



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL**

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA LA TECA
PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE DE CERDO.**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

JUAN CARLOS MÁRQUEZ ROMERO.

TUTOR:

Dra. MARIA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

COMITE TUTORAL:

Dra. MARIA ELENA TRUJILLO ORTEGA

Dr. MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ.



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.

Éste trabajo deseo dedicárselo a todos aquellos que compartieron su apoyo, tiempo, espacio, conocimientos y consejos, así como también a los que me acompañaron durante todo el camino sin importar las diferencias, los tiempos o las distancias.

A mi familia, por su apoyo incondicional y por haberme hecho parte de un sueño, de una ilusión y una esperanza. Por haberme apoyado con sus consejos y su paciencia, así como también proveerme de todo lo necesario. A mi papá, por que siguió siempre cada uno de los pasos que di y por toda la sabiduría de sus consejos. A mi mamá, por haber fomentado en mí, principios y valores, así como también su apoyo en todos los aspectos de mi vida.

A mis hermanos, por haber creído en mí, por su apoyo y por compartir conmigo sus ilusiones y metas.

A mis pequeños amores, Aylin Carolina y Lesiye Alejandra, ese par de chispitas traviesas que han endulzado mi vida y que me han hecho creer de nuevo que en este mundo hay inocencia y ternura, y por todo lo que me han enseñado.

A mi gran amor Sonia O. Tejada, por todo el apoyo y todo el amor que me dio durante estos hermosos años. También quiero agradecerle todas las horas de desvelo y de arduo trabajo que me dedicó, así como también por haber estado conmigo con tanto amor y dedicación durante incontables horas en todo momento.

ÍNDICE

Índice	I
Índice de figuras y tablas	II
Resumen	IV
Abstract	V
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
VI. RESULTADOS	36
VII. DISCUSIÓN	43
VIII. CONCLUSIONES	46
IX. BIBLIOGRAFÍA CITADA	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de la cabeza de un espermatozoide de mamífero, donde se muestra la localización de la TP y sus divisiones.

Figura 2. Representación gráfica del reconocimiento antígeno – anticuerpo.

Figura 3. Blott de las proteínas de la TP expuestas a los seis sueros, a una dilución de 1:500. Las flechas señalan los sitios en los que se hace evidente la inmunoreactividad de cada uno de los sueros de las ratas, esto es, el reconocimiento positivo ante las proteínas de la TP. Las bandas que presentaron inmunodetección, tienen un peso aproximado de 50, 45 y 17 kDa aproximadamente.

Figura 4. Recuperación de cabezas mayor al 95% posterior al decapitado y a la separación por medio del filtrado mediante el uso de mayas de Nylon. Posterior al decapitado las cabezas espermáticas fueron sometidas a tratamiento con detergente Brij 36-T.

Figura 5. MET de cabeza de espermatozoide después del decapitado en donde se aprecia el daño a la membrana, generado por la fricción de las perlas sobre la superficie de la cabeza espermática.

Figura 5-A. MET de cabeza de espermatozoide de cerdo después del decapitado y solubilización de membrana con detergente Brij 36-T. La flecha señala la presencia de la subestructura en buen estado. En la figura 5-B. Se observa un espermatozoide con extracción completa de la TP después de los procesos antes mencionados. También se puede observar que el núcleo permanece condensado.

Figura 6. SDS – PAGE al 12% de las proteínas de la TP del espermatozoide de cerdo, teñido con azul de Coomassie, en el que se observan del lado izquierdo los marcadores de peso molecular y en el lado derecho, las bandas de las proteínas.

Figura 7. Immunoblotting de las proteínas de la TP, en el que se observa el reconocimiento de las mismas al ser puestas en contacto con los anticuerpos presente en las ratas preinmunes.

Figura 8. Microscopía confocal de cabezas de espermatozoides de cerdo, con suero pre-inmune, como control negativo. En la figura 9-A se observa en fase de contrastes la presencia de los espermatozoides de cerdo en la muestra. En la figura 9-B se observa la ausencia de inmunodetección de proteínas de la TP.

Figura 9. Microscopía de fluorescencia mostrando la detección de las proteínas de la TP con el suero 1 (SIR1). La marca de fluorescencia se observa tenuemente sobre toda la cabeza, excepto en la región ecuatorial en donde se observa una especie de semiluna. También se encuentra inmunodetección en el cuello y en la pieza media del flagelo.

Figura 10. Microscopía confocal de fluorescencia con los anticuerpos obtenidos a partir del suero 2 (SIR2). Se observa fluorescencia en la región subacrosomal, así como también se encontró inmunodetección con forma de semiluna en la región ecuatorial, dicho marcaje fue la de mayor intensidad en la cabeza. En flagelo existe reconocimiento en la pieza media y pieza terminal en regiones intensas de fluorescencia.

Figura 11. Microscopía confocal de fluorescencia utilizando los anticuerpos del suero 3 (SIR3). Se observa fluorescencia tenue sobre toda la TP, excepto por arriba de la región ecuatorial, ya que ésta no presentó fluorescencia. También hubo una marca intensa de fluorescencia en cuello, al inicio de la pieza media y de la pieza principal del flagelo, presentándose en el resto del flagelo una ligera fluorescencia.

Tabla 1. Selección de la especie animal que puede ser utilizada para la producción y obtención de anticuerpos (Lane 1988)

Tabla 2. De izquierda a derecha, se muestran en la primera columna los marcadores de peso molecular, y en la siguiente columna el patrón de corrida de las proteínas de la TP en geles de poliacrilamida al 12 %, teñidas con azul de Coomassie, así como también las bandas que fueron reconocidas por las inmunoglobulinas presentes en los sueros de las ratas. El peso aproximado de las proteínas reconocidas por cada uno de los tres sueros es 50, 45 y 17 kDa respectivamente.

RESUMEN.

La teca perinuclear (TP) es el principal elemento citoesquelético de la cabeza espermática que cubre el núcleo de los espermatozoides de mamífero. La teca perinuclear, junto con una gruesa red de fibras intranucleares, es conocida como la matriz perinuclear la cual se ha propuesto que actúa como un escalafón estructural para el núcleo espermático. Ambas estructuras forman el citoesqueleto de la cabeza espermática. Las proteínas consideradas como constituyentes de la TP son aquellas caracterizadas por su resistencia a la extracción con detergentes no desnaturizantes, amortiguadores altos en sales y con una localización ultraestructural por inmunomarcaje o detección inmunoespecífica en la teca expuesta. Se obtuvieron fracciones ricas de eyaculados de verracos de línea Landrace – York. Se extrajeron las proteínas de la TP y fueron corridas en geles para proceder con el Western Blott. El propósito de este estudio, fue identificar las proteínas principales que componen el citoesqueleto perinuclear del espermatozoide cerdo, por medio de la producción y recuperación de anticuerpos policlonales producidos en ratas adultas de la sepa Sprague Dawley contra proteínas de la TP. Las proteínas fueron separadas por medio de SDS – PAGE 12 % y posteriormente fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. En los Blotts, se reconoció un grupo de tres proteínas pertenecientes a la TP, que se encuentran entre los 17,000 kDa, 45,000 kDa y 50,000 kDa. Por medio de microscopía confocal se observó la inmunodetección *in situ* de cada uno de los sueros, obteniéndose que los anticuerpos marcan principalmente región apical de la hoja subacrosomal, la región ecuatorial de la cabeza espermática, porción media del cáliz y el flagelo en forma discontinua (datos no presentados).

Palabras claves: Teca Perinuclear, Citoesqueleto, Proteínas, Anticuerpos.

SUMMARY.

The perinuclear theca (PT) is the principal cytoskeletal element of the spermatid head that covers the nucleus of the mammal sperms. The perinuclear theca, together with a bulk of intranuclear fibers net, it is known as the counterfoil perinuclear theca which has been proposed that acts as a structural scaffold for the spermatid nucleus. Both structures form the cytoskeleton of the spermatid head. The proteins considered as constituent of the PT are characterized by their resistance to the extraction with non denaturalizants detergents, high absorbers in you leave and with a ultrastructural location for immuno detection or by immunospecific detection in the exposed PT. They were obtained by rich fractions of ejaculated of boars Landrace - York line. They were extracted the proteins of the PT and they were bullfights in gels to proceed with the Western Blott. The purpose of this study, was to identificare the principal proteins that compose the cytoskeletal perinuclear of the pork sperm, by means of the production and antibodies recovery policlonales produced in adult rats of the strain Sprague Dawley against proteins of the PT. The proteins were separated by means of SDS - PAGE 12 % and thereafter they were transferred to membranes of nitrocelulosa. In the Blotts, it was recognized by a group of three proteins belonging to the PT, that are found between 17,000 kDa, 45,000 kDa and 50,000 kDa. By means of microscopy confocal was observed the inmunodetección *in situ* of each one of the serums, being obtained that the antibodies stain mainly apical region of the subacrosomal layer, the equatorial segment of the spermatid head, mean portion of the calix and in flagellum in a discontinues form (not presented data).

Key words: Perinuclear Theca, Cytoskeleton, Proteins, Antibodies.

Introducción.

La fertilización animal envuelve complejas interacciones entre los componentes del espermatozoide y el huevo que van más allá de la unión inicial y fusión de sus respectivas membranas.

La creencia popular impulsa el mito de que la única función del espermatozoide durante la fertilización es proveer un vehículo para transportar la mitad paterna de la carga genética. Este falso concepto es debido a un extracto de "*La Evolución de la vida*" (editado por Gamlin y Vines, 1987), el cual afirma que "*en la mayoría de las especies sexuales, solo la hembra contribuye con energía y recursos para la juventud*", mientras que "*los machos raramente contribuyen con más que el mínimo, un pequeño espermatozoide acarrea los genes, pero está desprovisto de otros recursos*". El desarrollo de estudios modernos contradice esta noción generalizada de la "contribución paterna inferior" (Sutovsky, 2003)

A partir de la década de los 70's, se empezó a esclarecer la arquitectura interna de las células, la cual no solo depende de sus elementos membranales; ésta también depende de un grupo de estructuras que resisten la lisis y la extracción celular mediante detergentes desnaturizantes y amortiguadores con diferentes concentraciones de sales, fuerzas iónicas y pH, que reciben el nombre de citoesqueleto (Longo et. al. 1987, Allen et. al. 1995, Mújica et. al. 2003, Sutovsky et. al. 1999, Lécuyer et. al. 2000).

La morfología de la cabeza de los espermatozoides de mamíferos, puede variar significativamente y las diferentes especies muestran una gran variedad de características y formas. Bajo diferentes presiones de selección, los espermatozoides evolucionaron para beneficiar sus funciones biológicas durante su estancia en el tracto genital de la hembra o en el tracto genital del macho o durante la fertilización. La co-evolución del gameto masculino y femenino permitió la diversificación celular y molecular y el aislamiento reproductivo. Esta evolución relativamente rápida significó, en la mayoría de los casos, que la importancia de la morfología de la cabeza del espermatozoide, en particular permanezca desconocida. Aunque la forma y el tamaño de la cabeza pueden variar considerablemente, los organelos básicos como lo son el acrosoma, el segmento ecuatorial y la región postacrosomal, están presentes

invariablemente y estas estructuras pueden ser identificadas en los espermatozoides de la mayoría de los mamíferos. Esto podría indicar que los aspectos constitutivos críticos de las funciones de la cabeza de los espermatozoides han sido conservados (ejemplo: capacitación, reacción acrosomal y fusión cabeza – huevo (Katerina, 2005).

Antecedentes

La teca perinuclear (TP) es el principal elemento citoesquelético de la cabeza espermática que cubre casi en su totalidad el núcleo de los espermatozoides de mamífero (Longo et. al. 1987, Juárez 1999, Rousseaux-Prévost 2003). La teca perinuclear, junto con una gruesa red de fibras intranucleares, son conocidas como la matriz perinuclear (Sutovsky et. al. 1999. Lécuyer et. al. 2000) la cual se ha propuesto que actúa como un escalafón estructural para el núcleo espermático (Mújica 2003). Ambas estructuras forman el citoesqueleto de la cabeza espermática.

Basándose en microscopía electrónica y evidencia citoquímica, ésta estructura extranuclear ha sido subdividida en dos regiones principales (Figura 1):

1. Un dominio apical, conocido como región subacrosomal, el cual incluye al perforatorium, compuesto por material granular denso, el cual se encuentra dentro del estrecho espacio citoplásmico, entre el acrosoma y el núcleo.
2. El segmento posterior o postacrosomal de la TP, también llamado cáliz, tiene forma de embudo. Esta capa a su vez puede ser dividida en una capa llamada postacrosomal que circunscribe estrechamente la envoltura nuclear y es una continuación de la capa subacrosomal; un estrato prominente de material denso llamado hoja paracristalina, fuertemente asociado con la membrana plasmática y separado de la anterior por otra capa llamada hoja postacrosomal. La hoja paracristalina está compuesta de un arreglo de fibras rígidas paralelas; cada fibra está unida a la membrana plasmática. Cada fibra tiene un diámetro aproximado de 10 – 12 nm y los elementos adyacentes están localizados aproximadamente a

15 nm de distancia (de centro a centro) y están conectadas con la membrana plasmática (Mújica et al 2003).

La hoja postacrosomal es una capa electrodensa y esta conectada con la cara citoplásmica de la membrana plasmática mediante subestructuras periódicas que emergen desde la capa post-acrosomal. (G. Manandhar et. al. 2003).

La continuidad estructural de la TP parece ser una característica generalizada en los espermatozoides de mamífero, (Mújica et. al. 2003) que llena la mayor parte del espacio citoplásmico de la cabeza espermática. La composición de estas dos regiones de la TP difiere entre ellas.

Las proteínas son los principales constituyentes de la teca perinuclear, estas son el producto de una familia multigénica y cuya expresión puede ser correlacionada con ciertas rutas de diferenciación celular (Benavente et. al. 1985). Sin embargo, aunque la mayoría de las proteínas de la TP son específicas de ésta, otras presentan una distribución general en las células. A pesar de que varias de las proteínas de la TP ya han sido caracterizadas, otras continúan siendo desconocidas. (Longo et. al. 1987, Mújica et. al. 2003).

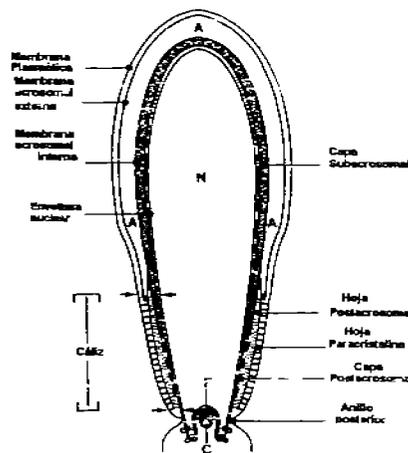


Figura. 1 Esquema de la cabeza de un espermatozoide de mamífero, donde se muestra la localización de la TP y sus divisiones.

Las proteínas de la TP son expresadas tempranamente y parecen estar intrincadamente involucradas con la formación del acrosoma (Oko et. al. 1998). La TP es ensamblada durante la espermiogénesis entre la membrana plasmática y la membrana nuclear, llenando efectivamente el espacio citoplásmico disponible en la cabeza espermática (Lécuyer et. al. 2000). Su formación es un proceso que se lleva a cabo en dos pasos los cuales están correlacionados con la morfogénesis de la espermátida. Primero es la deposición de la capa subacrosomal, seguido de la formación del segmento postacrosomal (Sutovsky et al. 1999, Mújica et. al. 2003).

Por otra parte, el papel de cada uno de los elementos del citoesqueleto en la formación y mantenimiento del contenido nuclear en la cabeza espermática, es aún poco claro (Sutovsky et al. 1997). En la mayoría de las células, el citoesqueleto, tiene un papel crítico en la estabilización de la membrana plasmática y en el mantenimiento funcional de sus dominios. En éste contexto existen dos posibilidades para implicar a las proteínas de la TP en ésta función:

1. En la estabilización de las membranas (acrosomal externa y membrana plasmática) y
2. De los componentes intramembranales en la región ecuatorial.

En esta última función podría prevenir que las membranas sean vesiculizadas durante la reacción acrosomal, logrando que ésta permanezca intacta y anclando las moléculas de señalización así como los receptores, a un nuevo dominio de la membrana plasmática, implicado en el reconocimiento y fusión con la membrana plasmática del ovocito.

Además, la membrana plasmática de la región postacrosomal del espermatozoide también ha sido implicada en el proceso de fertilización y su estabilidad es similar a la membrana plasmática que recubre la región ecuatorial.

También, se ha propuesto que la TP participa en la mayoría de las actividades relevantes que ocurren durante los cambios bioquímicos y morfológicos que el espermatozoide desarrolla durante su diferenciación (Sutovsky et. al. 1999).

Ortogenia de la TP.

La TP aparece durante la espermiogénesis la cual comprende la serie de fenómenos, mediante los cuales las espermatogonias se transforman en espermatozoides; por conveniencia descriptiva, suele dividirse en tres tercios (Fawcett 1986). El primer tercio de la espermiogénesis, es primariamente cuando se da la formación del acrosoma, el segundo tercio de la condensación nuclear y la elongación, y durante el tercio final la adición de componentes accesorios como el axonema del flagelo. Las proteínas de las fibras densas externas (FDE) y las vainas fibrosas (VF), son expresadas relativamente tarde, alcanzando el pico de síntesis y ensamblaje después de la condensación nuclear y elongación que la espermátida tiene que sufrir (Oko et. al. 1998).

Durante la fase de Golgi de la espermiogénesis, una vesícula acrosomal es formada por la fusión de muchas vesículas conteniendo enzimas hidrolíticas, llamadas gránulos proacrosómicos, los cuales derivan del aparato de Golgi (Oko et. al. 1998, Mújica et. al. 2003). Tan pronto como se forma la vesícula acrosomal, ésta es cubierta con proteínas de la TP (Oko et. al. 1998. Rousseaux-Prévost 2003). Es posible que la adición de proteínas de la TP a la vesícula proacrosómica, le confiera especificidad de reconocimiento, permitiéndoles fusionarse unas con otras y producir la característica vesícula acrosómica. Otro concepto importante y relacionado es que la membrana acrosomal contiene un sitio de unión específico para una o más de las proteínas de la TP. Al final de la fase de Golgi, las vesículas cubiertas con proteínas de la TP, se unen a la región anterior del núcleo de la espermátida.

Los anterior lleva a dos hechos importantes: primero, las proteínas de la TP intervienen en la unión entre la membrana acrosomal y la envoltura nuclear (formando esencialmente la porción inicial de la capa subacrosomal); y segundo, la existencia de una región específica de unión en la envoltura nuclear para una o más de las proteínas de la TP.

Durante la fase capping de la espermiogénesis, la vesícula acrosomal mantiene su crecimiento por medio de la fusión continua de pequeñas vesículas, derivadas del aparato de

Golgi, a su membrana. Conforme la vesícula crece, esta se extiende y cubre la mitad anterior del núcleo de la espermátida. El alargamiento de la vesícula acrosomal y de la capa subacrosomal, ocurre simultáneamente. Esto sugiere que las proteínas de la TP son instrumentales en el proceso de capping. El ensamble de la región subacrosomal de la TP muy probablemente envuelve una intrincada relación entre las proteínas de la TP y los componentes específicos de unión de la membrana acrosomal y membrana nuclear (Tovich et. al. 2004)

Durante la fase acrosomal de la espermatogénesis (paso 8 – 14) del acrosoma deja de crecer y solo adquiere la forma del núcleo de la espermátida. Es durante ésta fase que la región posicrosomal de la TP es formada inmediatamente después del descenso del manchete (Tovich et. al. 2004)

Utilizando microscopía electrónica e inmunomarcaje con oro coloidal se ha confirmado la localización de historias somáticas en el manchete el cual es una red de microtubulos que rodea la mitad caudal del núcleo durante el período de los cambios morfológicos más grandes que suceden en la cabeza espermática. Hallazgos sugieren que las historias somáticas son sintetizadas de novo durante la espermatogénesis tardía para ser ensambladas en la TP (Sutovsky et. al. 2003, Tovich et. al. 2004). La variante subacrosomal H2B (subH2Bv), nunca ha sido observada dentro del núcleo de espermátidas en desarrollo, pero si ha sido observada en el citoplasma en asociación con el sistema acrosomal en formación y se cree que es el primer candidato en la dirección de la unión de proteínas de TP con las vesículas acrosomales. La variante de subH2Bv se expresa principalmente en el testículo. Ésta variante se encuentra en espermatozoides de murinos y de bovino. Existe gran similitud entre H2B y la variante subH2Bv y por tal motivo es muy probable que compartan interacciones proteína – proteína, lo que implica que subH2Bv podría dimerizar con otras proteínas de la TP o con proteínas de la membrana acrosomal y así proveer de estabilidad a la membrana acrosomal. Los enlaces bisulfuro que posee la subH2Bv, pueden explicar la naturaleza insoluble de la variante subH2Bv en la TP (Aul y Oko 2001).

Por lo menos tres clases de proteínas han podido ser distinguidas, en la TP entre estas se incluyen proteínas estructurales, proteínas histónicas y proteínas de señalización. Se ha

encontrado que las proteínas estructurales de la TP de espermatozoides maduros son específicas del espermatozoide y tienen un carácter básico ($PI > 10$), estas proteínas son: Calicina, Cilicina I y Cilicina II, Polipéptidos de Bandas Múltiples (MBP), PERF 15 y Tecinas (Lécuyer et. al. 2000). Entre las proteínas conocidas que se encuentran en una o en ambas regiones, podemos encontrar: Actina, Calmodulina (CaM), Proteína Capping $\alpha 3$ y Proteínas Capping $\beta 3$, Distrofinas Cortas, Espectrina, STAT4 (Sutovsky et. al. 2003, Lécuyer et. al. 2000).

Los espermatozoides de mamíferos liberados por el epitelio seminífero y colectados del líquido de la rete testis, o de la cabeza del epidídimo, no pueden fertilizar el huevo. Estos necesitan desarrollar un proceso de maduración en el epidídimo para obtener la capacidad fertilizante. El epidídimo es un tubo muy contorneado, el cual conecta al testículo con el conducto deferente, en donde el promedio de tiempo del tránsito espermático varía de 8 – 14 días, independientemente de la longitud del epidídimo (3 – 4 m en el humano y 80 m en el caballo). Conforme la maduración procede, ocurren cambios concomitantes en la estructura, metabolismo y fisiología del espermatozoide. El último residuo de citoplasma es eliminado, mediante la formación de la “gota citoplásmica”. En algunas especies la remodelación del acrosoma es una característica ultraestructural y también se han detectado cambios en las características de la membrana plasmática. La TP durante la maduración epididimal, se vuelve más resistente a la sonicación, detergentes y a la tripsina.

El incremento en la resistencia estructural, ha sido atribuido a una mayor formación de puentes de disulfuro. Se creía que la morfología de la TP permanece sin cambios durante la maduración epididimal, pero estudios ultraestructurales recientes, han demostrado la formación de una subestructura de la TP, la cual se encuentra en espermatozoides inmaduros, pero que ésta aparece durante el transcurso de la maduración (Mújica et. al. 2003).

La activación del ovocito en los mamíferos, comprende la finalización de la segunda división meiótica y la activación de los mecanismos de defensa anti – poliespermia, paralelo a oleadas de calcio, las cuales periódicamente cruzan el citoplasma del ovocito.

La hoja postacrosomal se dispersa rápidamente durante la entrada de la cabeza del espermatozoide, un evento probablemente relacionado con la cascada de activación del

Después de la fusión espermatozoide - ovocito, la TP postacrosomal es expuesta al citoplasma del huevo antes que cualquier otra estructura espermática. La membrana acrosomal interna y la hoja subacrosomal de la TP subacrosomal son cinguladas de manera similar a la lagocitosis y englobadas por la membrana plasmática del huevo, creando una estructura semejante a una vacuola endocítica

También se ha propuesto que partes individuales de la TP podrían servir para diferentes propósitos durante la fertilización. Por ejemplo, se ha observado que la TP del espermatozoide incorporado se disuelve en el citoplasma del huevo durante la fertilización, por lo que ésta podría contribuir con moléculas de señalización importantes que disparan la activación del huevo, el desarrollo embrionario y la defensa contra la polispermia (Lécuyer et al. 2000).

- apoyar la validez de la hipótesis del SOAF en mamíferos (Mujica et al. 2003).
3. Hipótesis del SOAF / Oscilogénico: Esta favorece un factor oscilogénico, presumiblemente un polipéptido que es liberado de la cabeza espermática en el citoplasma del ovocito al momento de la fusión de gametos. Estudios actuales parecen liberación de Ca^{2+} de los almacenes internos del retículo endoplasmático del ovocito.
 2. Hipótesis del receptor: Mantiene que receptores específicos en la membrana plasmática del ovocito y del espermatozoide, activan la cascada de señalización, permitiendo la hipótesis de la bomba de Ca^{+} : Esta implica la inyección directa de iones de calcio en el citoplasma del ovocito durante la fertilización.

Se han planteado 3 diferentes hipótesis para explicar la activación del ovocito, inducida por el espermatozoide en mamíferos:

La fertilización induce la activación del ovocito y es acompañada por el ensamblaje de los complejos de poros nucleares (NPC) y la inserción de los mismos en la envoltura nuclear (NE), que se está formando de novo en el pronúcleo femenino y masculino.

ovocito. Entre los subdominios de la hoja postacrosomal, los anticuerpos monoclonales MN13, reconocen la capa más externa, la cual desaparece rápidamente en el citoplasma del huevo, antes de que el núcleo espermático inicie su descondensación. Actualmente, no se sabe cómo y cuándo el espermatozoide fertilizante pierde su membrana plasmática, aunque se especula que al menos algunas partes de ésta se fusiona con la membrana plasmática del huevo, formando una membrana continua en el cigoto, la cual puede además estar directamente anclada a la TP del espermatozoide (la hoja postacrosomal de la TP) (Sutovsky et al 2003).

Por estricta definición, el SOAF es un polipéptido específico de testículo, evolutivamente conservado, o bien, un grupo de polipeptidos presentes en los espermatozoides con reacción acrosomal, más probablemente en la hoja postacrosomal y/o en el segmento ecuatorial, expresados durante las etapas finales de la elongación de las espermátidas. Menos de un equivalente de proteína/SOAF de un espermatozoide, es suficiente para inducir la activación del ovocito, como se ha demostrado en estudios con citocalasina B, en los que solo una parte de la TP disuelta en el citoplasma del ovocito causó una completa activación. Además se ha conseguido la pérdida de la función activadora del ovocito por parte de la cabeza del espermatozoide cuando la hoja postacrosomal es bloqueada con el anticuerpo MN13 antes de la microinyección de la hoja postacrosomal de la TP (Mújica et. al. 2003).

Kimura et al (1998), han discutido la posibilidad de que la calicina (componente citoesquelético de la TP del espermatozoide de mamífero) puede estar involucrada en la activación del ovocito. Una activación por dos o más componentes del espermatozoide, podrían ser los responsables de disparar la activación de la vía de señalización para la activación del ovocito.

Herrada y Wolgemuth (1997), reportaron la presencia del factor de transcripción de unión a DNA, Stat4, en la TP del espermatozoide de murinos. Ésta y otras proteínas de la TP llamadas histónicas, podrían ser responsables de la unión extrínseca al DNA en los espermatozoides parcialmente desmembrados. La sobre expresión de una variante de Fosfolipasa C (PLC) testicular en los ovocitos de ratón, dispara oscilaciones de calcio,

similares a aquellas inducidas por inyecciones de SOAF. Otras especies similares de PLC con actividad similar, no están restringidas a la TP de los espermatozoides, o incluso a la hoja postacrosomal (Mújica et. al. 2003).

La pérdida y la dispersión de la hoja postacrosomal de la TP, precede a la descondensación de la cromatina, enfatizando la importancia de la remoción de la TP, para la conversión del núcleo espermático, en un pronúcleo macho (Juárez et. al. 1999).

La subestructura de la TP

La TP presenta una subestructura en la porción apical de la hoja postacrosomal. En el espermatozoide de caballo, consiste de proyecciones que asemejan pestañas apoyadas sobre dos líneas paralelas, las cuales circundan la región apical de la capa postacrosomal. (Juárez et. al. 1999), por lo cual podría estar participando en la unión de la capa postacrosomal con la membrana plasmática suprayacente (Manandhar et. al. 2003).

La subestructura de la TP está ausente en la región de la cabeza del epidídimo, pero durante el tránsito del espermatozoide del caballo por el epidídimo esta es formada, de tal manera que todos los espermatozoides que han madurado la presentan. En la misma especie la subestructura permanece en espermatozoides capacitados y se pierde en los que ya sufrieron la reacción acrosomal. Actina-F fue específicamente detectada en las líneas paralelas de la subestructura de la TP, e in vitro, la ruptura de la subestructura fue dependiente de bicarbonato, pH y calcio (Juárez et. al. 1999).

Sin embargo la mayor parte de los constituyentes proteicos de la subestructura son desconocidos, debido entre otras cosas a las dificultades encontradas para su aislamiento o extracción como una sola unidad. Sin embargo, es necesario saber cuántas proteínas (mayormente o menormente) constituyen este elemento del citoesqueleto y del grado de diferencias o variaciones entre especies para establecer el papel que desempeña cada uno de sus componentes (Ollero et. al. 1998).

En el espermatozoide de toro tratados con Tritón - X - 100, Olson et. al. (1983), mostraron que en el margen anterior de la hoja postacrosomal de la TP, también contiene una

subestructura pero de apariencia papilar; mientras que Koehler (1970) en el espermatozoide de conejo, mediante el uso de la técnica de criofractura, observó que el margen anterior mostraba una morfología serrada y Juárez – Mosqueda y Mújica también observaron la subestructura en el espermatozoide del borrego, cuya morfología fue parecida a la del borrego. Dichos hallazgos muestran que la morfología de la subestructura es especie – específica (Mújica et. al. 2003).

Cambios en las proteínas de la TP a través del epidídimo.

El espermatozoide recién liberado de los túbulos seminíferos, no son capaces de fertilizar al ovocito. Los espermatozoides adquieren estabilidad durante su paso por el epidídimo, a través de una serie de cambios morfológicos y bioquímicos. Estos cambios conocidos como maduración epididimal, incluyen cambios estructurales en la cabeza y en el flagelo, cambios en los constituyentes y en las propiedades de la superficie, y la adquisición de movimiento progresivo. Durante la maduración epididimal el núcleo espermático incrementa su estabilidad estructural, la cual ha sido atribuida al incremento progresivo en la formación de puentes disulfuro intramoleculares de las proteínas constituyentes (Bellvé y O' Brien 1983). Recientemente se reportó que en el espermatozoide de caballo se forma la subestructura en la hoja postacrosomal de la TP y que existe incremento de proteínas (calmodulina, miosina, espectrina y vimentina) en la TP conforme el espermatozoide transita por el epidídimo. Estos cambios son adicionales al incremento de los puentes de disulfuro reportados en la TP (Juárez y Mújica 1999).

Constituyentes proteicos de la TP en espermatozoides maduros.

Se consideran espermatozoides maduros, aquellos que provienen de la cola del epidídimo, vasos deferentes y espermatozoides eyaculados (Fawcett - Bloom. 1986). En la actualidad, solo un número limitado de proteínas de la TP ha sido identificado en los espermatozoides maduros. La TP es una estructura proteica muy compleja, casi imposible de obtener en forma completa, sin embargo sus constituyentes pueden ser obtenidos por medio de tratamientos diferenciales de extracción (Okó, et. al. 1998). Más aún, debido a que resisten la

extracción con detergentes no desnaturalizantes y soluciones amortiguadoras altas en sales, las proteínas de la TP han sido comparadas con las proteínas características del citoesqueleto de las células somáticas (Mújica et. al. 2003). En general, las proteínas de la TP pueden ser clasificadas como componentes solubles al SDS (extraídas con KCl) e insolubles al SDS (extraídas con NaOH) (Oko y Maravei, 1994). En el espermatozoide del bovino, las proteínas mayoritarias de los componentes de la TP insolubles en SDS tienen pesos moleculares de aproximadamente 60, 32, 28, 25 y 15 kDa (Oko y Maravei, 1994; Lecuyer y col., 2000).

A continuación se describen las proteínas de la TP que han sido reportadas como componentes de la TP, algunas de las cuales son compartidas con las células somáticas mientras que otras son exclusivas de ésta (Mújica et. al., 2003).

La calicina o PT60 es una proteína de carácter básico ($pI > 8.0$) (Hess et al., 1995) considerada el principal constituyente de la TP (~ 60,000 Da), tiene tres unidades repetidas consecutivas, llamadas elementos Keich y se encuentra localizada en la región postacrosomal en todas las especies estudiadas (cerdo, rata, ratón, bovino, humano y caballo) (Hess et al., 1995, Paranco et. al. 1988). Se ha demostrado que existe una alta afinidad de la calicina por la actina-F ($Kd \sim 5 \text{ nM}$), con una relación aproximada de 1:12. En solución acuosa la calicina está presente en forma multimérica. La calicina junto con otras proteínas ha sido involucrada en la estabilidad de la TP (Bellvé et al 1990, Lecuyer y col., 2000). También la calicina y las calicinas han sido localizadas exclusivamente en el cáliz de una gran variedad de especies de mamíferos (Hess et al., 1995).

Longo et. al. (1987) identificaron, en los extractos de los cálices (región postacrosomal de la TP) de espermatozoides de toro y rata, un grupo de proteínas, llamado bandas muropeptídicas (MBP, por sus siglas en inglés) con Mrs. 56,000 – 74,000 Da, con un punto isoelectrico alrededor de pH 10 (Longo et. al. 1987, Hess et. al. 1993). Se ha encontrado que las proteínas de la MBP están inmunológicamente relacionadas una con otra, pero no con la calicina. Se ha postulado que éstas junto con la calicina están involucradas en la estabilidad de la TP (Mújica et. al., 2003). Paranco et al. (1988) mostró la amplia distribución de ésta

proteína citoesquelética en los cálizos de muchas especies de mamíferos, desde ratón hasta el humano (Hess et. al. 1993).

La cilicina I (74.8 kDa) y cilicina II (53.6 kDa) son dos proteínas básicas (pI 10.5) (Holger et. al. 1993, Mújica et. al. 2003) específicas del espermatocitos. Éstas son expresadas específicamente en el testículo y son localizadas en la región postacrosomal de la TP en espermatozoides de humano, cerdo y bovino. El cáliz en su conjunto podría representar una estructura citoesquelética con carga netamente positiva, la cual es una situación inusual en vista de que la mayoría de las moléculas citoplásmicas son con carga negativa (Hess et al., 1995). La cilicina II es un miembro de la MBP y es la tercer proteína más abundante de la TP con propiedades de unión con actina-F. Para ambas cilicinas se ha sugerido una función estructural (Holger Hess et. al. 1993, Mujica 2003). Cilicina I se caracteriza por tener en la parte central de su molécula nueve unidades repetidas, con un máximo de 41 aminoácidos, por lo que tiende a formar α hélices. La cilicina I ha sido detectada solamente en espermátidas y espermatozoides maduros, con un punto isoeléctrico calculado de ~ 10.5. Se ha sugerido que cilicina I y calicina están implicadas en la morfogénesis de la cabeza del espermatozoide y en la diferenciación del espermatozoide, debido a que la síntesis en específico de la cilicina I y la calicina en la espermiogénesis tardía, así como el específicamente por el enriquecimiento del cáliz con éstas proteínas; aunque ni la cilicina I, ni las otras MBP son suficientes para establecer la morfogénesis especie – específica de los espermatozoides (Hess et. al. 1993). La propiedad de unión de cilicina II a actina-F, probablemente se debe a la naturaleza policationica de ésta proteína. Las funciones de las proteínas de la TP, que presentan propiedades de unión a actina durante la espermiogénesis, no están bien definidas (Rousseaux-Prévost 2003). Hasta el momento, no se puede excluir que la calicina y cilicina y otras MBP formen complejos con elementos del cáliz cargados negativamente, hasta ahora no identificados. Cilicina I, en contraste con cilicina II, es rica en residuos de prolina; quizá ésta característica de todas las cilicinas también representa una unidad estructural y/o funcional (Hess et al., 1995).

La proteína llamada PERF15 (15,060 Da) también es una proteína específica de testículo y principal componente del perforatorium de espermatozoides de rata y ratón, y pertenece a una

familia de proteínas de anclaje para lípidos. La secuencia de aminoácidos de PERF15 tanto en ratas como en ratones es casi idéntica. La PERF15, así como otras proteínas, esta asociada periféricamente con la membrana acrosomal, por lo que podría tener una función en el arreglo estructural y en la estabilidad de este organelo, debido a su propiedad de unión a lípidos (Mújica et. al. 2003). La localización estructural de esta proteína en vecindad con el acrosoma, también sugiere que PERF 15 podría tener funciones durante la reacción acrosomal y fertilización (Pouresmaeili et. al. 1997).

La isoforma Dp71f de las distrofinas ha sido identificada en la región postacrosomal de la TP y la β -distrobrevina en la región subacrosomal de espermatozoides de cobayo. Dp71 es una distrofina coria abundante en el tejido no muscular, incluyendo el tejido testicular. En diferentes tejidos las distrofinas las distrobrevinas están relacionadas con el mantenimiento funcional de los dominios de membrana y actúan como un puente de unión entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática, formando el llamado complejo DPC (complejo proteína-distrofina, por sus siglas en inglés). Las localizaciones diferentes de Dp71f y β -distrobrevina en la TP, apoya las diferencias bioquímicas entre la región subacrosomal y la región postacrosomal de la TP (Mújica 2003).

Las tecinas son una familia de proteínas (Mr 80,000, 70,000 y 75,000; con pI 7.4) específicas de células germinales constituyentes de la TP. Las tecinas son ensambladas coordinadamente en una estructura que gradualmente se extiende sobre el polo anterior del núcleo con forme la célula pasa de la espermiogénesis a la espermiación (Bellvé et al. 1990). La función de las tecinas, así como los mecanismos responsables de la transición morfológica y bioquímica durante la maduración epididimal, permanece sin ser resuelta (Mújica et. al. 2003).

La actina-F es una proteína de aproximadamente 43 kDa y un punto isoeléctrico aproximado a 10. Utilizando anticuerpos anti-actina, esta proteína ha sido encontrada en la región postacrosomal de la TP de espermatozoides de toro conejo y cerdo, sin embargo, bajo las mismas condiciones la actina no ha sido encontrada en espermatozoides de humano y hámster. En espermatozoides de toro, ha sido localizada en los dos tercios anteriores de la

región postacrosomal, mientras que en los espermatozoides de conejo en la mitad anterior de la región postacrosomal. También se ha demostrado, por microscopia electrónica que en los espermatozoides de cerdo la actina está presente en el segmento ecuatorial, entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa. En el espermatozoides de caballo la actina-F ha sido detectada en la región postacrosomal de la TP. La función de la actina, así como la interacción que tiene con otras proteínas de la TP, es hasta ahora desconocida (Rousseaux-Prévost 2003), pero una función común de las estructuras citoesqueleticas de actina consiste en endurecer o cambiar la forma de la membrana plasmática (Alberts et al., 2002). Una de las posibles funciones que se le ha atribuido a la actina es anclar el acrosoma y darle forma a la cabeza del espermatozoide (Rousseaux-Prévost 2003). En el espermatozoide del caballo, se ha demostrado que la actina-F esta implicada en la estabilización de la subestructura de la TP, ya que ésta desaparece cuando los espermatozoides son tratados con citocalasina-D.

En general la presencia de actina y la localización exacta de la misma en los espermatozoides maduros es un tanto controversial y parece ser variable de acuerdo a la especie (Mújica et. al. 2003). Sin embargo para un mejor entendimiento de las funciones de la misma, es necesaria la búsqueda de otras proteínas con propiedades de unión a ésta. Lo anterior es debido a que, las investigaciones sugieren que la actina podría jugar más de un papel en el desarrollo de la reacción acrosomal y en la preparación del espermatozoide para otros eventos de la fertilización, además de mantener las morfologías distintivas de la cabeza del espermatozoide (Dvoráková et. al. 2005).

Adicionalmente las proteínas relacionadas con actina Arp-T1 y Arp-T2 fueron recientemente descritas en la región subacrosomal de la TP (Sutovsky et. al. 2003).

Las proteínas Capping $\alpha 3$ y $\beta 3$ (CP $\alpha 3$ y CP $\beta 3$), proteína de unión a actina, son componentes del cáliz de espermatozoides de caballo, bovino y humano. El peso molecular calculado es de 33,740 y un punto isoeléctrico de 6.36 y consiste de 301 aminoácidos. Las proteínas capping se unen al extremo barbado de los filamentos de actina in vitro, además previenen la adición y pérdida de monómeros (Mújica et. al. 2003).

En el espermatozoide de conejo la espectrina ha sido localizada a lo largo de la cara nuclear de la membrana acrosomal interna y en la cara más externa de la región postacrosomal, incluyendo la lámina postacrosomal (Mújica et. al. 2003). Kann et. al., (1993) detectó espectrina en la capa subacrosomal en espermátidas de rata, mono, humano, hámster, ratón y conejo durante la mayor parte de la espermiogénesis. Se cree que la espectrina podría representar un componente citoesquelético en los espermatozoides. Espectrina, son proteínas que no son parte de la subestructura de la TP, aunque estas sean proteínas que pertenecen a la TP (Mújica et. al. 2003).

Otra proteína encontrada en la TP es la calmodulina (CaM) la cual se encuentra distribuida en sus dos regiones. Esta ha sido reportada en los espermatozoides de muchas especies animales, incluyendo carnero, conejos, hámster, rata, ratón, humano, cobayo y monos (Mújica et. al. 2003). Se ha establecido firmemente que la calmodulina es un componente integral de la TP del espermatozoide. La proteína ha sido reportada por algunos autores en la región post-acrosomal mientras que otros la reportan ya sea en la región subacrosomal o sobre toda la TP. Otra proteína la p30, de unión a calmodulina ha sido localizada en la TP (Leclerc y Goulpi, 2000). CaM pertenece a la familia de proteínas cinasas dependientes de calcio, estas cinasas fosforilan residuos de serina o de treonina de determinadas proteínas (Alberts et al 2002).

Por otra parte, se ha sugerido que algunos constituyentes de la TP son factores esenciales para la activación del ovulo, los cuales son introducidos a éste durante la fertilización. Uno de los factores propuestos es STAT4 ya que ha sido detectado en la TP de espermatozoides de ratón. STAT4 pertenece a la familia de citocinas STAT, cuyos miembros promueven diversos eventos fundamentales de la comunicación celular y podría no tener una función en espermatozoides de epidídimo o espermatozoides maduros, los cuales son transcripcionalmente inactivos. Una vez que el espermatozoide fertilizante está en contacto con el citoplasma del óvulo, la TP es desmantelada y sus componentes son incorporados al citoplasma, en donde STAT4, junto con otras proteínas de la TP como el SOAF (factor activador de origen espermático, por sus siglas en inglés), podrían participar en la activación del óvulo, activación de la transcripción y/o división temprana del embrión. La presencia de

STAT1 y STAT4 han sido reportadas en espermatozoides de humano y ambas están localizadas en la región apical de la cabeza espermática. Estas proteínas son activadas durante la capacitación, y en el espermatozoide de humano, después de la reacción acrosomal STAT4 permanece (Mújica et. al. 2003).

Actualmente, la necesidad por métodos más rápidos y específicos para la detección y cuantificación de varias biomoléculas, no había sido tan grande (Ueda. 2002), para éste propósito, los anticuerpos son herramientas poderosas cuando son utilizados para la identificación y caracterización de proteínas específicas. Fragmentos celulares e inclusive células completas pueden ser utilizados como antígenos y los anticuerpos resultantes deberán ser usados de manera apropiada para la creación de sistemas de pruebas para tener un acercamiento prospectivo y poder explorar la función y destino de las proteínas (Sutovsky et. al. 1999, I. N. Batova, et. al. 1997). Cuando se utilizan antígenos purificados, se incrementan las probabilidades de obtener una respuesta altamente específica por parte de las células B (Hendriksen y Leeuw, 1998).

La producción de anticuerpos puede ser hecha en varios animales, como lo son: conejo, ratón, rata, hámster, coballo, pollos, etc. Para la selección de la especie animal que puede ser utilizada para la producción y obtención de los anticuerpos, es necesario conocer algunos aspectos, los cuales se describen en la tabla 1.

Tabla I

Animal.	Cantidad max. de suero.	Anticuerpos monoclonales.	Notas.
Conejo.	500 ml	X	Frecuentemente es la mejor opción para la producción de pAb, en cantidades limitadas de Ag.
Ratón.	2 ml	✓	Frecuentemente es la mejor opción para la producción de mAb.
Rata.	20 ml	✓	Frecuentemente es buena opción para la producción de mAb.
Hámster.	20 ml	X	Frecuentemente es buena opción para la producción de pAb.
Coballo.	30	X	Son difíciles de sangrar.
Pollos.	50	X	Buenos para ser usados con Ag altamente conservados en mamíferos.

(Lane, 1988)

* pAb: Anticuerpos policlonales por sus siglas en inglés (polyclonal antibodies).

* mAb: Anticuerpos monoclonales por sus siglas en inglés (monoclonal antibodies).

* Ag: Antígeno.

Las inmunoglobulinas son glucoproteínas y están compuestas en un 82 – 96 % de polipéptidos y en un 4 – 18 % de carbohidratos. El componente polipeptídico de una inmunoglobulina, posee casi todas las propiedades biológicas asociadas a los anticuerpos, es decir, la propiedad de combinarse específicamente con la sustancia que provocó su formación (antígeno) (Toshimori et. al. 1991).

Es posible utilizar anticuerpos y antígenos en inmunoensayos, debido a su capacidad de fijación ya su acoplamiento a fluorocromos o a otros marcadores; reduciendo así el costo y el tiempo que de otra manera sería necesario para la conjugación química de dos dominios (Ueda. et. al. 2002).

La proteína G tiene la habilidad de unirse a la IgG de muchas especies de mamíferos, es por eso que se prefiere su uso para la marcación de anticuerpos (Roberts et. al. 1995). Gracias a ello, el uso de los inmunoensayos se incremento considerablemente por su rapidez y versatilidad. Por otra parte, con la utilización de la llamada tecnología de hibridomas, ha sido posible la producción virtualmente de cantidades ilimitadas de anticuerpos monoclonales (mAbs) (Ac. Por ascitis). Estos mAbs ahora son usados en la investigación, el diagnóstico y en las terapias (Hendriksen et. al. 1988, Juárez et. al. 2000).

Con el advenimiento de las técnicas de manipulación de genes, incontables fusiones de anticuerpos con proteínas han sido construidas y principalmente han sido utilizados para analizar la función que tiene cada proteína (Ueda. 2002). Los métodos inmunológicos han probado ser excelentes herramientas en varios campos de la biología. Las técnicas son lo suficientemente sensibles para detectar una muy pequeña cantidad de las moléculas de interés, visualizar las células o tejidos blanco, usando reacciones antígeno-anticuerpo (Susca et. al. 2001. Sites et. al. 1995).

Se ha visto que durante el proceso de congelación – descongelación de los espermatozoides, estos sufren una pérdida o redistribución de las proteínas del citoesqueleto, generándose así cambios o daños en las funciones fisiológicas en el espermatozoide; debido a la redistribución de dominios y proteínas involucrados en el reconocimiento y fusión de membranas durante el proceso de fertilización.

Introducción a los anticuerpos.

El principio básico de cualquier técnica inmunoquímica, se basa en un anticuerpo específico, el cual se combinará con un antígeno específico, el cual generará así, un complejo antígeno – anticuerpo exclusivo.

La definición clásica de antígeno es “cualquier sustancia extraña que genera una respuesta inmune, cuando son introducidas a los tejidos de un animal susceptible y es capaz de combinarlas con los anticuerpos recién formados. Los antígenos, generalmente son proteínas,

de alto peso molecular o también pueden ser polisacáridos. Los polipéptidos, lípidos, ácidos nucleicos y muchas otras sustancias pueden funcionar como antígenos. La respuesta inmune también puede ser generada contra otras sustancias más pequeñas, conocidas como haptenos. Una gran variedad de moléculas pequeñas como fármacos, azúcares simples, aminoácidos, pequeños péptidos, fosfolípidos o triglicéridos, pueden funcionar como haptenos. Con el suficiente tiempo, éstos serán identificados por el sistema inmune y evocarán la producción específica de anticuerpos. Sin embargo, esta respuesta inmune específica es altamente variable y depende mucho del tamaño, estructura y composición del antígeno. Los antígenos que desarrollan respuestas inmunes exacerbadas, se dice que son inmunógenos fuertes.

El pequeño sitio, en el que un anticuerpo complementario podría unirse, es conocido como epítipo. Este usualmente es de uno a seis monosacáridos o de 5 a 8 residuos de aminoácidos sobre la superficie de un antígeno. El rango de posibles sitios de unión, es enorme, y cada sitio de unión tiene sus propiedades estructurales, derivadas de uniones covalentes, enlaces iónicos, así como interacciones hidrofílicas e hidrófobas.

Para que ocurra una interacción eficiente entre el antígeno y el anticuerpo, el epítipo debe estar siempre disponible para la unión. Si la molécula blanco es desnaturalizada, como por ejemplo por un proceso de fijación, reducción, cambio de pH, o durante la preparación para un gel de electroforesis, el epítipo podría ser alterado y esto podría afectar su habilidad para interactuar con el anticuerpo. Por ejemplo, algunos anticuerpos son ineficientes para Western blott, pero muy buenos para inmunohistoquímica, en el último procedimiento se debe a que, un sitio antigénico podría ser mantenido en el tejido, mientras que en el otro tipo de preparaciones, la conformación de las proteínas se puede alterar lo suficiente como para destruir el sitio antigénico y así impedir la unión del anticuerpo.

En algunas instancias, los péptidos antigénicos tienen ventajas sobre los antígenos de las proteínas completas, debido a que los anticuerpos generados podrían ser dirigidos contra una sola secuencia. Esto es especialmente útil cuando se están investigando proteínas que pertenecen a familias o simplemente a secuencias con alta homología.

Las características de un buen antígeno incluyen:

- ◊ Áreas de estabilidad estructural y complejidad química dentro de la molécula.
- ◊ Peso molecular mínimo de 8,000 – 10,000 Daltons, aunque haptenos con pesos moleculares tan bajos como 200 Daltons, han sido utilizados en presencia de una proteína acarreadora.
- ◊ La habilidad para ser procesada por el sistema inmune.
- ◊ Regiones inmunogénicas que sean accesibles al mecanismo generador de anticuerpos
- ◊ Elementos estructurales que sean lo suficientemente diferente al los del huésped.
- ◊ Los péptidos antigénicos, deben contener al menos un 30% de aminoácidos inmunogénicos y una cantidad significativa de aminoácidos hidrófobos o de residuos con carga.

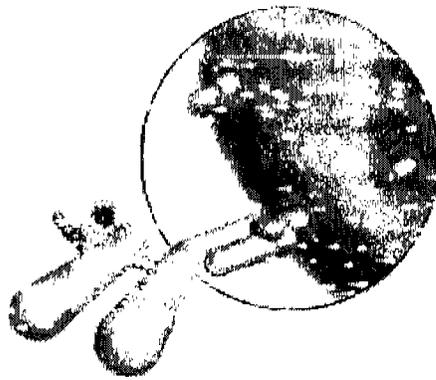


Fig. 2. Representación gráfica del reconocimiento antígeno – anticuerpo.

Un anticuerpo es definido como “una inmunoglobulina capaz de unirse específicamente con el antígeno que causó su producción en un animal susceptible”. Son producidas en respuesta a la invasión del organismo por moléculas extrañas. Los anticuerpos están compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas, cada copia contiene dos copias idénticas de la cadena pesada y dos copias idénticas de la cadena ligeras. Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgA, IgM, IgE, IgD. Esta nomenclatura se basa en el tipo de cadena pesada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos pueden ser clasificadas como tipo

Kappa (κ) o Lambda (λ) y esta clasificación se basa en pequeñas diferencias estructurales del polipéptido; sin embargo, la cadena pesada es la que determina la subclase de cada anticuerpo.

Las subclases de las inmunoglobulinas difieren en el número de puentes disulfuro y en la longitud de la región de bisagra. El anticuerpo mayormente utilizado es de la clase IgG debido a que es la inmunoglobulina que mayormente se libera en suero.

La clásica forma de "Y" de la IgG esta compuesta de dos brazos variables, antígeno específicos F(ab), los cuales son críticos para la unión con el antígeno; y la cola constante, conocida como Fc, la cual se une a los receptores Fc de las células inmunes. también es utilizada para la manipulación durante la mayoría de los procedimientos inmunoquímicos. El número de regiones F(ab) en el anticuerpo, corresponde con su subclase y determina la valencia del anticuerpo.

Los anticuerpos pueden ser conjugados directamente, con un marcador como podría ser una enzima o fluoróforo en la región Fc. La región Fc, también puede ser usada para anclar el anticuerpo en la placa de ELISA, ésta región puede ser encontrada mediante anticuerpos secundarios en inmunoprecipitaciones, inmanoblotts e inmunohistoquímicas.

La constante de afinidad para la unión antígeno – anticuerpo puede variar en un amplio rango, extendiéndose de menos de 10^5 mol^{-1} a más de 10^{12} mol^{-1} . Además, la constante de afinidad puede ser afectada por temperatura, pH y solventes. Por otra parte la constante de afinidad solo puede ser medida para anticuerpos monoclonales, pero no para policlonales, debido a las múltiples uniones que se llevan a cabo entre los anticuerpos y el antígeno.

Las técnicas inmunoquímicas se basan en la especificidad extrema que poseen los anticuerpos por su antígeno. La multivalencia que posee la mayoría de los antígenos y anticuerpos, les permite interactuar y formar un precipitado. Ejemplos de las aplicaciones experimentales en los que se utilizan anticuerpos, son el Western Blott, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica, ELISA, inmunoprecipitaciones y citometría de flujo.

Cuando se diseñan procedimientos experimentales, es importante diferenciar entre anticuerpos monoclonales y policlonales, y en esta diferencia, se basan las ventajas y las limitantes para su uso.

Muchos de los anticuerpos utilizados en las técnicas inmunoquímicas son producidos por inoculaciones repetidas en un animal conveniente. Ejemplo, conejo, rata, ratón, cabra, burro u oveja. El suero es obtenido en el pico de la producción de anticuerpos. Específicamente, las concentraciones de IgG son aproximadamente de 1 a 10 mg/ml. Las moléculas con baja antigenicidad podrían requerir de la adición de un adyuvante, el cual permite una lenta liberación del antígeno, permitiendo que éste sea mejor atrapado por los macrófagos.

Una característica de los antígenos es que éstos inducen la activación de muchas clonas de células B en el animal inmunizado. Ésta mezcla policlonal de los anticuerpos podría resultar en el reconocimiento de una variedad de epítomos en el antígeno. Debido a que éstas mezclas policlonales de anticuerpos reaccionan con múltiples epítomos sobre la superficie del antígeno, éstos serán más tolerantes a los cambios menores en el antígeno, mientras que los anticuerpos monoclonales no.

Una población de anticuerpos homogéneos (ejemplo, anticuerpos monoclonales) puede ser alcanzada por fusión de linfocitos B con cultivos de células inmortalizadas para producir hibridomas. Los hibridomas producirán muchas copias exactas del mismo anticuerpo. Debido a que los anticuerpos monoclonales reaccionan con un solo epítomo en el antígeno, éstos serán más vulnerables a la pérdida del epítomo debido a tratamientos químicos del antígeno, esto puede ser evitado al producir dos o más anticuerpos monoclonales del mismo antígeno.

Los anticuerpos policlonales, frecuentemente, se encuentran disponibles en formas relativamente no purificadas, descritas como "sueros" o "antisueros".

Antisuero se refiere a la sangre de un huésped inmunizado. Como su nombre lo sugiere, éste contiene anticuerpos de todas las clases, así como otras proteínas séricas.

Además, de que los anticuerpos reconocen al antígeno blanco, el antisuero contiene también anticuerpos contra varios antígenos no blancos que a veces pueden reaccionar en forma no específica en ensayos inmunológicos. Por ésta razón, los antisueros en bruto, frecuentemente son purificados para eliminar las proteínas del suero y enriquecer la fracción de inmunoglobulinas que reaccionan específicamente con el antígeno blanco.

Las preparaciones de anticuerpos sin purificar varían significativamente en su concentración de anticuerpos específicos. La concentración de anticuerpos específicos en los antisueros policlonales típicamente oscila es de 1 a 3 mg/ml. El sobrenadante de los hibridomas por lo general contiene de 0.1 a 10.0 mg/ml; el líquido de ascitis (sin purificar) típicamente oscila entre 2 y 10 mg/ml.

La concentración de anticuerpos en preparaciones purificadas deberá determinarse a través de ensayos estandarizados como lo es el BSA.

Frecuentemente, para la amplificación de la señal y para propósitos de detección, los anticuerpos purificados son conjugados con enzimas, fluoróforos o haptenos como es la peroxidasa de rábanos (HRP), fosfatasa alcalina (AP), rodamina, FITC, o biotina. Los anticuerpos conjugados tienen estabilidad diferencial y requieren diferentes amortiguadores y condiciones de almacenamiento específicas para retener su máxima actividad (Chemicon International, 2004).

Hipótesis.

Debido al potencial que tienen los anticuerpos para la identificación y cuantificación de biomoléculas; es posible utilizar anticuerpos específicos contra las proteínas de la teca perinuclear de verraco. Tales anticuerpos específicos podrán ser utilizados para la identificación y caracterización de las proteínas mayoritarias que conforman a la teca perinuclear del espermatozoide de cerdo, así como también tratar de conocer la función de éstas proteínas.

Objetivo.

El objetivo de ésta investigación es extraer la teca perinuclear de espermatozoides frescos de verraco, una vez obtenidas, las proteínas serán procesadas y posteriormente, serán inoculadas en ratas por vía intraperitoneal para promover la producción de anticuerpos contra las mismas.

Justificación

La amplia aplicación de la inseminación artificial y la realización de todo su potencial, depende ampliamente del uso de semen congelado. Sin embargo, la fertilidad en la inseminación artificial es más pobre que aquella que es hecha con semen fresco en la mayoría de las especies. Inclusive usando las mejores técnicas de preservación, la sobrevivencia de las poblaciones de espermatozoides después del descongelamiento es aproximadamente del 50%. La mayoría de los espermatozoides que sobreviven tienen características que los distinguen de aquellos que no han estado congelados (Hernández et al 2006). Se ha visto que la TP de los espermatozoides descongelados presentan alteraciones que posiblemente estén involucradas en la baja viabilidad de este tipo de célula. Además, el congelamiento y descongelamiento causan un considerable incremento en el porcentaje de espermatozoides que carecen de acrosomas. La producción de anticuerpos podrá ayudar con la caracterización de las proteínas de la TP afectada por el proceso de criopreservación.

Materiales y métodos.

Se colectó el semen (solo fracción rica), separando la fracción gelatinosa a través de una gasa estéril.

Para eliminar el plasma seminal y el diluyente de transporte, las muestras fueron lavadas a 1000 rpm durante 10 minutos y resuspendidas en solución salina (NaCl, 154 mM).

Se obtuvieron fracciones ricas de eyaculados de verracos por el método de la mano enguantada, de línea Landrace – York de un centro de inseminación ubicado en Jilotepec Estado de México, el cual fue transportado en un termo previamente temperado a 38 °C.

Evaluación del semen.

A los eyaculados obtenidos se les realizaron valoraciones cuantitativas (concentración espermática) y cualitativas (movimiento progresivo, morfoanormalidades). La concentración se determinó en una cámara de Neubauer, en una solución de 1000 μ l Triton X-100 al 0.1% en PBS y 50 μ l de semen homogenizándose suavemente. Se contaron cinco recuadros y se aplicó la siguiente ecuación para obtener el total de espermatozoides: espermatozoides contados X 1.05 = millones de células. La evaluación de la motilidad espermática se realizó en gotas de semen observadas con el objetivo de 40x en microscopio de luz, marca Carl Zeiss. Para observar las morfoanormalidades, los espermatozoides fueron teñidos con eosina – nigrosina y también observadas con el objetivo de 40x en microscopio de luz. Posteriormente las muestras fueron lavadas con solución salina fisiológica 154 mM (SSF) con la finalidad de retirar el plasma seminal y la concentración fue ajustada a 35×10^6 células/ml.

Decapitado.

Para el decapitado de las células espermáticas se adaptó la técnica descrita por Si y Okuno (1999). Todo el procedimiento de decapitado se realizó en una cámara fría a 4 °C. Las células espermáticas fueron suspendidas en solución salina fisiológica (NaCl 154 mM), a la

cual se le agregó 40 $\mu\text{l/ml}$ de el cocktail de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Germany), como fue descrito por Rousseaux-Prévost (2003).

El decapitado se realizó empleando perlas de vidrio de $\leq 106 \mu\text{m}$ (Sigma, México), y una concentración de 10×10^6 espermatozoides/ml en una relación 1:1 (v/v). Para ello las perlas fueron colocadas en un tubo de ensaye (3 cm^3), a las cuales se les agregó la suspensión espermática, enseguida la muestra fue agitada en un Vortex (IKA, Minishaker MS1) operado a máxima velocidad (2,500 rpm aproximadamente) por 2 minutos. Se dejó que las perlas sedimentaran y el sobrenadante fue recuperado, ya que este contenía las cabezas y los flagelos. El proceso fue monitoreado por medio de la observación de muestras alícuotas al microscopio de luz.

Para separar las cabezas, el sobrenadante fue filtrado pasando el sobrenadante principalmente a través de mayas de Nylon, con un tamaño de poro de $11 \mu\text{m}$ (Millipore, México), con este método se logro una purificación mayor al 95% de cabezas.

Exposición de la TP

La concentración de las cabezas obtenidas por el proceso de decapitada fue ajustada a la concentración de 35×10^6 células/ml en SSF.

La exposición de la TP se realizó incubando las cabezas con el detergente neutro Brij 36-T 14 (0.65% concentración final) durante 10 segundos a temperatura ambiente.

Inmediatamente, la suspensión de cabezas espermáticas fue centrifugada por 10 min a 1,500 rpm o 3 min a 2500 rpm, el sobrenadante fue desechado y la pastilla se resuspendió en SSF para ser lavada tres veces, por centrifugación resuspensión a 2500 rpm, en la misma solución. Las muestras se resuspendieron nuevamente en SSF a la concentración inicial. Este tipo de muestra será referida como cabezas con teca expuesta.

Extracción de la TP:

La extracción completa de la TP se realizó incubando las cabezas con teca expuesta (50×10^6 /ml) con el detergente Brij 36-T (0.65% concentración final) y DTT (3.75 mM concentración final) durante 40 segundos a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos en una centrifuga clínica. El sobrenadante fue recuperado y las proteínas presentes en el sobrenadante fueron precipitado en acetona fría v/v a -20°C por 12 – 18 horas para posteriormente ser separadas en geles de poliacrilamida.

Microscopia electrónica

Las muestras fueron procesadas para su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET) por tinción negativa (Juárez y Mújica 1999). Se tomaron alícuotas $20\ \mu\text{l}$ durante tres de las etapas del desarrollo de la investigación con el objetivo de valorar los procesos de decapitado, exposición de la TP y extracción de las proteínas de la TP. En todos los casos, las muestras espermáticas fueron fijadas con Karnowski (v/v) por 20 minutos a temperatura ambiente (Karnowsky, 1995). Después de la fijación, las cabezas espermáticas fueron centrifugados a 2,500 rpm por 3 minutos (lavado), la pastilla fue lavada tres veces en PBS, dos veces en agua desionizada y se resuspendió en su volumen inicial en ésta última. Gotas de $20\ \mu\text{l}$ de las suspensiones fueron colocadas sobre rejillas de cobre de 200 mesh (cubiertas con membranas de soporte colodión-carbón) y se dejó sedimentar por 10 minutos. El exceso fue retirado con el filo de un papel filtro y las cabezas fueron teñidas con ácido fosfotúngstico al 0.2% en solución acuosa por 2 minutos. Las rejillas fueron lavadas con agua destilada y observadas al MET Carl Zeiss EM900, (50 kv) operado a 50v.

Cuantificación de proteínas por el método del Ácido bicinoninico (BCA).

Es uno de los métodos utilizados para la cuantificación de proteínas en muestras con altas concentraciones de detergente (o a 1 % de detergente). Este método combina la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por parte de las proteínas en medio alcalino, el cual es detectado por el BCA. La estructura macromolecular de la proteína, el número de enlaces peptídicos y la

presencia de los aminoácidos cisteína, cistina, tirocina y triptófano, se ha reportado que son los responsables de la formación de color púrpura para la cuantificación (Smith 1985). Mismo que dio como resultado 0.055 µg/µl.

Esta determinación se realizó como está descrito en el Manual de métodos No. 2, Sec. VIII: Protein Chemistry, Pag. 138.

Procedimiento:

1. En placas de 96 pozos, colocar 100 µl de una solución de proteína estándar (BSA) con 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg, tres pozos por cada concentración.
2. Muestra problema: se colocan 100 µl de muestra.
3. A ambas muestras se les adicionan 100 µl de solución BSA, se homogeniza con micropipeta (sin hacer burbujas).
4. La lectura fue tomada con un filtro de 540 nm entre las 2 y las 24 hr de incubación a temperatura ambiente.

Ver anexo para ver las soluciones de trabajo y la curva estándar.

Electroforesis SDS-PAGE.

Las proteínas de la TP precipitadas con acetona fueron disueltas en 20 µl de PBS, adicionadas con el mismo volumen de amortiguador de muestra (SDS 2%) y hervidas a 100° C durante 2 minutos, enseguida se les adicionó 10 µl de 2 – mercaptoetanol al 5% (Biorad) y se hirvieron por 2 minutos más. Las muestras fueron cargadas y corridas en geles preparativos de poliacrilamida (SDS-PAGE al 12%), de acuerdo con el sistema discontinuo originalmente descrito por Laemmli (1970). Como referencia se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (Kaleidoscope Prestaines Standards, Biorad). Algunos de los geles fueron teñidos con plata y otros con azul de Coomassie (Rousseaux-Prévost 2003).

Inmunoblott (Western Blotting).

Para probar a las proteínas de la TP reconocidas por los anticuerpos producidos, se utilizó la técnica del western blotting.

Los geles con las proteínas de TP corridas por electroforesis (por duplicado), fueron sumergidos en amortiguador de transferencia durante 15 minutos para ser transferidos a través de un sistema semiseco a membranas de nitrocelulosa (Stratagene, La Jolla, California, 45 µm de tamaño de poro), aplicando una corriente de 400 milliamperes durante 50 minutos, utilizando para ello un aparato TermoEC, EC4000P, serie 90 programable, siguiendo la técnica descrita por Towbin et al (1979). Para la transferencia, todo el material (membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponjas) fueron humedecidas en el amortiguador de transferencia durante 15 minutos. El amortiguador de transferencia fue preparado de la siguiente manera:

Una vez transferidas las proteínas, estas fueron visualizadas por medio de tinción de las membranas con Rojo Ponceau S al 0.5% en ácido acético al 2%; posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con agua destilada (Longo et. al. 1987) y bloqueadas con leche descremada 5% (Sveltys de Nestlé) en PBS-T 0.05% durante 1 hr o bien a 4 °C durante toda la noche.

Posterior al bloqueo, las membranas fueron lavadas un mínimo de 5 veces con PBS-T. Una vez que las membranas fueron lavadas, una de ellas fue incubada con los anticuerpos obtenidos a partir de los sueros (anticuerpos primarios) durante 1-3 hr a temperatura ambiente ó bien toda la noche a 4 °C. La otra membrana fue mantenida en PBS-T, la cual fue utilizada como control negativo.

Después de incubada con los anticuerpos primarios, la membrana fue lavada 5 veces con PBS-T. Ambas membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios (marcados con peroxidasa de rábano) por un periodo de 1 a 2 hr a temperatura ambiente. Una vez concluido el periodo de incubación, las membranas fueron lavadas una vez más con PBS-T.

También se dirigieron anticuerpos anti - actina, anti - α tubulina, anti - β tubulina, anti - vimentina como controles positivos y como control negativo se utilizó PBS-T.

Nota: Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas pueden ser congeladas para su almacenamiento y posterior proceso. Antes del congelamiento de la membrana, ésta se deja secar sobre un papel filtro, posteriormente la membrana se coloca entre dos hojas de papel filtro y se envuelve en papel aluminio.

Revelado por quimioluminiscencia.

La visualización de la unión del anticuerpo a las proteínas de la 1P, se realizó proporcionando a la peroxidasa su sustrato, el cual fue revelado por quimioluminiscencia como sigue:

1. Después de incubar la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo secundario, esta se lavó 5 veces con PBS-T 0.005%, se escurrió y se colocó sobre un vidrio.
2. Se preparó la solución de revelado, mezclando las soluciones uno y dos del Kit de Amersham por partes iguales (v/v). Solamente se preparó la cantidad suficiente para cubrir las membranas.
3. Se colocó la solución reveladora sobre las membranas y se dejó incubar durante un minuto. (Se tuvo la precaución de marcar la superficie de la membrana que estuvo en contacto con el gel ya que esta fue la superficie a revelar).
4. Pasado el tiempo de incubación, la solución reveladora fue retirada.
5. Enseguida se colocaron las membranas entre dos hojas de plástico transparentes o acetatos dentro de un chasis (Kodak X-Omatic Cassette). Los siguientes pasos fueron realizados en un cuarto oscuro.
6. Una película radiográfica (Kodak Electrón Microscope Film Estar Tic Base 4489) fue colocada encima del acetato que protegía la cara de la membrana a revelar, la película fue expuesta desde un minuto hasta un minuto y medio.

7. La película radiográfica fue procesada introduciéndola en la solución reveladora (Kodak, GBX Developer & replenisher). Una vez que se observan las bandas, el revelador se bloquea lavando la película con agua corriente.
8. Enseguida, la película fue sumergida en la solución fijadora (Kodak, GBX Fixer & Replenisher) hasta que se observara transparente y lavada en agua corriente.
9. La película se dejó secar y fue rotulada.

Producción de anticuerpos policlonales.

Para la producción de anticuerpos contra las proteínas mayoritarias de la TP, se utilizaron 6 ratas hembras adultas de la cepa Sprague Dawley con una edad de ocho semanas (con aproximadamente 180 – 200 gr. de peso corporal). Antes de la inoculación de los extractos de TP, se obtuvo el suero de las seis ratas con la finalidad de conocer si presentaban inmunoreactividad contra las proteínas de la TP del espermatozoide de cerdo. Para ello, proteínas de la TP transferidas a papel de nitrocelulosa fueron procesadas por Westernblotting. De los seis sueros, tres reconocieron a las proteínas de la TP (figura 3).

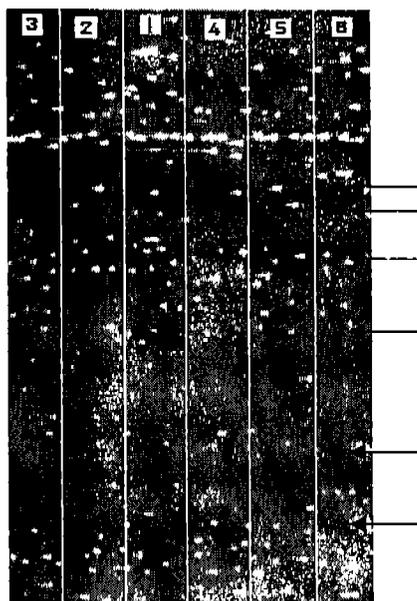


Figura 3. Blott de las proteínas de la TP expuestas a los seis sueros, a una dilución de 1:500. Las flechas señalan los sitios en los que se hace evidente la inmunoreactividad de cada uno de los sueros de las ratas, esto es, el reconocimiento positivo ante las proteínas de la TP. Las bandas que presentaron inmunodetección, tienen un peso aproximado de 50, 45 y 17 kDa aproximadamente.

Solo las ratas positivas fueron inoculadas vía intraperitoneal (IP) con el extracto proteico de la TP (6 µg/µl) mezclado con hidróxido de aluminio (v/v), inoculándose 1 ml. por rata.

El esquema de inmunización consistió de una aplicación primaria sin el adyuvante (hidróxido de aluminio), seguido de tres inoculaciones con el adyuvante, con un lapso de una semana entre cada aplicación. Para la obtención del suero de las ratas, ver anexo.

Inmunoensayo (ELISA Indirecto)

La especificidad de los anticuerpos fue evaluada mediante el método de inmunoensayo en fase sólida, en placas para ELISA de 96 pozos, como fue descrito por Bellvé et. al. 1990.

- 1) Se toman 25 µg de proteína (antígeno) y se llevan a 1 ml con solución de carbonato de sodio - bicarbonato de sodio 100 mM pH 9.6 (amortiguador Bicar)
- 2) A cada pozo de la placa se le agregaron 100 µl de proteínas de la TP en amortiguador de carbonato de sodio y se dejó incubar por 2 hr a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.
- 3) Cada pozo fue bloqueado con 100 µl de BSA 1% o con gelatina 0.5% en PBS-T y se dejó incubar a temperatura ambiente por 60 minutos.
- 4) Se retiró el bloqueador y se lavaron los pozos con PBS-T (5 veces).
- 5) Se agregaron 100 µl de los sueros obtenidos y se dejó incubar 60 minutos a 37 °C o durante 2 – 3 hr. a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4 °C.
- 6) Se retiró el exceso y se lavó con PBS-T (5 veces).
- 7) Se agregaron 100 µl de anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (anti-rata de Zymed) diluido 1:500 en PBS-T. Se dejó incubar 60 minutos a 37 °C durante 2 – 3 hr. a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4 °C. En este caso se utilizó.
- 8) Se retiró el exceso y se lavó con PBS-T (5 veces).

- 9) Se colocan 100 μ l de solución sustrato (Buffer Citratos/Fosfatos) por pozo.
- 10) Se dejan incubar por 15 minutos y se analiza el resultado con un lector de ELISA.

Purificación de anticuerpos por cromatografía de afinidad.

Para la purificación de los anticuerpos, tiras de membranas de nitrocelulosa con las proteínas de la TP transferidas fueron incubadas por separado, con cada uno de los anticuerpos diluidos 1:100 en PBS-T, durante una hora en agitación constante y a temperatura ambiente. El suero diluido fue recuperado y las tiras fueron lavadas en PBS-T.

La elusión del anticuerpo fue realizada con Glicina pH 3, utilizando un volumen máximo de 15 μ l, en agitación constante durante tres minutos y enseguida para neutralizar el pH se agregó Trisma Base pH 7. El sobrenadante con los anticuerpos obtenidos fue recuperado y mantenido a 4 °C.

La precipitación de los anticuerpos fue realizada con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (sulfato de amonio) saturado en agua desionizada, ajustada a pH 7 con NH_4OH (hidróxido de amonio) (Krohnone et. al. 1982) y pasada a través de filtros de nitrocelulosa de 45 μ m. La suspensión con los anticuerpos fue precipitada a 4°C durante toda la noche y posteriormente centrifugada durante 10 minutos a 16, 000 rpm.

Inmunofluorescencias in situ.

Para realizar la inmunofluorescencia se utilizaron muestras de espermatozoides frescos con TP expuesta y fijados con paraformaldehído al 4%.

La exposición de la TP para estas muestras, recibió un tratamiento diferente, debido a que no fueron expuestas a fricción con las perlas y fue procesada como se describe a continuación:

Los espermatozoides fueron lavados en solución salina para extraer el plasma seminal, la muestra resultante fue ajustada a 35×10^6 células/ml. a la cual se les añadió detergente Brij 36-T (0.65% concentración final) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente (Mújica, 1979; Juárez, 1995).

1. Para retirar el fijador los espermatozoides se centrifugaron a 2,500 rpm por 3 minutos (lavado), la pastilla fue lavada tres veces en PBS y dos veces en agua desionizada, y resuspendida en su volumen inicial
2. Se colocaron 10 - 15 μ l de una suspensión de espermatozoides, (previamente tratados) en portaobjetos y se dejaron secar.
3. Las células que permanecieron adheridas a los portaobjetos fueron lavados gentilmente con PBS y permeabilizadas con una solución de PBS-Triton X100 al 0.5 % durante 15 minutos (aunque las células no presentaban membranas, cuando fueron permeabilizadas, estas presentaban una mejor fluorescencia y menos fondo cuando fueron observadas al microscopio confocal)
4. Posteriormente, las muestras fueron bloqueadas con albúmina al 1% durante una hora a temperatura ambiente.
5. Se realizaron 10 lavados con PBS.
6. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: los 3 sueros inmunes de las ratas inmunizadas, anti-actina y a una dilución de 1:500 en PBS y un control negativo de PBS. Los anticuerpos fueron incubados durante 1 hr a temperatura ambiente en cámara húmeda.
7. Se realizaron 10 lavados con PBS.
8. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-rata (para las IgGs de los sueros obtenidos) y anti-ratón (para las IgGs contra anti-actina). Los anticuerpos fueron utilizados a una dilución 1:200 en PBS.
9. Las muestras fueron montadas con Gelvatol (para mantener la fluorescencia). (Banker 1991)

Resultados.

Con el método modificado de Si y Okuno (1999), para la decapitación de los espermatozoides de cerdos, fue posible obtener una pureza mayor al 95 % de las cabezas espermáticas (figura 4). La microscopia electrónica de las cabezas obtenidas mostró que la membrana plasmática se dañó, ello posiblemente por el roce de las perlas (figura 5). Después del tratamiento con el detergente Brij 36-T, para la solubilización de las membranas y acrosoma, la TP permaneció intacta, lo cual fue corroborado utilizando como marcador morfológico la integridad de la subestructura (figura 5-A)

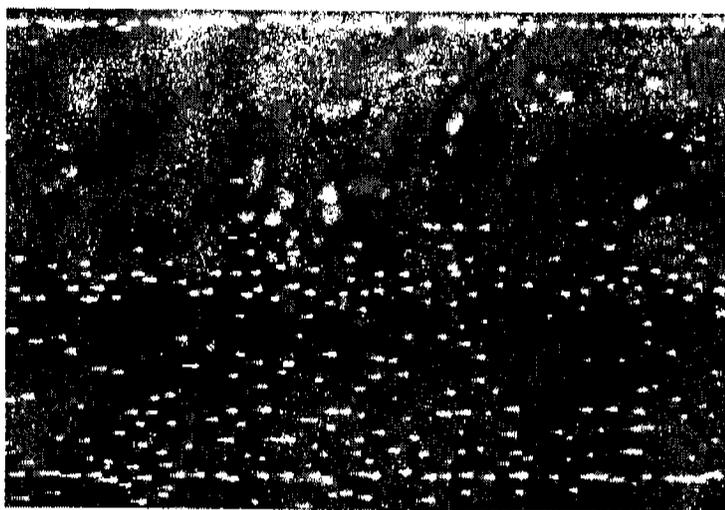


Figura. 4. Recuperación de cabezas mayor al 95% posterior al decapitado y a la separación por medio del filtrado mediante el uso de mayas de Nylon. Posterior al decapitado las cabezas espermáticas fueron sometidas a tratamiento con detergente Brij 36-T

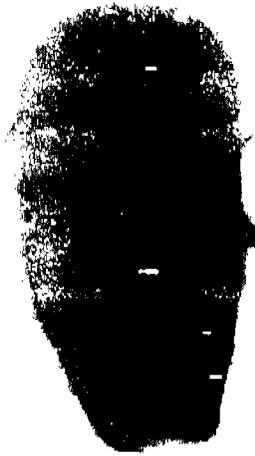


Figura 5. MET de cabeza de espermatozoide después del decapitado en donde se aprecia el daño a la membrana, generado por la fricción de las perlas sobre la superficie de la cabeza espermática.

La microscopía electrónica de las cabezas espermáticas tratadas con DTT / Brij 36-T mostró la extracción total de la TP, dejando el núcleo espermático intacto (figura 5-B).

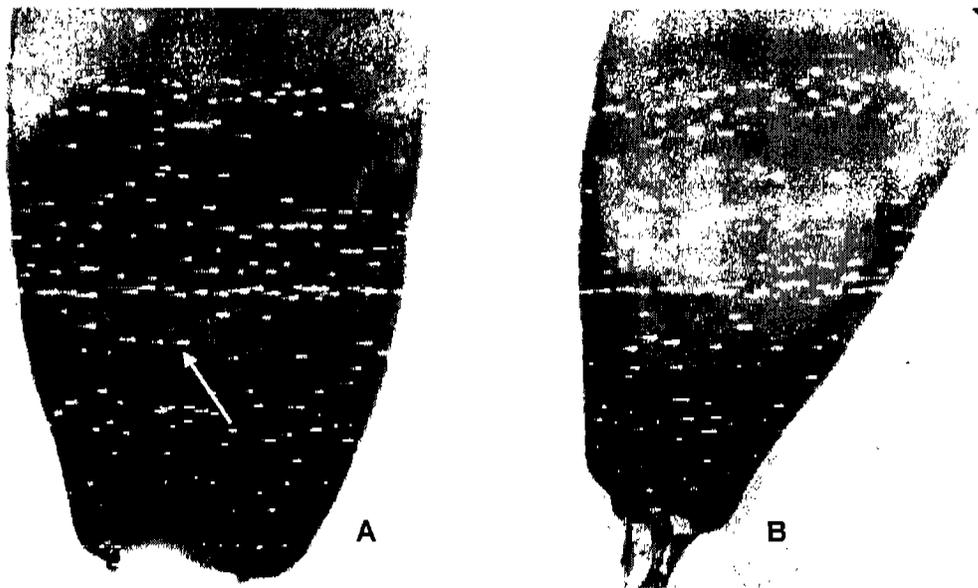


Figura 5-A. MET de cabeza de espermatozoide de cerdo después del decapitado y solubilización de membrana con detergente Brij 36-T. La flecha señala la presencia de la subestructura en buen estado. En la figura 5-B. Se observa un espermatozoide con extracción completa de la TP después de los procesos antes mencionados. También se puede observar que el núcleo permanece condensado.

Por otra parte la electroforesis de las proteínas extraídas de la TP mostró aproximadamente 17 bandas proteicas, siendo las bandas que poseen de los pesos aproximados de 17, 45 y 50 kDa las mayoritarias (Figura 6).

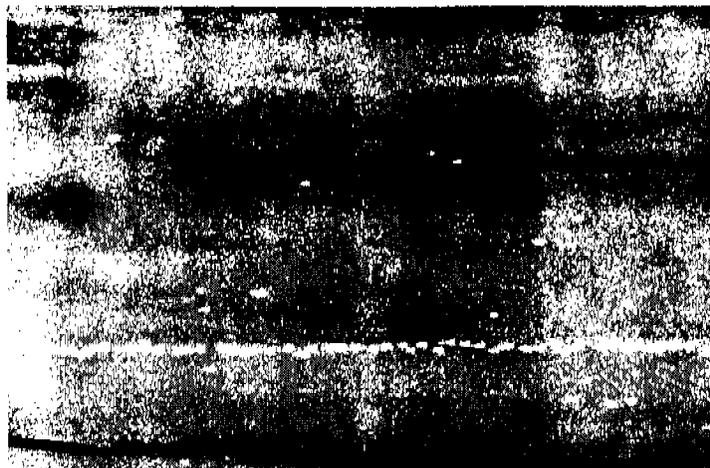


Figura 6. SDS – PAGE al 12% de las proteínas de la TP del espermatozoide de cerdo, teñido con azul de Coomassie, en el que se observan del lado izquierdo los marcadores de peso molecular y en el lado derecho, las bandas de las proteínas.

La banda proteica de 50 kDa fue reconocida por los anticuerpos del suero 1. Este suero obtenido fue de las ratas preinmunes, por lo que solamente se procedió a estimular la producción de los anticuerpos (IgG) por medio de la inoculación de la banda proteica reconocida y el anticuerpo será nombrado como PPT50. De igual forma la banda de 45 kDa fue reconocida por el suero 2, y será nombrada como PPT45 y la banda proteica de 17 kDa fue reconocida por el suero 3 el cual será nombrado como PPT17 (figura 7).



Figura 7. Immunoblotting de las proteínas de la TP, en el que se observa el reconocimiento de las mismas al ser puestas en contacto con los anticuerpos presente en las ratas preinmunes.

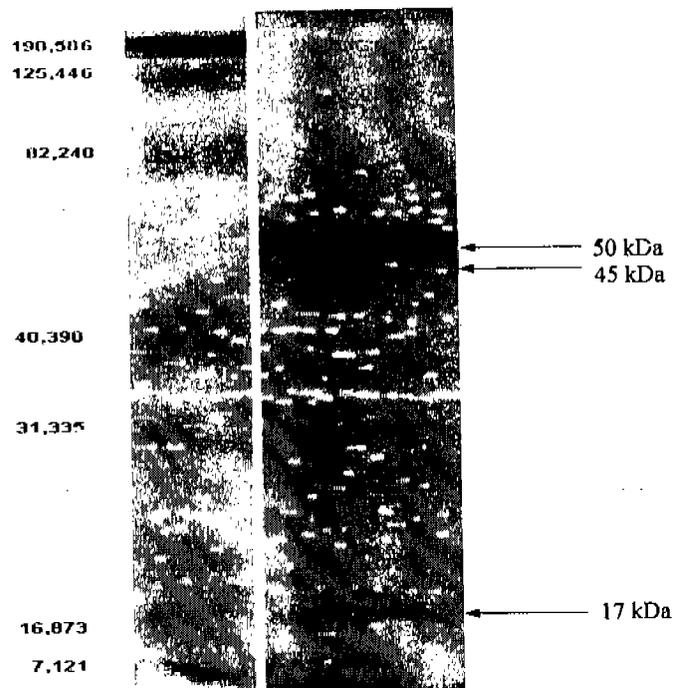


Tabla 2. De izquierda a derecha, se muestran en la primera columna los marcadores de peso molecular, y en la siguiente columna el patrón de corrida de las proteínas de la TP en geles de poliacrilamida al 12 %, teñidas con azul de Coomassie, así como también las bandas que fueron reconocidas por las inmunoglobulinas presentes en los sueros de las ratas. El peso aproximado de las proteínas reconocidas por cada uno de los tres sueros es 50, 45 y 17 kDa respectivamente.

Como controles positivos para el western blotting, se utilizaron anticuerpos monoclonales contra actina, α -tubulina, β -tubulina y vimentina. Solo para el caso de actina, hubo reconocimiento (datos no mostrados) y como control negativo se utilizó PBS. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron monoclonales anti-rata fluoresceinados (para la detección de las inmunoglobulinas presentes en los sueros de las ratas) y anti-ratón (para el reconocimiento de los anticuerpos monoclonales) también fluoresceinados en una dilución 1:50. Todos los anticuerpos secundarios que fueron utilizados fueron marca Zymed.

Para las inmunolocalizaciones indirectas, los espermatozoides fueron expuestos directamente a los anticuerpos obtenidos de las ratas inmunizadas y observados al microscopio confocal (Microscopio Láser Confocal TCS – SP2 Leica Heidelberg Germany).

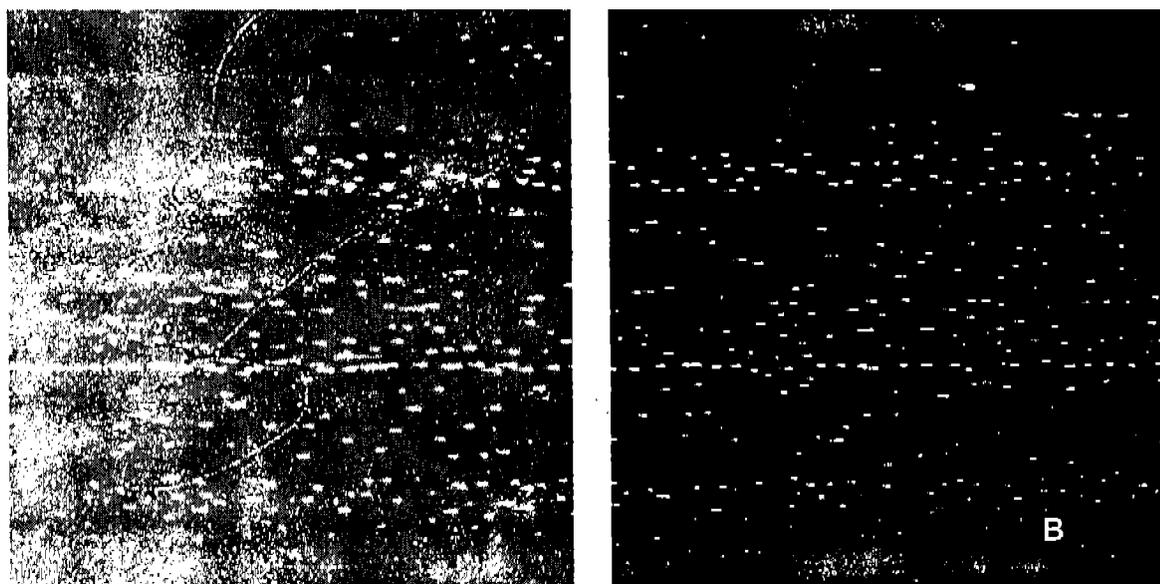


Figura 8. Microscopia confocal de cabezas de espermatozoides de cerdo, con suero pre-inmune, como control negativo. En la figura 9-A se observa en fase de contrastes la presencia de los espermatozoides de cerdo en la muestra. En la figura 9-B se observa la ausencia de inmunodetección de proteínas de la TP.

Con el anticuerpo SIR1 (Suero Inmune Rata 1) que identifica a la proteína de 50 kDa, se observó fluorescencia sobre toda la TP, principalmente en la región del segmento ecuatorial en donde la fluorescencia se distingue en forma de semiluna (figura 9). También se encontró

inmunoreactividad en la región subacrosomal, pero ésta no fue uniforme, ya que existieron áreas que no fueron reconocidas, por lo que la fluorescencia se encontró en forma de manchones (figura 9). Adicionalmente se encontró marca fluorescente sobre todo el flagelo, presentandose una mayor intensidad de la fluorescencia en la base del flagelo y en la pieza media (figura 9).

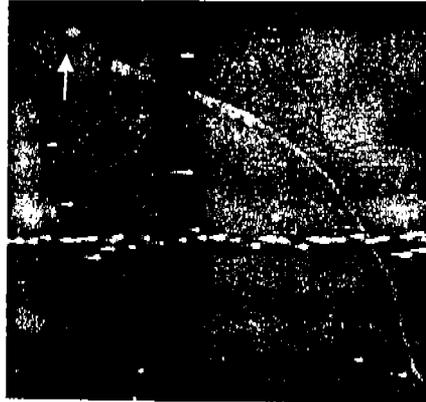


Figura 9. Microscopia de fluorescencia mostrando la detección de las proteínas de la TP con el suero 1 (SIR1). La marca de fluorescencia se observa tenuemente sobre toda la cabeza, excepto en la región ecuatorial en donde se observa una especie de semiluna. También se encuentra inmunodetección en el cuello y en la pieza media del flagelo.

Cuando la muestra fue expuesta a los anticuerpos obtenidos del suero 2 (SIR2), la fluorescencia se ubicó principalmente en la porción apical de la región subacrosomal y ecuatorial de la cabeza espermática, generando así, una regiones sin tinción entre la zona ecuatorial y la subacrosomal, mientras que la hoja postacrosomal presentó una ligera tinción. También se encontró reconocimiento en las tres porciones del flagelo, principalmente en la pieza principal y en la terminal.



Figura 10. Microscopía confocal de fluorescencia con los anticuerpos obtenidos a partir del suero 2 (SIR2). Se observa fluorescencia en la región subacrosomal, así como también se encontró inmunodetección con forma de semiluna en la región ecuatorial, dicho marcaje fue la de mayor intensidad en la cabeza. En flagelo existe reconocimiento en la pieza media y pieza terminal en regiones intensas de fluorescencia.

Cuando los espermatozoides fueron expuestos al tercer anticuerpo (SIR3), estos mostraron fluorescencia en un patrón muy semejante al obtenido con el suero SIR2, sin embargo el reconocimiento por parte del anticuerpo SIR3, presenta menor fluorescencia en la región ecuatorial. También se encuentra fluorescencia en todo el flagelo, principalmente en el cuello y en la pieza terminal del mismo.

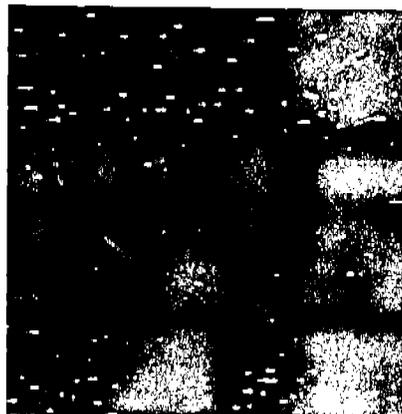


Figura 11. Microscopía confocal de fluorescencia utilizando los anticuerpos del suero 3 (SIR3). Se observa fluorescencia tenue sobre toda la TP, excepto por arriba de la región ecuatorial, ya que ésta no presentó fluorescencia. También hubo una marca intensa de fluorescencia en cuello; al inicio de la pieza media y de la pieza principal del flagelo, presentándose en el resto del flagelo una ligera fluorescencia.

Discusión.

La teca perinuclear (TP) es el principal elemento citoesquelético de la cabeza de los espermatozoides de mamífero (Longo et. al. 1987, Juárez 1999). Las proteínas consideradas como constituyentes de la TP son aquellas caracterizadas por su resistencia a la extracción y con una localización ultraestructural por inmunomarcaje o detección inmunoespecífica en espermatozoides con teca expuesta (Longo et. al. 1987, Sutovsky et. al. 1999, Lécuyer et. al. 2000).

El propósito de este estudio, fue identificar las proteínas mayoritarias que componen el citoesqueleto perinuclear del espermatozoide cerdo, por medio de la producción y recuperación de anticuerpos policlonales contra proteínas de la TP en ratas adultas de la cepa Sprague Dawley, logrando obtener tres sueros policlonales. Los espermatozoides fueron sometidos a diferentes tratamientos, con la finalidad de estandarizar técnicas que permitieran una completa solubilización de membranas (celiular y acrosomal), una extracción lo más uniforme posible de las proteínas de la TP, ya que por su resistencia a la extracción con detergentes no desnaturalizantes y amortiguadores altos en sales es casi imposible obtener esta estructura de forma completa (Oko 1998), así como también estandarizar una técnica que permitiera un decapitado del total de la muestra sometida a tratamiento y el consiguiente filtrado para separar los flagelos de las cabezas espermáticas. Para la solubilización de las membranas, se tuvo que modificar la técnica descrita por Juárez – Mosqueda (2000) debido a que el tiempo que debían ser incubadas las cabezas espermáticas en Brij 36-T, debió ser significativamente menor; esto probablemente fue debido a la fricción que se genera con las perlas de vidrio durante el decapitado de los espermatozoides, mostrándose un deterioro sobre la superficie de las membranas, lo cual propicia que se facilite la exposición de la TP como se muestra en la figura 5.

Se realizó una extracción diferencial de las proteínas de la TP de espermatozoides frescos de cerdo, utilizando un detergente neutro (Brij 36T / DTT). La extracción de las proteínas de la TP, respondieron a un tratamiento más suave, a pesar de que conforme la maduración espermática procede, ocurren cambios concomitantes en la estructura,

metabolismo y fisiología y durante la maduración epididimal y ésta se vuelve más resistente a la sonicación, detergentes y a la tripsina. El incremento en la resistencia estructural, ha sido atribuido a una mayor formación de puentes de disulfuro. (Mújica et. al. 2003). El método descrito por Bellvé (1990) para la extracción de la TP de espermatozoides de ratón incluye una incubación en dithiothreitol (DTT) 50 mM durante 20 minutos, bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) 1% y Tris – HCl pH 8.3 20 mM.

Al separar el enriquecido proteico obtenido de las cabezas espermáticas por medio de SDS – PAGE 12 %, se reconoció un grupo de tres proteínas mayoritarias pertenecientes a la TP, que se encuentran entre los 17,000 kDa, 45,000 kDa y 50,000 kDa, las cuales a su vez fueron reconocidas por los anticuerpos policlonales SiR3, SiR2 y SiR1 respectivamente. La reactividad de las proteínas aisladas de las cabezas espermáticas fue probada con anticuerpos en western blotting (Batova et al 1997).

Aparentemente la transición bioquímica y morfológica de los determinantes antigénicos en las células haploides se da conforme estas pasan del testículo al epidídimo por uno o más mecanismos. La explicación más simple incluye un procesamiento endoproteolítico de las tecinas de 80,000 – 75,000 Mr, para producir dos productos de 50,000 y de 48,000 Mr. Este modelo es apoyado por su coincidente desaparición y aparición durante la maduración espermática (Bellvé et al 1990). También la ausencia de reconocimiento puede ser resultado de la exclusión del correspondiente antígeno, cuando la proteína es corrida en gel bajo condiciones desnaturalizantes (Batova et al 1997).

Por medio de microscopía confocal se observó en espermatozoides con TP expuesta el reconocimiento de los tres antígenos de bajo peso molecular por parte de los sueros, encontrándose que los antígenos se encuentran predominantemente en la región subacrosomal (principalmente en la zona apical); la región ecuatorial de la cabeza espermática también presentó reconocimiento, formando una banda de fluorescencia variable alrededor de la cabeza espermática, así como también la porción media del cáliz. El flagelo mostró reconocimiento en toda su extensión, habiéndose presentado la fluorescencia en forma discontinua tanto en la pieza media, como en la principal y en la terminal (ver figura 10, 11 y 12). En general, el

patrón de reconocimiento de los anticuerpos SIR1, SIR2 y SIR3, es similar a los patrones reportados en espermatozoides de diversos mamíferos (Ilavperuma 2002). Los espermatozoides fueron utilizados con membranas solubilizadas, debido a que estas restringen la penetración de los anticuerpos hacia la matriz perinuclear (Manandhar and Toshimori. 2003). En algunas células dentro de una misma muestra, los anticuerpos no reaccionaron, lo cual coincide con lo descrito por Bathla y Sidhu (1998), quienes sugieren que probablemente la presencia de los antígenos está ligada con el estado fisiológico o con la madurez de la célula; así mismo Shaha et al (1998) obtuvo hallazgos similares y no pudo detectar con anticuerpos policlonales en espermatozoides inmaduros, antígenos espermáticos presentes en espermatozoides maduros. También la ausencia de tinción en espermatozoides que no han desarrollado la reacción acrosomal, no se debe a la falta de unión del anticuerpo con el antígeno, más bien es por la falta del antígeno (Allen y Green. 1995).

Existe una pérdida y una aparición de proteínas de alto y de bajo peso molecular respectivamente conforme el espermatozoide madura durante su paso desde el testículo hasta la cola del epidídimo, la cual puede empalmarse o ser discontinua (Beilvé et al (1990).

Inmunoblots obtenidos de proteínas extraídas de muestras espermáticas de roedores y humano, mostraron bandas claras con pesos moleculares relativos correspondientes a actina (42 kDa) α - Tubulina (55 kDa), y existen similitudes en la localización de actina en la cabeza espermática. Se ha encontrado tinción por inmunofluorescencia brillante en toda la región apical del acrosoma, cubriendo el citoesqueleto cortical entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, y el citoesqueleto subacrosomal, entre la membrana acrosomal interna y la membrana nuclear. Generalmente en espermatozoide de humano, la distribución del citoesqueleto de actina en la región postacrosomal, es más débil en espermatozoides control que en los espermatozoides después de la reacción acrosomal. Previo a la reacción acrosomal, el citoesqueleto apical del acrosoma y el segmento ecuatorial de espermatozoides de humano y de todas las especies de roedores muestra poca fluorescencia. En espermatozoides de humano, se forma un anillo a la mitad de la zona apical del acrosoma en forma prominente. La fluorescencia también se observa en la región postacrosomal, especialmente en los espermatozoides de hámster en donde la localización es fuerte y bien

definida en el área dorsal y ventral. Después de la reacción acrosomal, el segmento ecuatorial se vuelve más definido, pero en la capa subacrosomal la fluorescencia tenue fue vista solamente en espermatozoides de ardilla gris. La presencia de actina dentro de la cabeza de los espermatozoides ha sido confirmada previamente en muchas investigaciones, aunque se ha mostrado que la distribución exacta suele variar, posiblemente debido a los métodos de fijación, especificidad de los anticuerpos, sensibilidad de la técnica y la permeabilización de la membrana. Las razones para escoger anticuerpos policlonales es: su conveniente reactividad cruzada y además su consistencia en las pruebas inmunohistoquímicas y también debido a que se han obtenido resultados consistentes en trabajos previos hechos con espermatozoides de cerdo. Se ha utilizado faloidina conjugada con FITC para teñir exclusivamente actina-F; los resultados obtenidos por faloidina-FITC en espermatozoides control han sido muy diferentes de aquellos obtenidos con anticuerpos policlonales anti-actina. En los espermatozoides control, los anticuerpos anti-actina detectaron toda la zona apical del acrosoma, incluso entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa; sin embargo, en contraste, la actina-F detectada por faloidina, estuvo claramente confinada a la región acrosomal. Esta diferencia puede ser explicada por el pool de Actina-G, localizada entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal, la cual podría ser solo detectada por el anticuerpo anti-actina (Dvorácová 2005).

Conclusiones

En espermatozoides maduros de bovino, la actina y las proteínas de unión a actina son localizadas justo en el margen anterior del acrosoma y en la región postacrosomal y fue relocalizada en la región postacrosomal después de la reacción acrosomal (Dvorácová 2005).

Howes et al (2001) describió la relocalización de actina-F a la región postacrosomal en los espermatozoides eyaculados de cerdo después de la reacción acrosomal, sin embargo, el marcaje en ésta región también ha sido visto en espermatozoides control.

La mayoría de las células eucariontes puede expresar múltiples isotipos de α - y β -tubulina y ésta diversidad es posteriormente expandida por numerosas modificaciones

postraducción. Aunque el significado funcional de la diversidad de tubulina es difícil de asociar con consistencia a las funciones biológicas, existe evidencia de que los diferentes isotipos de α - y β - tubulina y las modificaciones postraducción pueden impactar la estructura y función de los microtúbulos (Kierszenbaum 2002). La tinción de α - tubulina sugiere que ésta proteína puede estar relacionada con la morfología de los espermatozoides. En espermatozoides de ardillas y de hamster, la α - tubulina fue claramente localizada dentro del citoesqueleto cortical de la región apical del acrosoma. En los espermatozoides de humano la α - tubulina se observó como una banda dentro de la zona apical del acrosoma, sugiriendo una distribución restringida de ésta proteína en la zona apical de la TP entre la membrana acrosomal interna y la membrana nuclear (Dvoráková 2005).

Virtanen et al (1984) reportó que no encontró tinción con anticuerpos anti-tubulina en la cabeza de espermatozoides de humano, solamente en la región del cuello y en todo el flagelo.

Diversos antígenos han sido reportados, así como también los anticuerpos mono o policlonales para cada uno de esos antígenos, los cuales se ha visto que pueden presentar reacción cruzada con proteínas del citoesqueleto de células somáticas o bien con proteínas citoesqueléticas del espermatozoide, tal es el caso de la citoqueratina en la región acrosomal, la cual se ha reportado que tiene algunos epítomos que presentan reacción cruzada en flagelo en espermatozoides eyaculados al utilizar anticuerpos policlonales (Longo et. al. 1987), o bien por presentar regiones idénticas en la secuencia de aminoácidos, como la que existe entre cilicina I y las MBP's (Hess 1993). La existencia de epítomos con reactividad cruzada puede ser predecible, debido a las características bioquímicas de las proteínas (Kontz 1987). El o los epítomos que son presentados de novo en el segmento ecuatorial posterior a la reacción acrosomal, potencialmente tiene dos orígenes. Éstos pueden provenir del procesamiento de antígenos ya presentes en la membrana plasmática del segmento ecuatorial de los espermatozoides sin reacción acrosomal; o bien el epítomo puede provenir de la difusión de un antígeno secuestrado previamente por la membrana plasmática del segmento ecuatorial, posterior a la reacción acrosomal (Allen y Green. 1995). Los métodos convencionales para la inmunización de animales de laboratorio contra las proteínas de la TP, han probado no ser lo

suficientemente eficientes para identificar los antígenos espermáticos específicos filogenéticamente conservados; así mismo. Trabajos sobre anticuerpos monoclonales contra espermatozoides, han mostrado que la mayoría de los anticuerpos convencionalmente producidos presentan reacción cruzada con tejidos somáticos y muchos de éstos, no se unen a células germinales testiculares (Fichorova et al 1996). Se han utilizado anticuerpos para demostrar la distribución de antígenos que están restringidos a los espermatozoides, como fue hecho con el anticuerpo monoclonal MN13, el cual identifica un epítipo que solamente se ubica entre la hoja postacrosomal y la membrana celular suprayacente y no parece corresponder a ningún componente caracterizado previamente (Toshimori et. al. 1991). También se ha comprobado la existencia de antígenos espermáticos altamente conservados, los cuales han tenido impacto clínico o en aspectos reproductivos en animales y humanos (Chiu 2003). La vimentina fue utilizada como control positivo, debido a que ha sido encontrada principalmente en el segmento ecuatorial de la cabeza de espermatozoides de humano, para la cual se ha sugerido que puede ser importante para el proceso de fertilización, sin embargo, esta ha presentado una distribución asimétrica. Esta asimetría tiende a ser más pronunciada en las cabezas de espermatozoides inmaduros, como por ejemplo en los que presentan gota citoplásmica. Frecuentemente en algunas células espermáticas con anomalías, se ha podido caracterizar una reacción positiva a vimentina en el cuello y en el segmento inicial de la pieza media (Markova et al 2001). Virtanen et al (1984) sugirió que la espectrina y vimentina pueden estar en correlación con distintas especializaciones de la superficie de las células espermáticas.

Bibliografía citada.

1. A. C. Lopo, V. D. Vacquier. 1980. Sperm-specific Surface Antigenicity Common to Seven Animal Phyla. *Nature*. 288: 397-399.
2. Adela Mújica, Fernando Navarro -García, Enrique O. Hernández -González, María de Lourdes Juárez-Mosqueda. 2003. Perinuclear Theca During Spermatozoa Maturation Leading to Fertilization. *Microscopy research & technique* 61: 76 – 87
3. A. G. Hunter. 1989. Immunology and fertility in bovine. *Journal Dairy Science*. 72: 3353 – 3362.
4. Banker, G. B. & Golsin K. 1991. *Culturing Nerve Cells* Massachusetts. Institute of Technology. 1st Ed. Pg. 94.
5. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Lewis. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega.
6. C. A. Allen & D. P. Green. 1995. Monoclonal Antibodies Which Recognize Equatorial Segment Epitopes Presented the Novo Following the A23187 Induced Acrosome Reaction of Guinea Pig Sperm. *Journal of Cell Science* 108: 767-777
7. C.F.M. Hendriksen & W de Leeuw. 1998. Production of monoclonal Antibodies by the Ascites method in Laboratory Animals. *National Institute of Public Health and the Environment*. 535-542.
8. Christophe Lécuyer, Jean – Louis Dacheux, Eric Hermand, Etienne Mazeman, Jean Rousseaux & Roselyne Rousseaux – Prévost. (2000). Actin-Binding Properties and Colocalization with Actin during Spermiogenesis of Mammalian Sperm Calicin. *Biology of Reproduction* 63: 1801 – 1810.
9. C. J. Roberts, L. S. Jackson. 1995. *Journal of Immunological Methods*. 181:157-166
10. Daniel P. Sites, John D. Stobo. 1995. *Inmunología Clínica y Básica*. 5a ed., México Distrito Federal.
11. David Lane. 1988 *antibodies: A laboratory manual*. Ed Harlow. Imperial Cancer Research Fund Laboratories
12. D. Stave Kohts, Veneta Georgieva-Hanson, Jhumku D. Kohts, William J.Schook & Saul Puszkin. 1987. Mapping two functional Domains of Clathrin Light Chains with Monoclonal Antibodies. *The Journal of Cell Biology*. 104. 897 – 903.

13. Detlev Drenckhahn, Thomas Jons & Frank Schmitz. 1993. Production of Polyclonal Antibodies against Proteins and Peptides. *Methods in Cell Biology*. Vol. 37. Academic Press.
14. D. W. Fawcett - Bloom. 1986. *Tratado de Histología*. Interamericana Mc. Graw Hill. 11a Edición.
15. E.A. Mc Laughlin, W.C.L. Ford & M.G.R. Hull. 1993. Effects of Cryopreservation on the Human Sperm Acrosome and its Response to A23187. *Journal of Reproduction and fertility* 99: 71-76.
16. E. Yakirevich, Y. Naot. 1999. Characterization of a potent sperm – agglutinating monoclonal antibody and its cognate antigens. *Fertility and sterility*. Vol. 71, No. 3.
17. Fertilization. *Microscopy Research and Technique* 61 :76-87
18. Frank J. Longo, Georg Krohne, and Werner W. Franke. 1987. Basic Proteins of the Perinuclear Theca of Mammalian Spermatozoa and Spermatids: A Novel Class of Cytoskeletal Elements. *Journal Cell Biology*. 105: 1105-1120.
19. Gaurishankar Manandhar and K. Toshimori. 2003. Fate of Postacrosomal Perinuclear Theca Recognized by Monoclonal Antibody MN13 after Sperm Head Microinjection and its Role in Oocyte Activation in Mice. *Biology of Reproduction*. 68: 655 – 663.
20. Guoqiang Zhuang, Yoshio Katakura, Takeshi Omasa. 2001. Measurement Of Association Rate Constant Of Antibody -Antigen Interaction In Solution Based On Enzyme -Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92: 330 – 332.
21. Hiroshi Ueda. 2002. Open Sandwich Immunoassay: A Novel Immunoassay Approach Based on the Interchain Interaction of an Antibody Variable Region. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94: 614-619.
22. Hishinuma, J. Sekine. Separation of canine epididymal spermatozoa by Percoll gradient centrifugation. 2004. *M. Theriogenology*. 61: 365-372
23. H. Bathla, K. S. Sidhu. 1998. Localisation of low molecular weight sperm antigens during capacitation and acrosome reaction. *Animal reproduction science*. 54: 55–64.
24. Holger Hess, Hans Heid & Werner Franke. 1993. Molecular Characterization of Mammalian Ciliclin, a Basic Protein of the Sperm Head Cytoskeleton. 122: 1043 – 1052.

25. Holger Hess, Hans Heid, Ralf Zimbelmann & Werner W. Franke. 1995. The Protein Complexity of the Cytoskeleton of Bovine and Human Sperm Heads: The Identification and Characterization of Cilicin II. *Experimental Cell Research* 174: 174 – 182.
26. I. N. Batova, S. D. Kyurkchiev, I. R. Kehayov. 1997. Cell specific nuclear antigens of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 49: 55 – 69.
27. J. Frayne, L. Hall. 1999. The potential use of sperm antigens as targets for immunocontraception; past, present and future. *Journal Reproduction Immunology*. 43: 1-33.
28. K. Toshimori, I. Tani, C. Oura & E. M. Eddy. 1991. A Monoclonal Antibody, MN13, that Recognizes Specifically a Novel Substance between the Postacrosomal Sheath and the Overlying Plasma Membrane in the Mammalian Sperm Head. *Molecular reproduction and development* 29: 289 -293.
29. Katerina Dvoráková, Harry D. M. Moore, Natasa Sebková & Jiri Palecek. 2005. Cytoskeleton Localization in the Sperm Head Prior to Fertilization. *Reproduction* 130: 61 – 69.
30. Koehler JK. 1970. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J Ultrastructures* 33:598–614.
31. M. Ollero, O. Boscós, J. A. Cebrián-Pérez & T. Muiño-Blanco. 1998. Loss of Plasma Membrane Proteins of Bull spermatozoa Through the Freezing -Thawing process. *Theriogenology*. 49: 547- 555.
32. Maria L. Juárez M. 2000. Caracterización de una Nueva Subestructura de la Teca Perinuclear del Espermatozoide Maduro no Capacitado del Cobayo. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Pg: 6
33. M. D. Markova, T. T. Marinova & I. T. Vatev. 2001. Asymmetric Vimentin Distribution in Human Spermatozoa. *Folia Biologica (Praha)* 48: 160 – 162.
34. M. Noor, H. D. M. Moore. 1999. Monoclonal antibody that recognizes an epitope of the sperm equatorial region and specifically inhibits sperm – oolemma fusion but not binding. *Journal Reprod Fertil*. 115: 215 – 224.
35. M. P. Bradley, J. Eade, J. Penhale, P. Bird. 1999. Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *Journal of Biotechnology*. 73: 91-101.

36. Olson GE, Noland TD, Winfrey VP, Garbers DL. 1983. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *J Ultrastructures* 85: 204 –218.
37. Peter Sutovsky, Gaurishankar Manandhar, Alex Wu & Richard Oko. 2003. Interactions of Sperm Perinuclear Theca with the Oocyte: Implications for the Oocyte Activation, Anti-Polyspermy Defense, and Assisted Reproduction. *Microscopy Research and Technique*. 61 :362-378
38. Peter Sutovsky, Joao Ramalho-Santos, Ricardo D. Moreno, Richard Oko, Laura Hewitson y Gerald Schatten. On-stage selection of single round spermatids using a vital, mitochondrion-specific fluorescent probe Mito Tracker TM and high resolution differential interference contrast microscopy. 1999. *Human Reproduction* Vol. 14 no.9 pag. 2301-2312
39. Peter Sutovsky, Richard Oko, Laura Hewitson. 1997. The Removal of the Sperm Perinuclear Theca and Its Association with the Bovine Oocyte Surface During Fertilization. *Developmental Biology* 118: 75-84.
40. Phillips DM. 1977. Surface of the Equatorial Segment of the Mammalian Acrosome. *Biol Reprod* 16:128–137.
- 41 P.M. Saling, G. Irons, R. Waibel. 1985. Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with egg plasma membrane using monoclonal antibodies. *Biol Reprod*. 33: 515 – 526.
42. Tovich P. Ronald, Peter Sutovsky & Richard J. Oko. 2004. Novel Aspect of Perinuclear Theca Assembly Revealed by Immunolocalization of Non – Nuclear Somatic Histones during Bovine Spermiogenesis. *Biology of reproduction* 71: 1182 – 1194.
43. Quantification of Reproductive Output in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 282: 1 – 21.
44. Ricardo Benavente & Georg Krhne. 1985. Change of Karyoskeleton During Spermatogenesis of *Xenopus*: Expression Of Lamin LIv, A Nuclear Lamina Protein Specific For The male Germ Line. *Cell Biology*. 82: 6176-6180.
45. R. Oko & D. Maravei. 1994. Protein Composition of the Perinuclear Theca of Bull Spermatozoa. *Biology of reproduction* 50: 1000-1014.

46. R. A. Bronson. 1999. Antisperm antibodies: a critical evaluation and clinical guidelines. *Journal of Reproduction Immunology*. 45: 159 – 183.
47. R. D. Moreno, E. Bustmante, G. Schatten, C. Barros. 2002. Inhibition of mouse in vitro fertilization by an antibody against a unique 18 – amino acid domain in the polysulfate –binding domain of proacrosin/acrosin. *Fertility and Sterility*. Vol. 77 No. 4.
48. R. Fichorova, Chr. Mavrov, I. Mladenov, E. Dimitrova, L. Nakov. 1996. A novel Approach to the generation of antibodies against phylogenetically preserved sperm antigens. *Theriogenology*. 45: 957 – 975.
49. Ricardo Benavente & Georg Krohne. 1985. Change of Caryoskeleton During Spermatogenesis of Xenopus: Expression of Lamin I,IV, A Nuclear Lamina Protein Specific For The male Germ Line. *Cell Biology*. Vol. 82, 6176 – 6180.
50. Ritu B. Auland Richard J. Oko. 2001. The Major Subacrosomal Occupant of Bull Spermatozoa is a Novel Histone H2B VVariant Associated with the Forming Acrosome during Spermiogenesis. *Developmental Biology*. 239, 376 – 387.
51. Roselyne Rousseaux-Prévoist, Christophe Lécuyer, Hervé Drobecq, Christian Sergheraert, Jean-Louis Dacheux & Jean Rousseaux. 2003. Characterization of Boar Sperm Cytoskeletal Cylicin II as an Actin-Binding Protein. *Biochemical and Biophysical Research*. 303: 182 – 189.
52. Sang- Gyun, Kwang -Sik Choi. 2003. Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Used In Quantification of Reproductive Output in the Pacific Oyster, *Cressostrea Gigas* in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 282: 1 – 21.
53. S. Kalaydjiev. 2001. Common sperm antigens of vertebrate animals from the classes Teleostei, Amphibia, Reptilia, Aves and Mammalia. *Comparative Rend Academy of Science of Bulgary*. 54: 75 – 78.
54. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.II., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 150, 76-85.
55. S. Kalaydjiev. 2002. Sperm antigenicity shared in five vertebrate classes. *Theriogenology*. 57: 1073 – 1085.

56. Si & Okuno M. 1999. Role of Tyrosine Phosphorylation of Flagellar Proteins in Hamster Sperm Hyperactivation. *Biology of Reproduction* 61: 240 – 246.
57. V. Susca, A Corriero, C. R. Bridges. 2001. Study Of The Sexual Maturity of Female Bluefin Tuna: Purification and Partial Characterization of Vitellogenin and Its Use In An Enzyme – Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Fish Biology*. 58: 815 – 831.
58. Will W. C. Chiu, M. D., and Lawrence W. Chanley, Ph. D. 2004. Clinical Association and Mechanism of Action of Anti-Sperm Antibodies. *Fertility and sterility* vol: 83. No. 3 529 – 535.