina de la teca perinuclear del espermatozoide criopreservado de verraco está relacionado con el aumento de la fosforilación de proteínas en tirosina en los subdominios de la cabeza espermática.

La disminución en la distribución del fosfatidilinositol bifosfato en la membrana plasmática de la cabeza de los espermatozoides congelados-descongelados afectó la translocación de gelsolina a la región acrosomal durante la capacitación.

En el presente estudio, se determinó por primera vez la localización de gelsolina y tirosina cinasa SRC en espermatozoides de verraco no capacitados, capacitados y con acrosoma reaccionado, así como los cambios que sufren estas proteínas en espermatozoides criopreservados, adicionalmente confirmamos que gelsolina y SRC co-inmunoprecipitan.

En espermatozoides frescos de verraco confirmamos que PLC- ζ antes de la capacitación se localiza principalmente en la región acrosomal y aumenta en la región postacrosomal después de la capacitación. En contraste, la detección de PLC- ζ en los espermatozoides congelados-descongelados es menor en la región acrosomal, lo que estaría relacionado con los efectos de la crioconservación que involucran la pérdida de la integridad acrosomal y las alteraciones de la teca perinuclear.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarabi, M., Yu, Y., Xu, W., Tse, M., Pang, S., Yi, Y., Sutovsky, P., & Oko, R. (2012). The testicular and epididymal expression profile of PLC ζ in mouse and human does not support its role as a sperm-borne oocyte activating factor. *PLoS ONE*, *7*(3), 1–12.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033496>
- Alvarez, C., Oko, R., Sutovsky, P., Chemes, H., & Rawe, V. Y. (2009). Biogenesis of the sperm head perinuclear theca during human spermiogenesis. *Fertility and Sterility*, *92*(4), 1472–1473.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.051>
- Amdani, S. N., Yeste, M., Jones, C., & Coward, K. (2016). Phospholipase C zeta (PLC ζ) and male infertility: Clinical update and topical developments. *Advances in Biological Regulation*, *61*, 58–67.
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.11.009>
- Anifandis, G., Michopoulos, A., Daponte, A., Chatzimeletiou, K., Simopoulou, M., Messini, C. I., Polyzos, N. P., Vassiou, K., Dafopoulos, K., & Goulis, D. G. (2019). Artificial oocyte activation: physiological, pathophysiological and ethical aspects. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *65*(1), 3–11.
<https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1516000>
- Arancibia Salinas, K., Juárez-Mosqueda, M., Montaldo, H., Gutierrez, C., Trujillo, O., Hernandex, G., & Muñoz, G. (2007). Morphological perinuclear theca alterations are related to acrosome loss in cryopreserved boar spermatozoa. *Veterinary Research*, *2*, 49–56.
- Ashish, Paine, M. S., Perryman, P. B., Yang, L., Yin, H. L., & Krueger, J. K. (2007). Global structure changes associated with Ca²⁺ activation of full-length human plasma gelsolin. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(35), 25884–25892. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702446200>
- Bagnato, G., Leopizzi, M., Urciuoli, E., & Peruzzi, B. (2020). Nuclear functions of the tyrosine kinase Src. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21082675>
- Bailey, J. L., Bilodeau, J. F., & Cormier, N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*, *21*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>
- Bailey, J. L., Tardif, S., Dubé, C., Beaulieu, M., Reyes-Moreno, C., Lefièvre, L., & Leclerc, P. (2005). Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm: Kinase activity and capacitation. *Theriogenology*, *63*(1), 599–614.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.034>
- Baker, M. A., Hetherington, L., & Aitken, R. J. (2006). Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *Journal of Cell Science*, *119*(15), 3182–3192. <https://doi.org/10.1242/jcs.03055>
- Barrientos, M., Arancibia Salina, K., Trujillo, O., Muñoz, R., Montiel, F., & Juárez Mosqueda, M. (2009). Is there a relationship between the PT-substructure status and acrosome loss of boar spermatozoa following freezing-thawing or acrosomal reaction. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *8*(1), 155–164.
- Bedford-Gaus, S. J., McPartlin, L. A., Xie, J., Westmiller, S. L., Buffone, M. G., & Roberson, M. S. (2011). Molecular cloning and characterization of

- phospholipase C zeta in equine sperm and testis reveals species-specific differences in expression of catalytically active protein. *Biology of Reproduction*, 85(1), 78–88. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.089466>
- Benítez, M. G. O., Flores, C. L., Ballesteros, J. A. H., Méndez, R. N., & Juárez-Mosqueda, M. D. L. (2008). Alterations of domains in the plasmatic membrane due to damages of the perinuclear theca of pig preserved spermatozoa. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(10), 1360–1364. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2008.1360.1364>
- Bonet, S., Casas, I., Holt, W., & Yeste, M. (2013). Boar Reproduction: fundamentals and new biotechnological trends. En *Springer*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-35049-8>
- Bragado, M. J., Gil, M. C., Martín-Hidalgo, D., De Llera, A. H., Bravo, N., Moreno, A. D., & García-Marin, L. J. (2012). Src family tyrosine kinase regulates acrosome reaction but not motility in porcine spermatozoa. *Reproduction*, 144(1), 67–75. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0075>
- Bravo, M. M., Aparicio, I. M., García-Herreros, M., Gil, M. C., Peña, F. J., & García-Marin, L. J. (2005). Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 71(1), 88–96. <https://doi.org/10.1002/mrd.20286>
- Breitbart, H., & Finkelstein, M. (2015). Regulation of sperm capacitation and the acrosome reaction by PIP2 and actin modulation. *Asian Journal of Andrology*, 17, 597–600. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154305>
- Breitbart, H., & Finkelstein, M. (2018). Actin cytoskeleton and sperm function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(2), 372–377. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.001>
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., & Breitbart, H. (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, 68(3), 837–845. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.009233>
- Brien, E. O., Estes, M. C., Casta, C., Vega, R. S., Guillam, F. G., & L, M. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology*, 129, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.024>
- Bucki, R., Wang, Y. H., Yang, C., Kandy, S. K., Fatunmbi, O., Bradley, R., Pogoda, K., Svitkina, T., Radhakrishnan, R., & Janmey, P. A. (2019). Lateral distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in membranes regulates formin and ARP2/3 mediated actin nucleation. *Journal of Biological Chemistry*, 294(12), 4704–4722. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005552>
- Cabello, J. F., Hernández, E. O., & Mújica, A. (2003). The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 56(2), 94–108. <https://doi.org/10.1002/cm.10135>
- Clarke, G., Clarke, F., & Wilson, S. (1982). Actin in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 26, 319–327.
- Corte, V. De, Demol, H., Goethals, M., Damme, J. Van, Gettemans, J., & Vandekerckhove, J. (1999). Identification of Tyr438 as the major in vitro c-Src phosphorylation site in human gelsolin: A mass spectrometric

- approach. *Protein Science*, 8(1), 234–241.
<https://doi.org/10.1110/ps.8.1.234>
- Cross, N. L. (1996). Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biology of reproduction*, 54, 138–145.
- Del Río, M. J., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., Cortés, M. E., Moreno, R. D., & Vigil, P. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: Avances recientes. *Revista Internacional de Andrología*, 5(4), 368–373.
[https://doi.org/10.1016/S1698-031X\(07\)74086-4](https://doi.org/10.1016/S1698-031X(07)74086-4)
- Dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., & Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological Reviews*, 83(2), 433–473.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2002>
- Escoffier, J., Lee, H. C., Yassine, S., Zouari, R., Martinez, G., Karaouzène, T., Coutton, C., Kherraf, Z. E., Halouani, L., Triki, C., Nef, S., Thierry-Mieg, N., Savinov, S. N., Fissore, R., Ray, P. F., & Arnoult, C. (2016). Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP. *Human Molecular Genetics*, 25(5), 878–891. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv617>
- Etkovitz, N., Rubinstein, S., Daniel, L., & Breitbart, H. (2007). Role of PI3-kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 77(2), 263–273.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.056705>
- Fatunmbi, O., Bradley, R. P., Kandy, S. K., Bucki, R., Janmey, P. A., & Radhakrishnan, R. (2020). A multiscale biophysical model for the recruitment of actin nucleating proteins at the membrane interface. *Soft Matter*, 16(21), 4941–4954. <https://doi.org/10.1039/d0sm00267d>
- Finkelstein, M., Etkovitz, N., & Breitbart, H. (2010). Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 285(51), 39702–39709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.170951>
- Finkelstein, M., Megnagi, B., Ickowicz, D., & Breitbart, H. (2013). Regulation of sperm motility by PIP2(4,5) and actin polymerization. *Developmental Biology*, 381(1), 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.06.014>
- Flores, E., Fernández-Novell, J. M., Peña, A., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. E. (2010). Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. *Theriogenology*, 74(3), 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.018>
- Fouquet, J. P., & Kann, M. L. (1992). Species-specific localization of actin in mammalian spermatozoa: Factor artifact? *Microscopy Research and Technique*, 20(3), 251–258. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070200304>
- França, L. R., Avelar, G. F., & Almeida, F. F. L. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, 63(2), 300–318.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.014>
- Fujimoto, S., Yoshida, N., Fukui, T., Amanai, M., Isobe, T., Itagaki, C., Izumi, T., & Perry, A. C. F. (2004). Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Developmental Biology*, 274(2), 370–383. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.07.025>
- Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A., & Brewis, I. A. (2008). Sperm head

- membrane reorganisation during capacitation. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 473–480.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.082583bg>
- Gao, D., & Critser, J. K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal*, 41(4), 187–196. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
- Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B., & Vogel, J. (2009). Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*, 30(11), 1845–1855. <https://doi.org/10.1002/elps.200800720>
- Grasa, P., Coward, K., Young, C., & Parrington, J. (2008). The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C ζ , in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Human Reproduction*, 23(11), 2513–2522.
<https://doi.org/10.1093/humrep/den280>
- Green, C. E., & Watson, P. F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122(6), 889–898. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220889>
- Gresset, A., & Harden, T. K. (2012). The phospholipase C isozymes and their regulation. *Sub-Cellular Biochemistry*, 58(1), 61–94.
<https://doi.org/10.1007/978-94-007-3012-0>
- Gutiérrez-Pérez, O., Juárez-Mosqueda, M. L., Mota, D., & Trujillo, M. E. (2011). The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. *Cryobiology*, 62(1), 32–39.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.11.006>
- Gutiérrez Pérez, O., Juárez Mosqueda, M. de L., Carvajal, S. U., & Ortega, M. E. T. (2009). Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology*, 58(3), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.02.003>
- Hachem, A., Godwin, J., Ruas, M., Lee, H. C., Buitrago, M. F., Ardestani, G., Bassett, A., Fox, S., Navarrete, F., De Sutter, P., Heindryckx, B., Fissore, R., & Parrington, J. (2017). PLC ζ is the physiological trigger of the Ca²⁺ oscillations that induce embryogenesis in mammals but conception can occur in its absence. *Development The Company of Biologists*, 144(16), 2914–2924. <https://doi.org/10.1242/dev.150227>
- Hafez, E. (2002). *Reproducción e iseminación artificial en animales* (7a ed.). Mc Graw- Hill Interamericana.
- Heytens, E., Parrington, J., Coward, K., Young, C., Lambrecht, S., Yoon, S., Fissore, R. A., Hamer, R., Deane, C. M., Ruas, M., Grasa, P., Soleimani, R., Cuvelier, C. A., Gerris, J., Dhont, M., Deforce, D., Leybaert, L., & Sutter, P. De. (2009). Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC z) in spermatozoa from infertile men. *Andrology*, 24(10), 2417–2428.
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hodgkin, M. N., Masson, M. R., Powner, D., Saqib, K. M., Ponting, C. P., & Wakelam, M. J. O. (2000). Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4 , 5-bisphosphate-specific PH

- domain. *Current Biology*, 571(368), 43–46.
- Holt, W. V. (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Holt, W. V. (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Ito, T., Suzuki, A., & Stossel, T. P. (1992). Regulation of water flow by actin-binding protein-induced actin gelatin. *Biophysical Journal*, 61(5), 1301–1305. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81938-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81938-0)
- Janmey, P. A., Bucki, R., Radhakrishnan, R., & Engineering, N. (2019). Regulation of actin assembly by PI(4,5)P2 and other inositol phospholipids: an update on possible mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(2), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.155> Regulation
- Jin, S. K., & Yang, W. X. (2017). Factors and pathways involved in capacitation: How are they regulated? *Oncotarget*, 8(2), 3600–3627. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12274>
- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 143–172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- Jovicic, M., Chmelikova, E., & Sedmikova, M. (2020). Cryopreservation of boar semen. *Czech Journal of Animal Science*, 65(4), 115–123.
- Juárez Mosqueda, M., & Mújica, A. (1999). A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *Journal of Structural Biology*, 128(3), 225–236. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4197>
- Kaewmala, K., Uddin, M. J., Cinar, M. U., Große-Brinkhaus, C., Jonas, E., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., Looft, C., & Schellander, K. (2012). Investigation into association and expression of PLCz and COX-2 as candidate Genes for boar sperm quality and fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 213–223. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01831.x>
- Kaláb, P., Pěkníková, J., Geussová, G., & Moos, J. (1998). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Molecular Reproduction and Development*, 51(3), 304–314. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199811\)51:3<304::AID-MRD10>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199811)51:3<304::AID-MRD10>3.0.CO;2-2)
- Kashir, J., Buntwal, L., Nomikos, M., Calver, B. L., Stamatiadis, P., Ashley, P., Vassilakopoulou, V., Sanders, D., Knaggs, P., Livaniou, E., Bunkheila, A., Swann, K., & Lai, F. A. (2017). Antigen unmasking enhances visualization efficacy of the oocyte activation factor, phospholipase C zeta, in mammalian sperm. *Molecular human reproduction*, 23(1), 54–67. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw073>
- Kashir, J., Heynen, A., Jones, C., Durrans, C., Craig, J., Gadea, J., Turner, K., Parrington, J., & Coward, K. (2011). Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(2), 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.04.006>
- Kashir, J., Jones, C., & Coward, K. (2012). Calcium oscillations, oocyte

- activation, and phospholipase C zeta. En *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 740, pp. 1095–1121). Springer Science. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_50
- Kashir, J., Jones, C., Mounce, G., Ramadan, W. M., Lemmon, B., Heindryckx, B., De Sutter, P., Parrington, J., Turner, K., Child, T., McVeigh, E., & Coward, K. (2013). Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability. *Fertility and Sterility*, *99*(1), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.001>
- Kashir, J., Konstantinidis, M., Jones, C., Lemmon, B., Chang Lee, H., Hamer, R., Heindryckx, B., Deane, C. M., De Sutter, P., Fissore, R. A., Parrington, J., Wells, D., & Coward, K. (2012). A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility. *Human Reproduction*, *27*(1), 222–231. <https://doi.org/10.1093/humrep/der384>
- Kashir, J., Nomikos, M., & Lai, F. A. (2018). Phospholipase C zeta and calcium oscillations at fertilisation: The evidence, applications, and further questions. *Advances in Biological Regulation*, *67*(1), 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2017.10.012>
- Kato, Y., Kumar, S., Lessard, C., & Bailey, J. L. (2021). ACRBP (Sp32) is involved in priming sperm for the acrosome reaction and the binding of sperm to the zona pellucida in a porcine model. *PLoS ONE*, *16*(6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251973>
- Kumar, P., & Meizel, S. (2005). Nicotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(27), 25928–25935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502435200>
- Kumaresan, A., Siqueira, A. P., Hossain, M. S., & Bergqvist, A. S. (2011). Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. *Cryobiology*, *63*(3), 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.08.002>
- Lawson, C., Goupil, S., & Leclerc, P. (2008). Increased activity of the human sperm tyrosine kinase SRC by the cAMP-dependent pathway in the presence of calcium. *Biology of Reproduction*, *79*(4), 657–666. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070367>
- Leahy, T., & Gadella, B. M. (2011). Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*(2), 7–13. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01799.x>
- Leclerc, P., & Goupil, S. (2002). Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes. Activation by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inhibition by Ca²⁺. *Biology of Reproduction*, *67*(1), 301–307. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.301>
- Li, J., Parrilla, I., Ortega, M. D., Martinez, E. A., Rodriguez-Martinez, H., & Roca, J. (2018). Post-thaw boar sperm motility is affected by prolonged storage of sperm in liquid nitrogen. A retrospective study. *Cryobiology*, *80*(September 2017), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.11.004>
- Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T., Cerolini, S., Penny, P., & Noble, R. (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of

- boar semen. *Theriogenology*, 63(2), 411–421.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.021>
- Mandal, K. (2020). Review of PIP2 in cellular signaling, functions and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–20.
<https://doi.org/10.3390/ijms21218342>
- Martecikova, S., Hulinska, P., Reckova, Z., Pavlik, A., Jeseta, M., & Machatkova, M. (2010). Effect of acrosome reaction progress in frozen-thawed boar spermatozoa on the efficiency of in vitro oocyte fertilization. *Veterinarni Medicina*, 55(9), 429–437. <https://doi.org/10.17221/2985-VETMED>
- Mazur, P., Leibo, S. P., & Chu, E. H. Y. (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research*, 71(2), 345–355. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90303-5)
- McGough, A. M., Staiger, C. J., Min, J. K., & Simonetti, K. D. (2003). The gelsolin family of actin regulatory proteins: Modular structures, versatile functions. *Federation of European Biochemical Societies*, 552(2–3), 75–81. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00932-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00932-3)
- Medrano, A., Holt, W. V., & Watson, P. F. (2009). Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Andrologia*, 41(4), 246–250.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.00927.x>
- Mejía-Flores, I., Chiquete-Félix, N., Palma-Lara, I., Uribe-Carvajal, S., & De Lourdes Juárez-Mosqueda, M. (2017). During capacitation in bull spermatozoa, actin and PLC- ζ undergo dynamic interactions. *Zygote*, 25(5), 558–566. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000260>
- Mitchel, L. A., Nixon, B., Baker, M. A., & Aitken, R. J. (2008). Investigation of the role of SRC in capacitation-associated tyrosine phosphorylation of human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 14(4), 235–243.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gan007>
- Mújica, A., Navarro-García, F., Hernández-González, E. O., & Juárez-Mosqueda, M. de L. (2003). Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy Research and Technique*, 61(1), 76–87. <https://doi.org/10.1002/jemt.10318>
- Muldrew, K., & McGann, L. E. (1994). The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophysical Journal*, 66(2), 532–541.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80806-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80806-9)
- Nakai, M., Ito, J., Sato, K. I., Noguchi, J., Kaneko, H., Kashiwazaki, N., & Kikuchi, K. (2011). Pre-treatment of sperm reduces success of ICSI in the pig. *Reproduction*, 142(2), 285–293. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0073>
- Nicander, L., & Bane, A. (1962). Fine structure of boar spermatozoa. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 57(3), 390–405.
<https://doi.org/10.1007/BF00343326>
- Nomikos, M. (2015). Novel signalling mechanism and clinical applications of sperm-specific PLC ζ . *Biochemical Society Transactions*, 43, 371–376.
<https://doi.org/10.1042/BST20140291>
- Nomikos, M., Elgmati, K., Theodoridou, M., Calver, B. L., Nounesis, G., Swann, K., & Lai, F. A. (2011). Phospholipase C ζ binding to PtdIns(4,5)P₂ requires the XY-linker region. *Journal of Cell Science*, 124(15), 2582–2590.
<https://doi.org/10.1242/jcs.083485>
- Nomikos, M., Kashir, J., & Lai, F. A. (2017). The role and mechanism of action

- of sperm PLC-zeta in mammalian fertilisation. *Biochemical Journal*, 474(21), 3659–3673. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160521>
- O’Flaherty, C., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(4), 528–540. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.027>
- Okada, M. (2012). Regulation of the Src family kinases by Csk. *International Journal of Biological Sciences*, 8(10), 1385–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5141>
- Oko, R., & Maravei, D. (1994). Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 50(5), 1000–1014. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.5.1000>
- Oko, Richard, Aarabi, M., Mao, J., Balakier, H., & Sutovsky, P. (2017). Sperm-specific WW-domain-binding proteins. En *The sperm cell* (2a ed., pp. 157–176). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781316411124.013>
- Oko, Richard, & Sutovsky, P. (2009). Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *Journal of Reproductive Immunology*, 83(1–2), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.05.008>
- Ono, S. (2007). Mechanism of depolymerization and devering of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *International Review of Cytology*, 258(07), 1–82. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)58001-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)58001-0)
- Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23(7), 7906–7909. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208160>
- Pertile, P., Liseovitch, M., Chalifa, V., & Cantley, L. (1995). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis is required for activation of phospholipase D in D937 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(10), 5130–5135. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.10.5130>
- Pesch, S., & Bergmann, M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, 37(7), 597–612. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.02.006>
- Pollard, T. D. (2017). Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8, 1–18.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., & Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscular cells. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29(1), 545–576.
- Romarowsky, A., Treviño, C. L., Mata-Martínez, E., Chávez, J. C., Sánchez-Cárdenas, C., Baker, M., & Darszon, A. (2016). Role of actin cytoskeleton during mammalian sperm acrosomal exocytosis. En *Sperm acrosome: Biogenesis and function during fertilization* (Vol. 220, pp. 145–158). Springer International Publishing Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30567-7>
- Rotfeld, H., Hillman, P., Ickowicz, D., & Breitbart, H. (2014). PKA and CaMKII mediate PI3K activation in bovine sperm by inhibition of the PKC/PP1 cascade. *Reproduction*, 147(3), 347–356. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0560>
- Saleh, A., Kashir, J., Thanassoulas, A., & Safieh-garabedian, B. (2020). Essential role of sperm-specific PLC-Zeta in egg activation and male factor

- infertility : An update. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* |, 8(28), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00028>
- Sati, L., Cayli, S., Delpiano, E., Sakkas, D., & Huszar, G. (2014). The pattern of tyrosine phosphorylation in human sperm in response to binding to zona pellucida or hyaluronic acid. *Reproductive Sciences*, 21(5), 573–581. <https://doi.org/10.1177/1933719113504467>
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., & Lai, F. A. (2002). PLC ζ : A sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129(15), 3533–3544.
- Saunders, C. M., Swann, K., & Lai, F. A. (2007). PLC ζ , a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochemical Society Symposium*, 74(1), 23–36. <https://doi.org/10.1042/BSS0740023>
- Shannalee R. Martinez, Maresha S. Gay, and L. Z. (2016). New insights into the molecular events of mammalian fertilizations. *Physiology & behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.006>
- Singh, D. K., Deshmukh, R. K., Narayanan, P. K., Shivaji, S., & Siva, A. B. (2017). SRC family kinases in hamster spermatozoa: Evidence for the presence of LCK. *Reproduction*, 153(5), 655–669. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0591>
- Sun, H. Q., Yamamoto, M., Yin, H. L., Sun, H. Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., & Yin, H. L. (1999). Gelsolin a multifunctional actin regulatory protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 32, 33179–33183.
- Sutovsky, P., Manandhar, G., Wu, A., & Oko, R. (2003). Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy Research and Technique*, 61(4), 362–378. <https://doi.org/10.1002/jemt.10350>
- Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T., & Lai, F. A. (2006). PLC ζ (zeta): A sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17(2), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2006.03.009>
- Swann, Karl. (2018). The role of Ca²⁺ in oocyte activation during in vitro fertilization: Insights into potential therapies for rescuing failed fertilization. *Molecular Cell Research*, 1865(11), 1830–1837. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.05.003>
- Swann, Karl, & Lai, F. A. (2016). The sperm phospholipase C- ζ and Ca²⁺ signalling at fertilization in mammals. *Biochemical Society Transactions*, 44, 267–272. <https://doi.org/10.1042/BST20150221>
- Tardif, S., Dubé, C., Chevalier, S., & Bailey, J. L. (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biology of Reproduction*, 65(3), 784–792. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.784>
- Torra-Massana, M., Cornet-Bartolomé, D., Barragán, M., Durban, M., Ferrer-Vaquer, A., Zambelli, F., Rodriguez, A., Oliva, R., & Vassena, R. (2019). Novel phospholipase C zeta 1 mutations associated with fertilization failures after ICSI. *Human reproduction*, 34(8), 1494–1504. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez094>
- Toshimori, K. (2009). Dynamics of the mammalian sperm head. En *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* (1a ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Trzcińska, M., Bryła, M., Gajda, B., & Gogol, P. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, *83*(3), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.045>
- Urner, F., & Sakkas, D. (2003). Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction*, *125*(1), 17–26. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250017>
- Vadnais, M. L., & Althouse, G. C. (2011). Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*, *76*(8), 1508–1516. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.021>
- Varano, G., Lombardi, A., Cantini, G., Forti, G., Baldi, E., & Luconi, M. (2008). Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not motility in human spermatozoa. *Human Reproduction*, *23*(12), 2652–2662. <https://doi.org/10.1093/humrep/den314>
- Vincent, C., Pruliere, G., Pajot-Augy, E., Champion, E., Garnier, V., & Renard, J. P. (1990). Effects of cryoprotectants on actin filaments during the cryopreservation of one-cell rabbit embryos. *Cryobiology*, *27*(1), 9–23. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90048-9](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90048-9)
- Visconti, M., & Kopf, G. (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, *59*, 1–6. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004952>
- Wang, Y. H., Bucki, R., & Janmey, P. A. (2016). Cholesterol-dependent phase-demixing in lipid bilayers as a switch for the activity of the phosphoinositide-binding cytoskeletal protein gelsolin. *Biochemistry*, *55*(24), 3361–3369. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01363>
- Wang, Y. H., Collins, A., Guo, L., Smith-Dupont, K. B., Gai, F., Svitkina, T., & Janmey, P. A. (2012). Divalent cation-induced cluster formation by polyphosphoinositides in model membranes. *Journal of the American Chemical Society*, *134*(7), 3387–3395. <https://doi.org/10.1021/ja208640t>
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, *60–61*, 481–492. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Wysocki, P., Koncicka, K., & Strzerek, J. (2009). Is the phosphorylation status of tyrosine proteins a marker for the cryo-capacitation of boar spermatozoa? *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, *53*(2), 229–232.
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, *85*(1), 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
- Yoneda, A., Kashima, M., Yoshida, S., Terada, K., Nakagawa, S., Sakamoto, A., Hayakawa, K., Suzuki, K., Ueda, J., & Watanabe, T. (2006). Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C ζ . *Reproduction*, *132*(3), 393–401. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01018>
- Yoon, S. Y., & Fissore, R. A. (2007). Release of phospholipase C ζ and [Ca $^{2+}$] oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction*, *134*(5), 695–704. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0259>
- Young, C., Grasa, P., Coward, K., Davis, L. C., & Parrington, J. (2009). Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of

- localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertility and Sterility*, 91(5), 2230–2242. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.05.021>
- Yu, A., Nomikos, M., Theodoridou, M., Nounesis, G., Lai, F. A., & Swann, K. (2012). PLC ζ causes Ca²⁺ oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane PI(4,5)P₂. *Molecular Biology of the Cell*, 23(2), 371–380. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-08-0687>
- Zigo, M., Maňásková, P., Zuidema, D., Kerns, K., Jonáková, V., Tůmová, L., Bubeníčková, F., & Sutovsky, P. (2020). Porcine model for the study of sperm capacitation, fertilization and male fertility. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03181-1>

11. APÉNDICES Y ANEXOS

Protocolos de técnicas de laboratorio

Protocolo de Inmunocitoquímica de espermatozoides

DIA 1

1. Las muestras de espermatozoides fijadas en las laminillas portaobjetos se colocan en la caja de plástico de manera ordenada (grupos de tratamiento: espermatozoides no capacitados, capacitados, RA y control negativo)
2. Hidratar las muestras mediante pases rápidos en alcohol desde: 100% → 96% → 90% → 80% → 70%.
3. Inmediatamente realizar lavado con agua destilada.
4. Limpiar y secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
5. Dibujar un círculo con un plumón hidrófobo alrededor de la señal marcada en la lámina portaobjeto.
6. Colocar 50 ul de solución para permeabilizar sobre cada una de las muestras (que cubra todo el círculo donde se encuentra la muestra)
7. Cerrar la caja y llevarla al agitador por 20 minutos.
8. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → PBS.
9. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
10. Colocar por segunda vez 50 ul de Solución para permeabilizar sobre cada una de las muestras.
11. Cerrar la caja y llevarla al agitador por 10 minutos.
12. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → PBS.
13. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
14. Colocar 50 ul de Bloqueador de Peroxidasa (H₂O₂) en cada una de las muestras.
15. Llevar la caja a agitación y dejar actuar por 10 minutos.
16. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → PBS.
17. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
18. Colocar por segunda vez 50 ul de Bloqueador de Peroxidasa en cada una de las muestras.
19. Llevar la caja a agitación y dejar actuar por 10 minutos.
20. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → PBS.
21. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
22. Colocar por tercera vez 50 ul de Bloqueador de Peroxidasa en cada una de las muestras.
23. Llevar la caja a agitación y dejar actuar por 10 minutos.
24. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → PBS.
25. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
26. Colocar 50 ul del bloqueador de proteína (Background Sniper azul) en cada una de las muestras.
27. Llevar la caja a agitación y dejar actuar por 10 minutos.
28. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → PBS.
29. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
30. Colocar por segunda vez 50 ul del bloqueador de proteína en cada una de las muestras.
31. Llevar la caja a agitación y dejar actuar por 10 minutos.
32. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → PBS.
33. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
34. Colocar por tercera vez 50 ul del bloqueador de proteína en cada una de las muestras.
35. Llevar la caja a agitación y dejar actuar por 10 minutos.
36. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → PBS.
37. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
38. Colocar por cuarta vez 50 ul del bloqueador de proteína en cada una de las muestras.
39. Dejar actuar por 30 minutos al ambiente.
40. Durante este tiempo preparar la dilución del anticuerpo primario para la proteína correspondiente:

Anticuerpo	Dilución	Para 1 réplica (3 laminillas NC, C, RA)	Para 2 réplicas (6 laminillas)
PIP2	1:50	3ul AC en 147 ul TBS Tween	6 ul AC en 294 ul TBS Tween
Gelsolina	1:25	6 ul AC en 144 ul TBS Tween	12 ul AC en 288 ul TBS Tween
PLCZ	1:50	3 ul AC en 147 ul TBS Tween	6 ul AC en 294 ul TBS Tween
SRC	1:100	1.5 ul AC en 148.5 TBS Tween	3 ul AC en 297 ul TBS Tween

41. Transcurrido el tiempo lavar en PBS → PBS Tween → PBS.
42. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.
43. Colocar 50 ul del anticuerpo primario indicado a cada una de las laminillas de muestras (NC, C, RA) excepto en la laminilla del control negativo, en esta colocar bloqueador de proteína en lugar del AC primario.
44. Incubar la caja con las laminillas en refrigeración a 4°C y dejar actuar el anticuerpo primario durante toda la noche.

DIA 2

45. Sacar la caja con las laminillas de refrigeración y dejarle al ambiente durante al menos una hora.
46. Lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → TBS rojo → PBS.
47. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra
48. Colocar 50 ul de la Bloqueador de Peroxidasa en cada una de las muestras.
49. Dejar actuar durante 10 minutos en reposo.
50. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS → PBS Tween → TBS rojo → PBS.
51. Secar con una gasa alrededor del círculo donde se encuentra la muestra.

52. Colocar 50 ul del Link amarillo (Trekkie Universal Link: anticuerpo secundario) en cada una de las muestras y el control negativo y dejar actuar durante 30 minutos en reposo.
53. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS→ PBS Tween → PBS.
54. Secar con una gasa alrededor del circulo donde se encuentra la muestra
55. Colocar 50 ul de Link rosa (TrekAvidin-HRP Label) en cada una de las muestras y el control negativo y dejar actuar durante 20 minutos en reposo.
56. Durante este tiempo preparar el cromógeno en un tubo ependorf: Usar pipetas con etiqueta roja.
 - Colocar 1 ml de diluyente del Kit (Betazoid DAB Substrate Buffer) "botella transparente grande"
 - Colocar 1 gota del cromógeno del Kit (botella gotero pequeño).
57. Transcurrido el tiempo lavar las laminillas en PBS→ PBS Tween → PBS.
58. Secar con una gasa alrededor del circulo donde se encuentra la muestra.
59. Añadir 50 o 60 ul del Cromógeno preparado en cada una de las muestras y dejar actuar por 5 minutos o más (hasta que se observe un color café marrón).
60. Lavar inmediatamente las láminas de las muestras con agua de la llave sobre el recipiente de cromógeno específico.
61. Inmediatamente colocar 50 ul de tinción de hematoxilina por 1 minuto.
62. Lavar con agua de la llave y luego agua destilada.
63. Deshidratar las muestras con pases rápidos en alcohol desde 70% → 80% → 90% → 96% → 100% (menor a mayor).
64. Llevar la caja de las muestras a la cámara de extracción.
65. Colocar xilol en el recipiente de vidrio (coplin) para las laminillas.
66. Introducir las laminillas entre las ranuras del recipiente con Xilol (ojo: asegurarse y cuidar el lado de la laminilla donde se encuentra la muestra).
67. Voltear las laminillas para favorecer que toda la marca del lápiz hidrófobo se elimine (asegurarse siempre la dirección donde se encuentra la muestra)
68. Secar las láminas con una gasa alrededor del circulo donde se encuentra la muestra.
69. Extraer con una jeringa de 3ml una pequeña cantidad de resina nueva de la botella que la contiene.
70. Colocar una gota de la resina en el centro del círculo de la muestra.
71. Inmediatamente colocar una lámina cubreobjetos.
72. Expandir toda el área del circulo haciendo presión el cubreobjetos con una pinza y eliminar burbujas.
73. Guardar las láminas en una caja por 48h para que sequen antes de su evaluación.
74. Observar los espermatozoides por microscopia utilizando lente 100 X con aceite de inmersión.
75. Realizar la evaluación contando 100 espermatozoides por cada laminilla.

Protocolo de extracción de proteínas de la TP de espermatozoides

DIA 1

1. Preparar el coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa:
En un tubo falcon de 15 ml añadir: 10 ml de DPBS, 1 pastilla de inhibidor de proteasas y 1 pastilla de inhibidor de fosfatasa. Homogenizar en el vortex y mantener en refrigeración.
2. Preparar: Brij 36T 10%, y Dithiothreitol (DTT).
3. En un tubo falcon de 15 ml colocar 200×10^6 espermatozoides/ml y añadir 1 ml del coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.
4. Decapitar los espermatozoides por sonicación durante 30 segundos, amplitud 65%.
5. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
6. Eliminar sobrenadante y reconstituir con 1 ml del coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.
7. Realizar lavados por centrifugación por tres veces.
8. Al finalizar el tercer lavado eliminar sobrenadante y reconstituir con: 1 ml del coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa y 130 ul de Brij 36 T10 %
9. Al colocar Brij 36T inmediatamente homogenizar por vortex durante 45 segundos.
10. Transferir toda la muestra a un tubo eppendorf de 2 ml.
11. Centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos. Usar centrifuga pequeña refrigerada a 4°C.
12. Eliminar sobrenadante y reconstituir con 1ml de coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa.
13. Centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos.
14. Eliminar sobrenadante y reconstituir con: 1.5 ml del coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa, 150 ul de DDT y 130 ul Brij 36T 10%.
15. Homogenizar e incubar los tubos en refrigeración por 30 minutos a 4°C.
16. Transcurrido el tiempo homogenizar la muestra y tomar 100 ul de sobrenadante y colocar en un nuevo tubo eppendorf. Esta muestra se etiqueta como: sobrenadante y se guarda en congelación.
17. La muestra principal restante. Centrifugar a 12500 rpm por 15 min.
18. Tomar 1 ml de sobrenadante y colocar en un tubo eppendorf y etiquetar como muestra de proteínas de la TP.
19. Añadir 1 ml de acetona y guardar en congelación hasta el siguiente día.
20. El pellet se reconstituye con 1 ml de paraformaldehído y se guarda en refrigeración.

DIA 2

21. Descongelar muestra de proteínas de TP a temperatura ambiente.
22. Centrifugar a 13500 rpm a 4°C por 15 minutos para separar la acetona.
23. Eliminar sobrenadante lo máximo posible por aspiración o decantación rápida.
24. Reconstituir el pellet añadiendo 20 -40 ul de agua millipore.

Cuantificación de la concentración de proteína extraída mediante el uso del NanoDrop

25. Tomar 4 ul de muestra de proteína del extracto total para llevar a cuantificación. El volumen restante guardar rápidamente en congelación.
26. Preparar materiales necesarios: cooler, gradilla, hielo, micropipeta de 10 ul, puntas blancas, agua millipore, sanitas.
27. Una vez en el laboratorio INP: Encender la computadora y abrir el programa ND-1000 V3.5.2.
28. Seleccionar: Protein A280.
29. Para abrir la pantalla de medición primero limpiar con 2 ul de agua en el pedestal de medición y bajar el brazo de muestreo.
30. Cuando la pantalla de medición este activa, levantar el brazo de muestreo y secar con papel el pedestal de medición.
31. Cargar una alícuota de 2 ul de agua millipore en el pedestal de medición y bajar el brazo de muestreo.
32. Hacer clic en: Blank y esperar que el valor marque 0.
33. Una vez completada la medición, limpiar y secar con papel para eliminar el agua del pedestal de medición
34. Colocar una alícuota de 1.5 o 2 ul de la muestra de proteína de interés en el pedestal de medición y bajar el brazo de muestreo.
35. Hacer clic en Measure y esperar el valor marque en mg/ml.
36. Una vez completada la medición de todas las muestras, limpiar con papel seco, colocar 2 ul de agua millipore, seleccionar Blank y Exit para cerrar el programa.

Consejos:

- Medir más de una muestra a la vez en el NanoDrop, limpiarlo y cambiar puntas de pipeta para la siguiente medición.
- Si mide varias réplicas de la misma muestra, es importante utilizar una alícuota nueva para cada medición para garantizar resultados precisos.
- De existir errores: limpiar, volver a colocar agua millipore y Blank.
- Tomar fotos de los resultados y revisar la imagen espectral para evaluar la calidad de la muestra.

Preparación de los extractos de proteína cuantificados para SDS-PAGE

De regreso al Laboratorio luego de cuantificar la concentración de proteína

37. Preparar el amortiguador de proteína (sacar de la refrigeradora y colocar en la cámara de extracción).
38. Preparar un vaso de precipitación con agua hirviendo y colocar en platina térmica a máxima temperatura (95°C).
39. Añadir el amortiguador de muestra: 40 ul para Muestra de proteínas precipitada y 100 ul para muestra los sobrenadantes (Dilución 1:1) e inmediatamente usando un cartón colocar los tubos en el vaso con agua hirviendo durante 5 minutos, de manera que floten, sin sumergir completamente.
40. Guardar las muestras de proteína en congelación hasta su análisis por western blot.

Protocolo de trabajo para la identificación de proteínas mediante western blot

Armar el equipo (Biorad 1.5 mm) para colocar el gel

1. Preparar los componentes del equipo: Base o soporte de fundición, marco de fundición, cauchos de color gris y platos de vidrio grandes y pequeños.
2. Poner los dos platos de vidrio en la ranura del marco de fundición, tomando en cuenta que entre los dos cristales se forme un espacio. Fijarse que el plato de vidrio más pequeño quede en dirección hacia los seguros externos y el vidrio más grande quede hacia la parte interna.
3. Cerrar los dos seguros de ambos lados del marco de fundición para asegurar a los dos platos de vidrio.
4. Revisar que el asiento de los vidrios este totalmente plano, es decir ambos platos de vidrio nivelados.
5. Colocar los cauchos grises sobre la base del soporte de fundición.
6. Colocar el marco de fundición armado con los platos de vidrio sobre el soporte de fundición y asegurarlas correctamente.
7. Para comprobar que no exista fugas, llenar de agua entre los dos platos de vidrio, vaciar y secar con papel sin desarmar.
8. Realizar una marca sobre el plato de vidrio para identificar hasta donde se llenará el gel espaciador, para ello medir con el peine formador de pocillos y marcar aprox. debajo de 1 cm.

Preparación de geles: Gel acrilamida al 10%

9. Etiquetar dos vasos de precipitación: mediano y pequeño con el gel tipo de gel respectivo.
Para correr dos geles: preparar 16 ml de gel espaciador y 10 ml de gel concentrador.

Gel espaciador, running gel o Resolving gel

	16 ml
Acrilamida 30%	5.36 ml
Bisacrilamida 2%	2.16 ml
Tris 1M pH 8.8	6 ml
H2O	2.32 ml
SDS 20%	80 ul
TEMED	6.96 ul
APS 2 % en agua	240 ul

El TEMED y APS 2% se debe colocar doble y al final

Gel concentrador o Stacking Gel

	6 ml
Acrilamida 30%	1.02 ml
Bisacrilamida 2%	420 ul
Tris 1M pH 6.8	744 ul
H2O	4.8 ml
SDS 20%	30 ul
TEMED	6 ul
APS 2 %	150 ul

El TEMED y APS se debe colocar doble y luego que el gel espaciador este solidificado.

Colocación del gel en la ranura de los platos de vidrio

10. Con una pipeta de 1ml colocar el gel espaciador en la ranura entre los dos vidrios hasta alcanzar la marca realizada previamente y evitando formar burbujas.
11. Dejar solidificar el gel espaciador durante 10 a 15 minutos.
12. Transcurrido el tiempo terminar de preparar el gel concentrador y colocar en la parte superior hasta alcanzar el límite de la ranura de los dos platos de vidrio.
13. Introducir el peine para formar los pocillos en la parte superior del gel.
14. Dejar solidificar el gel concentrador con el peine colocado durante 5 a 10 minutos.
15. Una vez solidificado el gel, sacar el peine cuidadosamente.

Armado del equipo para la corrida del gel

16. Una vez formado los pocillos sacar el soporte de fundición de la base principal, abrir el soporte de fundición y sacar los platos de vidrio con el gel.
17. Colocar los platos de vidrio con el gel en el armazón blanco que tiene los electrodos (rojo y negro).
Si se corren dos geles deben colocarse, uno en cada lado.
Los vidrios pequeños deben quedar orientados hacia la parte interior.
Asegurar los vidrios y cerrar los seguros.
18. Colocar el armazón blanco en la cámara de electroforesis.
19. Llenar el espacio central de la cámara de electroforesis con buffer de corrida nuevo, cubriendo completamente.

Colocación de la muestra de proteína en los pocillos del gel

20. Colocar en el primer pocillo 10 ul el control de peso molecular (precisión plus protein dual color standards) utilizando una punta de pipeta extra-delgada
21. En los siguientes pocillos colocar las muestras de proteína con una concentración de 30 ug de forma ordenada según los grupos experimentales.
22. En el último pocillo colocar 5 ul de la muestra de proteína de cerebro de rata utilizado como control positivo.
23. Una vez colocadas todas las muestras en los dos geles de ambos lados de la cámara de electroforesis llenar con buffer de corrida los dos espacios laterales de la cámara cubriendo completamente.
24. Cerrar la cámara de electroforesis con la cubierta de color verde que contiene los cables de los electrodos asegurándose que se enlacen en la posición correcta (negro con negro y rojo con rojo).

Configuración del equipo Bio Rad Power PAC1000 para realizar la electroforesis

25. Conectar y encender el equipo Bio Rad Power PAC1000.
26. Conectar los cables de los electrodos de la cámara de electroforesis al equipo Bio Rad Power PAC1000 asegurándose que estén acoplados correctamente (rojo-rojo; negro-negro).
27. Programar el equipo Bio Rad Power PAC 1000 para la corrida del gel:
Opciones: Manual → Constant V (voltios) → Asignar en el teclado: 90 V → Correr
28. Cuando las muestras hayan corrido hasta la línea transparente del equipo y se hayan igualado en los diferentes pocillos.
Parar → Exit → Manual → Constant V (voltios) → Asignar en el teclado: 100 V → Correr
29. Cuando las muestras hayan superado la mitad del gel.
Parar → Exit → Manual → Constant V (voltios) → Asignar en el teclado: 100 V → Correr
30. El tiempo aproximado de corrida y separación de proteínas es: 2 a 2h30 min. Importante observar continuamente.

Inmunotransferencia:

31. Preparar y activar las membranas: (minutos previos al final de la corrida del gel).
 - a) Cortar las membranas al tamaño adecuado.
 - b) Colocar en un toper pequeño de plástico 10 ml de alcohol metílico.
 - c) Sumergir las membranas en el alcohol metílico y dejar actuar por 1 minuto.
 - d) Sacar las membranas del alcohol metílico y colocar en un nuevo toper de plástico para enjuagar las membranas con agua millipore y luego eliminar el agua cuidadosamente.
 - e) Colocar las membranas en tópers de plástico individuales y añadir buffer de transferencia nuevo que cubra completamente las membranas (ahí permanecen hasta que termine la corrida del gel).
32. Preparar el cassette de inmunotransferencia para hacer el sándwich.
 - a) Colocar en una bandeja buffer de transferencia (cantidad suficiente).
 - b) Preparar dos cassettes de inmunotransferencia.
 - c) Sumergir dos filtros de papel y dos esponjas por cada cassette.
33. Cuando las proteínas han corrido todo el gel parar el equipo Bio Rad Power PAC1000. Seleccionar el icono de parar y Exit.
34. Desconectar los dos cables de la cámara de electroforesis del equipo Bio Rad Power PAC1000.
35. Sacar los platos de vidrio que contienen los geles del armazón blanco.
36. Con el uso de una paleta introducir cuidadosamente en una de las esquinas entre los platos de vidrio y levantar suavemente el plato de vidrio pequeño y luego retirarlo con la mano.
37. Con la misma paleta haciendo presión cortar los bordes laterales, superior e inferior del gel donde no están los carriles de las proteínas.
38. Utilizando la misma paleta desde una esquina levantar el gel cuidadosamente y llevarlo al cassette de inmunotransferencia (evitar usar los dedos, aunque estén con guantes)
39. Colocar el gel sobre el filtro de papel en la misma dirección que se asentaba sobre la placa de vidrio (no voltear).
40. Hacer una muesca en el lado izquierdo de la membrana para saber el lado de inicio y la orientación,
41. Colocar la membrana PVDF sobre el gel, cuidando que quede completamente cubierta y recta.
42. Cubrir con filtro de papel y esponja, haciendo presión fuerte en cada capa.
43. Con la misma paleta a manera de rodillo hacer presión sobre la esponja y cerrar el seguro del cassette.
44. Finalmente se forma el sándwich que queda formado en la base la esponja luego se monta el filtro blanco, luego el gel, la membrana de papel y sobre este nuevamente filtro blanco y la esponja.
45. Colocar el cassette con el sándwich de gel-membrana en el armazón rojo-negro de inmunotransferencia, asegurándose que la pared negra del cassette este en contacto con la pared negra del armazón de inmunotransferencia (de cátodo a ánodo).
46. Llevar el armazón rojo-negro con los cassettes y colocarlo sobre la cámara de equipo de inmunotransferencia.
47. Colocar una barra de hielo en el espacio de la cámara de inmunotransferencia.
48. Añadir el buffer de transferencia sobre los espacios laterales de la cámara hasta cubrir completamente.
49. Cerrar la cámara de inmunotransferencia con su cubierta de color verde que contiene los cables de los electrodos asegurándose que se enlacen en la posición correcta (negro con negro, rojo con rojo).
50. La cámara de inmunotransferencia colocar sobre una cubeta grande que contenga hielo en la base y a los costados de la cámara.
51. Conectar los cables de los electrodos de cámara de inmunotransferencia al equipo Bio Rad Power PAC1000, asegurándose que estén acoplados correctamente (rojo con rojo y negro con negro)

Configuración del equipo Bio Rad Power PAC1000 para realizar la Inmunotransferencia

52. Encender el equipo y luego configurar:
Manual → Constant mA (miliamperes) → 250
Time /V-Hour → 2:00 h (asignar en el teclado) y Correr
53. Esperar las dos horas de inmunotransferencia.
54. Durante este tiempo: Preparar 30 ml de solución Bloqueador de proteína: BSA + TBS Tween (este volumen se divide en 2 toper individuales para dos membranas 12 ml + 12 ml y 6 ml para preparar los anticuerpos primarios).
55. Para bloquear membrana se necesita BSA 0.5% diluido en TBS Tween, por lo tanto para el volumen de 30 ml pesar 0.15 g de BSA. Esta cantidad se coloca en un vaso de precipitación, se diluye y se homogeniza en TBS Tween.

Procesamiento de las membranas luego de la Inmunotransferencia

56. Al terminar la inmunotransferencia, apagar el equipo, desconectar, abrir el cassette y extraer la membrana, cuidadosamente.
57. Etiquetar la membrana con lápiz para saber a qué grupo corresponde cada banda.
58. Colocar las membranas en toper individuales y añadir la tinción Rojo de púrsieu— (cantidad pequeña que cubra la membrana).
59. Observar si se marcan los carriles.
60. Realizar 3 enjuagues en agua destilada para desteñir el fondo de la membrana.
61. Lavar las membranas en TBS Tween enjuagando y vertiendo varias veces para retirar completamente la tinción hasta que las membranas se observen nuevamente blancas.

Bloqueo de las membranas

62. Colocar las membranas en tóper individuales y añadir 12 ml de BSA+ TBS tween en cada una.
63. Cubrir los tópers, llevar a la máquina de agitación y dejar actuar durante 1h.

Incubación de las membranas con el anticuerpo primario

64. Durante este tiempo preparar el anticuerpo primario.
Preparar en tubos eppendorf (anticuerpo primario + 1.5ml Diluyente BSA+TBS Tween)
Tabla referencia del volumen de AC 1° y diluyente a utilizar según la dilución recomendada para cada anticuerpo.

	para preparar 1.5 ml	
	AC	Diluyente
Dilución 1:25	60 ul	1440 ul
Dilución 1:50	30 ul	1470 ul
Dilución 1:100	15 ul	1485 ul
Dilución 1:200	7.5 ul	1492.5 ul
Dilución 1:400	3.75 ul	1496.25 ul
Dilución 1:500	3 ul	1497 ul

65. Preparar los plásticos individuales para colocar las membranas con el anticuerpo primario.
66. Al terminar el bloqueo tirar la solución de bloqueo de BSA y realizar tres enjuagues en TBS-Tween para remover el exceso de la solución de bloqueo.
67. Colocar la membrana sobre el plástico tomando cuidadosamente con una pinza.
68. Sellar tres lados del plástico con la maquina azul caliente.
69. Colocar el anticuerpo primario dentro del plástico donde se encuentra la membrana, quitar las burbujas con la pinza y sellar el ultimo lado del plástico asegurándose de que no exista fugas del anticuerpo.
70. Colocar los plásticos sellados sobre una base y asegurar con cinta adhesiva todo el contorno del plástico de tal manera que los plásticos queden totalmente estirados.
71. Colocar la base con los plásticos que contienen las membranas sobre una plataforma basculante giratoria dentro de la refrigeradora a 4°C (asegurarse que este en movimiento)
72. Dejar toda la noche para que el anticuerpo primario actúe.

AL SIGUIENTE DIA

Incubación de las membranas con el anticuerpo secundario

73. Sacar la base de refrigeración, cortar los plásticos y con una pinza colocar las membranas en tópers individuales.
74. Añadir TBS Tween (cantidad que cubra la membrana) y realizar 5 lavados en agitación por 5 minutos eliminado y añadiendo nuevo volumen de TBS Tween entre cada lavado.
75. Preparar la solución del anticuerpo secundario del KIT (2° Antibody Solution). Este se utiliza para si los anticuerpos primarios incubados son de conejo o cabra.
76. Luego de los lavados con la pinza colocar las membranas en los plásticos
77. Colocar 1 ml de Solución de anticuerpo secundario y sellar todos los lados del plástico.
78. Colocar los plásticos sellados sobre una base y asegurar con cinta adhesiva, de tal manera que los plásticos queden totalmente estirados.
79. Colocar la base con los plásticos que contienen las membranas sobre un agitador a temperatura ambiente y cubrir de la luz con una franela limpia (asegurarse que este en movimiento).
80. Dejar que actúe el anticuerpo secundario durante 1 hora.
81. Transcurrido el tiempo, sacar las membranas de los plásticos y colocar en tóper individuales.
82. Añadir solución de lavado preparada (cantidad que cubra la membrana) y realizar 3 lavados en agitación por 5 min eliminado y añadiendo nuevo volumen de Solución de lavado entre cada lavado.
83. Luego realizar dos lavados adicionales con agua destilada en agitación por 2 min.

Revelado de las membranas

84. Preparar materiales y reactivos en el cuarto oscuro:
Materiales: tres de bandejas de plástico, cajas petri de plástico, pinza, tijera, cinta adhesiva, alarma.
Reactivos: sustrato de quimioluminiscencia del KIT, solución de revelado, solución de fijación y agua de la llave.
85. Encender luz roja.
86. Luego de los lavados con agua destilada colocar las membranas en cajas de petri individuales.
87. Colocar 1 ml del sustrato de quimioluminiscencia sobre toda la superficie de la membrana y dejar actuar por 5 min.
88. Preparar el chasis con las micas de plástico.
89. Con la pinza colocar la membrana entre la mica y asegurar la mica con cinta adhesiva pegando los bordes al chasis.
90. Preparar una lámina film de revelado y cortar un borde para asegurarse el borde de inicio de las bandas.
91. Inmediatamente sobre la mica que contiene la membrana colocar la lámina film de revelado (la cara blanca en contacto con la mica).
92. Cerrar el chasis y esperar de 10 min en completa oscuridad.
93. Transcurrido el tiempo observar si existe fluorescencia de las membranas.
94. Sacar la lámina film del chasis y colocar en la bandeja con solución de revelado hasta observar las bandas de color oscuro.
 - Al colocar el film en la solución de revelado hacerlo rápido, de forma que la lámina film se introduzca y se cubra de forma uniforme del líquido.
 - La observación de las bandas en la solución de revelado puede tardar hasta 5 min.
95. Enjuagar rápidamente en la bandeja con agua de la llave (aproximadamente 1 minuto).
96. Luego colocar en la bandeja con solución de fijación hasta que las láminas film se observen transparentes (aproximadamente 3 min).
97. Nuevamente enjuagar en la bandeja con agua de la llave y dejar secar al ambiente.

IMPORTANTE: Si el anticuerpo primario no es de conejo o cabra utilizar el método Anticuerpo secundario: goat anti-mouse IgG-HRP, Sigma en lugar de 2° Antibody solution del KIT.

Protocolo de Co-inmunoprecipitación

DIA 1

1. Extraer las proteínas de la TP de los espermatozoides de verraco y resuspender en 20-40 ul de agua millipore (protocolo anterior).
2. Cuantificar la concentración de proteína en el NanoDrop de los diferentes grupos experimentales, para ello utilizar 4 ul del extracto total de proteínas.
3. Realizar los cálculos para conocer la concentración proteica en ug de proteína total por 1 ml de lisado celular.
4. Transferir 100-500 ug de proteína celular total a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y aforar añadiendo PBS hasta completar un volumen de 500 ul.
5. Añadir el anticuerpo primario.
Para inmunoprecipitar gelsolina se necesita: 1-2 ug de anticuerpo por cada 100 -500 ug de proteína total (500 ul de lisado celular).
Concentración del anticuerpo anti-gelsolina por cada vial: 500 ug de AC IgG / ml de PBS
6. Calcular volumen requerido
Volumen de AC anti-gelsolina requerido: $(2 \text{ ug} \times 1000 \text{ ul}) / 500 \text{ ug} = 4 \text{ ul}$ de anticuerpo anti-gelsolina.
La concentración óptima depende de cada AC, pero normalmente se recomienda añadir entre 1 – 10 ul de AC.
7. Luego de añadir el anticuerpo, homogenizar por pipeteo.
8. Cerrar los tubos, envolver con papel parafilm las tapas de los tubos para evitar que se abran por movimiento.
9. Colocarlos sobre una plataforma basculante giratoria y pegarlos con cinta masking.
10. Incubar los tubos eppendorf (extractos de proteínas de la TP de esperma + anticuerpo) en refrigeración a 4°C, en agitación durante toda la noche.

DIA 2

11. Sacar los tubos de refrigeración e inmediatamente añadir 10 -20 ul de Protein G Plus/Protein A Agarose Suspension.
12. Cerrar los tubos, envolver con papel parafilm las tapas de los tubos para evitar que se abran por movimiento.
13. Colocarlos sobre una plataforma basculante giratoria y pegarlos con cinta masking.
14. Incubar en refrigeración a 4°C durante toda la noche.

DIA 3

15. Centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C para coleccionar los inmunoprecipitados.
Cuidadosamente retirar el sobrenadante y dejar el pellet, donde están los inmunocomplejos.
16. Añadir al pellet 40 – 50 ul de PBS y lavar el pellet 4 veces por centrifugación a 2500 rpm por 5 minutos a 4°C.
17. Después del lavado final desechar el sobrenadante, aspirar y resuspender el pellet en 40-50 µl de amortiguador de muestra de electroforesis 1x (dilución 1:1).
18. Hervir las muestras durante 5 minutos
19. Guardar las muestras en congelación hasta su uso.
20. Correr alícuotas de 20 µl mediante SDS-PAGE.

Consejos:

- Las muestras no utilizadas se pueden almacenar a -20 °C.
- Realizar todos los pasos de la co-inmunoprecipitación utilizando tubos de microcentrífuga de 1.5 ml o 0.5 ml en hielo.
- Centrifugar siempre en refrigeración a 4°C.
- Al eliminar los sobrenadantes, pipetear cuidadosamente.