



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

**INTERACCIÓN ENTRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y LA PLC- $\zeta$  EN EL  
ESPERMATOZOIDE DE BOVINO**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

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

PRESENTA:

**ITZAYANA MEJÍA FLORES**

TUTOR PRINCIPAL: MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTORAL: SALVADOR URIBE CARVAJAL INSTITUTO DE  
FISIOLOGÍA CELULAR

MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

JUNIO 2017



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.

## **DECLARACIÓN**

El autor da su consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

---

**MVZ. ITZAYANA MEJÍA FLORES**

## DEDICATORIA

A Dios por sus bendiciones, esta es una más de ellas.

A mis padres: Rocio y Victor, por permitirme elegirlos como guías de vida, por enseñarme del amor y del respeto, pero sobretodo por enseñarme que la gratitud y la humildad son cualidades que se cultivan día a día. Los amo eternamente.

A la estrella de mi vida "Tzoali", que ahora nos ha dado un regalito hermoso llamado Alverick Akbal, gracias por escucharme, por apoyarme y por tus consejos brindados siempre. Te amo hermana.

A mi otra madre, mi Tía Blanca, gracias por su apoyo y sus consejos, sin ellos no sería la mujer que ahora soy. Gracias por estar siempre al pendiente de mí. La amo

" si te quiero es porque sos mi amor, mi cómplice y todo y en la calle codo a codo somos mucho más que dos" (*Mario Benedetti*). Eres parte esencial de este proyecto llamado vida, gracias por permitirme ser parte de tu andar nuevamente, gracias por tu apoyo y cuidados incondicionales, gracias por ser mi amigo, compañero, cómplice, y amante. Gracias por seguir eligiéndome cada día para seguir caminando juntos. Pero sobre todo gracias por ser el mejor maestro de mi vida, al demostrarme que el amor es la ausencia total de miedo.  
Te amo Marco Antonio.

## AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México, simplemente la mejor.

Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado (298283), y a la beca 239487 SNI III del Dr. Salvador Uribe Carvajal. Al proyecto DGAPA-UNAM: PAPIIT IN204015 e IN219717.

A mi tutora la Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, gracias por enseñarme a crecer y madurar, gran parte de lo que soy ahora es por su apoyo.

A mi comité tutorial: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, gracias por sus consejos y apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Salvador Uribe Carvajal, es usted el mejor, gracias por enseñarme de la paciencia y perseverancia, por guiarme cuando necesite de un consejo, por enseñarme a madurar y luchar hasta alcanzar la meta, por enseñarme a no rendirme aunque la tormenta arrecie, por hacer de mí una mejor persona profesional y personalmente. Gracias por todo su apoyo incondicional.

A los miembros de mi jurado: Dr. Miguel Ángel Cornejo Cortes por todo su apoyo durante mi paso por el doctorado, fue usted incondicional, Gracias. Dra. Rosa María Viguera Villaseñor, por sus comentarios muy acertados, por sus consejos personales y profesionales, pero sobre todo por su ayuda con las tomas de microscopía. Y Al Dr. Oscar Gutiérrez Pérez por su apoyo y consejos durante mi paso por el posgrado.

A la Dra. Natalia Chiquete Félix, Técnico Académico Titular A de tiempo completo del laboratorio 305 ote. del Instituto de Fisiología Celular. Te lo he dicho siempre, eres un gran ejemplo a seguir, fuiste el pilar central de este trabajo. Gracias por escucharme, gracias por tu tiempo que vale oro. Te quiero mucho.

A todos los miembros del laboratorio 305 ote. a cargo del Dr. Salvador Uribe Carvajal en el Instituto de Fisiología celular, gracias por adoptarme y hacerme sentir parte de ustedes, por su apoyo e interés durante mi estancia ahí especialmente: al M en C Emilio Espinoza Simón, a la M en C Cristina Uribe Carvajal y a la MCLilia Morales García, por su ayuda y tiempo, por sus enseñanzas, por compartir sus conocimientos conmigo. Pero sobre todo por su sencillez y calidad humana.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Morfología: Sandra Hernández Garduño, Sandra Romero y la Dra. Icela Palma Lara, por su apoyo y ayuda brindados durante el doctorado..

A mi mentor, mi jefe, mi amigo y "Patrón", el M en C Javier Hernández Ignacio por el asesoramiento técnico y apoyo para la obtención de muestras. Pero sobre todo gracias por que este camino de desarrollo profesional te lo debo a tí. Te quiero mucho.

A mi mejor amiga, mi confidente, mi guía y ejemplo, la que me regaña pero con amor: Paola Montelongo Solís. Eres la mejor. Gracias por el tiempo, por las desveladas, por adoptarme, por apoyarme, en fin tu sabes lo agradecida que estoy contigo y toda tu familia hermosa. Te amo

A mis grandes amigos, los mejores: Adolfo, Moni, Rodrigo, Edgar, Luisa. Por estar al pendiente, por ser la familia que elegí, por el apoyo constante, por sus palabras de aliento, por confiar siempre en mí. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas.

El Universo tiene para ti regalos únicos y especiales, que llegan en forma de persona y te dan alas, que te ayudan a llevar tu carga, que te enseñan a amar, que dan todo por verte brillar, yo prefiero llamarlos regalos cósmicos aunque sé que son mis ángeles: gracias Everardo Anta y Lizeth Sosa por dar luz y sentido a mi vida. Los amo inmensamente.

## RESUMEN

**MEJIA FLORES ITZAYANA.** INTERACCIÓN ENTRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y LA PLC-  $\zeta$  EN EL ESPERMATOZOIDE DE BOVINO (Tutora principal Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, COMITÉ TUTORAL Dr. Salvador Uribe Carvajal y Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes).

Los ovocitos de mamíferos son activados durante la fertilización por una isoforma de fosfolipasa C (PLC), la PLC- $\zeta$ , que se expresa de manera específica en la teca perinuclear (TP) del espermatozoide. La PLC- $\zeta$  ha sido identificada en espermatozoides de diferentes especies entre ellas el bovino. Otra proteína de la TP es la actina, la cual ha sido implicada en la capacitación y reacción acrosomal (RA). La ausencia de PLC- $\zeta$  o su mutación resulta en la falta de activación del ovocito; PLC- $\zeta$  hidroliza fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato, generando dos productos: inositol 1,4,5-trifosfato que aumenta el calcio en el citoplasma y diacilglicerol, un activador de la proteína quinasa. Además, PLC- $\zeta$  coordina los movimientos del ovocito poco después de la fusión de gametos. A pesar de estos avances, el proceso exacto por el cual PLC- $\zeta$  se prepara para su papel como activador del ovocito es todavía desconocido. En espermatozoides de hámster y de ratón sometidos a capacitación y RA, PLC- $\zeta$  migra mientras se somete a modificaciones post-traduccionales, mientras que la actina concentra varias proteínas dentro de PT y se implica en el tráfico durante AR. El objetivo de este trabajo fue analizar la localización de la PLC- $\zeta$  y su asociación con actina en la especie bovina, empleando para ello espermatozoides frescos, capacitados y capacitados con RA. Tanto por *western blot* como por inmunofluorescencia la PLC- $\zeta$  se localizó en la TP, tal como se ha reportado, y adicionalmente en el flagelo. La interacción actina/PLC- $\zeta$  fue dos veces más alta con actina globular (G) que para la filamentosa ( $P < 0,001$ ). La PLC- $\zeta$  fue parcialmente liberada al medio durante la capacitación, previa fosforilación en tirosina. Concluimos que la dinámica del citoesqueleto de actina controla la migración de PLC- $\zeta$  durante la capacitación, lo que conduce a su liberación parcial durante la capacitación y la reacción acrosomal. La PLC- $\zeta$  liberada estaría en posición de alcanzar el huevo al comienzo de la fecundación lo que apoya que sea el factor activador del ovocito.

**PALABRAS CLAVES:** PLC- $\zeta$ , ACTINA-F, TECA PERINUCLEAR, CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.

## ABSTRACT

**MEJIA FLORES ITZAYANA.** INTERACTION BETWEEN THE ACTIN CYTOSKELETON AND THE PLC- $\zeta$  IN THE BOVINE SPERMATOZOA (Principal tutor Dr. María de Lourdes Juárez Mosqueda, TUTORAL COMMITTEE Dr. Salvador Uribe Carvajal and Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes).

Mammalian oocytes are activated during fertilization by a phospholipase C (PLC) isoform, the PLC- $\zeta$ , which is specifically expressed in the perinuclear theca (PT) of the spermatozoa. The PLC- $\zeta$  has been identified from spermatozoa of different species including bovine. Another protein of PT is actin, which has been implicated in training and acrosomal reaction (AR). The absence of PLC- $\zeta$  or mutation results in the lack of oocyte activation; PLC- $\zeta$  hydrolyzes phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate, generating two products: inositol 1,4,5-triphosphate that increases calcium in the cytoplasm and diacylglycerol, a protein kinase activator. In addition, PLC- $\zeta$  coordinates oocyte movements shortly after the fusion of gametes. Despite these advances, the exact process by which PLC- $\zeta$  is prepared for its role as an oocyte activator is still unknown. In hamster sperm and mouse undergoing training and RA, PLC- $\zeta$  migration while some post-translational modifications, while actin concentrates several proteins within PT and is involved in trafficking during AR. It was to analyze the location of the PLC- $\zeta$  and its association with actin in the bovine species, using spermatozoa fresh, capacitated and capacitated with AR. Both by Western Blot and by immunofluorescence the PLC- $\zeta$  was located in the PT, as has been reported, and additionally in the flagellum. The actin / PLC-inter interaction was partially released to the medium during training, following tyrosine phosphorylation. We conclude that actin cytoskeletal dynamics controls the migration of PLC- $\zeta$  during training, which leads to its partial release during AR. The PLC-release is in the position of reaching the egg at the beginning of fertilization, which supports that it is the activating factor of the oocyte.

KEY WORDS: PLC- $\zeta$ , ACTINA-F, PERINUCLEAR THECA, SPERM CAPACITATION.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
CONTENIDO.....	VIII
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 GENERALIDADES.....	4
1.1.1 LA CÉLULA ESPERMÁTICA.....	4
1.1.2 PROCESOS FISIOLÓGICOS DEL ESPERMATOZOIDE.....	6
1.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA TECA PERINUCLEAR.....	11
2 HIPOTESIS.....	32
3 OBJETIVO.....	33
4 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	33
5 MATERIAL Y METODOS.....	34
5.1 DESARROLLO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	34
5.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
5.2.1 OBTENCIÓN DEL SEMEN.....	35
5.2.2 EVALUANCÓN DE LAS CÉLULAS:.....	36
5.3 CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL in vitro DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO.....	37
5.3.1 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA.....	38
5.3.2 PRUEBA DE CTC-HOECHST 33258.....	40
5.4 IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C- $\zeta$ EN ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOCITOQUÍMICA.....	43
5.5 INMUNOCITOQUÍMICA.....	44

5.6	IDENTIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA FOSFOLIPASA C- $\zeta$ Y ACTINA EN EXTRACTOS DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT.....	44
5.7	INMUNOPRECIPITACIÓN .....	45
5.8	ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOTTING.....	46
5.9	IDENTIFICACIÓN DE LA AFINIDAD DE LA PLC- $\zeta$ POR ACTINA-F Ó ACTINA-G MEDIANTE FAR WESTERN. ....	47
5.10	IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C- $\zeta$ EN SOBRENADANTES DEL MEDIO DE INCUBACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA POR AFINIDAD Y WESTERN BLOT.....	48
5.11	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
5.12	DENSITOMETRIA .....	50
6	RESULTADOS .....	51
6.1	IDENTIFICACIÓN DE PLC- $\zeta$ Y ACTINA EN ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHSTOQUIMICA. ....	51
6.2	IDENTIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA PLC- $\zeta$ Y ACTINA EN EXTRACTOS DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT. ....	57
6.3	IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PLC- $\zeta$ EN EXTRACTOS DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT. ....	59
6.4	AFINIDAD DE LA PLC- $\zeta$ POR ACTINA-F O ACTINA-G.....	60
6.5	IDENTIFICACIÓN DE LA AFINIDAD DE LA PLC- $\zeta$ POR ACTINA-F O ACTINA-G MEDIANTE FAR WESTERN. ....	63
6.6	IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C- $\zeta$ EN SOBRENADANTES DEL MEDIO DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA POR AFINIDAD Y WESTERN BLOT. ....	66
7	DISCUSION.....	68

8	CONCLUSIONES .....	75
9	PERSPECTIVAS .....	76
10	LITERATURA CITADA .....	77

## LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Intervalos de tiempo requeridos para que se produzca la capacitación <i>in vitro</i> en algunas especies de mamíferos. ....	9
Cuadro 2. Principales proteínas identificadas en la teca perinuclear en el espermatozoide de bovino. ....	16
Cuadro 3. Composición del medio de Capacitación espermática. ....	39
Cuadro 4. Valoración del estado fisiológico de los espermatozoides incubados en el medio de capacitación y reacción acrosomal. ....	42
Cuadro 5. Localización de PLC- $\zeta$ en los espermatozoides de bovino no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal, evaluado por inmunocitoquímica. ....	55
Cuadro 6. Localización de actina en los espermatozoides de bovino no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal, evaluado por inmunocitoquímica ....	58

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Partes principales del espermatozoide. ....	5
Fig. 2 Esquema de la estructura del espermatozoide. ....	6
Fig. 3 Esquema que ilustra las dos regiones de la teca perinuclear. ....	13
Fig. 4 Un modelo que describe la cascada bioquímica en la capacitación espermática. ....	22
Fig. 5 Un modelo que describe la cascada bioquímica que conduce a la reacción acrosómica. ....	23
Fig. 6 Diagrama que muestra la estructura de la red de capacitación de espermatozoides de verraco y la localización subcelular de los nodos. ....	25
Fig. 7 Representación esquemática de la distribución de los dominios de PLC $\zeta$ . ....	27
Fig. 8 Esquema que ilustra las características de los dominios de las isoformas $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ , $\zeta$ , y $\eta$ . ....	29
Fig. 9 Activación de los ovocitos por un factor específico del espermatozoide, la fosfolipasa C $\zeta$ (PLC- $\zeta$ ). ....	31
Fig. 10 Espermatozoides mostrando los diferentes patrones que se observan en los espermatozoides, dependiendo del estado fisiológico que presentan, al ser evaluados con la prueba de CTC. ....	43

Fig. 11	Espermatozoides mostrando el patrón de tinción con la prueba CTC-HOESCHT 33258. ....	43
Fig. 12	Espermatozoides mostrando el patrón de tinción para observar el acrosoma, dependiendo del estado fisiológico con la prueba hiposmótica con azul de Commassie. ....	44
Fig. 13	Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides no capacitados de bovino incubados con el anticuerpo anti PLC- $\zeta$ y con faloidina rodaminada. ....	53
Fig. 14	Detección de la PLC- $\zeta$ ,por inmunocitoquímica, en espermatozoides de bovinos 60x. ....	54
Fig. 15	Localización de la PLC- $\zeta$ en testículo de bovino, mediante la técnica de inmunohistoquímica. ....	55
Fig. 16	Inmunocitoquímica de actina en espermatozoides de bovinos 60x. ....	57
Fig. 17	Inmunoprecipitación de la PLC- $\zeta$ revelado con actina de los extractos obtenidos de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide. ....	59
Fig. 18	Inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-fosfotirosina (pTir) revelado con PLC- $\zeta$ de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide. ....	60
Fig. 19	Densitometría de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-pTir revelado con PLC- $\zeta$ de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide. ....	61
Fig. 20	Grafica que muestra el porcentaje de concentración	

	relativa de Actina-F. ....	62
Fig. 21	Grafica que muestra el porcentaje de concentración relativa de Actina-F durante la capacitación espermática. ....	63
Fig. 22	Inmunoprecipitación de la PLC- $\zeta$ revelado con actina de los extractos obtenidos a partir de espermatozoides capacitados con o sin tratamiento con Citocalasina-D. ....	64
Fig. 23	<i>Far Western</i> de la PLC- $\zeta$ revelado con actina. ....	66
Fig. 24	<i>Western Blot</i> identificando la PLC- $\zeta$ en los sobrenadantes después del procedimiento de aislamiento por cromatografía de afinidad. ....	68

# 1 INTRODUCCION

En los mamíferos durante el proceso de fertilización, la entrada del espermatozoide al ovulo, ahora huevo o cigoto, provoca la activación del mismo, lo que implica el reinicio y termino de la meiosis, con la consiguiente liberación del segundo cuerpo polar y su progresión en la interfase (Ito y col., 2011); por lo que se ha postulado que un producto del espermatozoide conocido como “factor espermático” (SF) es liberado en el huevo.

La hipótesis del SF propone que, en la fusión espermatozoide-óvulo, un factor soluble suministrado desde el citosol del espermatozoide al ovoplasma es capaz de activar la vía de señalización inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y la producción de las oscilaciones posteriores de  $Ca^{2+}$  observada en los huevos fertilizados de mamíferos (Stricker 1999; Swann 1990). La evidencia experimental para esta hipótesis surge de la demostración de que la inyección de extractos citosólicos del espermatozoide en huevos de mamífero es capaz de desencadenar oscilaciones de  $Ca^{2+}$ , indistinguibles de las observadas durante la fertilización in vitro (FIV) (Stricker 1997; Swan 1990).

La PLC- $\zeta$  (fosfolipasa C- $\zeta$  por sus siglas en inglés) es señalada como el factor espermático activador del óvulo (Saunders y col., 2002 y 2007; Swann y col., 2004; Yoneda y col. 2006); la cual se expresa de manera testículo-espermatozoide dependiente y ha sido identificada en esta última célula en especies como ratón, mono, humano, cerdo, gallo y bovino (Young y col., 2009). De hecho, en el humano se ha encontrado que la ausencia de PLC- $\zeta$  o su mutación, elimina la activación del óvulo (Yoon y col., 2008; Nomikos y col., 2011), mientras que anomalías en su localización llevan a una menor activación de este último (Heytens y col., 2010).

En el caso del bovino, la localización de la PLC- $\zeta$  se presenta en la región ecuatorial de la teca perinuclear (TP) del espermatozoide (Nomikos y col., 2005). La TP es la principal estructura citoesquelética de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos, la cual se encuentra intercalada entre la membrana plasmática

y el núcleo; morfológicamente se le ha dividido en dos partes: la región subacrosomal y la hoja postacrosomal (Bedford y Calvin, 1974). Esta estructura, entre otras funciones, ofrece protección al núcleo, por lo que necesita ser removida para que este pueda descondensarse (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999; Sutovsky y Schatten 2000), y es considerada un reservorio de distintas proteínas con la capacidad de funcionar como activadoras en diversos procesos de señalización (Kitamura y *col.*, 2004; Oko y Sutovsky 2009; Sutovsky y *col.*, 2003).

La PLC- $\zeta$  es la PLC más pequeña hasta ahora identificada, con un peso molecular de 70-75 kDa; se compone de 4 dominios EF (EF-hand dominio de unión a calcio) en el extremo amino terminal, un dominio central catalítico XY y un dominio C2 en el extremo carboxilo terminal. Estructural o evolutivamente, la PLC- $\zeta$  ha sido relacionada con la PLC- $\delta$  teniendo un 38% de identidad y un 49% de similitud en 647 residuos de aminoácidos, sin embargo la mayor diferencia de la PLC- $\zeta$  con esta proteína y otras PLC's es la ausencia del dominio de homología a plectrina (PH). Entre las funciones de dicho dominio se encuentran la de unir a las PLC's a su sustrato en la membrana plasmática y con proteínas del citoesqueleto; debido a la ausencia de este dominio PH, aún no está claro cómo la PLC- $\zeta$  es capaz de dirigirse a su sustrato PIP<sub>2</sub> (Fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato) (Miyazaki e Ito 2006; Swann y *col.*, 2006).

Por otra parte, se ha reportado que en el espermatozoide de hámster y ratón existen cambios en el patrón de distribución de la PLC- $\zeta$  tanto en los espermatozoides capacitados, como en los que llevan a cabo la reacción acrosomal (RA), dichos cambios han sido atribuidos a posibles modificaciones pos-traduccionales de la PLC- $\zeta$  que permiten de alguna forma la reubicación de la proteína en la región post-acrosomal de la cabeza del espermatozoide; sitio donde se da la unión del espermatozoide con la membrana del óvulo (Young y *col.*, 2009).

La actina, otra proteína de la TP, además de haber sido implicada en la reubicación de varias proteínas durante el proceso de maduración del espermatozoide (Howes y *col.*, 2001), también sido involucrada en la capacitación

y la reacción acrosomal (RA) (Breitbart y *col.*, 2005; Brener y *col.*, 2003; Devoráková y *col.*, 2001), eventos en donde se reportan cambios en la dinámica de esta proteína junto con la fosforilación de otras proteínas en tirosina (Breitbart y *col.*, 2005; Jagan-Mohanarao y Atreja 2011; Kierszenbaum y *col.*, 2007). En otro tipo de células el citoesqueleto de actina ha sido implicado en el mecanismo de transducción de señal de varias isoformas de PLC (Banno y *col.*, 1996); por ejemplo, usando como modelo precursores de macrófagos, fue demostrado que la actina-F media la redistribución de la PLC- $\gamma$ 2, previa fosforilación de esta última por una cinasa Src (Dearden-Badet y Mouchiroud, 2005). A este respecto, dos proteínas de la familia Src han sido reportadas en la TP (Pittoggi y *col.*, 2001). También se ha señalado que la interacción de las proteínas que unen actina con el PIP<sub>2</sub> (el sustrato de PLC) pueden regular la organización del citoesqueleto de actina (Hilpelä y *col.*, 2004; Yin y Janmey 2003) o la accesibilidad de fosfolípidos a la PLC (Witke 2004). Interesantemente se ha observado que la PLC- $\zeta$  puede unirse a lípidos o proteínas de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Nomikos y *col.*, 2005). Adicionalmente, estudios en hepatocitos han mostrado una interacción física entre la actina-F y los dominios SH2 de la PLC- $\gamma$ 2, de igual forma en macrófagos y fibroblastos existe una estrecha colocalización entre la PLC- $\gamma$ 2 y la actina-F (Dearden-Badet y Mouchiroud, 2005).

Por lo anterior, no descartamos que éste pudiera ser un mecanismo general por el cual los efectos sobre la reorganización del citoesqueleto de actina modifiquen o regulen la actividad de la PLC- $\zeta$ .

## **ANTECEDENTES**

Para tener una visión general sobre la participación de la teca perinuclear espermática en el proceso de regulación del factor activador del ovocito y como este proceso puede verse alterado por los eventos de capacitación y reacción acrosomal, a continuación se describen brevemente diferentes conceptos.

## 1.1 GENERALIDADES

### 1.1.1 LA CÉLULA ESPERMÁTICA

#### 1.1.1.1 MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA ESPERMÁTICA

El espermatozoide (del griego esperma-semilla, y zoon-animal) es una célula haploide que constituye el gameto masculino y cuya función es la formación de un cigoto totipotente, resultado de la fusión de su núcleo con el del gameto femenino, fenómeno que dará lugar posteriormente al embrión.

La célula espermática tiene 3 regiones altamente diferenciadas y especializadas: cabeza, pieza de conexión o cuello y cola o flagelo (Pesch y Bergmann, 2006).

**Cabeza**, en ella encontramos las siguientes estructuras: un núcleo altamente condensado, la teca perinuclear que lo rodea y el acrosoma, todas ellas envueltas por la membrana plasmática (Figura 1).

Además, estructuralmente la cabeza, se puede subdividir en 4 segmentos: apical, pre-ecuatorial, ecuatorial y post-ecuatorial (Figura 2).

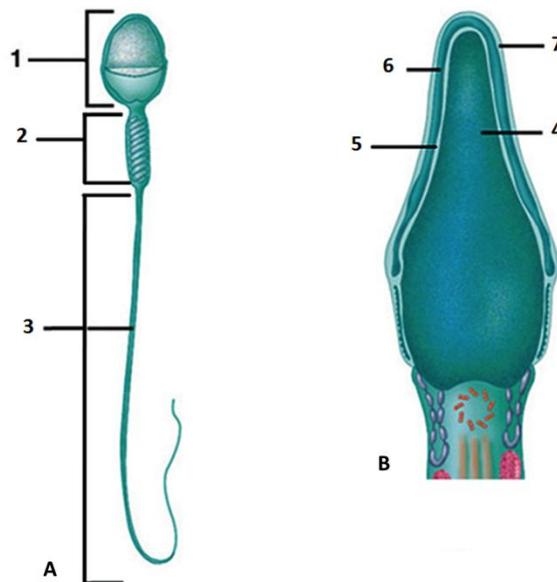
**Pieza de conexión o cuello.** El cuello es un segmento de unión corto (1  $\mu\text{m}$ ) entre el flagelo y la cabeza espermática, compuesto de columnas segmentadas y una estructura densa y fibrosa denominada *capitulum*. Seguido del *capitulum* se encuentran los centriolos proximal y distal. Este último está ausente en el espermatozoide maduro. El cuello sirve como conector y pieza articular (Pesch y Bergmann, 2006).

**El flagelo o cola** se subdivide en tres regiones: la pieza media, intermedia o mitocondrial (que se extiende desde la parte distal de la pieza de conexión hasta el *annulus* o anillo de Jensen), la pieza principal que es el segmento más largo de la cola y la pieza terminal (Longo y col., 1987).

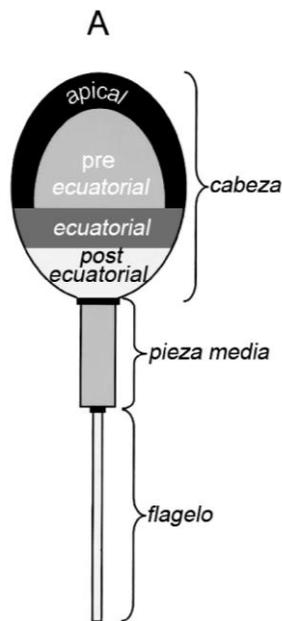
Al igual que la cabeza, el flagelo se encuentra recubierto por la membrana plasmática.

En los mamíferos, la membrana plasmática (MP) del espermatozoide tiene una gran variedad de especializaciones y cada una de ellas tiene un papel único en la cascada de eventos que se presentan en la célula, cuyo objetivo final es permitir la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con el ovocito.

Una característica importante en el espermatozoide es la subdivisión de la membrana plasmática en regiones que difieren en composición y función denominadas “dominios”, estos dominios reflejan las funciones especializadas de la superficie y de los componentes citoplasmáticos del espermatozoide (Holt 1984; Koehler 1978); por lo que la membrana experimenta cambios en la organización y composición de sus componentes durante la vida del espermatozoide (Bearer y Friend 1981; Toshimori 1998).



**Figura 1. A)** Partes principales del espermatozoide: 1) Cabeza, 2) Pieza de conexión o cuello, 3) Cola o flagelo. **B)** Corte transversal de la cabeza espermática: 4) Núcleo, 5) Teca perinuclear, 6) Acrosoma y 7) Membrana plasmática. (Tomado de <http://www.oocities.org/ar/biolembrio>)



**Figura 2.** Esquema de la estructura del espermatozoide. Donde la cabeza es dividida en 4 segmentos. Imagen tomada de Flesch y Gadella, 2000.

## 1.1.2 PROCESOS FISIOLÓGICOS DEL ESPERMATOZOIDE

### 1.1.2.1 MADURACIÓN EPIDIDIMAL ESPERMÁTICA.

En un principio los espermatozoides recién liberados del testículo son inmóviles e incapaces de unirse a la cubierta extracelular del ovocito (zona pelúcida), de hecho los espermatozoides liberados de los túbulos seminíferos son infértiles, pero una vez en el epidídimo, presentan una serie de modificaciones físicas y químicas que le confieren determinadas características conocidas como “maduración espermática”.

Durante el tránsito por el epidídimo, entre otras cosas, varias estructuras espermáticas aumentarán su resistencia o sufrirán una serie de modificaciones que más adelante le permitirán a la célula lograr adecuadamente la capacitación espermática e interactuar con el ovocito (Bellve y O’Brien 1983; Juárez-Mosqueda y Mujica 1999; Sutovsky 2003).

#### 1.1.2.1.1 Modificaciones físicas del espermatozoide durante la maduración

Uno de los cambios físicos que adquiere el espermatozoide es el desarrollo de la capacidad de movimiento progresivo, ya que al abandonar el testículo los espermatozoides presentan una movilidad nula o muy débil, debido en gran medida a la falta de maduración de su MP (Yanagimachi, 1994a). Se ha observado que los espermatozoides pasan de ser inmóviles a experimentar un movimiento circular no progresivo, hasta llegar a ser lineal y progresivo en regiones más distales del mismo (Blandau y Rumery 1964; Hinton *y col.*, 1979).

Una vez que los espermatozoides se separan de las células de Sertoli, presentan una cantidad de citoplasma residual de las espermatidas, denominada gota citoplasmática (Chenoweth, 1997). Durante la maduración epididimaria la gota citoplasmática va a migrar desde la pieza de conexión al anillo de Jensen (Bedford, 1975). La presencia de una elevada proporción de espermatozoides con gotas citoplasmáticas en el eyaculado se asocia comúnmente con alteraciones en la maduración epididimaria y con una capacidad fecundante reducida (Gómez *y col.*, 1996; Keating *y col.*, 1997).

#### 1.1.2.1.2 Modificaciones químicas del espermatozoide durante la maduración

Entre las modificaciones que puede experimentar el espermatozoide durante su maduración se encuentran: cambios en la composición de los fosfolípidos de membrana y en la cantidad de colesterol en proporción a los fosfolípidos, incremento de las uniones disulfuro, incremento de la carga neta negativa de la superficie, re-localización de antígenos de superficie y modificación, eliminación y adición de proteínas de superficie (Cooper 1998; Cuasnicú *y col.*, 1984).

Sin embargo, cuando el espermatozoide maduro es eyaculado es incapaz de unirse de manera específica a la zona pelúcida e interactuar con un óvulo, previamente necesita ser expuesto a una secuencia de eventos conocidos como capacitación (Harrison y Gadella, 2005).

#### 1.1.2.2 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.

El espermatozoide adquiere su capacidad fecundante después de permanecer en el tracto genital femenino por un período de tiempo más o menos largo (Austin 1951; Chang 1951). Este intervalo entre la deposición de los espermatozoides en el tracto genital de la hembra y la fecundación se denominó "capacitación" (Austin, 1952). Hoy en día, la capacitación se define como una serie de modificaciones funcionales y moleculares que tienen lugar en el espermatozoide que le confieren la capacidad de fecundar al ovocito. En dichas modificaciones el espermatozoide sufre un aumento en el calcio libre intracelular, cambios en la fluidez de la membrana plasmática, en su metabolismo energético y en la motilidad del gameto, producto todo ello de la remoción de glicoproteínas, que fueron integradas en la membrana plasmática del espermatozoide durante su paso por el epidídimo y que fueron absorbidas de la superficie del espermatozoide. En condiciones *in vivo* tanto el tracto reproductivo del macho como de la hembra influyen en dichas modificaciones. No obstante, la capacitación, bajo determinadas condiciones también puede ser reproducida *in vitro* en un gran número de especies, variando el grado de éxito entre ellas. Por otro lado, la capacitación espermática requiere un periodo de tiempo el cual puede oscilar entre 1 a 7 horas dependiendo de la especie (Breitbart 2003; Tienthai y col., 2004; Yaganimachi,, 1994) (Cuadro 1).

La capacitación *in vitro* ha sido llevada a cabo, con espermatozoides tanto epididimarios (cola del epidídimo) como de eyaculado, mediante incubación de los espermatozoides en medios definidos y bajo unas determinadas condiciones de

temperatura, humedad y CO<sub>2</sub> que mimetizan el ambiente oviductal (Bravo y col., 2005; Flesch y col., 1999; Matás y col., 2010; Tardif y col., 2003). Estos medios llevan en su composición sustratos energéticos como el ácido pirúvico, lactato y glucosa (dependiendo de la especie), una fuente proteica la cual es usualmente la albúmina, HCO<sup>3-</sup> y el Ca<sup>2+</sup> (Visconti y Kopf, 1998). El éxito de la fertilización *in vitro* depende de que el espermatozoide sea capacitado adecuadamente *in vitro*, lo cual comprende un proceso en el que gradualmente se va modificando la arquitectura de la MP, mediante la remoción de colesterol y la sensibilización del espermatozoide a señales específicas, que son mediadas por los glucosaminoglicanos, glicoproteínas, pH y calcio. Dichos cambios preceden a modificaciones en el transporte de calcio, el movimiento hiperactivado y a la reacción acrosomal (Breitbart y col., 2005; Fraser y col., 1995).

**Cuadro 1.** Intervalos de tiempo requeridos para que se produzca la capacitación *in vitro* en algunas especies de mamíferos.

Nombre común	Tiempo requerido para la capacitación (horas)
Ratón (Austin, 1952), Gato (Hamner y col., 1970) Carnero (Davis, 1981)	1-2
Toro (Parrish y col., 1988) Hámster dorado (Austin y Bishop, 1958a) Rata (Bedford, 1970)	2-4
Conejo (Austin, 1952) Cerdo (Hunter y Hall 1974a; b) Caballo (Odeh y col., 2003)	5-6
Hombre (Davis, 1981)	6-7

### 1.1.2.3 REACCIÓN ACROSOMAL

La reacción acrosomal (RA) es un proceso de exocitosis regulada, en la que el acrosoma libera sus enzimas proteolíticas para que el espermatozoide logre atravesar las vestimentas del ovocito, además provoca modificaciones a nivel del segmento ecuatorial y postacrosomal necesarias para la fusión con la membrana del ovocito, de hecho uno de estos cambios se traduce en la pérdida de una subestructura de la TP que se formó durante la maduración epididimal (Juárez-Mosqueda y Mujica 1999).

### 1.1.2.4 FERTILIZACIÓN

La interacción del espermatozoide con el óvulo inicia una serie de transformaciones que involucran a los componentes citoplasmáticos y nucleares de ambos gametos, este fenómeno múltiple se conoce como fertilización y comienza con la interacción de los gametos que posteriormente se fusionan y termina con la asociación de los cromosomas correspondientes derivados de los dos pronúcleos en la etapa conocida como singamia (Flesch y *col.*, 2000).

En el caso del espermatozoide los eventos secuenciales que se llevan a cabo, una vez que se ha producido la RA, después de la fusión de membranas y la incorporación del gameto masculino al citoplasma del ovocito son: ruptura de la envoltura nuclear, la desestructuración de la TP, la descondensación de la cromatina espermática y por último la formación del pronúcleo masculino (Sutovsky y *col.*, 2003). Inmediatamente después de la incorporación del espermatozoide al ovocito, las membranas interna y externa de la envoltura nuclear se fusionan en múltiples sitios alrededor del núcleo espermático condensado para formar vesículas que se distribuyen en el citoplasma circundante y rápidamente se confunden con otros elementos membranosos, entonces se

puede decir que la envoltura nuclear desaparece (Bedford, 2006; Marushige y Marushige 1978a,b) y como resultado de su rompimiento la cromatina espermática queda rodeada solamente por la teca perinuclear (Sutovsky y Schatten 2000).

De manera casi paralela, la región postacrosomal de la TP se desestructura y su material comienza a mezclarse con el citoplasma del ovocito antes de que la descondensación del núcleo espermático se haga aparente (Sutovsky y *col.*, 2003). Esta desestructuración de la TP debe acontecer como un requisito para un adecuado proceso de descondensación y formación del pronúcleo y este fenómeno también se presenta al igual que la desestructuración de la envoltura nuclear a partir de la porción apical de la región postacrosomal espermática (Sutovsky y Schatten 2000).

Por otra parte estudios con ICSI (inyección espermática intracitoplásmica) han mostrado que si persisten el acrosoma y la teca perinuclear dentro del ovocito fertilizado, la descondensación del DNA espermático de la región postacrosomal se lleva a cabo de manera irregular (Ramalho-Santos, 2004). Por lo tanto, todo parece indicar que la teca perinuclear debe prepararse para permitir la liberación del factor involucrado en la activación del ovocito y el acceso de los factores citoplasmáticos del ovocito al DNA espermático (Katayama y *col.*, 2005; Takeuchi y *col.*, 2004). Posiblemente los procesos de capacitación y RA son necesarios para que el espermatozoide fertilizante presente la relativa fácil solubilidad de la hoja post-acrosomal dentro del citoplasma del óvulo (Yanagimachi, 1994) y que ha llevado a proponer a esta región como la más probable para contener las proteínas que regulan la activación del óvulo y la descondensación del núcleo espermático (Sutovsky y *col.*, 2003; Sutovsky y Schatten 2000).

### 1.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA TECA PERINUCLEAR.

La teca perinuclear (TP) es la principal estructura citoesquelética de la cabeza del espermatozoide de los mamíferos, que también ha sido llamada

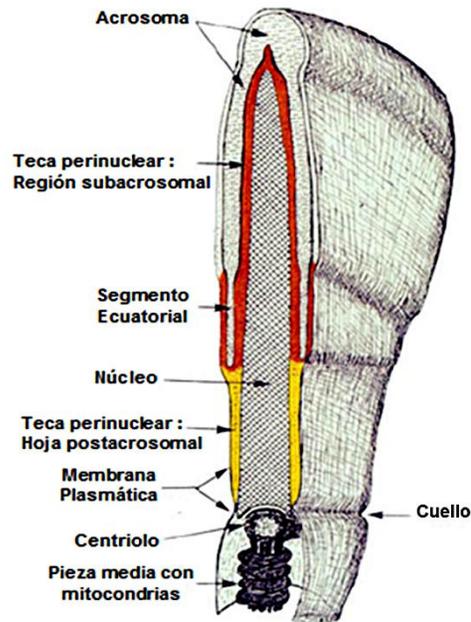
sustancia perinuclear (Bedford y Calvin, 1974); esta es una cubierta citoesquelética no tradicional en la que muchos de sus componentes proteicos no son compartidos con los del citoesqueleto de otros tipos celulares (Okó y Maravei, 1994).

La teca perinuclear es ensamblada durante la espermiogénesis, estableciéndose entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear de manera continua; morfológicamente ha sido dividida en dos regiones, la primera recibe el nombre de hoja o lamina subacrosomal (Figura 3), que se intercala entre la membrana acrosomal interna y la envoltura nuclear y llena este espacio entre acrosoma y núcleo. La segunda región se conoce como hoja o lámina postacrosomal (Figura 3) la cual se extiende desde la región ecuatorial de la cabeza espermática y se acomoda entre la membrana plasmática y la envoltura nuclear, las dos regiones no tienen su morfogénesis en la misma etapa de la espermiogénesis y difieren en composición proteica (Mújica y *col.*, 2003; Sutovsky y *col.*, 2003).

Esta estructura entre otras funciones ofrece protección al núcleo, por lo que necesita ser removida para que este pueda descondensarse (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999; Sutovsky y Schatten 2000), y es considerada un reservorio de distintas proteínas con la capacidad de funcionar como activadoras en diversos procesos de señalización (Kitamura y *col.*, 2004; Okó y Sutovsky, 2009; Sutovsky y *col.*, 2003).

Durante la maduración epididimal, la TP sufre cambios morfológicos que le proporcionan al espermatozoide la capacidad de fertilizar. Estos cambios ocurren en la hoja postacrosomal, como se ha comprobado en el cobayo (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999); primero durante su paso por el epidídimo se forma una subestructura (sTP) por debajo de la región ecuatorial y forma parte de la porción apical de la región postacrosomal, esta subestructura también ha sido reportada en espermatozoides de conejo (Koehler y *col.*, 1970), carnero (Watson y *col.*, 1995), cerdo (Juárez-Mosqueda, 1999) y bovino (Olson y *col.*, 1983; Martínez y *col.*, 2006). Se ha reportado que la sTP se mantiene en espermatozoides

capacitados, pero no en los que sufren reacción acrosomal (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999).



**Figura 3.** Esquema que ilustra las dos regiones de la teca perinuclear; en rojo la región subacrosomal y en amarillo la hoja postacrosomal. Tomado de Oko y Maravei, 1994.

La sTP ha sido empleada como marcador morfológico de la TP (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999). Se ha reportado que en el espermatozoide bovino la sTP sufre alteraciones causadas por el proceso de congelación-descongelación, los cuales van desde alteraciones en su arquitectura, hasta la pérdida total de la misma. De igual modo se ha encontrado que existe una correlación negativa entre el número de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides con sTP ausente (Martínez y *col.*, 2006).

### 1.1.3.1 COMPOSICIÓN PROTEICA DE LA TECA PERINUCLEAR DEL ESPERMATOZOIDE.

La TP del espermatozoide de los mamíferos está compuesta por varias proteínas que se caracterizan por su resistencia a la extracción con detergentes neutros o soluciones amortiguadoras altas en sal, algunas de las cuales son comparables con el citoesqueleto de las células somáticas (Mújica y *col.*, 2003) (Cuadro 2).

Entre las proteínas que se han detectado en la TP podemos mencionar a las siguientes:

**Actina** de 43 kDa, se localiza en la región postacrosomal de la TP del bovino y del conejo; en el caso del espermatozoide de bovino se encuentra en las dos terceras partes de esta región (Flaherty y *col.*, 1986).

**Calicina** de 60 kDa, se localiza exclusivamente en la región postacrosomal de la TP del bovino y tiene gran afinidad por actina (Longo y *col.*, 1987).

**Calmodulina** de 17 kDa, ha sido identificada en la región postacrosomal de la TP de los espermatozoides de carnero, conejo, hámster, rata, ratón, mono, humanos y cobayos (Kanh y *col.*, 1991).

**CP $\beta$ 3** (por sus siglas en inglés, proteínas capeadoras) de 31 kDa y **CP $\alpha$ 3** de 33.74 kDa, se ubica en la región postacrosomal o cáliz de la TP del espermatozoide del bovino y del humano (Von Bülow y *col.*, 1997).

**Cilicina I y II** de 74 y 53 kDa respectivamente, fueron localizadas en la región postacrosomal del espermatozoide del bovino y del humano (Hess y *col.*, 1993; 1995).

**MBP** (por sus siglas en inglés, polipéptidos de bandas múltiples) de 56 y 74 kDa, se han identificado distribuidas en toda la TP en espermatozoides de ratón y toro (Longo y *col.*, 1987). Oko y Maravei (1994, 1995); en donde se identificaron alrededor de 20 polipéptidos en la TP del espermatozoide bovino, de los cuales 6 fueron los más prominentes con un peso molecular de 60, 36, 32, 28, 25, 15.5 kDa, encontrándose distribuidos en toda la TP, aunque no de manera uniforme, siendo el polipéptido de 15.5 exclusivo de la región subacrosomal (Mújica y *col.*, 2003).

**PERF 15**, una proteína de 15 kDa, se ubica en la región subacrosomal o *perforatorium* de la TP y es el componente más abundante de la TP de la rata y el ratón (Mújica y col., 2003; Oko y Morales 1994). Oko (1995), logró la clonación y secuenciación en su totalidad del polipéptido mayor de la TP, de 15 kDa, el cual contiene 32 residuos de aminoácidos, y se le dio el término de PERF 15, debido a su localización en el *perforatorium* (región subacrosomal) del espermatozoide de ratón.

**Arp T1 y Arp T2.** Estudios realizados por Heid y colaboradores (2002), identificaron al componente proteico perteneciente a la familia de proteínas relacionadas con actina (Arp), Arp-T1 y Arp-T2 de 40 kDa, nombradas como T por la ubicación testicular en las espermátides del bovino, es decir, solo se encontraron en espermatozoides inmaduros; se localizaron en el cáliz de espermátides del ser humano y del bovino (Heid y col., 2002).

**Distrobrevinas** de 66 kDa se detectó en la región subacrosomal de la TP del cobayo; las distrobrevinas pertenecen a la familia de las distrofinas, las cuales se encuentran en varios tipos celulares como proteínas citoesqueléticas asociadas a la membrana. Hernández-González y col., 2001 determinaron dos proteínas asociadas a la distrofina,  $\beta$ -distroglican y  $\alpha$ -sintrofina, y nNOS una proteína asociada frecuentemente con  $\alpha$ -sintrofina. En los espermatozoides que carecen de membrana plasmática y acrosoma, reportán haber encontrado una proteína tipo Dp71f en la teca perinuclear postacrosómica y también en la parte media del flagelo. En el flagelo, Dp71f se localiza junto con  $\alpha$  sintrofina y nNOS. Dp71d estaba presente en la membrana plasmática de la pieza intermedia con  $\beta$ -distroglican,  $\alpha$ -sintrofina y nNOS. Dp71d se encontraba presente en la membrana plasmática de la región post acrosomal, pero sólo con nNOS. Finalmente, la distrobrevina fue localizada a lo largo de las estructuras del flagelo esquelético y en el hemisferio subacrosomal de la teca perinuclear. Reportan que esta distribución distinta y complementaria en diversos dominios de los espermatozoides puede revelar una función específica para cada producto familiar

corto de la distrofina, en la estabilización de los dominios en los que se encuentran.

### 1.1.3.2 LA ACTINA EN LA TECA PERINUCLEAR

La actina es la proteína más abundante del citoesqueleto en las células eucariotas y juega un papel fundamental en muchos y diversos procesos celulares dinámicos (Ocampo y *col.*, 2005).

La actina-F se ha identificado en la región postacrosomal de la teca del espermatozoide del toro y del conejo (Flaherty y *col.*, 1986), cobayo (Juárez y Mújica 1999; Ocampo y *col.*, 2005) y del cerdo (Mújica y *col.*, 2003).

**Cuadro 2.** Principales proteínas identificadas en la teca perinuclear en el espermatozoide de bovino. (Mújica y *col.*, 2003).

PROTEÍNA	Región de Localización	Peso Molecular kDa	Referencias
Técinas	Subacrosomal y Postacrosomal	50 y 48	Bellvé, y <i>col.</i> , 1990
Proteína soluble en álcalis (PERF 15)	Subacrosomal	15.5	Oko y Maravei, 1994
ACTINA	Postacrosomal	43	Flaherty, y <i>col.</i> , 1986, 1988
Calicina	Postacrosomal	60	Longo y <i>col.</i> , 1987
CP $\alpha$ 3	Postacrosomal	31	Von Bülow y <i>col.</i> , 1997

CP $\beta$ 3	Postacrosomal	33.74	Von Bülow y <i>col.</i> , 1997
Cilicina I y II	Postacrosomal	74 y 53	Hess y <i>col.</i> , 1993, 1995

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

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

Durante el proceso de maduración epididimal, la actina parece desempeñar un papel importante durante el proceso de formación y estabilización de la sTP en el espermatozoide de cobayo, cerdo y bovino, tal como lo valoraron Juárez y Mújica (1999) en el espermatozoide de cobayo, utilizando faloidina y citocalisina D. No obstante, hasta la fecha, no se sabe que otro papel pueda desempeñar actina durante éste proceso en espermatozoides bovinos.

Sin embargo, se ha reportado que existe un decremento gradual en la concentración relativa de actina-F, conforme los espermatozoides del cobayo experimentan los procesos de maduración, capacitación y RA (Azamar y *col.*, 2007).

Los procesos de maduración, capacitación y RA están acompañados por cambios en la distribución de moléculas en la membrana plasmática, pero los mecanismos involucrados en el confinamiento de proteínas en regiones específicas de la superficie espermática durante la maduración espermática y en

la presentación de receptores involucrados en el reconocimiento espermatozoide-huevo en las regiones apropiadas de la cabeza del espermatozoide son pobremente entendidas. El control de la polimerización y despolimerización de actina ha sido ampliamente estudiado en células somáticas, sin embargo la presencia y el rol de las proteínas de unión a actina (ABP) en el espermatozoide no ha sido bien caracterizado. Se han realizado pocos estudios de las proteínas que regulan la polimerización de actina en el espermatozoide de mamíferos, a pesar de que algunas formas nuevas de ABP han sido identificadas en espermatozoides maduros, estas incluyen  $\beta$ -actina y tropomiosina en bovino (Yagi y Paranko, 1992), miosina en bovino (Tamblyn, 1981) y humano (Clarke y Yanagamachi, 1978), y  $\beta$ -espectrina en humano (Virtanen y *col.*, 1984) y conejo (Camatini y *col.*, 1991), todas ellas han sido involucradas en la estructura y estabilización del citoesqueleto. De igual manera se ha encontrado gelsolina, un factor despolimerizante de actina, en espermatozoide de carnero (de las Heras y *col.*, 1997) y sinderina, una proteína de corte de filamentos de actina dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , ha sido bien identificada en el espermatozoide bovino (Pelletier y *col.*, 1999). Howes (2001) encontró en espermatozoides maduros de toro al menos tres tipos de proteínas que se sabe están involucradas en el control de la polimerización de actina, la destrina, que es una proteína de despolimerización de actina; la timosina  $\beta$ 10, una proteína que secuestra monómeros de actina, y la proteína capeadora de actina específica de testículo (TS-ACP por sus siglas en inglés). Además, reporta que estas tres proteínas cambian su patrón de distribución en la cabeza del espermatozoide durante la maduración epididimal en un patrón similar, por lo que sugiere que las ABP son activas durante la maduración espermática desempeñando un papel en el control del balance entre actina G y F, y que esta modulación continua de actina es importante para aspectos de función del espermatozoide.

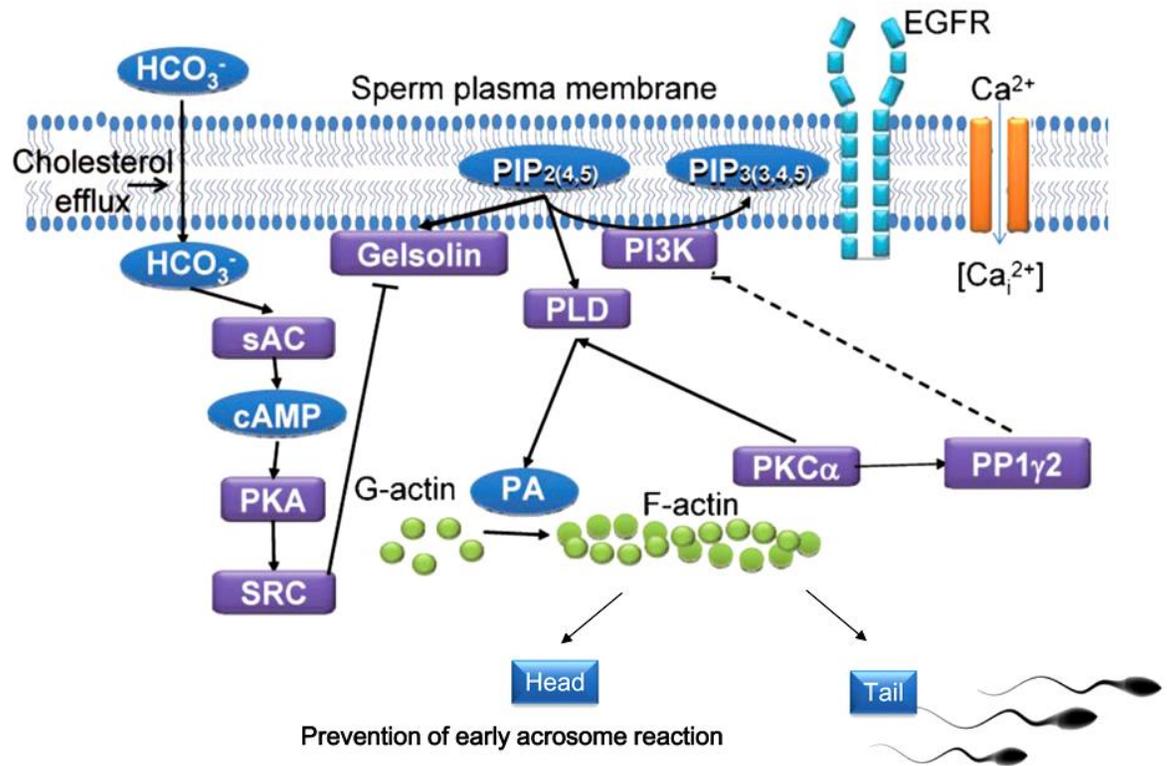
#### 1.1.3.2.1 El papel del citoesqueleto de actina en la señalización de la capacitación

La polimerización de actina ocurre durante la capacitación y antes de la reacción acrosomal; se ha propuesto que el incremento de actina-F durante la capacitación crea una red entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, mientras que su despolimerización es necesaria para permitir la exocitosis acrosomal. El aumento de actina-F en la cola del espermatozoide durante la capacitación es importante para el desarrollo de la motilidad hiperactiva (MH); siendo la polimerización de actina dependiente de la PLD (fosfolipasa D, por sus siglas en inglés). Se sabe que el  $\text{PIP}_2$  además de ser un cofactor para la activación de PLD y un lípido importante en las dinámicas de la membrana plasmática como la motilidad celular, la adhesión, la endo y la exocitosis, sirve como un efector de proteínas como la substrato quinasa C rica en alanina miristoilada (MARCKS, por sus siglas en inglés), la gelsolina y la PI3K; todas ellas presentes en el espermatozoide, por lo que han sido implicadas en la regulación de la capacitación y/o la reacción acrosomal. En la célula espermática, antes de la capacitación, la gelsolina, proteína que corta actina, se localiza unida a la fracción de actina-G (monómeros de actina), mientras que al final de la misma a la fracción de actina-F (actina filamentosa); simultáneamente con el incremento de la actina-F, esta proteína se transloca del flagelo a la cabeza del espermatozoide de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , (Breitbart y Finkelstein, 2015).

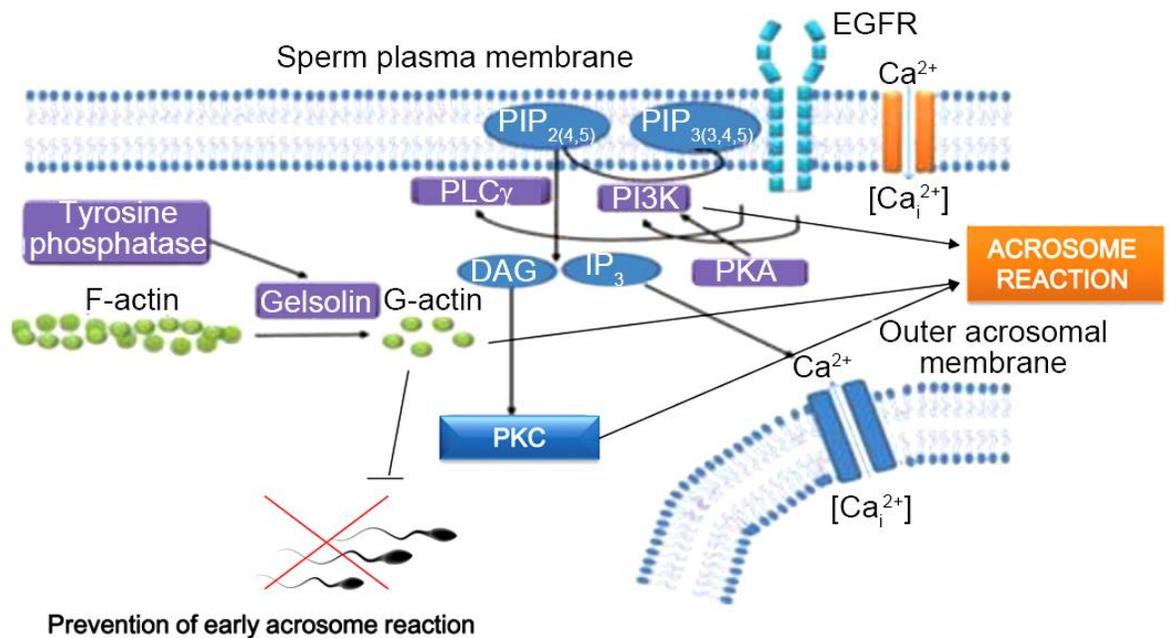
Como se mencionó, durante la capacitación la actina-F también se incrementa en la cola de espermatozoide y que ello es necesario para el desarrollo de la MH, por lo que, posiblemente la translocación de la gelsolina, desde el flagelo hasta la cabeza se requiere para evitar la despolimerización de la actina-F, permitiendo así el desarrollo de la motilidad HA, mientras que en la cabeza poco después es requerida para despolimerizar la actina-F y permitir así que se lleve a cabo la RA. Se ha mostrado que durante la capacitación la unión del  $\text{PIP}_2$  a la gelsolina la mantiene en una forma inactiva/fosforilada lo que permite la formación de actina-F (Breitbart y Finkelstein, 2015).

Así, para que los niveles de actina-F aumenten durante la capacitación, la gelsolina debe ser inactiva durante este período de tiempo. La gelsolina puede inhibirse por su fosforilación dependiente de Src en el residuo de tirosina-438 y/o su unión a PIP<sub>2</sub>, dos procesos que se producen durante la capacitación del espermatozoide. En espermatozoides humanos, Src está involucrado en la regulación de la capacitación, en el flujo de Ca<sup>2+</sup>, la fosforilación de proteínas en tirosina y la RA (Breitbart y Finkelstein, 2015).

De hecho un modelo descrito por Breitbart y Finkelstein (2015), propone que un aumento relativamente pequeño de Ca<sup>2+</sup> durante la capacitación es necesario para la translocación de la gelsolina a la cabeza espermática; mencionando que ello posiblemente se deba a dos razones: 1) el requerimiento de la gelsolina para la despolimerización de actina-F y con ello ocurra la RA y 2) la salida de la gelsolina del flagelo previene la despolimerización de la actina-F permitiendo así el movimiento HA. Así, durante la capacitación una baja elevación en la concentración de Ca<sup>2+</sup> conduce a cambios conformacionales en la gelsolina para revelar sus sitios de unión a la actina F y este cambio, junto con el aumento de F-actina y PIP<sub>2</sub> en la cabeza del espermatozoide, coinciden con la translocación de gelsolina en esta región de la célula; mientras que la elevación de los niveles de PIP<sub>2</sub> y la activación de PKA/Src en la cabeza del espermatozoide sirven para mantener a la gelsolina en un estado fosforilado/inactivado, por lo que se produce la polimerización de actina y el aumento de la actina-F en el flagelo conduce al desarrollo de la motilidad hiperactivada como parte del proceso de capacitación (Figura 4). También proponen que inmediatamente antes de la AR (Figura 5), la zona pelucida del huevo activa el GPCR (Receptor acoplado a proteína G) y/o el EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento epidermal, por sus siglas en inglés) lo que conduce a un aumento de Ca<sup>2+</sup> y la activación de PLC que hidroliza al PIP<sub>2</sub>, dando como resultado la liberación de gelsolina fosforilada, la cual es desfosforilada por una tirosina-fosfatasa, lo que permite, junto con el aumento de Ca<sup>2+</sup>, que se active y despolimerice a la actina-F en la cabeza espermática y se de la RA.



**Figura 4.** Modelo que describe la cascada de señalización durante la capacitación espermática:  $HCO_3^-$  activa a sAC para generar cAMP lo que conduce a la activación de PKA y la salida de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide, que estimulan aún más la cascada  $HCO_3^-$  /sAC /cAMP /PKA. La PKA activa Src para fosforilar/inactivar a la gelsolina unida a  $PIP_2$ .  $PIP_2$  es un cofactor para la activación de PLD y esta activación es estimulada por  $PKC\alpha$ , conduciendo a hidrólisis de fosfatidilcolina y la producción de ácido fosfatídico (PA) que media la conversión de actina-G en actina-F. Por lo tanto, la activación de PLD y la prevención de la dispersión de actina-F por inhibición de la gelsolina, permite la formación de actina-F. Actina-F en la cabeza impide la reacción acrosomal y en la cola actina-F regula la motilidad del espermatozoide, incluyendo la motilidad HA. Imagen tomada de Breitbart y Finkelstein, 2015.



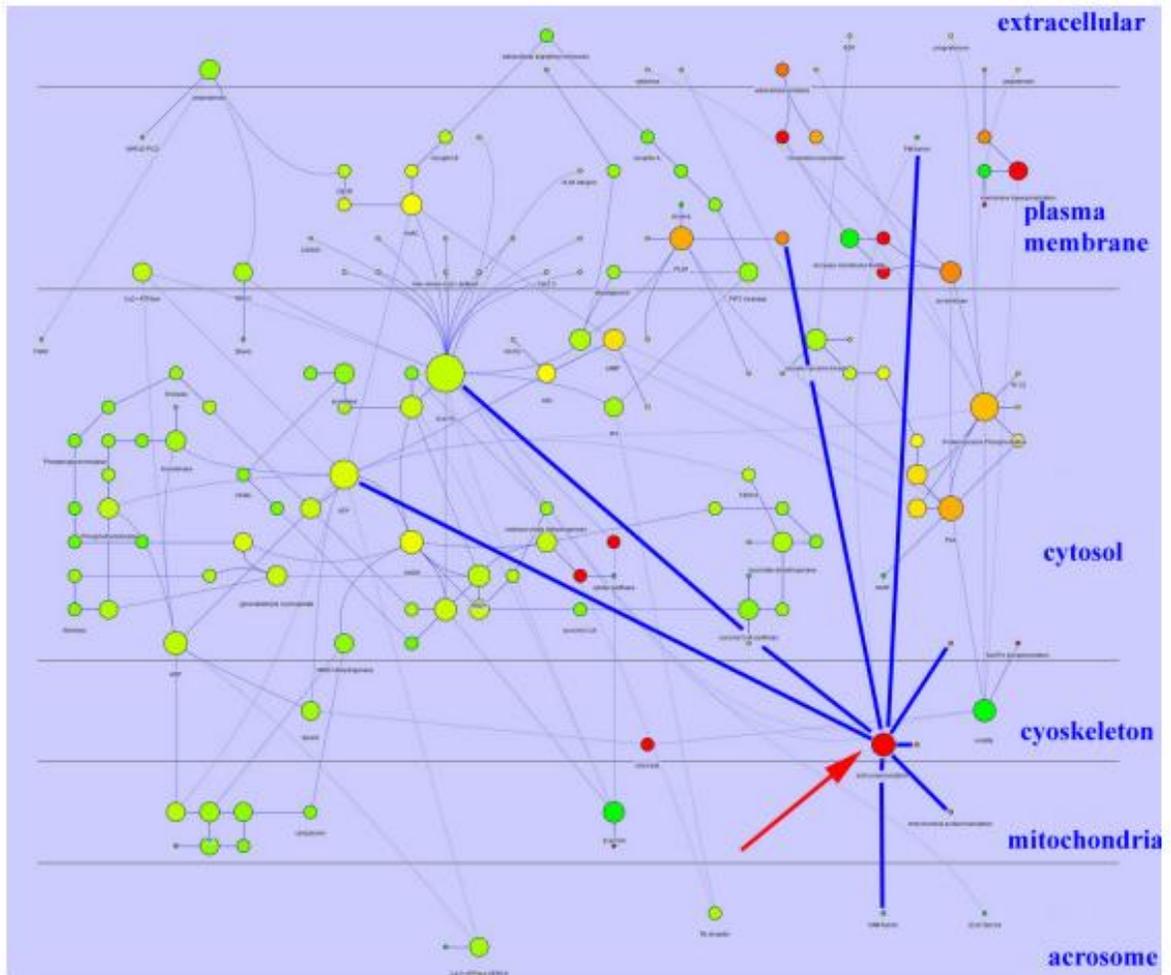
**Figura 5.** Modelo que describe la cascada bioquímica que conduce a la reacción acrosómica (RA): la unión de los espermatozoides capacitados a la zona pelúcida del huevo causa un rápido y elevado incremento de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como resultado, la PLC activa cataliza la hidrólisis de  $\text{PIP}_2$  para producir  $\text{IP}_3$  y diacilglicerol (DAG) y la liberación de p-gelsolina unida. La p-gelsolina experimenta una desfosforilación/activación por tirosina fosfatasa que conduce a la conversión de la actina-F en actina-G.  $\text{IP}_3$  activa el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana acrosomal externa lo que reduce el  $\text{Ca}^{2+}$  intra-acrosomal conduce a la activación canal dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática que causa un aumento adicional de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que junto con DAG activan a la PKC que media la reacción acrosoma. Además, la activación de PI3K dependiente de la PKA ocurre hacia el final del proceso de capacitación, implica en el mecanismo que conduce al AR. Imagen tomada de Breitbart y Finkelstein, 2015..

Como se ha mencionado durante el proceso de capacitación y reacción acrosomal, existen cambios en el citoesqueleto de actina. Como es sabido, las cascadas de señalización implicadas en muchos procesos biológicos requieren la coordinación de diferentes regiones subcelulares; como es el caso de las vías involucradas en la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide (la llamada "capacitación").

En relación a lo anterior en un estudio, tomando como modelo la capacitación en espermatozoides de verraco, Bernabó y *col.*, 2011, se señala que la polimerización de actina tiene 8 nodos de conexiones en la red de la

capacitación, localizados en varios compartimentos subcelulares (membrana, citosol, citoesqueleto, mitocondrias y acrosoma) (Figura 6), que de manera particular se vinculan con:

- Ácido fosfatídico (el producto de la actividad de PLD): la polimerización de actina depende de la activación de PLD, que se produce a través de la vía  $\text{HCO}_3^-$  / AMPc / PKA o vía receptor acoplado a proteína G (GPCR) (receptor-LPA) / vía PKC.
- ATP (adenosin trifosfato): la actina es una ATPasa y su polimerización depende de la concentración celular de ATP, además el ATP es la molécula más importante del metabolismo energético de los espermatozoides. De hecho, la producción de energía metabólica en los espermatozoides depende de la glucólisis y/o oxidación mitocondrial.
- F-actina y G-actina: polimerización de actina.
- $\text{Ca}^{2+}$ : el calcio intracelular es uno de los segundos mensajeros más importantes que impulsa la señalización intracelular durante la capacitación.
- Fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y membrana plasmática (MP).
- Síntesis de proteínas: la incubación con un inhibidor de la traducción mitocondrial (D-cloranfenicol) bloquea casi completamente la polimerización de la actina de los espermatozoides.



**Figura 6.** Diagrama que muestra la estructura de la red de capacitación de espermatozoides de verraco y la localización subcelular de los nodos. Imagen tomada de Bernabó y col., 2011.

De manera importante, en el modelo se encontró que la eliminación del nodo de "polimerización de actina" no causa efectos importantes sobre los principales parámetros topológicos de la red de capacitación, sin embargo, si afecta nodos fuera de la red: fusión MAE, fusión MP, actina-G, actina-F y en la traducción mitocondrial de proteínas. Este hallazgo permitió predecir que *in vitro* la eliminación de la polimerización de actina durante la capacitación podría causar la incapacidad de los espermatozoides para someterse a la RA (es decir que la fusión MEA y PM no tuvieran lugar), sin que otras vías diferentes de señalización se vieran afectadas.

Estos resultados refuerzan la idea de que el citoesqueleto de actina no es sólo un soporte mecánico para la célula, sino que ejerce un papel clave en la señalización durante la capacitación del espermatozoide.

### 1.1.3.3 LA FOSFOLIPASA C- $\zeta$ EN LA TECA PERINUCLEAR

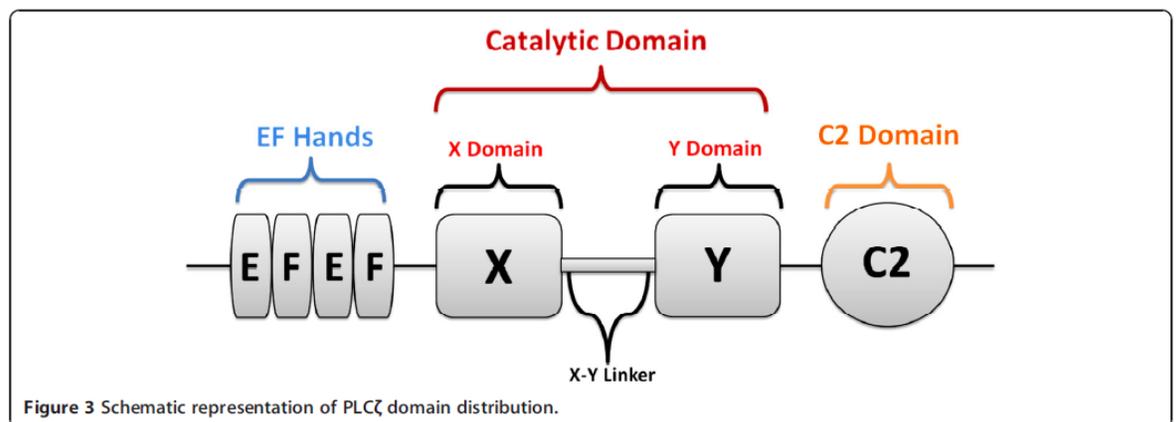
Otra de las proteínas que se encuentra presente en la TP, es una isoforma de la fosfolipasa C (PLC), la PLC- $\zeta$  (1-fosfatidilinositol 4,5-bifosfato fosfodiesterasa zeta-1; número de acceso Q86YW), específica del espermatozoide, es señalada como el factor espermático activador del óvulo (SOAF por sus siglas en inglés) (Saunders y *col.*, 2002 y 2007; Swann y *col.*, 2004; Yoneda y *col.*, 2006).

Bajo el control del receptor de superficie celular, la función de fosfolipasa C es hidrolizar al fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), generando dos productos intracelulares: inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), un segundo mensajero movilizador de calcio; y diacilglicerol (DAG por sus siglas en inglés), un activador de la proteína cinasa C (PKC por sus siglas en inglés) (Yeste y *col.*, 2016).

#### 1.1.3.3.1 Mecanismo de acción de la PLC- $\zeta$

Hasta ahora el proceso exacto por el cual la PLC- $\zeta$  activa el mecanismo molecular que promueve la activación del ovocito aún no está claro, aunque los papeles críticos desempeñados por sus dominios funcionales discretos son muy evidentes (Nomikos y *col.*, 2005). En este sentido, hay que considerar que la PLC- $\zeta$  es la isoforma más pequeña hasta ahora identificada de las PLC, con un peso molecular de 70-75 kDa. Está compuesta de 4 dominios EF en el extremo amino terminal, un dominio catalítico XY y un dominio C2 en el extremo carboxilo terminal (Figura 7). Se sabe que la estructura de los dominios de PLC- $\zeta$  se encuentra relacionada más cercana con la PLC- $\delta$  teniendo un 38% de identidad y

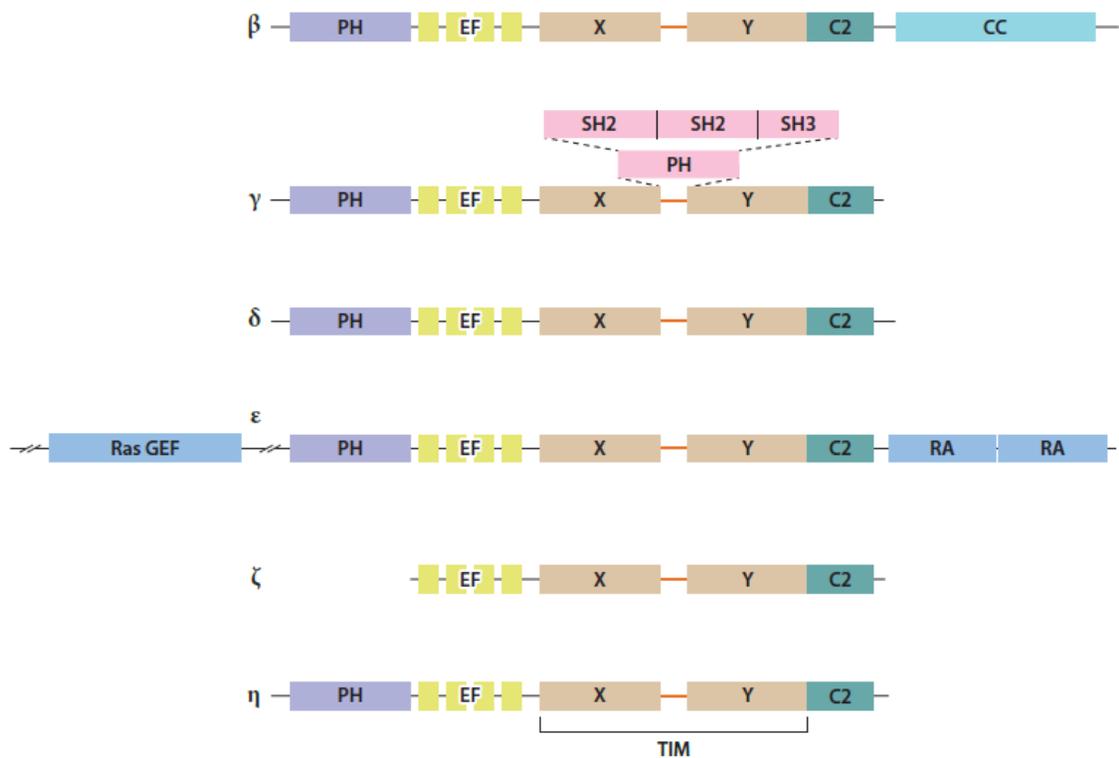
un 49% de similitud en 647 residuos de aminoácidos de la PLC- $\zeta$ , sin embargo la mayor diferencia entre la PLC- $\zeta$  y otras PLC's es la ausencia del dominio de homología con las plectrina (PH). La mayoría de las isoformas de PLC, residen en la membrana plasmática, se encuentran unidas a receptores acoplados a proteína G y poseen el dominio PH. Entre las funciones de dicho dominio se encuentran la unión con proteínas de membrana y la asociación con proteínas del citoesqueleto; debido a la ausencia del dominio PH, no está claro cómo PLC- $\zeta$  es capaz de dirigirse a su sustrato en la membrana, el PIP<sub>2</sub> (Fosfoinositol 4,5-bifosfato) (Miyazaki e Ito 2006; Swann K y *col.*, 2006). Se ha observado que la PLC- $\zeta$  puede unirse a fosfolípidos o proteínas de manera dependiente de Ca<sup>2+</sup> y que esta unión aumenta la actividad enzimática de la PLC- $\zeta$  (Nomikos y *col.*, 2005; Swann K y *col.*, 2006), dicha característica es atribuida al dominio C2, el cual contiene 3 sitios de unión a Ca<sup>2+</sup> (Suh y *col.*, 2008). Otros estudios han demostrado que la PLC- $\zeta$ , a diferencia de las isoformas  $\beta$ ,  $\gamma$  o  $\delta$ , posee la característica de tener una actividad significativamente alta (70%) a concentraciones muy bajas de Ca<sup>2+</sup> (por ejemplo, 10 fg/huevo); por lo que la PLC- $\zeta$  es más eficaz en causar la liberación de Ca<sup>2+</sup> cuando es microinyectada en los óvulos (Miyazaki e Ito y *col.*, 2006; Nomikos y *col.*, 2005).



**Figura 7.** Representación esquemática de la distribución de los dominios de PLC $\zeta$ . Tomado de Ramadan y *col.*, , 2012.

Adicionalmente, otra diferencia de la PLC- $\zeta$  con respecto a las PLC  $\beta$  y  $\delta$  es la región que incluye al dominio de unión XY, el cual está cargado positivamente, observándose que su carga puede contribuir a la unión de la proteína a la membrana plasmática y a su afinidad por PIP<sub>2</sub>. El dominio de unión XY en las otras isoformas de PLC's se encuentra cargado negativamente o, en el caso de PLC- $\gamma$ , con dominios regulatorios adicionales que incluyen un dominio PH, dos SH2 (homología a SRC 2) y uno SH3 (homología a SRC 3), y la eliminación del dominio de unión XY generalmente provoca su activación. Sin embargo, en la PLC- $\zeta$  la supresión del dominio de unión XY disminuye significativamente su actividad enzimática, y la escisión proteolítica de este dominio inactiva a la enzima (Kadamur y col., 2013) (Figura 8). Adicionalmente la región XY se encuentra pobremente conservada entre las especies, esta diversidad pudiera explicar las diferencias en la tasa de hidrolisis del PIP<sub>2</sub> observada en las isoformas de PLC- $\zeta$  entre las diferentes especies y la frecuencia para inducir los picos de Ca<sup>2+</sup> especie-específica del espermatozoide observada en los huevos de diferentes mamíferos (Nomikos y col., 2011).

La PLC- $\zeta$  se expresa únicamente en el espermatozoide y en testículo, y ha sido identificada en diversas especies como ratón, mono, humano, cerdo, gallo y bovino (Young y col., 2009). De hecho, se ha encontrado que la ausencia de PLC- $\zeta$  o su mutación produce la falta de activación del óvulo (Yoon y col., 2008; Nomikos y col., 2011), mientras que anomalías en su localización la reducen (Heytens y col., 2010). En el ratón, se ha mostrado que la PLC- $\zeta$  junto con tr-kit disparan la activación del óvulo conducente a la división del embrión (Cox y col., 2002; Saunders y col., 2002); encontrándose que la inyección de RNAc (ácido ribonucleico complementario) de PLC- $\zeta$  de ratón induce oscilaciones de Ca<sup>2+</sup> en ovocitos de bovino (Nomikos y col., 2005). En el caso del bovino, la localización de la PLC- $\zeta$  se presenta en la región ecuatorial del espermatozoide.



**Figura 8.** Esquema que ilustra las características de los dominios de las isoformas  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ , y  $\eta$ . Los diferentes dominios están abreviados de la siguiente manera: PH, homología de plectrina; manos EF; CC, (coiled-coil) doble alfa hélice; SH2 / SH3, homología de Src 2/3; RA, asociación a Ras; Ras GEF, Ras factor de intercambio GDP / GTP; X-Y dominio de unión, N - y C-terminal TIM dominio del barril. C2 es un dominio estructural implicado en dirigir las proteínas a las membranas celulares. Tomado de Kadamur y Ross, 2013.

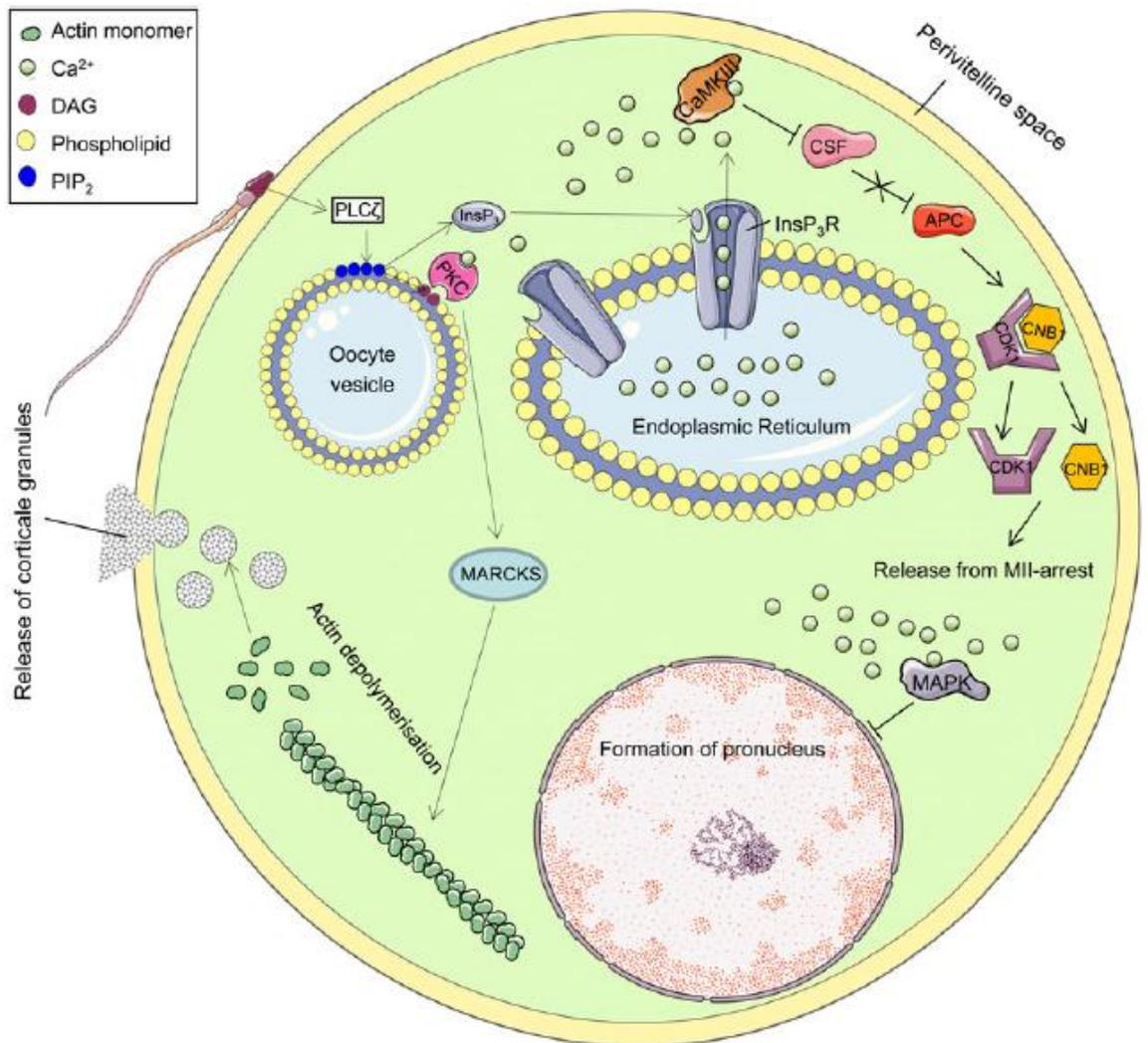
Se ha reportado que existen cambios en el patrón de distribución de la PLC- $\zeta$  tanto en los espermatozoides capacitados y como en los que llevan a cabo la reacción acrosomal, dichos cambios pudieran deberse a modificaciones post-traduccionales de la PLC- $\zeta$ , que permiten su ubicación en la región post-acrosomal de la cabeza del espermatozoide donde se da el sitio de unión con la membrana del óvulo (Young y *col.*, 2009).

Así, se postula que tras la fusión de la membrana ovocito-espermatozoide, la PLC- $\zeta$  se libera en el ovoplasma e interactúa con un factor (o factores) aún no conocidos del ovocito, facilitando así la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> en DAG e InsP<sub>3</sub>; InsP<sub>3</sub> posteriormente desencadena la liberación de Ca<sup>2+</sup> de los almacenes intracelulares y, por tanto, inicia una cascada de eventos que finalmente libera el

arresto del ovocito de la MII. Además, las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  median la liberación de los gránulos corticales, desactivan a una proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) que permite la formación de los pronúcleos, y activa a la proteína quinasa II dependiente de cadmodulina (CaMKII); la CaMKII activada inhibe a su vez el factor citostático (CSF (Emi2) lo que permite la liberación de APC. El APC induce la degradación de la ciclina B1 del complejo promotor de la maduración (MPF), formado por CDK1 y Ciclina B1, lo que lleva a la inactivación del MPF, que es lo finalmente libera al ovocito del arresto en MII (Figura 9) (Yeste y col., 2016).

Como fue mencionado la actina, otra proteína de la TP, ha sido involucrada en la capacitación y la reacción acrosomal (RA) (Devoráková y col., 2001; Brener y col., 2003; Breibart y col., 2005), procesos en donde se reportan cambios en la dinámica de esta proteína del citoesqueleto junto con la fosforilación de otras proteínas en tirosina (Breitbart y col., 2005; Jagan-Mohanarao y Atreja 2011; Kierszenbaum y col., 2007). En otro tipo de células el citoesqueleto de actina ha sido implicado en el mecanismo de transducción de señal de varias isoformas de PLC (Banno y col., 1996); usando como modelo a precursores de macrófagos, se demostró que la actina-F media la redistribución de la PLC- $\gamma$ 2, previa fosforilación de esta última por una cinasa Src (Dearden-Badet y Mouchiroud, 2005). A este respecto, dos proteínas de la familia Src han sido reportadas en la TP (Pittoggi y col., 2001). También se ha señalado que la interacción de las proteínas que unen actina con el  $\text{PIP}_2$  (el substrato de PLC) pueden regular la organización del citoesqueleto de actina (Hilpelä y col., 2004; Yin y Janmey, 2003) o la accesibilidad de fosfolípidos a la PLC (Witke, 2004); y como ya se mencionó se ha observado que la PLC- $\zeta$  puede unirse a lípidos o proteínas de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Nomikos y col., 2005). Estudios en hepatocitos han mostrado una interacción física entre la actina-F y los dominios SH2 de la PLC- $\gamma$ 2, de igual forma en macrófagos y fibroblastos existe una estrecha colocalización entre la PLC- $\gamma$ 2 y la actina-F. (Dearden-Badet y Mouchiroud, 2005).

Por lo anterior expuesto no descartamos que este pudiera ser un mecanismo general por el cual los efectos sobre la reorganización del citoesqueleto puedan modular la vía de señalización de PLC- $\zeta$ .



**Figura 9.** Activación de los ovocitos por un factor específico del espermatozoide, la fosfolipasa C  $\zeta$  (PLC- $\zeta$ ). APC: complejo promotor de anafase / cicloso; CaM / CaMKII: cadmodulina / proteína quinasa II dependiente de cadmodulina; CSF: factor citostático; CNB1: ciclina B1; CDK1: quinasa dependiente de ciclina 1; DAG: diacilglicerol;  $\text{InsP}_3$ : 1,4-trisfosfato de inositol;  $\text{InsP}_3\text{R}$ : receptor  $\text{InsP}_3$ ; MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno;  $\text{PIP}_2$ : fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PKC: proteína quinasa C. Imagen tomada de Yeste y col., 2016.

## JUSTIFICACIÓN

Posiblemente durante el proceso de fertilización la TP se prepara para permitir la liberación del factor activador del ovocito. Ya que esta estructura entre otras funciones ofrece protección al núcleo, por lo que necesita ser removida para que este pueda descondensarse (Juárez-Mosqueda y Mújica 1999; Sutovsky y Schatten 2000), y es considerada un reservorio de distintas proteínas con la capacidad de funcionar como activadoras en diversos procesos de señalización (Kitamura y *col.*, 2004; Oko y Sutovsky, 2009; Sutovsky y *col.*, 2003).

Por lo que, como un primer paso, el propósito de este estudio es identificar en la especie bovina, si existe una dinámica de interacción entre la actina y la PLC- $\zeta$ , para que esto sirva de base a estudios futuros tendientes a identificar los componentes de la TP que podrían estar participando en la regulación molecular del factor espermático activador del ovocito. Además, la identificación de los componentes de la TP que podrían estar participando en dicho proceso y su correlación con la morfología de esta estructura serían de utilidad para proponer que tipo de espermatozoide sería el más conveniente para aumentar el desarrollo embrionario al emplear técnicas de reproducción asistida.

## **2 HIPOTESIS**

En el espermatozoide de bovino existe una asociación entre la actina y la PLC- $\zeta$  de la teca perinuclear dependiente del estado fisiológico de la célula que favorece la migración o el cambio de localización de esta última proteína.

### **3 OBJETIVO**

Correlacionar si el cambio de localización que presenta la PLC- $\zeta$  durante los procesos de capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide bovino depende del citoesqueleto de actina.

### **4 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Analizar si en los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide la actina experimenta cambios en su patrón de localización comparables a los de la PLC- $\zeta$ .
2. Evaluar la interacción de la PLC- $\zeta$  con actina en espermatozoides no capacitados, capacitados y con reacción acrosomal por inmunoprecipitación.
3. Evaluar si PLC- $\zeta$  es fosforilada durante los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide (capacitación y reacción acrosomal).

## 5 MATERIAL Y METODOS    DESARROLLO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL

La fase experimental del estudio se dividió en dos partes:

1. Capacitación y reacción acrosomal *in vitro* de los espermatozoides de bovino

Esta etapa se llevó a cabo en el laboratorio de morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

- 2.- Identificación de la interacción de la PLC- $\zeta$  con actina, y fosforilación de la PLC- $\zeta$  por inmunoprecipitación y Western blot.

La segunda etapa se realizó en colaboración con el Dr. Salvador Uribe Carvajal, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### REACTIVOS

Todos los reactivos fueron de calidad analítica. Tween 20, 2- $\beta$  mercaptoetanol, solución de Ponceau S, tetrametil faloidina marcada con rodamina (TRITC-Ph), fueron de Sigma Chemical Co (St Louis, Missouri); las tabletas Complete, una mezcla de inhibidores de la proteasa; las tabletas PhosphoStop, una mezcla de inhibidores de fosfatasas y la proteína A con agarosa fueron de Roche (Mannheim, Alemania); dodecil sulfato de sodio (SDS) fue de BDH (Poole, Inglaterra); acrilamida / bis-acrilamida, N, N, N 9, N 9-tetrametil-etilen-diamina (TEMED) y marcadores de peso molecular fueron de Bio-Rad (Richmond, California); membranas de polyvinylidene difluoride (PVDF) de Millipore Billerica, MA, USA, reactivo de aumento de quimioluminiscencia (ECL) de Amersham™ (Arlington Heights, Illinois), el reactivo universal de bloqueo HK085-5K de Genex (Milmont Drive, Fremont, CA ) y leche en polvo descremada Blotto SC-2325 de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

## ANTICUERPOS

El anticuerpo monoclonal anti-actina para western blot fue CP01 Anti-Actin (Ab-1) Mouse mAb (JLA20) de Millipore, Billerica, MA, USA y para PLC- $\zeta$  fue SC-131753 (E-13). Para el Far Western se utilizó el péptido de PLC- $\zeta$  SC-131753 P (E-13) P de Santa Cruz Biotechnology, La secuencia del peptido utilizado consta de 50 aminoácidos, que corresponden a la parte de los aminoácidos 350 a 400 de la proteína. El utilizado para las inmunocitoquímica fue SC-376421 Actina (H-6) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Los anticuerpos secundarios fueron de conejo anti-cabra y cabra anti-ratón marcados con TRITC y peroxidasa de rábano picante (HRP) fueron de Jackson Inmuno Research Laboratories Inc. (West Grove, Pennsylvania).

## 5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

### 5.2.1 OBTENCION DEL SEMEN

#### Colección y transporte del material biológico

Los eyaculados fueron obtenidos de toros sanos de la raza Jersey pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la FMVZ-UNAM, mediante el método de vagina artificial. Las muestras fueron trasladadas al Departamento de Morfología de la FMVZ-UNAM a una temperatura de 35° C, aproximadamente dentro de la primera hora de obtenidas. El medio de transporte fue Triladyl-yema de huevo al 20%. Una vez en el laboratorio las muestras fueron lavadas con el medio NKM (110 mM de NaCl, 5 mM de KCl y 20 mM 3-N-morfolino propanosulfónico (Mops), pH 7.4) y se mantuvieron en este medio hasta su utilización. Al llegar al laboratorio se evaluó la concentración espermática, la motilidad progresiva, la viabilidad espermática por la tinción de eosina-nigrosina, viabilidad e integridad del acrosoma con la prueba hiposmótica con azul de Coomassie; cada prueba se hizo por triplicado para cada grupo experimental. Solo se utilizaron los eyaculado que tuvieran 80% de espermatozoides vivos motiles.

## 5.2.2 EVALUACIÓN DE LAS CÉLULAS:

### A) Motilidad

1. La motilidad progresiva fue evaluada de la siguiente manera: se colocó una gota sobre un portaobjetos previamente calentado a 37°C y se cubrió con un cubreobjetos, se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40X, otorgándose un valor de movimiento rectilíneo progresivo de 0-100%. Los eyaculados con menos del 80% de motilidad progresiva y más de 20% de morfoanomalías fueron descartados.

2. Se calculó la concentración espermática por conteo en el hematocitómetro (cámara de Neubauer) y aplicando la siguiente fórmula:

No. de espermatozoides  $\times$  21  $\times$  10,000  $\times$  5 = concentración de espermatozoides por ml.

Donde 21 es el factor de dilución (25  $\mu$ l de semen diluido en 500ul de Tritón X-100 al 0.1% diluido en PBS), 10,000 está dado por la dimensión de la cámara y 5, es el número de cuadros contabilizados.

La determinación del número de espermatozoides anormales se realizó de manera simultánea durante el conteo en el hematocitómetro.

### B) Evaluación de la viabilidad espermática por la tinción de eosina-nigrosina

Esta tinción sirve para evaluar el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta (Selles y *col.*, 2003). Primeramente, se tomó una cantidad de la muestra y se agregó el colorante en una proporción 1:2 respectivamente, se dejó incubando en baño María a 37°C por cinco minutos, posteriormente se realizaron frotis, empleando laminillas previamente desengrasadas. La muestra se dejó secar al aire, una vez seca se aplicó resina

para montar el cubreobjetos. Se evaluaron 100 células en un microscopio de luz; las células teñidas fueron consideradas como muertas; mientras que las células no teñidas fueron consideradas como vivas.

Para determinar las proteínas presentes en la teca perinuclear y su relación con el estado fisiológico del espermatozoide, las muestras fueron divididas en 3 grupos: espermatozoides no capacitados (NC), espermatozoides capacitados (C) durante 4 hrs y espermatozoides capacitados con reacción acrosomal (RA).

### **5.3 CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL *in vitro* DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO**

Se indujo la capacitación *in vitro* de espermatozoides de bovino como se describe previamente (Parrish y col., 1988). Los espermatozoides ( $100 \times 10^6$  células/ml) fueron centrifugados a 800g por 10 min a temperatura ambiente, para retirar el medio NKM en el que se mantuvieron, y la pastilla fue re-suspendida hasta una concentración final de  $100 \times 10^6$  células/ml en el medio de capacitación modificado TALP (MMTC), Solución Tyrode modificada que contenía (Cuadro 3): 100 mM de NaCl, 3.1 mM de KCl, 1.5 de mM de  $MgCl_2$ , 0.92 de mM  $KH_2PO_4$ , 25 mM de  $NaHCO_3$ , 20 mM de HEPES, 0.1 mM de pirúvato de sodio, 21.6 mM de lactato de sodio, 50  $\mu g/ml$  gentamicina, 1 mg/ml de BSA, 20  $\mu g/ml$  Heparina, y 2 mM de  $CaCl_2$ , pH 7.4 e incubadas por 4 horas a 39° C, con 5%  $CO_2$  y 100% humedad relativa. La muestra espermática fue divididas en 3 diferentes grupos: no capacitados, capacitados y capacitados con RA. Los espermatozoides no capacitados fueron tomados en el tiempo 0 (inmediatamente después de resuspender en el medio de capacitación) y los capacitados a las 4 horas de incubación en el medio de capacitación. Para inducir la RA los espermatozoides fueron previamente capacitados por 4 horas y después incubados con el ionoforo de calcio A23187 a una concentración final de  $1\mu M$  por una hora bajo las mismas condiciones de temperatura,  $CO_2$  y humedad relativa. En varios experimentos, durante la capacitación se utilizaron dos toxinas para inhibir la polimerización de

actina, 25 $\mu$ M de citocaladina-D (Chiquete-Felix N et. al., 2009) y 1  $\mu$ M de Latrunculina (Azamar Y et. al., 2007). El estado de capacitación se comprobó por medio de la prueba de CTC-HOECHST 33258 según Frase y col., 1995.

**Cuadro 3.** Composición del medio de Capacitación espermática

Reactivos	Concentración
NaCl	100.0 mM
KCl	3.1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.0 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.92 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.0 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Piruvato de sodio	0.1 mM
HEPES	20.0 mM
Lactato	21.6 mM
BSA	1.0 mg/ml
Gentamicina	50.0 $\mu$ g/ml
Heparina	20.0 $\mu$ g/ml

### 5.3.1 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA.

PRUEBA HIPOOSMÓTICA (HOST) EN COMBINACIÓN CON AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE (CBB)

Cabe mencionar que esta prueba se realizó al inicio y final de la capacitación y reacción acrosomal, para validar la presencia del acrosoma. La muestra se ajustó a una concentración de 35x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml y fueron lavadas por centrifugación (800 g por 10 min), para retirar el diluyente. El frotis testigo se realizó de la manera siguiente: 100  $\mu$ l de semen fueron fijados en 100  $\mu$ l de

paraformaldehído al 4% por 10 min a temperatura ambiente; posteriormente las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS a 2500 rpm por 3 min, después se reconstituyeron en 100  $\mu$ l de cloruro de amonio (50mM en PBS), se realizó un frotis con 20  $\mu$ l y se dejó secar al aire. Mientras que para el frotis prueba se tomaron 100  $\mu$ l de semen más 100  $\mu$ l de solución hipoosmótica (citrato de sodio 4.9 g y 9 g de fructosa por litro de agua destilada) y se incubaron por 60 minutos a 37°C, después se agregan 200  $\mu$ l de paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se lavaron 2 veces con PBS y se reconstituyeron en 100  $\mu$ l de cloruro de amonio, finalmente se realizó un frotis con 20  $\mu$ l y se dejó secar al aire. Ambos frotis se tiñeron por inmersión en Azul brillante de Coomassie (Azul de Coomassie 0.55 g (0.22%), metanol 12.5 ml (50%), ácido acético 2.5 ml (10%), agua bidestilada c.b.p. 125 ml) por 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo los frotis fueron sumergidos en un vaso copplin con agua destilada para remover el exceso de colorante y se dejaron secar al aire. Una vez secas las laminillas fueron montan con resina y cubreobjetos para su posterior conteo de 200 células por laminilla. La combinación de la prueba HOST y la tinción CBB se realizó buscando una mejor valoración, de los resultados al aportar información sobre el estado funcional de la membrana plasmática e integridad acrosomal (Gutiérrez, 2009).

La interpretación de la prueba de HOST, se considera positiva (membrana funcional) cuando los flagelos se encuentran doblados, enrollados en ovillo o en látigo (Gutiérrez, 2009).

La CCB interpreta la integridad acrosomal como: sin daño (acrosoma bien definido e intensamente teñido), dañado (acrosoma difusamente teñido, con pérdida de continuidad y/o pérdida de material) y ausente (ausencia definitiva del acrosoma) (Gutiérrez, 2009).

### 5.3.2 PRUEBA DE CTC-HOECHST 33258.

El estado de capacitación del espermatozoide usualmente es valorado con la clortetraciclina (CTC), un antibiótico fluorescente. Esta sonda se une a la membrana plasmática del espermatozoide de manera dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$ , formando así complejos altamente fluorescentes de CTC con iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  unidos a las membranas. Las células espermáticas viables se marcan con CTC en aquellas partes superficiales de las membranas donde el  $\text{Ca}^{2+}$  está presente por encima de una cierta concentración umbral para permitir la inmovilización de CTC (Silva y Gadella, 2006). Para valorar si están los espermatozoides vivos o muertos se utiliza Hoechst 33258. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

Una vez que la muestra fue tratada experimentalmente, se preparó para la tinción.

La muestra de semen se ajustó a una concentración de  $35 \times 10^6$ /ml, se empleó Hoechst 33258 en una concentración final de  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . En una alícuota de espermatozoides (usualmente  $396 \mu\text{l}$ ) se agregarán  $4 \mu\text{l}$  de Hoechst, se mezclaron invirtiendo y vortexeando gentilmente, se incubaron por 3 minutos a temperatura ambiente en cuarto oscuro. Posteriormente las células fueron lavadas v/v con 3% de polivinilpirrolidona en PBS y se centrifugaron a  $833 \times g$  por 6 min. Seguidamente se removió el sobrenadante y el pellet se resuspendió en  $75 \mu\text{l}$  de medio de cultivo TCM-199 (Fraser y *col.*, 1995).

Se tomaron de esta suspensión  $45 \mu\text{l}$  y se adicionaron  $45 \mu\text{l}$  de la solución CTC ( $750 \mu\text{M}$  CTC, Cisteína  $5 \text{mM}$ ,  $130 \text{mM}$  de NaCl en buffer Tris-HCL  $20 \text{mM}$  pH 7.8) y se incubaron por 30 segundos en oscuridad. La muestra se fijó con  $22 \mu\text{l}$  de glutaraldehído al 1% (w/v en Tris HCl  $0.5 \text{M}$ , pH 7.4) por 10 a 15 minutos. Posteriormente se colocaron en una laminilla  $10 \mu\text{l}$  de la muestra y se le agregó una gota de glicerol:PBS (9:1) se mezclaron y se colocó un cubreobjetos, ejerciendo presión suave, sellando los bordes con barniz de unas. Las laminillas fueron observadas al microscopio de fluorescencia con el objetivo de  $100 \times$ . Se contaron 100 espermatozoides y se determinó el porcentaje de presentación de

los patrones de fluorescencia en la cabeza del espermatozoide con la clasificación utilizada por Fraser y *col.*, 1995:

Patron F: fluorescencia uniforme en toda la cabeza o con un incremento de la fluorescencia en la zona de la protuberancia acrosomal, característico de espermatozoides no capacitados con el acrosoma intacto.

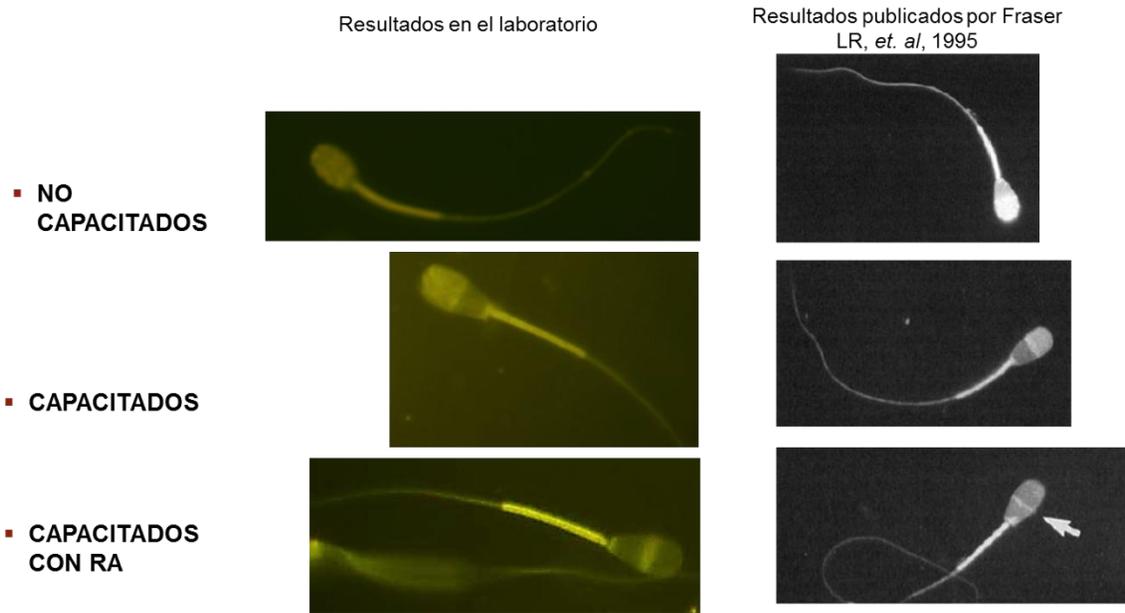
Patron B: Fluorescencia en la región acrosomal, característico de los espermatozoides capacitados con el acrosoma intacto.

Patron RA: Banda fluorescente en la región ecuatorial característico de los, espermatozoides con reacción acrosomal.

La valoración de las muestras mostró que el 90% de espermatozoides se encontraban capacitados al final de las 4 horas de incubación y que el 95 % de espermatozoides mostraban reacción acrosomal al terminar la hora de incubación con el ionoforo de calcio A23187 (Cuadro 4, Figura 10, 11 y 12).

**Cuadro 4.** Valoración del estado fisiológico de los espermatozoides incubados en el medio de capacitación y reacción acrosomal.

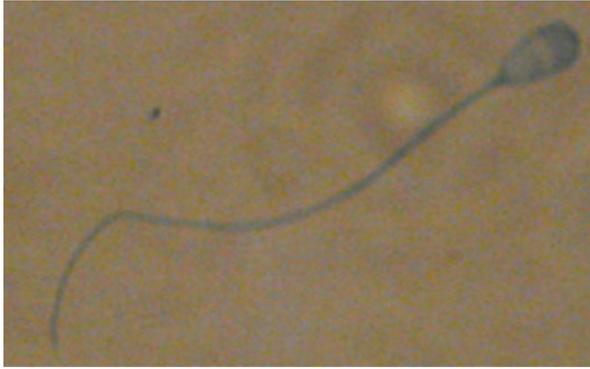
ESTADO FISOLOGICO	CTC-HOESCHT 33258 (%)		TINCION AZUL DE COOMASSIE (%)
	INICIO DE LA INCUBACIÓN	FIN DE LA INCUBACIÓN	
NO CAPACITADOS	60 -70	20 -10	
CAPACITADOS	30 -40	80 -90	
CAPACITADOS CON REACCIÓN ACROSOMAL		90 -95	90 -95



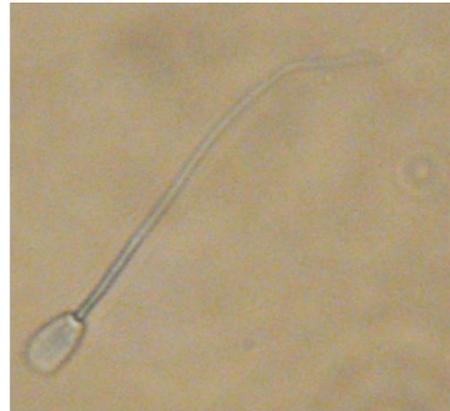
**Figura 10.** Espermatozoides mostrando los diferentes patrones que se observan en los espermatozoides, dependiendo del estado fisiológico que presentan, al ser evaluados con la prueba de CTC. La columna del lado izquierdo muestra los resultados obtenidos en el laboratorio y de lado derecho se muestran los descritos por Fraser LR, et. al. 1995. La primera fila muestra el patrón F, (no capacitado) la segunda fila muestra el patrón B (capacitados) y la última fila muestra el patrón RA (capacitados con reacción acrosomal).



**Figura 11.** Espermatozoides mostrando el patrón de tinción con la prueba CTC-HOESCHT 33258. La foto del lado izquierdo muestra un espermatozoide vivo y la del lado derecho muestra un espermatozoide muerto.



Con acrosoma (capacitados)



Sin acrosoma (capacitados con RA 1hr) 90-95%

**Figura 12.** Espermatozoides mostrando el patrón de tinción para observar el acrosoma, dependiendo del estado fisiológico con la prueba hiposmótica con azul de Commassie. La foto del lado izquierdo muestra los resultados obtenidos en el laboratorio en espermatozoides capacitados con acrosoma y de lado derecho se muestra un espermatozoide capacitado con reacción acrosomal (sin acrosoma).

#### **5.4 IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C- $\zeta$ EN ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOCITOQUÍMICA.**

##### **INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA**

Para la inmunofluorescencia de PLC- $\zeta$  y actina-F, se emplearon preparaciones enteras de espermatozoides permeabilizados no capacitados, capacitados y capacitados con RA. Las células fueron utilizadas a una concentración de  $30 \times 10^6$ /ml, fijada en paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos. Enseguida las muestras se lavaron en PBS 2 veces y se realizaron frotis. Las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0.25% en PBS durante 30 minutos y fueron lavadas nuevamente con PBS 2 veces. Las muestras fueron bloqueadas con BSA 1% en PBS por una hora a temperatura ambiente; posteriormente fueron incubadas en cámara húmeda con el anticuerpo primario apropiado (anti-PLC- $\zeta$  1:25) y faloidina para identificar actina-F (1:25), durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este periodo fueron lavadas 2 veces con PBS-Tween 20 al 0.1% y

con agua destilada, posteriormente se incubó durante 1 hora a 30°C con el anticuerpo secundario apropiado, posteriormente se realizaron 10 lavados de 5 min con PBS-Tween 20 al 0.1%. Finalmente se montaran las laminillas utilizando el medio Vectashiel y se observaron en un microscopio de fluorescencia.

## **5.5 INMUNOCITOQUÍMICA**

Se utilizaron frotis de espermatozoides de cada grupo experimental, los cuales fueron tratados previamente por 30 minutos, a temperatura ambiente, para permeabilizar las células con buffer TBT (Tris- BSA- Triton X-100) que contenía 0.05 M de Tris, 2% de BSA, 0.1% de Triton X-100 y 0.15 M de NaCl para 1 litro de agua miliQ y bloqueadas con el reactivo universal (BioGenex HK085-5K) para reducir la unión no específica por 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron tres veces con PBS y la peroxidasa endógena se inactivó incubando los frotis en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 15 min a temperatura ambiente (DakoCytomation). Los frotis se incubaron durante toda la noche a 4 ° C con los anticuerpos primarios pertinentes [Sc-131752 PLCz (C-12) (1:50) y SC-376421 Actina (H-6) (1:50)]. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó utilizando el complejo avidina-biotina-peroxidasa utilizando como sustrato cromogénico el tetrahidrocloreuro de 3,3-diaminobencidina (kit de Dako cat. no. 679 KO LSAB + Sys / HRP, DakoCytomation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como controles negativos, muestras se procesaron en paralelo de manera similar sin el anticuerpo primario para cada experimento de inmunotinción, y el control positivo fueron cortes de testículo de bovino y musculo esquelético de rata, los estudios se realizaron por triplicado.

## **5.6 IDENTIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA FOSFOLIPASA C-ζ Y ACTINA EN EXTRACTOS DE**

## **ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT.**

### **EXTRACCIÓN DE PROTEINAS**

Para solubilizar la membrana plasmática, la membrana nuclear y el acrosoma de los espermatozoides, se realizaron modificaciones de los protocolos realizado por Felipe-Pérez *y col.*, 2012 y Takiguchi, *y col.*, 2011. Por lo que espermatozoides de cada grupo experimental a una concentración de  $100 \times 10^6$  células/ml, fueron centrifugados a 800 g por 10 min para retirar el medio de capacitación y fueron re-suspendidos en 200  $\mu$ l de una solución de 3.75 mM de DTT (Dithiothreitol por sus siglas en inglés) en PBS, se incubaron por 15 min a 4° C (Juárez-Mosqueda y Mújica, 1999). Posteriormente se adicionaron 500  $\mu$ l de buffer de extracción modificado (Tris-HCl 50mM, pH7.4, 1% NP-40, 0.75% SDS y 0.1mM de EDTA) acompañado con 100  $\mu$ l de inhibidor de proteasas (Compleat®) y 100  $\mu$ l de inhibidor de fosfatasas (Phosphostop®) (siguiendo las indicaciones del proveedor), la muestra se aforó a un volumen total 1 ml con PBS y se incubaron por 5 minutos más. Enseguida se centrifugaron a 4°C a 12,000 rpm por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se les adicionó 100  $\mu$ l Compleat® y 100  $\mu$ l Phosphostop®.

Los sobrenadantes fueron concentrados en tubos Amicon® Ultra 10K, de Millipore™ se centrifugaron a 4°C a 4,500 rpm por 30 minutos. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) y se corrieron en SDS-PAGE (Oko *y col.*, 1994).

### **5.7 INMUNOPRECIPITACIÓN**

Una vez concentradas y cuantificadas las proteínas obtenidas, 10 $\mu$ l del anticuerpo contra PLC- $\zeta$  fueron incubados con 10  $\mu$ l de Proteína A agarosa a 4°C por 15 min, fueron mezclados con 200  $\mu$ g/ml del extracto proteico y se adicionó buffer para inmunoprecipitación (PMSF 1mM y Tween-20 0.1% en PBS), para

aforar a un volumen final de 500  $\mu$ l y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación.

El complejo anticuerpo-Proteína A fue recuperado por centrifugación (5000 rpm durante 6 minutos), las muestras de cada grupo fueron lavadas 2 veces a 5000 rpm durante 6 minutos con el buffer antes mencionado, al final fueron resuspendidas en 50  $\mu$ l del mismo buffer y hervidas con buffer de muestra para ser analizadas por SDS-PAGE (por sus siglas en inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) y Western blot.

De igual forma para comprobar si la PLC-  $\zeta$  se encontraba fosforilada, las muestras fueron inmunoprecipitadas como se ha descrito anteriormente, utilizando 2 mg de extracto proteico. Primeramente 10 $\mu$ l del anticuerpo contra P-Tyr fueron incubados con 10  $\mu$ l de Proteína A agarosa a 4°C por 15 min, posteriormente se adicionaron los 2 mg/ml del extracto proteico y se adicionó buffer para inmunoprecipitación (PMSF 1mM y Tween-20 0.1% en PBS), para aforar a un volumen final de 500  $\mu$ l y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación.

## **5.8 ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOTTING**

Para la detección de la PLC- $\zeta$ , las muestras se diluyeron con amortiguador de muestra 1:4 (500 mM Tris pH 6.8, 10% de glicerol, 10% SDS, 0.05% 2-b-mercaptoetanol, y 0.01% de azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 minutos (Laemmli, 1970). Las muestras fueron corridas en SDS- PAGE al 8% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas de PVDF se procesaron como ha sido descrito previamente por Moreno-Fierros et al (1992). El anticuerpo primario anti-PLC- $\zeta$  se diluyó apropiadamente (1:500) con solución de bloqueo [albumina 0.5% en TBS-T (NaCl 150 mM; 100 mM Tris-HCl, pH 7.6; más 0.1% de Tween 20)]. El anticuerpo secundario marcado con HRP se diluyó 1: 10,000 en la solución de bloqueo.

Para determinar la presencia de actina, las membranas fueron reprogramadas para ello fueron sometidas al proceso de desnudado por 20 min en buffer de stripping (15g de glicina, 1g SDS, 10ml Tween-20/ 1Lt, pH 2.2), posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-actina (1:5000) en solución de bloqueo. Los anticuerpos secundarios marcados con HRP se diluyeron 1: 10,000 en solución de bloqueo. La HRP se reveló usando un kit de quimioluminiscencia ECL. Como control positivo para PLC- $\zeta$  y actina, se utilizó extracto de cerebro (Katan y Parker 1987).

Para comprobar la fosforilación de la PLC- $\zeta$ , las muestras después de la inmunoprecipitación, fueron sujetas a SDS-PAGE al 10%, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas de PVDF se procesaron según lo descrito por Moreno-Fierros *et al.* (1992). El anticuerpo primario anti-fosfotirosina se diluyó apropiadamente (1:250) en solución de bloqueo albumina 0.5% en TBS-T (NaCl 150 mM; 100 mM Tris-HCl, pH 7.6; más 0.1% de Tween-20). Los anticuerpos secundarios marcados con HRP se diluyeron 1: 4000 en solución de bloqueo. La HRP se reveló usando un kit de quimioluminiscencia ECL.

## **5.9 IDENTIFICACIÓN DE LA AFINIDAD DE LA PLC- $\zeta$ POR ACTINA-F Ó ACTINA-G MEDIANTE FAR WESTERN.**

Para determinar la interacción entre la PLC- $\zeta$  y actina se procedió a realizar un Far-Western, para ello se utilizó el péptido PLC- $\zeta$  (SC-131 753-P z, Santa Cruz) y el control fue 3.65  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de extracto de cerebro, el cuál fue donado por la Dra Natalia Chiquete Félix, del laboratorio 305 oriente del Instituto de Fisiología Celular. Las muestras fueron corridas en SDS- PAGE al 8% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas de PVDF se procesaron como ha sido descrito previamente por Moreno-Fierros *et al.* (1992). Las membranas fueron bloqueadas por 12 horas en solución de bloqueo (albumina 0.5% en TBS-T (NaCl 150 mM; 100 mM Tris-HCl, pH 7,6; más 0.1% de Tween 20), lavadas con TBS-T por 5 minutos dos veces e incubadas por tres horas con 200  $\mu\text{g}$  de actina-F o

actina-G respectivamente. Se repitieron los lavados y se incubaron por tres horas con el anticuerpo primario correspondiente (actina o PLC- $\zeta$ ) en leche en polvo descremada (Blotto) al 1% en TBS-T. Se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con HRP por 2 horas en 1% leche en TBS-T en una dilución 1:2000 para PLC- $\zeta$  y 1:15000 para actina. La HRP se reveló usando un kit de quimioluminiscencia ECL. Para la polimerización de 6 mM actina se emplearon 2 mM Tris/HCl pH 8, 1.2 mM ATP, 200 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.5 mM dithiothreitol, se incubaron por una hora a temperatura ambiente. La actina fue donada por la Dra. Natalia Chiquete Félix, del laboratorio 305 oriente del Instituto de Fisiología Celular, quien la obtuvo siguiendo el protocolo de Parde JD y Spudich, 1982.

## **5.10 IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C- $\zeta$ EN SOBRENADANTES DEL MEDIO DE INCUBACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA POR AFINIDAD Y WESTERN BLOT.**

AISLAMIENTO DE PLC- $\zeta$  DE SOBRENADANTES DE LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Actina-F (6.9 mg) fue disuelta en amortiguador básico de acoplamiento (0.1 M NaHCO<sub>3</sub> y 0.5 M NaCl, pH 8.3-8.5) y unida covalentemente a la columna cyanogen bromide-activated Sepharose 4B column (Sigma-Aldrich). Para activar la resina cyanogen-bromide fue lavada e hidratada con 3ml de 1 mM de HCl en frío por al menos 30 minutos. Posteriormente fue lavada con agua destilada y con el amortiguador de acoplamiento. La proteína se mezcló con la Sepharosa 4B (5-10 mg de proteína por ml de resina) toda la noche a 4°C. La proteína no unida se eliminó por lavado, utilizando el amortiguador de acoplamiento NaHCO<sub>3</sub>/NaCl. La resina fue bloqueada con 0.2 M glicina, pH 8,0, durante 2 horas a temperatura ambiente.

Para remover la solución de bloqueo de la resina, se lavó extensivamente, primero con un amortiguador básico de acoplamiento pH 8.5, y después con un amortiguador de acetato 0.1 M, pH 4, que contenía 0.5 M NaCl. Este ciclo de lavado se completó utilizando dichos amortiguadores de pH alto y bajo en cinco ocasiones de manera alternada. La resina lavada se equilibró en una columna usando 10 mM de Tris pH 7.4 (buffer de equilibrio). Por triplicado, los concentrados de los sobrenadantes de cada grupo experimental fueron adicionados a la columna y lavados exhaustivamente con buffer de equilibrio, hasta que no fuera detectada proteína por el método de Bradford (1976). El material unido fue lavado por la adición de Tris pH 7.4 en concentraciones crecientes (10, 20, 50, 70, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 mM) en alícuotas de 3ml, la proteína fue cuantificada por el método de Bradford (1976). La PLC- $\zeta$  fue detectada en las fracciones del gradiente que correspondían a Tris pH 7.4 50, 70, 100 y 150 mM, por lo que fueron agrupadas y se concentraron en tubos Amicon® Ultra 10K, de Millipore™ centrifugadas a 4°C, 4.500 rpm por 30 minutos, para cada grupo experimental. La proteína fue detectada por Western blot. La polimerización de actina 6.9  $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$  se llevo a cabo con Tris-HCl 2 mM pH 8, ATP 1.2 mM, KCl 50 mM y  $\text{MgCl}_2$  2mM. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (Pardee y Spudich 1982).

#### TINCIÓN GELES CON PLATA

El gel SDS / PAGE se incubó en buffer I (50% de metanol y 5% de ácido acético) durante 20 min. Posteriormente fue lavado por 10 min con el buffer II (50% metanol), se enjuago con agua destilada por 10 min. Se añadió tiosulfato de sodio 0.02% y se incubó durante 5 min. El gel se lavó extensamente con agua destilada, tres veces durante 5 min cada uno. Se añadió el buffer III [0.1% de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), 3% de etanol y 0.024% de formaldehído), y se incubó durante 20 min. El gel se lavó de nuevo con agua destilada. Por último, el gel se incubó con buffer IV (carbonato de sodio 2.5% y formaldehído 0.4%) hasta que

aparecieron las bandas, cambiando la solución cuando esta se oxidaba. La reacción se detuvo con ácido acético al 5%.

### **5.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se empleó ANOVA de una vía (prueba de comparación múltiple de Dunnett) para comprar las medias y el patrón de localización de la PLC- $\zeta$  y actina en los espermatozoides no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal, usando GraphPad Prism Versión 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Con un valor de  $P < 0.001$ .

### **5.12 DENSITOMETRIA**

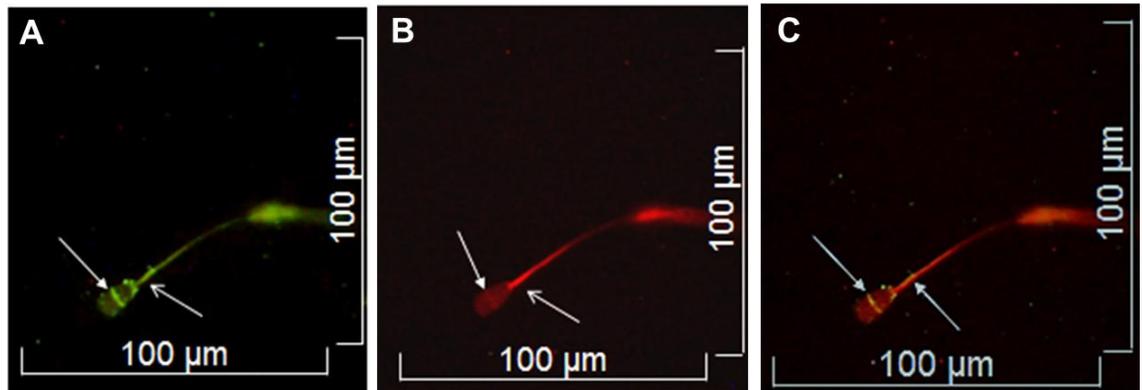
La intensidad de las bandas de las muestras de los grupos no cpacitados (NC), capacitados (C) y capacitados con reacción acrosomal (RA) para cada co-inmunoprecipitación; así como no tratados (nT) y los tratados con citocalasina-D (CD) y la actina-F o actina-G respectivamente, se cuantificó utilizando un escáner, y el programa de análisis ImageJ versión 1.46 (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.). ANOVA de una vía (prueba de comparación múltiple de Dunnett) fue realizado para comparar las diferencias entre la banda de NC, C y RA; nT y CD, actina-F y actina-G, respectivamente, usando GraphPad Prism Versión 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU.).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 IDENTIFICACIÓN DE PLC- $\zeta$ Y ACTINA EN ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUIMICA.

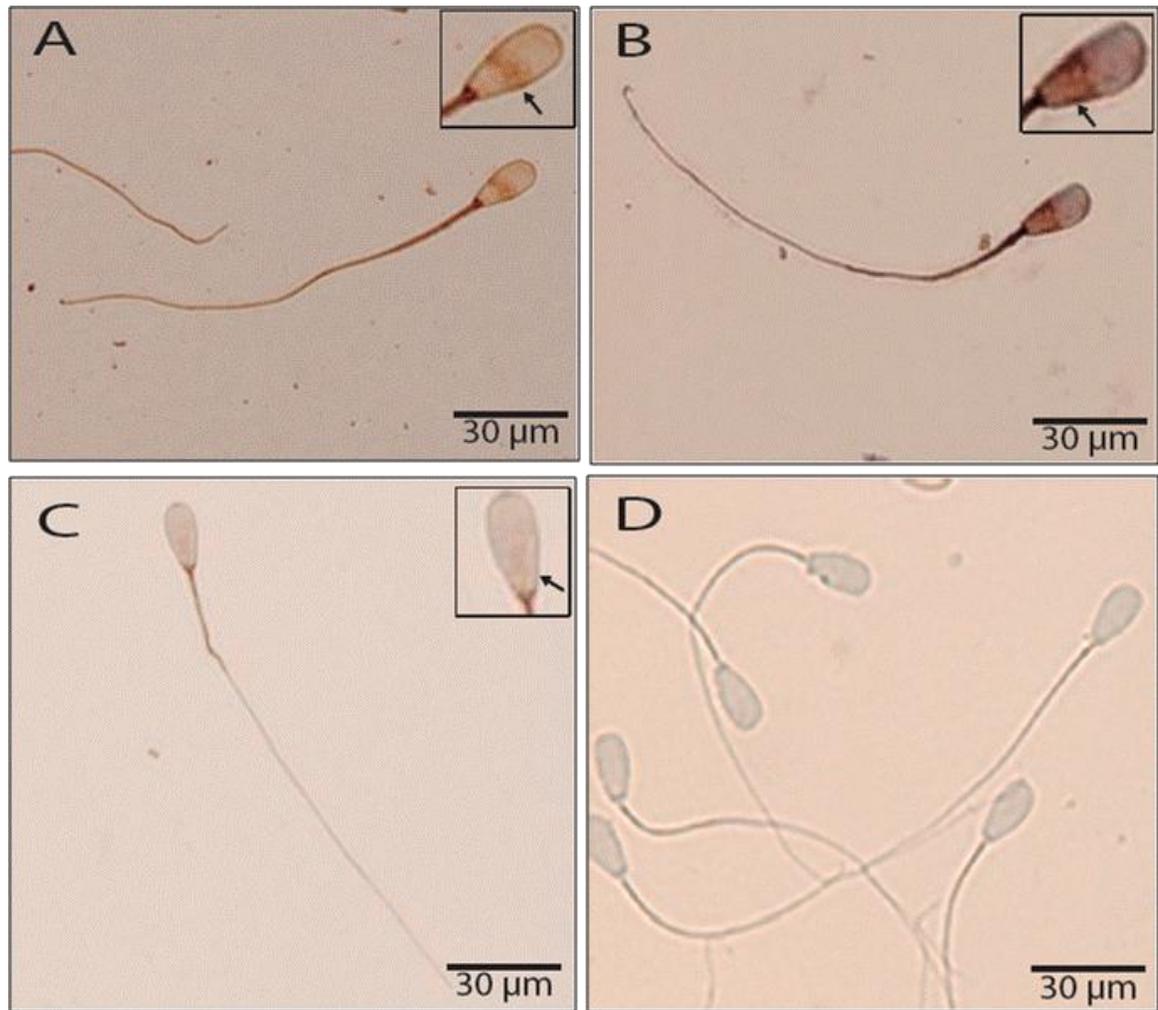
El análisis por inmunofluorescencia del patrón de localización de la PLC- $\zeta$  y de actina en los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide, mostró que en el espermatozoide no capacitado la primera se localiza en la región ecuatorial de la cabeza y a lo largo del flagelo, principalmente en la pieza media (Figura 13A), mientras que la actina-F se observa principalmente en la región ecuatorial de la cabeza y de manera difusa en el resto de la misma y a lo largo del flagelo, siendo más intensa la fluorescencia principalmente en pieza media (Figura 13B). En la figura 13C muestra la superposición de la marca fluorescente de PLC- $\zeta$  y de actina-F en las células espermática, observándose la colocación de ambas proteínas en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide y en la pieza media del flagelo.

En los espermatozoides capacitados y en los capacitados con RA, tanto PLC- $\zeta$  como actina-F fueron observadas a lo largo del flagelo, principalmente en pieza media, y en la cabeza; sin embargo la fluorescencia detectada fue muy tenue (datos no mostrados).

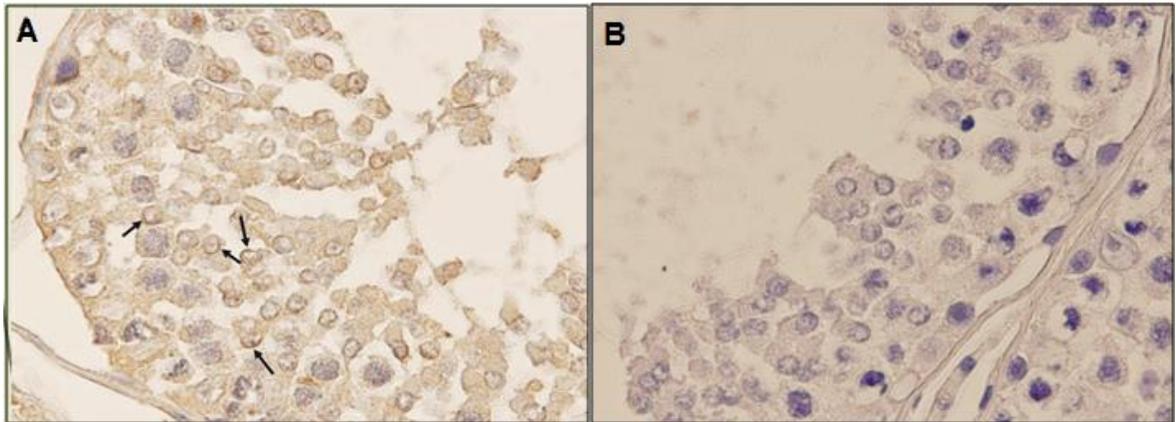


**Figura 13.** Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides no capacitados de bovino incubados con el anticuerpo anti PLC- $\zeta$  y con faloidina rodaminada. A) El anticuerpo anti PLC- $\zeta$  marcó la región ecuatorial de la cabeza (flecha punta cerrada) y pieza media del flagelo (flecha punta abierta). B) La faloidina rodaminada mostró una débil marca de actina-F en toda la cabeza espermática, siendo más marcada en la región ecuatorial (flecha punta cerrada) al igual que en la pieza media del flagelo (flecha punta abierta). C) Merge de la inmunofluorescencia de PLC- $\zeta$  y actina-F.

Al emplear la técnica de inmunocitoquímica (Cuadro 5) se observó que en los espermatozoides no capacitados (NC) la PLC- $\zeta$  se localizó principalmente en la región del ecuador ( $83.3\pm 0.9\%$ ) (al igual que lo observado por inmunofluorescencia), mientras que en los espermatozoides capacitados fue observada en la región postacrosomal ( $86.6\pm 0.7\%$ ), y en los capacitados con RA la inmunoreactividad de la PLC- $\zeta$  se encontró mayormente en la región postacrosomal y base del cuello ( $88.3\pm 0.7\%$ ), sin embargo la marca fue muy tenue; en los tres estados fisiológicos del espermatozoide se observó en la pieza media del flagelo, siendo más ligera la marca en los capacitados y con RA (Figura 14 A, B y C). Para esta prueba se utilizó como control positivo tejido de testículo de bovino (Figura 15 A y B).



**Figura 14.** Detección de la PLC- $\zeta$  ,por inmunocitoquímica, en espermatozoides de bovinos 60x. A. Espermatozoides no capacitados observándose a la PLC- $\zeta$  en la región del ecuador y pieza media. B. Espermatozoides capacitados con marca de la PLC- $\zeta$  en la región post-acrosomal y pieza media. C. Espermatozoides capacitados con RA donde disminuye la marca de la PLC- $\zeta$  en la región postacrosomal, pero se observa una intensa marca en la base del cuello y pieza media y D. Control negativo. Las flechas en los cuadros de la esquina superior derecha que muestra los aumentos de la cabeza, señalan la región donde se observa la marca de la PLC- $\zeta$ .



**Figura 15.** Localización de la PLC- $\zeta$  en testículo de bovino, mediante la técnica de inmunohistoquímica. En bovinos, existen 8 etapas (I-VIII) del ciclo del epitelio seminífero. A. La marca para PLC- $\zeta$  fue intensa en las espermatidas redondas en la etapa de formación del acrosoma (flechas). B. Control negativo.

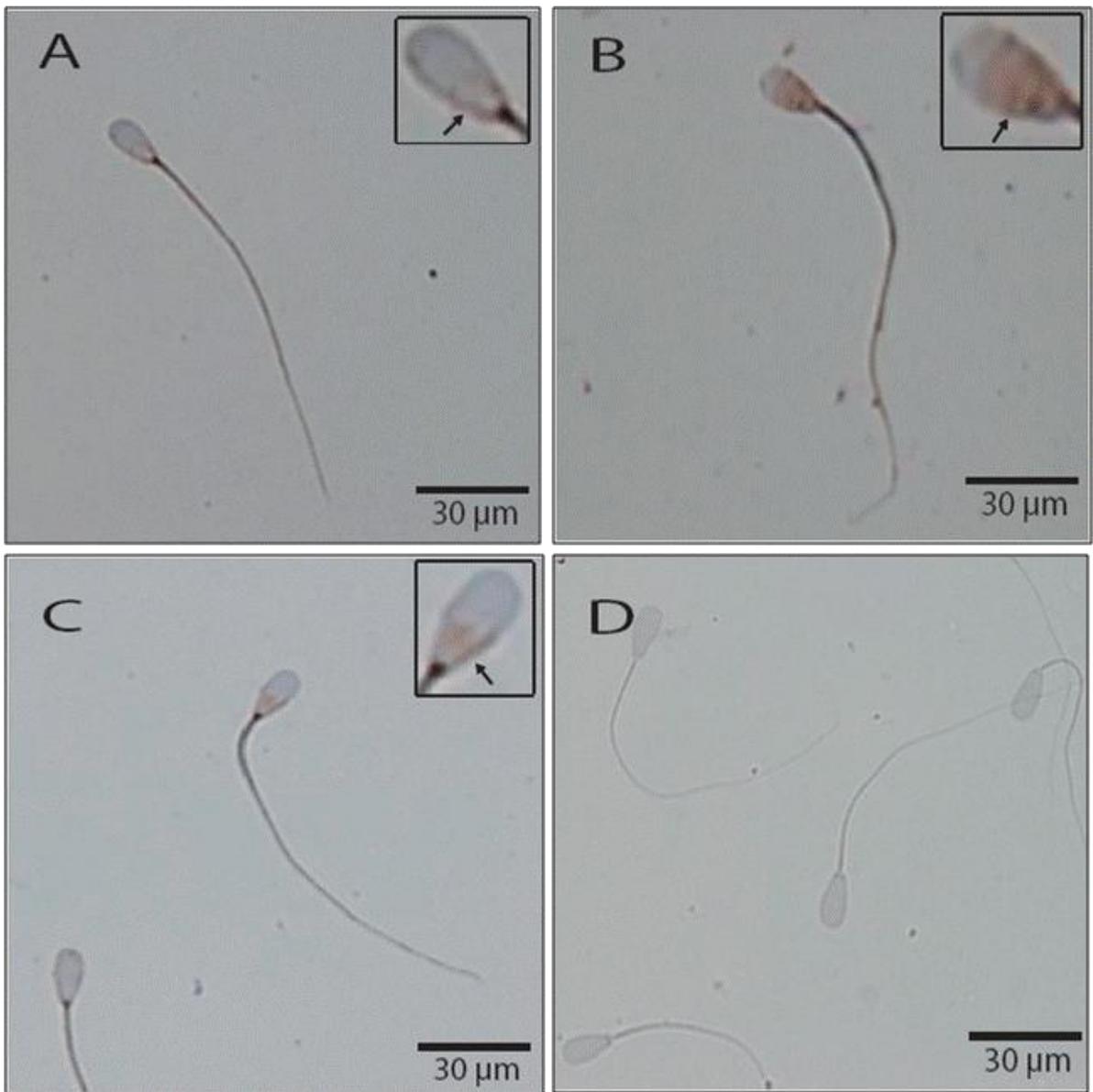
**Cuadro 5.** Localización de PLC- $\zeta$  en los espermatozoides de bovino no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal, evaluado por inmunocitoquímica.

	NC	C	RA
Localización	%	%	%
Ac	1.3 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	0	0
Ec	83.3 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	13.3 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>	2.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>
Pa	15.3 $\pm$ 0.8 <sup>c</sup>	86.6 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	9.0 $\pm$ 1.0 <sup>c</sup>
Pa <sub>mi</sub> y Bc	0	0	88.3 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>

Media  $\pm$  SEM (n=9).. NC = no capacitados; C = capacitados; RA = capacitados con reacción acrosomal; Ac = acrosomal; Ec = ecuatorial; Pa = post-acrosomal; Pa<sub>mi</sub> = post-acrosomal con menor intensidad; Bc = base del cuello. Columnas con diferente superíndice indica diferencia significativa con P < 0.001.

En el caso de actina, en los espermatozoides NC una marca de menor intensidad fue observada en la región postacrosomal, mientras que la marca fue más intensa en base del cuello y pieza media del flagelo (89 $\pm$ 0.6%) (Figura 16A); en los espermatozoides capacitados la marca en la región postacrosomal fue más intensa al igual que en la pieza media, observándose además una marca difusa en

el resto de la cabeza ( $90\pm 0.1\%$ ) (Figura 16B). En los espermatozoides capacitados con RA la marca presentada fue de menor intensidad en la región postacrosomal, base del cuello y pieza media ( $90\pm 0.7\%$ ) (Figura 16C) (Cuadro 6). El control negativo para actina se observa en la figura 16D. Cabe señalar que el anticuerpo utilizado reconoce ambos tipos de actina (F o G), sin embargo, los resultados obtenidos, sugieren que el anticuerpo pudiera estar identificando a actina-F, ya que se sabe que esta aumenta durante la capacitación y disminuye en la reacción acrosomal, lo que coincide con nuestros resultados.



**Figura 16.** Inmunocitoquímica de actina en espermatozoides de bovinos 60x. A. Espermatozoides no capacitados observándose en la base del cuello y pieza media del flagelo. B. En los espermatozoides capacitados se observa marca muy débil para la actina en la región post-acrosomal y pieza media del flagelo. C. En los espermatozoides capacitados con RA solo se observa una marca en la base del cuello. D. Control negativo. Las flechas en los cuadros de la esquina superior derecha que muestra los aumentos de la cabeza, señalan la región donde se observa la marca de la actina.

**Tabla 6.** Localización de actina en los espermatozoides de bovino no capacitados, capacitados y capacitados con reacción acrosomal, evaluado por inmunohistoquímica.

	NC	C	RA
Localización	%	%	%
Pa tenue, Cu y Pm	89.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	9.44 ± 0.7 <sup>b</sup>	0
Pa y cabeza difusa	11 ± 0.6 <sup>b</sup>	90.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	10.0 ± 0.7 <sup>a</sup>
Cu, Pm y cabeza tenue	0	0	90.0 ± 0.7 <sup>b</sup>

Media ± SEM (n=9). NC = no capacitados; C = capacitados; RA = capacitados con reacción acrosomal; Pa = post-acrosomal; Cu = cuello; Pm = pieza media.

Columnas con diferente superíndice indica diferencia significativa con P < 0.001.

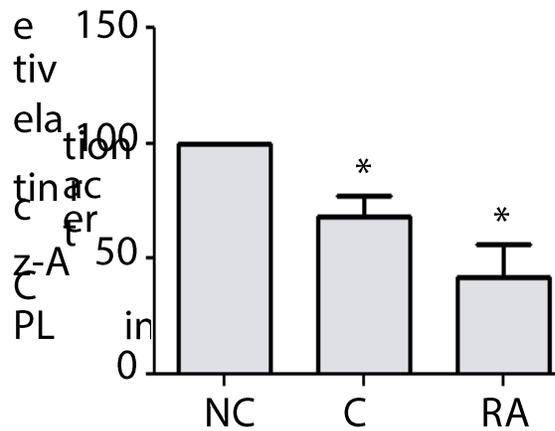
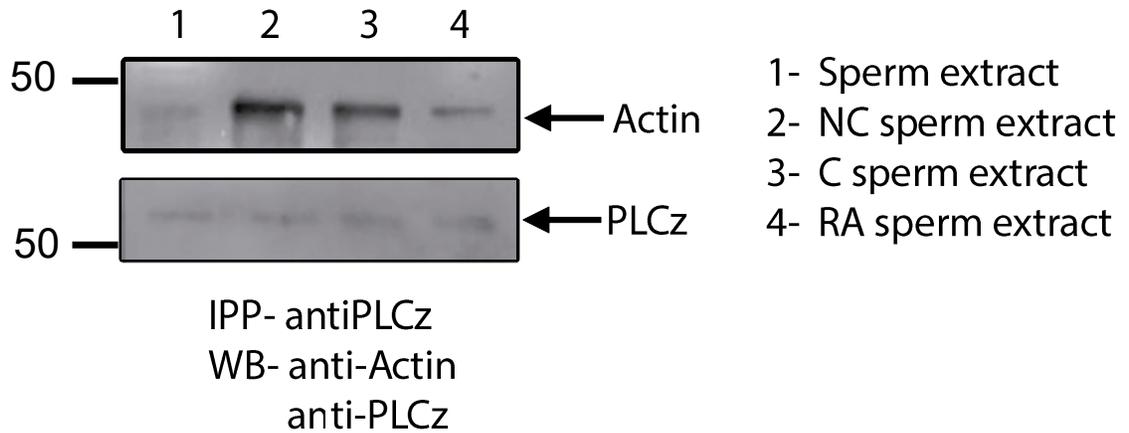
## 6.2 IDENTIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA PLC- $\zeta$ Y ACTINA EN EXTRACTOS DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT.

### INMUNOPRECIPITACIÓN DE PLC- $\zeta$ CON ACTINA-F

Ya que el cambio de patrón de localización de la PLC- $\zeta$  y de la actina depende del proceso de capacitación y reacción acrosomal que sufre el espermatozoide, además de que los resultados inmunocitoquímica indicaban la existencia de una interacción entre ambas proteínas se decidió llevar a cabo la inmunoprecipitación de ambas proteínas. Como se observa en la figura 17, los resultados mostraron que la PLC- $\zeta$  interaccionó con la actina en los tres estados fisiológicos del espermatozoide.

La densitometría de las bandas obtenidas por Western blot muestra la interacción de ambas proteínas. Teniendo que existe una interacción aparentemente mayor de la PLC- $\zeta$  con la actina en los espermatozoides NC (100%), y dicha interacción va disminuyendo conforme el espermatozoide lleva a

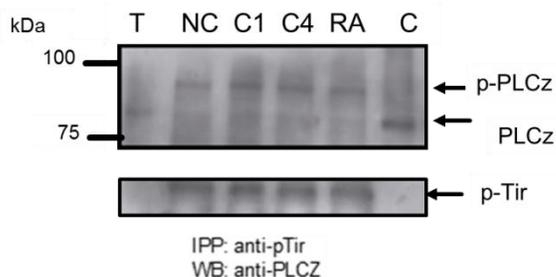
cabo la capacitación (68.33% vs NC) y decrece aún más cuando sufre la reacción acrosomal (42.33% vs NC)



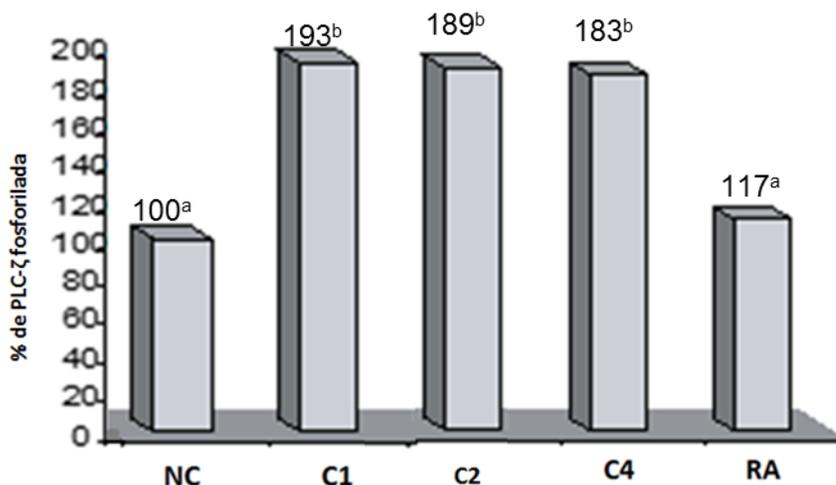
**Figura 17.** Inmunoprecipitación de la PLC- $\zeta$  revelado con actina de los extractos obtenidos de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide. (1- Extracto de espermatozoides; 2- Extracto de espermatozoides no capacitados; 3- Extracto de espermatozoides capacitados; 4- Extracto de espermatozoides capacitados con reacción acrosomal. Densitometría que muestra la interacción relativa de la PLC- $\zeta$  con la Actina.

### 6.3 IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PLC- $\zeta$ EN EXTRACTOS DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE INMUNOPRECIPITACIÓN Y WESTERN BLOT.

Se sabe que el patrón de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina cambia durante la capacitación en diversas especies entre ellas el bovino (Bernabó y *col.*, 2011); en base a esto, se decidió evaluar si existe una fosforilación de la PLC- $\zeta$  en residuos de tirosina, para lo cual se llevó a cabo la inmunoprecipitación con un anticuerpo antifosfotirosina y se reveló con PLC- $\zeta$  (Figura 18). Los resultados indican que la PLC- $\zeta$  se fosforila en residuos de tirosina y que durante la capacitación incrementa su fosforilación. Sin embargo la densitometría del WB nos muestra que cuando el espermatozoide alcanza la RA el grado de fosforilación disminuyó, siendo esto muy similar a los espermatozoides no capacitados (Figura 19).



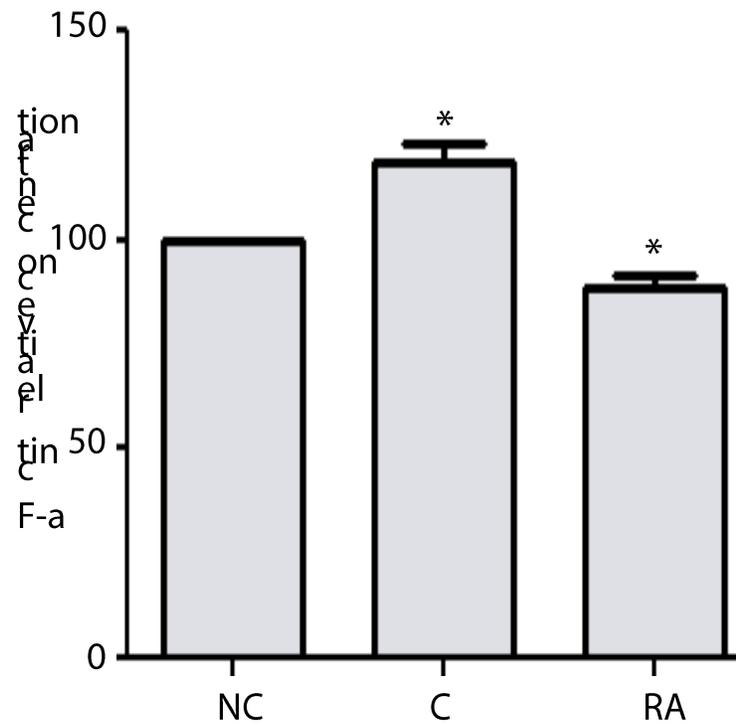
**Figura 18.** Inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-fosfotirosina (pTir) revelado con PLC- $\zeta$  de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide. (T- testículo; NC- espermatozoides no capacitados; C1 y 4- espermatozoides capacitados 1, y 4 hr; RA- espermatozoides capacitados con reacción acrosomal; C- cerebro).



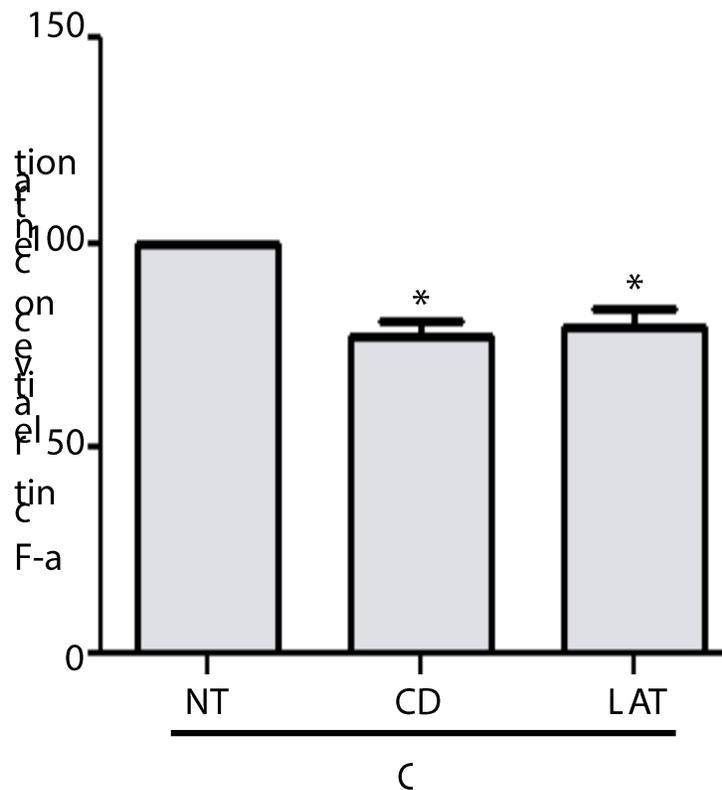
**Figura 19.** Densitometría de la inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-pTir revelado con PLC-ζ de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide que muestra el porcentaje de PLC-ζ fosforilada en residuos de tirosina. Donde C1, C2 y C4 son espermatozoides capacitados a la una, dos y cuatro horas.

#### 6.4 AFINIDAD DE LA PLC-ζ POR ACTINA-F O ACTINA-G

Una vez que observamos la interacción de la actina con la PLC-ζ, se decidió averiguar si era la actina-F la que estaba orquestando la reubicación de la PLC-ζ, por lo que en principio se determinó la cantidad de actina polimerizada antes, durante y después del proceso de capacitación (Figura 20); la valoración de la concentración de actina-F indica que el porcentaje mayor fue para los espermatozoides capacitados (118.25 vs 100% NC) y el menor para los espermatozoides con RA (88.5% vs 100% NC). Como siguiente punto al realizar los ensayos con las toxinas citocalasina-D y Latrunculina, para inhibir la polimerización de actina,, los resultados obtenidos (Figura 21), mostraron que el tratamiento con la citocalasina-D tuvo un mejor efecto sobre la inhibición de la polimerización de filamentos de actina (77%) que la Latrunculina (79.75%), por lo que se decidió utilizar únicamente la citocalasina-D en el proceso de capacitación para determinar si el efecto de inhibir la polimerización de filamentos de actina tendría un impacto en la interacción de esta con la PLC-ζ.

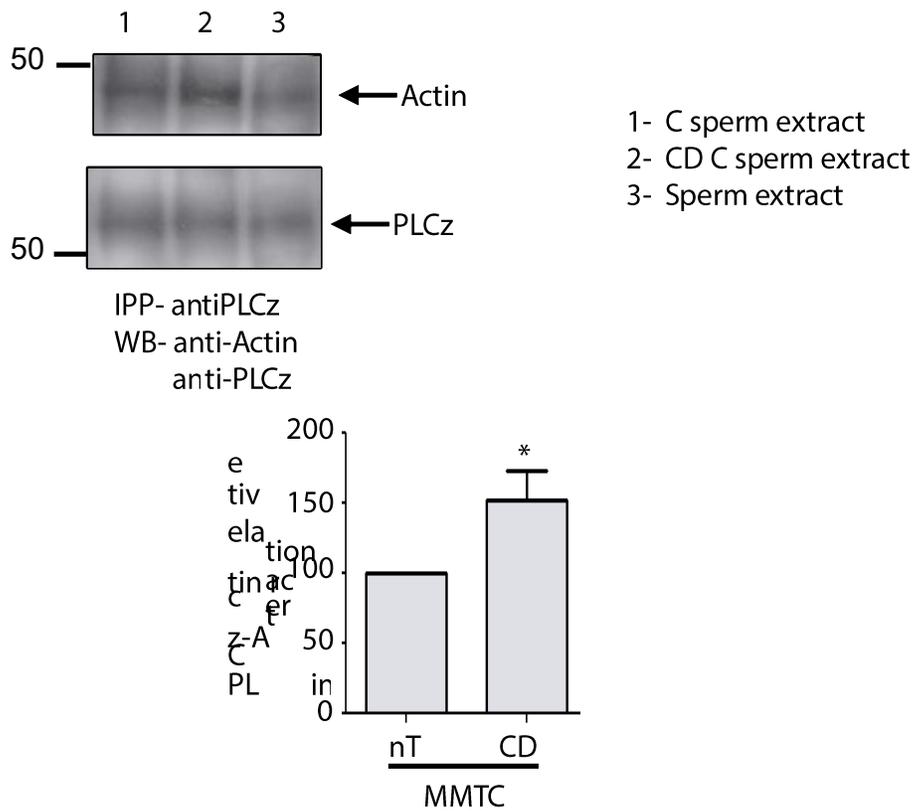


**Figura 20.** Grafica que muestra el porcentaje de concentración relativa de Actina-F. (NC- Espermatozoides No Capacitados, C- Espermatozoides Capacitados y RA- Espermatozoide capacitados con Reacción Acrosomal).



**Figura 21.** Grafica que muestra el porcentaje de concentración relativa de Actina-F durante la capacitación espermática (C). (NT- espermatozoides no tratados, CD- espermatozoides tratados con citocalasina-D, LAT- espermatozoides tratados con latrunculina).

Los resultados obtenidos por inmunoprecipitación de los extractos proteicos obtenidos del tratamiento de los espermatozoides con Citocalasina-D (Figura 22) durante el proceso de capacitación, mostraron que la interacción entre la PLC- $\zeta$  y la actina aumentó considerablemente cuando los espermatozoides fueron tratados con la droga 152.33% comparado con el 100% de los no tratados (NT), por lo que la interacción, que se observó en los tres diferentes estados fisiológicos del espermatozoide por la inmunoprecipitación puede atribuirse mayoritariamente a la Actina-G que a la Actina-F, ya que unos de los principales efectos de la citocalasina-D es inhibir la polimerización de actina, de este modo existe un mayor porcentaje de actina en su estado globular.

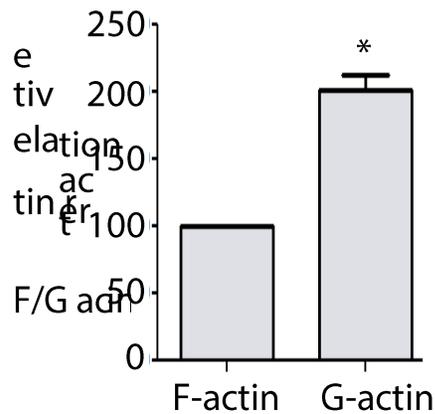
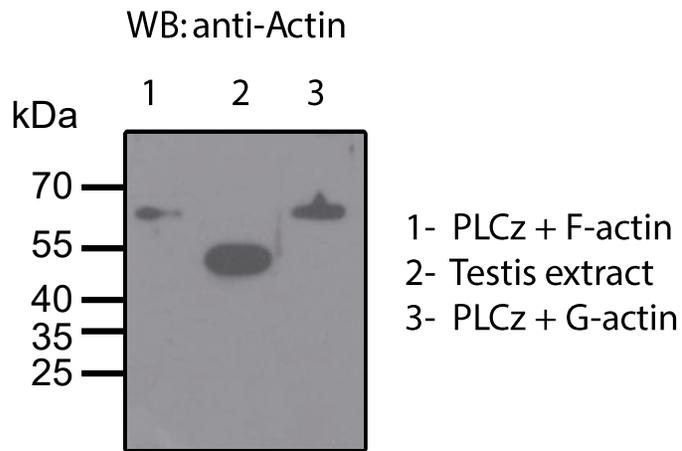
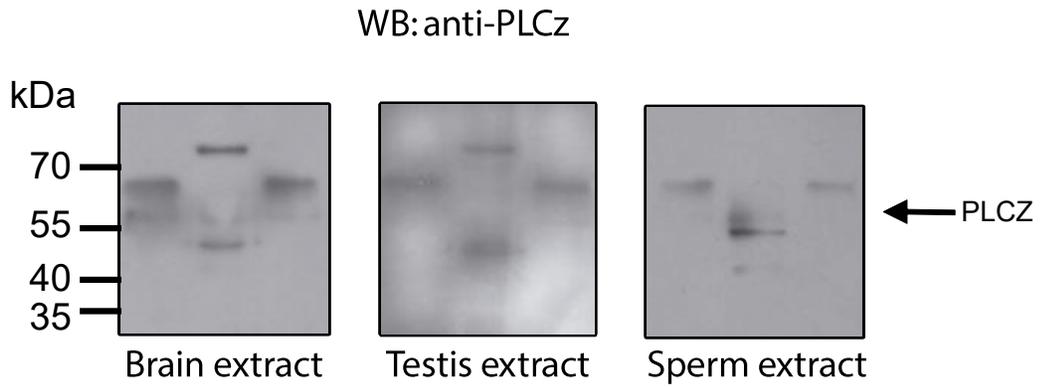


**Figura 22.** Inmunoprecipitación de la PLC- $\zeta$  revelado con actina de los extractos obtenidos a partir de espermatozoides capacitados con o sin tratamiento con Citocalasina-D (1- Extracto de espermatozoides capacitados sin Citocalasina-D; 2- Extracto de espermatozoides capacitados con Citocalasina-D; 3- Extracto de espermatozoides). Densitometría que muestra la interacción relativa de la PLC- $\zeta$  con la Actina en el proceso de capacitación del grupo control: no tratados con citocalasina-D y el grupo tratado con citocalasina-D.

## 6.5 IDENTIFICACIÓN DE LA AFINIDAD DE LA PLC- $\zeta$ POR ACTINA-F O ACTINA-G MEDIANTE FAR WESTERN.

Después de obtener los resultados con el tratamiento de Citocalasina-D, se decidió comprobar si existe una mayor interacción entre la PLC- $\zeta$  y la forma globular de la actina. Por lo que se decidió realizar un Far Western, el cual nos permitiría corroborar con qué tipo de actina tiene mayor afinidad la PLC- $\zeta$ . Para el Far Western, utilizamos diferentes controles para la PLC- $\zeta$  como son cerebro, testículo y extracto de espermatozoides. Los resultados de la densitometría que se muestran en la figura 23, indican que existe una mayor interacción relativa entre la

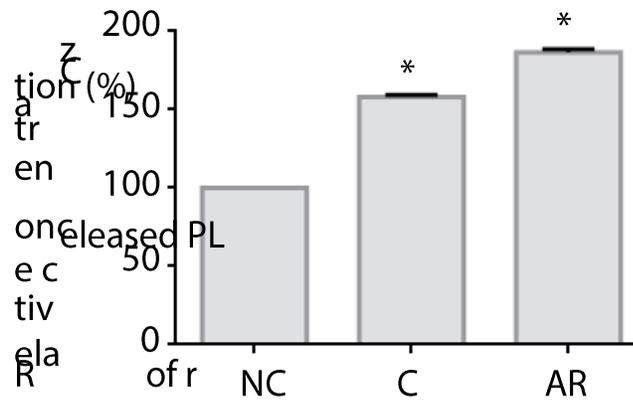
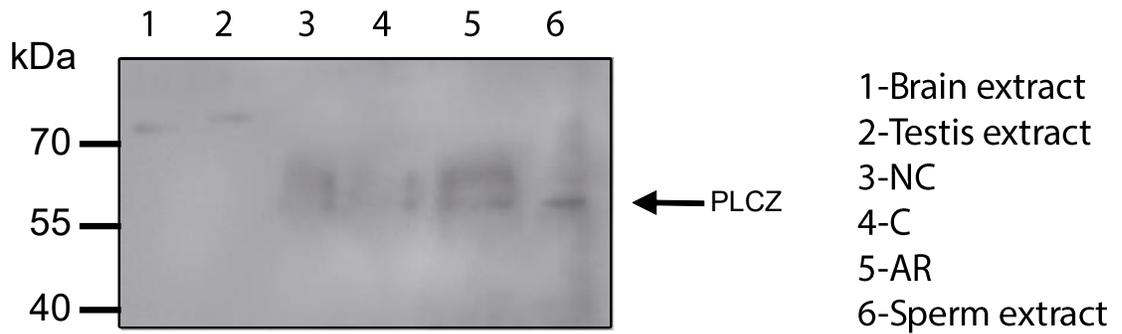
PLC- $\zeta$  y la Actina-G (201.66%) que con la Actina-F (100%). Estos resultados corroboran el aumento de la interacción entre la PLC- $\zeta$  y la actina, cuando los espermatozoides fueron tratados con la citocalasina-D durante la capacitación. Por lo que podemos decir que la PLC- $\zeta$  tiene una mayor afinidad con el estado no filamentoso de la actina.



**Figura 23.** Far Western de la PLC- $\zeta$  revelado con actina. Los western blot de la parte superior, muestran los diferentes controles que se utilizaron para la PLC- $\zeta$  (Extracto de cerebro, extracto de testículo y extracto de espermatozoides, donde carril 1- Péptido de la PLC- $\zeta$  con actina-F, 2- Extracto de control y 3- Péptido de la PLC- $\zeta$  con actina-G). Densitometría que muestra la interacción relativa de la PLC- $\zeta$  con la Actina-F o la Actina-G.

## **6.6 IDENTIFICACIÓN DE LA FOSFOLIPASA C- $\zeta$ EN SOBRENADANTES DEL MEDIO DE ESPERMATOZOIDES DE BOVINO POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA POR AFINIDAD Y WESTERN BLOT.**

Los resultados obtenidos por la prueba de co-inmunoprecipitación, el tratamiento con citocalasina-D y por far western, indican que la interacción de la PLC- $\zeta$  y el citoesqueleto de actina se da en la forma globular de esta última proteína, mientras que los resultados por inmunodetección mostraron una disminución en el marcaje de ambas proteínas en los espermatozoides capacitados con RA, lo que hace pensar que probablemente la disminución en la interacción pudiera deberse a que una porción de la PLC- $\zeta$  se estaba enmascarando o liberando al medio durante la capacitación, por lo que se decidió analizar los sobrenadantes de cada grupo experimental. Para ello primeramente se hizo un aislamiento de la PLC- $\zeta$  por medio de cromatografía de afinidad (gel figura suplementaria) y se realizó el western blot para identificarla, los resultados de la figura 24 nos muestran que una parte de la PLC- $\zeta$  se encuentra en los sobrenadantes de los tres grupos experimentales, y que la cantidad de PLC- $\zeta$  en el sobrenadante aumenta conforme se da el proceso de capacitación (158% vs 100% NC) y reacción acrosomal (186.5% vs 100% NC).



**Figura 24.** Western Blot identificando la PLC- $\zeta$  en los sobrenadantes después del procedimiento de aislamiento por cromatografía de afinidad. El western blot muestra la PLC- $\zeta$  se utilizaron diferentes controles (1- extracto de cerebro, 2-extracto de testículo, 3- sobrenadante de espermatozoides no capacitados, 4- sobrenadante de espermatozoides capacitados, 5- sobrenadante de espermatozoides capacitados con reacción acrosomal y 6- extracto de espermatozoides). Densitometría que muestra el porcentaje de concentración relativa liberada de PLC- $\zeta$  al sobrenadante en los diferentes estados fisiológicos.

## 7 DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo reportan por primera vez que existe una interacción entre la PLC- $\zeta$  y la actina en los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide de bovino, no teniendo conocimiento hasta la fecha de que exista un reporte que muestre la interacción de ambas proteínas en ninguna especie.

Los resultados por inmunodetección para la localización de PLC- $\zeta$ , en espermatozoides NC, C y con RA mostraron un cambio en el patrón de localización de la proteína, ya que de la región ecuatorial observada en los espermatozoides NC en los C paso a la región post-acrosomal y en los espermatozoides capacitados con RA aunque permaneció en la región postacrosomal esto fue con menor intensidad en la marca, además de que se presentó marca en la base del cuello en todos los estados fisiológicos del espermatozoide. grupos experimentales. Estos resultados coinciden con los reportados por Young y *col.*, 2009 , quienes observaron cambios de localización de la PLC- $\zeta$  en espermatozoides de ratón y hámster en los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide; sin embargo los investigadores reportan que en los espermatozoides no capacitados la PLC- $\zeta$  se localizó en la región del acrosoma, mientras que en los espermatozoides capacitados la marca se localizó con menor intensidad en acrosoma y mayormente en la región post-acrosomal, y que en los espermatozoides tratados con ionoforo de calcio se observó una marca con menor intensidad únicamente en la región post-acrosomal (esto parece coincidir con nuestros resultados); la PLC- $\zeta$  que permaneció en la región post-acrosomal de la TP posiblemente corresponda a la que hace alusión Kashir y *col.*, (2014), la resistente a la extracción por detergentes.

La disminución de la inmunoreactividad de la PLC- $\zeta$ , observada en el presente estudio, en espermatozoides capacitados con reacción acrosomal

comparada con los no capacitados pudiera deberse a un movimiento de la PLC- $\zeta$  dentro de la región postacrosomal durante la capacitación, es decir a un cambio en la accesibilidad del anticuerpo a la PLC- $\zeta$ . Sin embargo, también pudiera deberse a cambios conformacionales que sufra la proteína durante el proceso de capacitación o a cambios en la interacción con otras proteínas (Adeoya-Osiguwa y Fraser 2002; Yeung y *col.*, 2001). Otra alternativa que pudiera explicar la disminución de la señal, es la propuesta por Grasa y *col.*, 2008, quienes mencionan la existencia de PLC- $\zeta$  en el acrosoma del espermatozoide de humano; lo cual también explicaría la presencia de PLC- $\zeta$  en los sobrenadantes que fueron evaluados del medio de capacitación y de RA en el presente trabajo. Aunque en este estudio no hubo inmunoreactividad en el acrosoma, Yoon y Fissore (2007) encontraron marca para la proteína en dicha estructura del espermatozoide de bovino, pero mencionan que posiblemente se debió a una marca inespecífica. Por otra parte, al igual que los otros autores, la marca de PLC- $\zeta$  observada en la región postacrosomal fue más evidente en los espermatozoides capacitados, no así en los espermatozoides con reacción acrosomal; también difiere en cuanto a que el patrón de localización de la proteína es el segmento ecuatorial no se mantuvo después del proceso de capacitación y RA, de hecho encontramos una pérdida o disminución de la proteína después de ambos procesos, por lo que estos hallazgos apoyan los cambios en la dinámica que experimenta la proteína en su patrón de localización durante estos procesos de pre-fertilización. Es decir, los cambios en el patrón de localización que muestra la PLC- $\zeta$  probablemente se deban a que se esté preparando para jugar un papel en la activación del ovocito. Además en este trabajo, en los tres estados fisiológicos del espermatozoide se identificó a la PLC- $\zeta$  en base del cuello y pieza media del flagelo; los múltiples patrones de localización de la PLC- $\zeta$  han llegado a sugerir diferentes funciones, no limitándola a la activación del ovocito, aunque esta teoría permanece sin esclarecerse y representa un reto muy interesante para futuras investigaciones (Amdani y *col.*, 2016).

En cuanto al patrón de localización de la actina, se ha reportado que durante la capacitación y la reacción acrosomal, existen cambios en la dinámica del citoesqueleto (Jagan-Mohanarao y Atreja, 2011; Breitbart y col., 2005; Kierszenbaum y col., 2007). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los reportados por Brener y col., 2003 quienes encontraron que conforme se da la capacitación *in vitro* de espermatozoides de carnero, toro, ratón y humanos existe un aumento tiempo dependiente en la formación de actina-F primero en la pieza intermedia y más tarde en la cabeza del espermatozoide, mientras que en los espermatozoides con reacción acrosomal reportan que disminuyó la proporción de actina-F. Cabe señalar que en este estudio el anticuerpo utilizado para la inmunodetección de la actina reconoce tanto actina-G como actina-F, en donde se observó siempre una marca más intensa conforme se llevó a cabo la capacitación, la cual disminuyó drásticamente en los espermatozoides capacitados con RA, por lo que posiblemente el marcaje identificado en este trabajo pudiera ser principalmente actina-F.

Nuestros resultados mostraron que existió un aumento en el porcentaje de fosforilación de la PLC- $\zeta$  durante el proceso de capacitación, la cual disminuyó en los espermatozoides capacitados con reacción acrosomal. Se sabe que, la PLC- $\zeta$  ([www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org)) sufre fosforilación en residuos de tirosina, en los espermatozoides de ratón, humano y rata, siendo en los residuos de tirosina 494, 457 y 493, respectivamente. Young et. al., 2009 demostró por análisis filogenético que la PLC- $\zeta$  es una proteína muy conservada entre las especies, manteniendo un 77% de aminoácidos idénticos y un 85% de aminoácidos similares entre las diversas especies. Nuestros resultados apoyan que la PLC- $\zeta$ , en el caso del espermatozoide bovino también puede ser fosforilada en residuos de tirosina.

Una de las vías de señalización importante durante la capacitación espermática, que involucra la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, es la vía ACs/AMPC/PKA (adenilato ciclasa soluble/ adenosin monofosfato cíclico/ Protein Kinasa A), en donde la activación de la PKA modula la respuesta de los canales de calcio, los cuales producen cambios en el potencial de membrana e

incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . PKA fosforila diversa proteínas en residuos de serina y treonina, activando, directa o indirectamente varias proteínas cinasas y/o inhibiendo a fosfatasas, lo que finalmente producirá un aumento en la fosforilación de residuos de tirosina en las proteínas blanco. Se ha demostrado que la inhibición de PKA bloquea el inicio de la fosforilación en residuos de tirosina. Sin embargo recientemente se ha sugerido que la familia Src tirosina cinasa (SFKs) media el incremento de fosforilación en residuos de tirosina en el espermatozoide de ratón, humano y bovino (Ickowicz y col., 2012). Por lo que sería interesante investigar si este mecanismo participa en la fosforilación de la PLC- $\zeta$  observada en el presente estudio.

La presencia de PLC- $\zeta$  fosforilada en los extractos, correspondientes a los espermatozoides no capacitados, puede ser atribuido a una capacitación espermática espontánea (de Lamirande y col., 1993). En este estudio las muestras no se trabajaron de forma inmediata, ya que estas se mantuvieron en el medio NKM aproximadamente por 10 min. De hecho al evaluar el estado fisiológico de las células antes de ser sometidas a la capacitación se encontró que entre el 60-70% de las mismas mostraron el patrón característico de no capacitados por la prueba de CTC (Cuadro 4), por lo que la presencia de la PLC- $\zeta$  fosforilada podría corresponder al porcentaje restante. En cuanto al aumento de la PLC- $\zeta$  fosforilada en los extractos de los diferentes tiempos del proceso de capacitación, Bernabó y col., 2011, señala que en diversas especies, como el humano, ratón, bovino, cerdo, hámster y gato, el patrón de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina cambia durante la capacitación. Adicionalmente, el hecho de que la cantidad de la PLC- $\zeta$  fosforilada disminuya durante la capacitación espermática, probablemente se deba a que se esté liberando y que dicha liberación dependa de la fosforilación; por lo que es probable que esta subpoblación pudiera ejercer un efecto en el ovocito. Estudios recientes en ovocitos de ratón muestran por inmunocitoquímica que la PLC- $\zeta$  puede estar localizada en pequeñas vesículas (no mayores a  $1\mu\text{m}$ ) en el citoplasma del ovocito, mientras que el  $\text{PIP}_2$  también aparece en otras vesículas (Kashir y col., 2014), por lo cual podríamos sugerir que

probablemente la PLC- $\zeta$  liberada por el espermatozoide pudiera ser introducida vía la formación de vesículas al citoplasma del huevo. A este respecto existe el reporte de que la existencia de una pequeña fracción de la PLC- $\zeta$  es capaz de inducir una serie de oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  largas y sostenidas cuando es introducida en el huevo (Kashir y *col.*, 2014).

Como es sabido, durante la capacitación y la reacción acrosomal se reportan cambios en la dinámica del citoesqueleto de actina (Jagan-Mohanarao y Atreja, 2011; Breitbart y *col.*, 2005; Kierszenbaum y *col.*, 2007). Al investigar la posible relación de la PLC- $\zeta$  con la actina, nuestros resultados mostraron una interacción de la PLC- $\zeta$  con la actina al inicio del proceso de capacitación, mientras que dicha interacción disminuyó al avanzar la capacitación y en los espermatozoides con RA. La disminución de la interacción observada entre ambas proteínas al finalizar la capacitación pudiera explicarse con lo señalado por Fujimoto y *col.*, 2004, quienes encontraron dos poblaciones de PLC- $\zeta$ , una periférica libre asociada a la matriz perinuclear (MPN), cercana al acrosoma y otra integral (resistente a la extracción con detergentes), especulando que la PLC- $\zeta$  asociada a la matriz perinuclear podría ser la responsable de la activación del ovocito, pues podría ser fácilmente liberada y/o retirada, mientras que la otra posiblemente esté involucrada en modular algunos aspectos de la función pronuclear. Nosotros sugerimos que la aparición de la población de PLC- $\zeta$  asociada a la MPN posiblemente se deba a que pierde su asociación con la actina durante el proceso de capacitación y ello cause la disminución entre la interacción de ambas proteínas observada en este trabajo, mientras que la población integral (post-acrosomal) continúe interactuando con actina. Por otro lado Kashir y *col.*, 2014 sugieren que la PLC- $\zeta$  puede ser encontrada en forma soluble e insolubles en la cabeza del espermatozoide.

Se sabe que antes del proceso de capacitación y reacción acrosomal, diversas proteínas regulan el citoesqueleto de actina (Breitbart y Finkelstein, 2015), tal es el caso de la gelsolina, la cual durante el proceso de capacitación

cambia de localización del flagelo a la cabeza. Posiblemente la mayor afinidad por la actina-G, que observamos en nuestros resultados, de deba a que la PLC- $\zeta$  podría estar participando tempranamente durante la capacitación, no descartando la posibilidad de que posiblemente juegue el papel de una proteína reguladora del citoesqueleto de actina, ya que comparte un promotor bidireccional con el gen alfa 3 de la proteína de cobertura de actina de la línea Z muscular (CAPZA 3, capping muscle Z-line alpha 3 por sus siglas en inglés) (Amdani et al., 2016), lo que a su vez le permita regular su actividad.

Ya que este péptido mostró mayor afinidad por actina-G, decidimos valorar si compartía alguna similitud con las proteínas de unión a actina (gelsolina y timosina pues son proteínas con mayor afinidad por la actina-G), empleando para ello un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés); los resultados indicaron que existe un 33 % de similitud con gelsolina mientras que con timosina ninguna. De manera particular, la secuencia del péptido de la PLC- $\zeta$  que se utilizó en este trabajo para la prueba de FW constó de 50 aminoácidos, correspondiendo a los aminoácidos 350-400, por lo que según la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondía a una parte de la región linker X-Y y de la región inicial del dominio PI-PLC Y-box (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C Y domain, por sus siglas en inglés). La función principal de estos dominios es la actividad catalítica de la proteína, es decir la hidrólisis de fosfoinosítidos.

Así, nuestros hallazgos apoyan tanto la relevancia fisiológica de la PLC- $\zeta$  en el proceso de activación del ovocito, pero sobre todo revelan el papel potencial que puede jugar el citoesqueleto de actina en el mecanismo de regulación o activación de la proteína y/o viceversa. Por lo que sería de gran interés en un futuro realizar estudios para determinar si la disminución de la PLC- $\zeta$  se deben a cambios en la interacción de la proteína con la actina, si esta ayuda a prepararla para su liberación ya sea hacia fuera del espermatozoide y una vez dentro del citoplasma del huevo. También sería de importancia determinar el mecanismo

que participa en la fosforilación de la PLC- $\zeta$  durante el proceso de capacitación y si ello produce cambios en la actividad de la proteína o altera su interacción con la actina y que nos puede decir ello de otro papel funcional de la proteína en el espermatozoide.

## 8 CONCLUSIONES

- 1.- El cambio de localización de la PLC- $\zeta$  y la actina depende del estado fisiológico del espermatozoide.
- 2.- La PLC- $\zeta$  interacciona con la actina y esta interacción depende del proceso de capacitación y reacción acrosomal.
- 3.- La PLC- $\zeta$  se fosforila en residuos de tirosina, y esta fosforilación incrementa durante la capacitación y disminuye en la reacción acrosomal.
- 4.- La PLC- $\zeta$  interacciona con la actina G y parece ser dependiente del estado fisiológico del espermatozoide
- 5.- Una cantidad de la PLC- $\zeta$  es liberada durante el proceso de capacitación y RA al medio.

## 9 PERSPECTIVAS

1.- Agregar al medio de capacitación un inhibidor de tirosin cinasas. Para valorar si la fosforilación de la PLC- $\zeta$  interfiere en la interacción con la actina.

2.- Utilizar una DNasa que reconoce a actina-G para verificar la interacción con la PLC- $\zeta$  tanto por inmunolocalización como por inmunoprecipitación de los diferentes estados fisiológicos del espermatozoide.

## 10 LITERATURA CITADA

1. ADEOYA-OSIGUWA, S. A. & FRASER, L. R. 2002. Capacitation state-dependent changes in adenosine receptors and their regulation of adenylyl cyclase/cAMP. *Mol Reprod Dev*, 63, 245-55.
2. AMDANI, S. N., YESTE, M., JONES, C. & COWARD, K. 2016. Phospholipase C zeta (PLCzeta) and male infertility: Clinical update and topical developments. *Adv Biol Regul*, 61, 58-67.
3. AUSTIN, C. R. 1951. Activation and the correlation between male and female elements in fertilization. *Nature*, 168, 558-9.
4. AUSTIN, C. R. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170, 326.
5. AUSTIN, C. R. & BISHOP, M. W. 1958. Capacitation of mammalian spermatozoa. *Nature*, 181, 851.
6. AZAMAR, Y., URIBE, S. & MUJICA, A. 2007. F-actin involvement in guinea pig sperm motility. *Mol Reprod Dev*, 74, 312-20.
7. BANNO, Y., ITO, Y., OJIO, K., KANOH, H., NAKASHIMA, S. & NOZAWA, Y. 1996. Membrane-associated phospholipase D activity in neural cell line PC12. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 14, 237-43.
8. BEARER, E. L. & FRIEND, D. S. 1982. Modifications of anionic-lipid domains preceding membrane fusion in guinea pig sperm. *J Cell Biol*, 92, 604-15.
9. BEDFORD, J. M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod Suppl*, 2, 128-58.
10. BEDFORD, J.M., 1975. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis., In: Hamilton D.W, G.R.O. (Ed.), In Handbook of physiology. Endocrinology, American Physiology Society., Washington, pp. 303-317.
11. BEDFORD, J. M. 2006. Why do penetrating sperm create an oblique path in the zona pellucida? *Reproduction*, 131, 23-5.

12. BEDFORD, J. M. & CALVIN, H. I. 1974. The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool*, 188, 137-55.
13. BELLVE', A.R, & O'BRIEN, D. A. 1983. The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. In: Hartmann JF editor. Mechanism and control of animal fertilization. New York; Academic Press. p 55–137.
14. BERNABO, N., BERARDINELLI, P., MAURO, A., RUSSO, V., LUCIDI, P., MATTIOLI, M. & BARBONI, B. 2011. The role of actin in capacitation-related signaling: an in silico and in vitro study. *BMC Syst Biol*, 5, 47.
15. BLANDAU, R. J. & RUMERY, R. E. 1964. The Relationship of Swimming Movements of Epididymal Spermatozoa to Their Fertilizing Capacity. *Fertil Steril*, 15, 571-9.
16. BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
17. BRAVO, M. M., APARICIO, I. M., GARCIA-HERREROS, M., GIL, M. C., PENA, F. J. & GARCIA-MARIN, L. J. 2005. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 71, 88-96.
18. BREITBART, H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 49, 321-7.
19. BREITBART, H., COHEN, G. & RUBINSTEIN, S. 2005. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*, 129, 263-8.
20. BREITBART, H. & FINKELSTEIN, M. 2015. Regulation of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction by PIP 2 and Actin Modulation. *Asian J Androl*, 17, 597-600.
21. BRENER, E., RUBINSTEIN, S., COHEN, G., SHTERNALL, K., RIVLIN, J. & BREITBART, H. 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during

- mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*, 68, 837-45.
22. CAMATINI, M., COLOMBO, A. & BONFANTI, P. 1991. Identification of spectrin and calmodulin in rabbit spermiogenesis and spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 28, 62-9.
  23. CHENOWETH, P., 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. In Youngquist, In: R.S. (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. , Saunders., pp. 217-229.
  24. CLARKE, G. N. & YANAGIMACHI, R. 1978. Actin in mammalian sperm heads. *J Exp Zool*, 205, 125-32.
  25. COOPER, T. G. 1998. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl*, 53, 119-36.
  26. COX, L. J., LARMAN, M. G., SAUNDERS, C. M., HASHIMOTO, K., SWANN, K. & LAI, F. A. 2002. Sperm phospholipase C $\zeta$  from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction*, 124, 611-23.
  27. CUASNICU, P. S., GONZALEZ ECHEVERRIA, F., PIAZZA, A., PINEIRO, L. & BLAQUIER, J. A. 1984. Epididymal proteins mimic the androgenic effect on zona pellucida recognition by immature hamster spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 71, 427-31.
  28. CHANG, M. C. 1951. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168, 697-8.
  29. CHIQUETE-FELIX, N., HERNANDEZ, J. M., MENDEZ, J. A., ZEPEDA-BASTIDA, A., CHAGOLLA-LOPEZ, A. & MUJICA, A. 2009. In guinea pig sperm, aldolase A forms a complex with actin, WAS, and Arp2/3 that plays a role in actin polymerization. *Reproduction*, 137, 669-78.
  30. DAVIS, B. K. 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7560-4.

31. DE LAMIRANDE, E., EILEY, D. & GAGNON, C. 1993. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl*, 16, 258-66.
32. DE LAS HERAS, M. A., VALCARCEL, A., PEREZ, L. J. & MOSES, D. F. 1997. Actin localization in ram spermatozoa: effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore-induced acrosomal exocytosis. *Tissue Cell*, 29, 47-53.
33. DE LOURDES JUAREZ-MOSQUEDA, M. & MUJICA, A. 1999. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *J Struct Biol*, 128, 225-36.
34. DEARDEN-BADET, M. T. & MOUCHIROUD, G. 2005. Re-distribution of phospholipase C gamma 2 in macrophage precursors is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the Src kinases. *Cell Signal*, 17, 1560-71.
35. DVORAKOVA, K., PALECEK, J. & PEKNICOVA, J. 2001. Changes in immunocytochemical localization of cytoskeletal proteins in boar spermatozoa after acrosome reaction induced by specific cytoskeletal inhibitors. *Folia Biol (Praha)*, 47, 18-27.
36. FELIPE-PEREZ, Y. E., VALENCIA, J., JUAREZ-MOSQUEDA MDE, L., PESCADOR, N., ROA-ESPITIA, A. L. & HERNANDEZ-GONZALEZ, E. O. 2012. Cytoskeletal proteins F-actin and beta-dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm. *Cryobiology*, 64, 103-9.
37. FLAHERTY, S. P., WINFREY, V. P. & OLSON, G. E. 1986. Localization of actin in mammalian spermatozoa: a comparison of eight species. *Anat Rec*, 216, 504-15.
38. FLESCH, F. M., COLENBRANDER, B., VAN GOLDE, L. M. & GADELLA, B. M. 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the

- boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 787-92.
39. FLESCH, F. M. & GADELLA, B. M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*, 1469, 197-235.
  40. FRASER, L. R., ABEYDEERA, L. R. & NIWA, K. 1995. Ca<sup>2+</sup>-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev*, 40, 233-41.
  41. FUJIMOTO, S., YOSHIDA, N., FUKUI, T., AMANAI, M., ISOBE, T., ITAGAKI, C., IZUMI, T. & PERRY, A. C. 2004. Mammalian phospholipase Czeta induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev Biol*, 274, 370-83.
  42. GOMEZ, E., BUCKINGHAM, D. W., BRINDLE, J., LANZAFAME, F., IRVINE, D. S. & AITKEN, R. J. 1996. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl*, 17, 276-87.
  43. GRASA, P., COWARD, K., YOUNG, C. & PARRINGTON, J. 2008. The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase Czeta, in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Hum Reprod*, 23, 2513-22.
  44. GUTIERREZ, P. O. 2009. Valoracion in vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, criopreservado en diluyentes formulados con trehalosa y una baja concentracion de glicerol. Tesis Doctorado. FMVZ-UNAM; Ciudad Universitaria.
  45. HAMNER, C. E., JENNINGS, L. L. & SOJKA, N. J. 1970. Cat (*Felis catus* L.) spermatozoa require capacitation. *J Reprod Fertil*, 23, 477-80.
  46. HARRISON, R. A. & GADELLA, B. M. 2005. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*, 63, 342-51.

47. HEID, H., FIGGE, U., WINTER, S., KUHN, C., ZIMBELMANN, R. & FRANKE, W. 2002. Novel actin-related proteins Arp-T1 and Arp-T2 as components of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res*, 279, 177-87.
48. HERNANDEZ-GONZALEZ, E. O., MARTINEZ-ROJAS, D., MORNET, D., RENDON, A. & MUJICA, A. 2001. Comparative distribution of short dystrophin superfamily products in various guinea pig spermatozoa domains. *Eur J Cell Biol*, 80, 792-8.
49. HESS, H., HEID, H. & FRANKE, W. W. 1993. Molecular characterization of mammalian cylicin, a basic protein of the sperm head cytoskeleton. *J Cell Biol*, 122, 1043-52.
50. HESS, H., HEID, H., ZIMBELMANN, R. & FRANKE, W. W. 1995. The protein complexity of the cytoskeleton of bovine and human sperm heads: the identification and characterization of cylicin II. *Exp Cell Res*, 218, 174-82.
51. HEYTENS, E., SCHMITT-JOHN, T., MOSER, J. M., JENSEN, N. M., SOLEIMANI, R., YOUNG, C., COWARD, K., PARRINGTON, J. & DE SUTTER, P. 2010. Reduced fertilization after ICSI and abnormal phospholipase C zeta presence in spermatozoa from the wobbler mouse. *Reprod Biomed Online*, 21, 742-9.
52. HILPELA, P., VARTIAINEN, M. K. & LAPPALAINEN, P. 2004. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Curr Top Microbiol Immunol*, 282, 117-63.
53. HINTON, B. T., DOTT, H. M. & SETCHELL, B. P. 1979. Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis. *J Reprod Fertil*, 55, 167-72.
54. HOLT, W. V. 1984. Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. *Int Rev Cytol*, 87, 159-94.
55. HOWES, E. A., HURST, S. M. & JONES, R. 2001. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and

- intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *J Androl*, 22, 62-72.
56. HUNTER, R. H. & HALL, J. P. 1974a. Capacitation of boar spermatozoa: synergism between uterine and tubal environments. *J Exp Zool*, 188, 203-13.
  57. HUNTER, R. H. & HALL, J. P. 1974b. Capacitation of boar spermatozoa: the influence of post-coital separation of the uterus and fallopian tubes. *Anat Rec*, 180, 597-603.
  58. ICKOWICZ, D., FINKELSTEIN, M. & BREITBART, H. 2012. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl*, 14, 816-21.
  59. ITO, J., PARRINGTON, J. & FISSORE, R. A. 2011. PLCzeta and its role as a trigger of development in vertebrates. *Mol Reprod Dev*, 78, 846-53.
  60. JAGAN MOHANARAO, G. & ATREJA, S. K. 2011. Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 123, 40-7.
  61. KADAMUR, G. & ROSS, E. M. 2013. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol*, 75, 127-54.
  62. KANN, M. L., FEINBERG, J., RAINTEAU, D., DADOUNE, J. P., WEINMAN, S. & FOUQUET, J. P. 1991. Localization of calmodulin in perinuclear structures of spermatids and spermatozoa: a comparison of six mammalian species. *Anat Rec*, 230, 481-8.
  63. KASHIR, J., NOMIKOS, M., LAI, F. A. & SWANN, K. 2014. Sperm-induced Ca<sup>2+</sup> release during egg activation in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*, 450, 1204-11.
  64. KATAN, M. & PARKER, P. J. 1987. Purification of phosphoinositide-specific phospholipase C from a particulate fraction of bovine brain. *Eur J Biochem*, 168, 413-8.
  65. KATAYAMA, M., SUTOVSKY, P., YANG, B. S., CANTLEY, T., RIEKE, A., FARWELL, R., OKO, R. & DAY, B. N. 2005. Increased disruption of sperm

- plasma membrane at sperm immobilization promotes dissociation of perinuclear theca from sperm chromatin after intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Reproduction*, 130, 907-16.
66. KEATING, J., GRUNDY, C. E., FIVEY, P. S., ELLIOTT, M. & ROBINSON, J. 1997. Investigation of the association between the presence of cytoplasmic residues on the human sperm midpiece and defective sperm function. *J Reprod Fertil*, 110, 71-7.
  67. KIERSZENBAUM, A. L., RIVKIN, E. & TRES, L. L. 2007. Molecular biology of sperm head shaping. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65, 33-43.
  68. KITAMURA, K., IGUCHI, N., KANEKO, Y., TANAKA, H. & NISHIMUNE, Y. 2004. Characterization of a novel postacrosomal perinuclear theca-specific protein, CYPT1. *Biol Reprod*, 71, 1927-35.
  69. KOEHLER, J. K. 1970. A freeze-etching study of rabbit spermatozoa with particular reference to head structures. *J Ultrastruct Res*, 33, 598-614.
  70. KOEHLER, J. K. 1978. The mammalian sperm surface: studies with specific labeling techniques. *Int Rev Cytol*, 54, 73-108.
  71. LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
  72. LONGO, F. J., KROHNE, G. & FRANKE, W. W. 1987. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J Cell Biol*, 105, 1105-20.
  73. MARTINEZ, C. O., JUAREZ-MOSQUEDA MDE, L., HERNANDEZ, J. & VALENCIA, J. 2006. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. *Theriogenology*, 66, 1969-75.
  74. MARUSHIGE, Y. & MARUSHIGE, K. 1978a. Dispersion of mammalian sperm chromatin during fertilization: an in vitro study. *Biochim Biophys Acta*, 519, 1-22.
  75. MARUSHIGE, Y. & MARUSHIGE, K. 1978b. Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals. *Biochim Biophys Acta*, 518, 440-9.

76. MATAS, C., SANSEGUNDO, M., RUIZ, S., GARCIA-VAZQUEZ, F. A., GADEA, J., ROMAR, R. & COY, P. 2010. Sperm treatment affects capacitation parameters and penetration ability of ejaculated and epididymal boar spermatozoa. *Theriogenology*, 74, 1327-40.
77. MIYAZAKI, S. & ITO, M. 2006. Calcium signals for egg activation in mammals. *J Pharmacol Sci*, 100, 545-52.
78. MORENO-FIERROS, L., HERNANDEZ, E. O., SALGADO, Z. O. & MUJICA, A. 1992. F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Mol Reprod Dev*, 33, 172-81.
79. MUJICA, A., NAVARRO-GARCIA, F., HERNANDEZ-GONZALEZ, E. O. & DE LOURDES JUAREZ-MOSQUEDA, M. 2003. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microsc Res Tech*, 61, 76-87.
80. NOMIKOS, M., BLAYNEY, L. M., LARMAN, M. G., CAMPBELL, K., ROSSBACH, A., SAUNDERS, C. M., SWANN, K. & LAI, F. A. 2005. Role of phospholipase C-zeta domains in Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations. *J Biol Chem*, 280, 31011-8.
81. NOMIKOS, M., ELGMATI, K., THEODORIDOU, M., CALVER, B. L., CUMBES, B., NOUNESIS, G., SWANN, K. & LAI, F. A. 2011. Male infertility-linked point mutation disrupts the Ca<sup>2+</sup> oscillation-inducing and PIP(2) hydrolysis activity of sperm PLCzeta. *Biochem J*, 434, 211-7.
82. OCAMPO, J., MONDRAGON, R., ROA-ESPITIA, A. L., CHIQUETE-FELIX, N., SALGADO, Z. O. & MUJICA, A. 2005. Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the guinea pig sperm nuclear matrix. *Tissue Cell*, 37, 293-308.
83. ODEH, A. I., DASCANIO, J. J., CACECI, T., BOWEN, J. & ENG, L. A. 2003. Effect of platelet-activating factor (PAF) on stallion sperm motility, capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction*, 126, 605-13.

84. OKO, R. & MARAVEI, D. 1994. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol Reprod*, 50, 1000-14.
85. OKO, R. & MARAVEI, D. 1995. Distribution and possible role of perinuclear theca proteins during bovine spermiogenesis. *Microsc Res Tech*, 32, 520-32.
86. OKO, R. & MORALES, C. R. 1994. A novel testicular protein, with sequence similarities to a family of lipid binding proteins, is a major component of the rat sperm perinuclear theca. *Dev Biol*, 166, 235-45.
87. OKO, R. & SUTOVSKY, P. 2009. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J Reprod Immunol*, 83, 2-7.
88. OLSON, G. E., NOLAND, T. D., WINFREY, V. P. & GARBERS, D. L. 1983. Substructure of the postacrosomal sheath of bovine spermatozoa. *J Ultrastruct Res*, 85, 204-18.
89. PARDEE, J. D. & SPUDICH, J. A. 1982. Purification of muscle actin. *Methods Enzymol*, 85 Pt B, 164-81.
90. PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M. A. & FIRST, N. L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod*, 38, 1171-80.
91. PELLETIER, R., TRIFARO, J. M., CARBAJAL, M. E., OKAWARA, Y. & VITALE, M. L. 1999. Calcium-dependent actin filament-severing protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biol Reprod*, 60, 1128-36.
92. PESCH, S. & BERGMANN, M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, 37, 597-612.
93. PETERSON, R. N., BOZZOLA, J. J., HUNT, W. P. & DARABI, A. 1990. Characterization of membrane-associated actin in boar spermatozoa. *J Exp Zool*, 253, 202-14.
94. PITTOGGI, C., MAGNANO, A. R., SCIAMANNA, I., GIORDANO, R., LORENZINI, R. & SPADAFORA, C. 2001. Specific localization of

- transcription factors in the chromatin of mouse mature spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 60, 97-106.
95. RAMADAN, W. M., KASHIR, J., JONES, C. & COWARD, K. 2012. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLCzeta): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Cell Commun Signal*, 10, 12.
  96. RAMALHO-SANTOS, J., AMARAL, A., BRITO, R., FREITAS, M. & ALMEIDA SANTOS, T. 2004. Simultaneous analysis of cytoskeletal patterns and chromosome positioning in human fertilization failures. *Fertil Steril*, 82, 1654-9.
  97. SAUNDERS, C. M., LARMAN, M. G., PARRINGTON, J., COX, L. J., ROYSE, J., BLAYNEY, L. M., SWANN, K. & LAI, F. A. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129, 3533-44.
  98. SAUNDERS, C. M., SWANN, K. & LAI, F. A. 2007. PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem Soc Symp*, 23-36.
  99. SAXENA, N., PETERSON, R. N., SAXENA, N. K. & RUSSELL, L. D. 1986. Microfilaments appear in boar spermatozoa during capacitation in vitro. *J Exp Zool*, 239, 423-7.
  100. SELLES, E., GADEA, J., ROMAR, R., MATAS, C. & RUIZ, S. 2003. Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Domest Anim*, 38, 66-72.
  101. SILVA, P. F. & GADELLA, B. M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65, 958-78.
  102. STRICKER, S. A. 1997. Intracellular injections of a soluble sperm factor trigger calcium oscillations and meiotic maturation in unfertilized oocytes of a marine worm. *Dev Biol*, 186, 185-201.
  103. STRICKER, S. A. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev Biol*, 211, 157-76.

104. SUH, P. G., PARK, J. I., MANZOLI, L., COCCO, L., PEAK, J. C., KATAN, M., FUKAMI, K., KATAOKA, T., YUN, S. & RYU, S. H. 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep*, 41, 415-34.
105. SUTOVSKY, P., MANANDHAR, G., WU, A. & OKO, R. 2003. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech*, 61, 362-78.
106. SUTOVSKY, P. & SCHATTEEN, G. 2000. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol*, 195, 1-65.
107. SWANN, K. 1990. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, 110, 1295-302.
108. SWANN, K., LARMAN, M. G., SAUNDERS, C. M. & LAI, F. A. 2004. The cytosolic sperm factor that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction*, 127, 431-9.
109. SWANN, K., SAUNDERS, C. M., ROGERS, N. T. & LAI, F. A. 2006. PLCzeta(zeta): a sperm protein that triggers Ca<sup>2+</sup> oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol*, 17, 264-73.
110. TAKEUCHI, T., COLOMBERO, L. T., NERI, Q. V., ROSENWAKS, Z. & PALERMO, G. D. 2004. Does ICSI require acrosomal disruption? An ultrastructural study. *Hum Reprod*, 19, 114-7.
111. TAKIGUCHI, H., MURAYAMA, E., KANEKO, T., KURIO, H., TOSHIMORI, K. & IIDA, H. 2011. Characterization and subcellular localization of Tektin 3 in rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 78, 611-20.
112. TAMBLIN, T. M. 1981. Evidence for non-muscle myosin in bovine ejaculated spermatozoa. *Gamete Res*, 4, 499-506.
113. TARDIF, S., DUBE, C. & BAILEY, J. L. 2003. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but

- protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod*, 68, 207-13.
114. TIENHAI, P., JOHANNISSON, A. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim Reprod Sci*, 80, 131-46.
  115. TOSHIMORI, K. 1998. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res*, 293, 177-87.
  116. VIRTANEN, I., BADLEY, R. A., PAASIVUO, R. & LEHTO, V. P. 1984. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol*, 99, 1083-91.
  117. VISCONTI, P. E. & KOPF, G. S. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod*, 59, 1-6.
  118. VON BULOW, M., RACKWITZ, H. R., ZIMBELMANN, R. & FRANKE, W. W. 1997. CP beta3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp Cell Res*, 233, 216-24.
  119. WATSON, P. F., PLUMMER, J. M., JONES, P. S. & BREDL, J. C. 1995. Localization of intracellular calcium during the acrosome reaction in ram spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 41, 513-20.
  120. WITKE, W. 2004. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol*, 14, 461-9.
  121. YAGI, A. & PARANKO, J. 1992. Localization of actin, alpha-actinin, and tropomyosin in bovine spermatozoa and epididymal epithelium. *Anat Rec*, 233, 61-74.
  122. YANAGIMACHI, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, 2, 371-2.
  123. YANAGIMACHI, R. 1994. In *The Physiology of Reproduction*, pp 189–317. Eds E Knobil & JD Neil. New York: Raven Press.

124. YESTE, M., JONES, C., AMDANI, S. N., PATEL, S. & COWARD, K. 2016. Oocyte activation deficiency: a role for an oocyte contribution? *Hum Reprod Update*, 22, 23-47.
125. YEUNG, C. H., PEREZ-SANCHEZ, F., SCHROTER, S., KIRCHHOFF, C. & COOPER, T. G. 2001. Changes of the major sperm maturation-associated epididymal protein HE5 (CD52) on human ejaculated spermatozoa during incubation. *Mol Hum Reprod*, 7, 617-24.
126. YIN, H. L. & JANMEY, P. A. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol*, 65, 761-89.
127. YONEDA, A., KASHIMA, M., YOSHIDA, S., TERADA, K., NAKAGAWA, S., SAKAMOTO, A., HAYAKAWA, K., SUZUKI, K., UEDA, J. & WATANABE, T. 2006. Molecular cloning, testicular postnatal expression, and oocyte-activating potential of porcine phospholipase C $\zeta$ . *Reproduction*, 132, 393-401.
128. YOON, S. Y. & FISSORE, R. A. 2007. Release of phospholipase C zeta and  $[Ca^{2+}]_i$  oscillation-inducing activity during mammalian fertilization. *Reproduction*, 134, 695-704.
129. YOON, S. Y., JELLERETTE, T., SALICIONI, A. M., LEE, H. C., YOO, M. S., COWARD, K., PARRINGTON, J., GROW, D., CIBELLI, J. B., VISCONTI, P. E., MAGER, J. & FISSORE, R. A. 2008. Human sperm devoid of PLC $\zeta$  fail to induce  $Ca^{2+}$  release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J Clin Invest*, 118, 3671-81.
130. YOUNG, C., GRASA, P., COWARD, K., DAVIS, L. C. & PARRINGTON, J. 2009. Phospholipase C zeta undergoes dynamic changes in its pattern of localization in sperm during capacitation and the acrosome reaction. *Fertil Steril*, 91, 2230-42.