



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EL PAPEL DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN FOCAL EN LA CAPACITACIÓN,
LA REACCIÓN ACROSOMAL Y LA SOBREVIVENCIA DE LOS
ESPERMATOZOIDES DEL COBAYO”**

T E S I S
QUE PRESENTA:

M en C Ana Lilia Roa Espitia

Matrícula 2131800203

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

Directores:

Dra. Irma Jiménez Morales

Dr. Enrique Othón Hernández González

Jurados:

Dra. Mayel del Valle Chirinos Espin

Dra. Karina Pastén Hidalgo

Dr. Humberto González Márquez

Dr. Edmundo Bonilla González

Iztapalapa, Ciudad de México, febrero de 2018

El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **“El papel de las moléculas de adhesión focal en la capacitación, la reacción acrosomal y en la sobrevivencia de los espermatozoides del cobayo”**, que presentó:

M en C Ana Lilia Roa Espitia

El día 16 de febrero del año 2018

JURADO DEL EXAMEN

Presidente: Dr. Humberto González Márquez
Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa

Secretario: Dr. Edmundo Bonilla González
Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa

Vocal: Dra. Karina Pastén Hidalgo
Catedrática CONACYT

Vocal: Dra. Mayel Chirinos Espín
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORES

Dra. Irma Jiménez Morales

Laboratorio de Andrología S-257
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
jimi@xanum.uam.mx

Dr. Enrique Othón Hernández González

Laboratorio 51 de Biología de la Reproducción
Departamento de Biología Celular,
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN
Eoton7003@hotmail.com

ASESOR

Dr. Humberto González Márquez

Laboratorio de Expresión Génica
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
hgm@xanum.uam.mx

El azar no existe, Dios no juega a los dados con el Universo.

Albert Einstein

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 51 de Biología de la Reproducción del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV-IPN y en el Laboratorio de Andrología S-257 del Departamento de Ciencias de la Salud de la UAM Iztapalapa, bajo la dirección de la del Dr. Enrique Othón Hernández González y la Dra. Irma Jiménez Morales respectivamente.

Esta tesis forma parte de los proyectos que fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), cuyos números son 79921 y **284183** que le fueron otorgados al Dr. Enrique Othón Hernández González.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por haberme aceptado, para realizar mis estudios de postgrado.

Al programa de Doctorado en Biología Experimental de la UAM-I, que pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Conacyt, con registro 001482.

Agradezco de manera especial a mis tutores:

Dra. Irma Jiménez Morales por todas sus enseñanzas y consejos, pero sobre todo por su amistad y su calidad humana, gracias por su profesionalismo y por brindarme su apoyo incondicional.

Al Dr. Enrique Hernández Gonzáles por dirigir este trabajo y alentarme todos los días a seguir adelante por su forma tan especial de ver las cosas, pero sobre todo por sus enseñanzas, su profesionalismo y su paciencia.

A mi asesor Dr. Humberto González Márquez y la por ser siempre muy honesto en sus críticas y por aportar ideas al trabajo, pero sobre todo por su disposición para trabajar juntos gracias a por su profesionalismo, su entrega a la investigación y por brindarme su apoyo incondicional.

A mi jurado la Dra. Dra. Mayel Chirinos Espín, la Dra. Karina Pastén Hidalgo y al Dr. Edmundo Bonilla que amablemente aceptaron ser críticos de este trabajo gracias por su disposición y sus sugerencias en este trabajo.

A todos y cada uno de los profesores que me dedicaron su tiempo y me formaron con sus apreciables enseñanzas.

Al M. en C. Jaime Escobar Herrera quien es el encargado de la Unidad de Microscopía confocal del CINVESTAV, por su valiosa ayuda en el manejo del microscopio.

DEDICATORIA

Primero le dedico y agradezco a Dios, porque cuando lo conocí supe que siempre había estado ahí durante toda mi vida cuidándome. Él me ha enseñado a enfrentar las adversidades y los obstáculos con los que me he encontrado, los cuales fueron usados por El mismo para moldear mi carácter, para hacerme fuerte, para darme sabiduría, humildad y para abrirme los ojos espirituales. Gracias Papito lindo.

Dedico este trabajo también a mi amado esposo Enrique por su amor, paciencia, madurez y porque me has enseñado a ver la vida de diferente manera, una vida que cambió cuando unimos nuestras vidas.

A mi Preciosa hija a quien amo intensamente y me apoyó con amor y paciencia durante el tiempo que duro este trabajo, has sido una hija modelo, has madurado tanto que me sorprendo de cómo has crecido física, intelectualmente, así como espiritualmente. Gracias Ana Paola te amo.

MUY ESPECIALMENTE:

A mi esposo Enrique y mi hija Ana Paola quienes me apoyaron todo el tiempo y me dieron mucho amor y comprensión.

A mi mamá gracias por ser el pilar de mi vida por tus enseñanzas que han hecho de mí lo que ahora soy. Te amo.

A mi papá que ahora ya también está en los brazos de Dios junto con mi mamá “juntos para siempre”, gracias por el apoyo que me diste para formarme profesionalmente, te agradezco el gran amor que tenías por nosotros era difícil entenderte, pero al final lo comprendí. Te amo papá.

A mi hermana Ale sin lugar a dudas por tu invaluable ayuda gracias por tu ayuda y por siempre hacerlo con amor y dedicación. Gracias hermana te quiero y que Dios te siga dando salud, sabiduría, pero sobre todo mucho amor.

A mis Hermanas Paty y Martha por su bondad, su apoyo siempre incondicional, pero sobre todo por su amor. Gracias por cuidar a mi hija todas las veces que lo necesité, gracias por la calidad humana que las caracteriza, gracias por ser mis hermanas que Dios la siga bendiciendo.

A mi hermana Paz y Rico quienes amo por su forma de ser siempre preocupados por el prójimo (hermanos). Nunca cambies Pasita y Rico que Dios los siga bendiciendo.

Al resto de mis hermanos: Manuel, Fernando, Gloria, Mary, Vero y Jaime, los amo.

A mis cuñados en general y a mis sobrinos a quienes quiero y respeto. Gracias a todos por ser mi familia. La familia Telerín.

A mis amados pastores José y Betty por alentarme a seguir estudiando gracias, nunca cambien y que Dios los siga utilizando en gran manera.

A mis compañeros y alumnos del laboratorio con quien compartí tantos momentos en el laboratorio: Mónica, Tania, Eva, Deneb, Aidé y Cesar, Tania Ángeles y hasta Rafa.

A mis compañeras y amigas Lucero y Clara por escucharme siempre y darme sabios consejos, siempre dispuestas a escuchar y ayudar. Gracias Chicas.

A mi amiga Mónica Sierra con quien siempre soñé con hacer el doctorado mira amiga ya lo logramos. Te quiero.

A mi amiguito Alex por ser mi mejor amigo y estar siempre en las buenas y en las malas conmigo. Te quiero Ale.

RESUMEN

Las integrinas ligan la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina a través de diversas proteínas involucradas con la formación de adhesiones focales, como resultado de esta interacción se forman complejos de adhesión focal y diferentes vías de señalización son activadas. A pesar de que los espermatozoides de los mamíferos expresan varias integrinas, es desconocido como estas proteínas funcionan en espermatozoides de los mamíferos. En este trabajo mostramos la presencia de proteínas de adhesión focal en espermatozoides de cobayo y exploramos su papel durante la capacitación y la reacción acrosomal. Primeramente, encontramos la presencia de las cadenas $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ y $\beta 3$ de las integrinas en los espermatozoides del cobayo, las cuales fueron localizadas en la región apical del acrosoma y el flagelo. Nuestros resultados sugieren la presencia de complejos de adhesión focal conformados por: integrina- $\beta 1$, la cinasa de adhesión focal (FAK), paxilina, vinculina, talina y α -actinina en la región acrosomal. La inhibición de FAK durante la capacitación afectó la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina (Tyr), la cual ocurre en los primeros minutos de la capacitación, causando que la reacción acrosomal se incrementara tempranamente y de manera dependiente de Ca^{2+} . Adicionalmente, no permitió la polimerización de actina asociada a la capacitación. La integración de vinculina y talina a los complejos de adhesión focal sugiere que los complejos de adhesión focal se ensamblan durante la capacitación. Nosotros identificamos que durante la capacitación el citoesqueleto de actina fue remodelado, incrementando la interacción de vinculina y α -actinina a este, con lo que los complejos de adhesión focal se terminan de estructurar. Lo anterior indica que FAK contribuye a la integridad del

acrosoma, probablemente regulando la polimerización de actina y remodelando el citoesqueleto de actina. Por otro lado, la interacción de los espermatozoides con proteínas de la matriz extracelular mostró que dependiendo del estado de las proteínas (soluble o en forma de matriz) los efectos sobre la fisiología del espermatozoide son diferentes. Inicialmente, determinamos que los espermatozoides solo se adhieren a matrices formadas por fibronectina (FN), pero no a las formadas por laminina o colágeno-I. Los espermatozoides solo se adhirieron a la matriz de FN cuando tienen un tiempo mínimo de capacitación (30 min). Los espermatozoides adheridos a la matriz incrementaron varias veces su expectativa de vida, ya que no experimentaron la reacción acrosomal después de varias horas de incubación. Sin embargo, cuando los espermatozoides fueron incubados con FN soluble, experimentaron rápidamente la reacción acrosomal alcanzando una vida media máxima de aproximadamente 2 horas. Estos resultados sugieren que la interacción de los espermatozoides a una matriz de FN incrementa su sobrevivencia.

ABSTRACT

Integrins link to the extracellular matrix with the actin cytoskeleton through diverse proteins involved in the structuring of focal adhesions, as a result of this interaction they form focal adhesion complexes and different signaling pathways are activated. Although mammalian sperm expresses different integrins, it is unknown how these proteins function in mammalian spermatozoa. In this work, we show the presence of focal adhesion proteins in guinea pig spermatozoa and explore their role during capacitation and acrosomal reaction. First of all, we found the presence of the $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ and $\beta 3$ chains of the integrins in the guinea pig spermatozoa, which were located in the apical region of the acrosome and flagellum. Our results suggest the presence of focal adhesion complexes composed by $\beta 1$ -integrin, Focal adhesion kinase (FAK), paxillin, vinculin, talin and α -actinin in the acrosomal region. Inhibition of FAK during capacitation affected protein phosphorylation in Tyr, which occurs in the first minutes of capacitation, causing the acrosomal reaction to increase early and in a Ca^{2+} -dependent manner. Also, it did not allow actin polymerization associated to capacitation. The integration of vinculin and talin to focal adhesion complexes suggests that these complexes are assembled during capacitation. We identified that the actin cytoskeleton was remodeled during capacitation, increasing the interaction of α -actinin to actin cytoskeleton; whereby the focal adhesion complexes complete their structuring. The above indicates that FAK contributes to acrosome integrity, probably by regulating actin polymerization and remodeling the actin cytoskeleton. On the other hand, the interaction of the spermatozoa with extracellular matrix proteins showed that depending on the state of the proteins (soluble or in a matrix) the effects on the physiology are

different. First, we determined that spermatozoa only adhere to matrices formed by fibronectin, but not to those formed by laminin or collagen-I. Spermatozoa only adhered to the fibronectin matrix when they had a time of capacitation of 30 min. The spermatozoa adhered to the matrix increased several times their life expectancy since they did not experience the acrosomal reaction after several hours of incubation. However, when the spermatozoa were incubated with soluble fibronectin, they rapidly experienced the acrosomal reaction reaching a maximum life expectancy of approximately 2 hours. These results suggest that the interaction of spermatozoa to a fibronectin matrix increases their survival.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Capacitación.....	2
1.2	Reacción Acrosomal.....	5
1.3	El papel del Citoesqueleto de Actina en la Capacitación y la Reacción Acrosomal...6	
1.4	Transporte y Supervivencia Espermática.....	8
1.5	El Reservorio Oviductal	10
1.6	Mecanismo de Adhesión al Epitelio del istmo	12
1.7	Las Integrinas en la Adhesión Celular.....	13
1.8	Activación de las Integrinas	14
1.9	Adhesiones Focales	19
1.9.1	Formación de las Adhesiones Focales	20
1.9.2	Contactos Focales, FAK y Supervivencia Celular	21
2	ANTECEDENTES.....	25
3	JUSTIFICACIÓN.....	26
4	HIPÓTESIS.....	27
5	OBJETIVO GENERAL	28
6	OBJETIVOS PARTICULARES	29
7	MATERIAL Y MÉTODOS	30
7.1	Reactivos.....	30
7.2	Animales.....	31
7.3	Preparación de los Espermatozoides de Cobayo.....	31
7.4	Extractos de las Células Espermáticas, Electroforesis e Inmunoblot	32
7.5	Ensayos de Inmunofluorescencia	33
7.6	Co-Inmunoprecipitación.....	34

7.7	Análisis de la Fosforilación de Proteínas en Residuos de Tirosina.....	34
7.8	Evaluación del Estado de la Capacitación Mediante Tinción con Clortetraciclina (CTC).....	35
7.9	Evaluación de la Actina-F	36
7.10	Determinación de la Concentración Óptima de PF573228	37
7.11	Ensayo de Viabilidad Espermática	37
7.12	Estimación de la Reacción Acrosomal.....	37
7.13	Preparación de las Placas para el Ensayo de Adhesión.....	38
7.14	Experimentos de Adhesión Celular	38
7.15	Obtención de Extractos Proteicos de MDA-MB-231	39
7.16	Evaluación de la movilidad espermática.....	39
7.17	Análisis estadístico y densitométrico	40
8	RESULTADOS	41
8.1	Caracterización de las Proteínas de Adhesión Focal en los espermatozoides	41
8.1.1	Presencia de las proteínas de adhesión Focal en espermatozoides del cobayo.....	41
8.1.2	Formación de los complejos de adhesión focal durante la capacitación.	43
8.2	La fosforilación de FAK y paxilina se incrementan durante la capacitación de los espermatozoides de cobayo.....	45
8.3	Papel de FAK en la Capacitación y en la Reacción Acrosomal.....	48
8.3.1	La inhibición de FAK no altera la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina durante la capacitación.	48
8.4	La inhibición de FAK induce la RA dependiente de calcio.....	53
8.4.1	La inhibición de FAK evita la polimerización de actina durante la capacitación.	56
8.5	Los Complejos de Adhesión Focal Interaccionan con la Actina-F durante la Capacitación	58

8.6	Caracterización de la Adhesión de Espermatozoides con la Matriz Extracelular In Vitro.	59
8.6.1	Adhesión de los espermatozoides a proteínas de la matriz extracelular.....	59
8.6.2	Efecto de la fibronectina soluble sobre la reacción acrosomal.....	62
9	DISCUSIÓN.....	67
10	CONCLUSIONES.....	76
11	PERSPECTIVAS.....	77
12	BIBLIOGRAFIA.....	78
13	FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	87
14	ABREVIATURAS.....	91
15	ANEXOS.....	92
15.1	Solución isotónica [NaCl a 0.154 M].....	92
15.2	PBS 10X.....	92
15.3	PBS-Tritón X 100 al 0.1%.....	92
15.4	Medio MCM-PL (medio capacitante).....	92
15.5	Solución de Tyrode.....	93
15.6	Amortiguador de lisis para proteínas No fosforiladas.....	94
15.7	Amortiguador de lisis para proteínas fosforiladas modificado para proteínas que se degradan como FAK.....	95
15.8	Gel separador.....	96
15.9	Gel Concentrador.....	96
15.10	Amortiguador de Tricina10X.....	97
15.11	Buffer de Laemmli 3X.....	97
15.12	Buffer de Corrida: [tris 0.025 M – Glicina 0.192 M – SDS 0.1%] 10X.....	97
15.13	Amortiguador de Transferencia.....	97
15.14	Solución de bloqueo para WB.....	97

15.15	Solución Stripping	98
15.16	Solución fijadora:.....	98
15.17	Cloruro de amonio [NH ₄ Cl a 50 mM].....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales eventos que ocurren durante la capacitación. Cambios en la fluidez de la membrana por la salida de colesterol de la membrana plasmática, por lo que hay un cambio en el potencial de membrana, también hay una remodelación de los lípidos de la membrana (PL), activación de las fosfolipasas (PLA y PLC γ), entrada de los iones calcio Ca $^{2+}$ y bicarbonato (HCO $_3^-$), fosforilación de proteínas asociado con la capacitación por la entrada de (HCO $_3^-$) el cual activa la enzima adenilato ciclasa (AC) con un incremento de AMPc y la subsecuente activación de la proteína Cinasas A (PKA). La activación de la PKA activa la fosforilación de tirosinas cinasas (TK). Otro modulador fisiológico de la fosforilación de tirosinas durante la capacitación son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). También es registrado un aumento en la producción de ATP que es necesario para que se lleve a cabo la hiperactivación flagelar. Modificado de Kate et al [11] 4

Figura 2. Reacción del acrosoma en el espermatozoide humano. I. Espermatozoide con el acrosoma intacto (no reaccionado). II. Reacción del segmento principal (SP) del acrosoma: fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) en el segmento principal del acrosoma. III. Reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE). IV. Espermatozoide con reacción acrosómica del segmento principal y ecuatorial. La membrana acrosómica interna se continúa con la membrana plasmática del segmento postecuatorial. Tomado de del Rio et al., 2007 [23]..... 7

Figura 3. Esquema de la región del istmo. En el istmo se observan las criptas lugar donde los espermatozoides se unen al epitelio. También se muestra el orden de los procesos por los que pasa el espermatozoide en el tracto reproductor de la hembra: 1) Activación, 2) Capacitación, 3) Hiperactivación, 4) Reconocimiento entre gametos, 5) Reacción acrosomal, 6) Adhesión y 7) Fusión. Tomado de Olivera et al [148]..... 11

Figura 4. Representación esquemática del estado conformacional las integrinas. Las integrinas muestran 2 estados conformacionales: El inactivo y el activo. El inactivo (es decir, baja afinidad para componentes ECM) las subunidades α y β están con la cabeza inclinada hacia la membrana plasmática y la unión por ejemplo de SHARPIN o MDGI (a las subunidades), O ICAP1 o filamina (a las subunidades) al dominio citoplásmico de

integrinas estabiliza el heterómero de Integrina, en su conformación de baja afinidad. La conformación de alta afinidad requiere de la extensión del dominio extracelular y la separación de las subunidades α y β resultando en la conformación llamada de cabeza abierta y extendida. Esta conformación es disparada por la unión a componentes de la MEC en el dominio extracelular llamada señalización de afuera hacia adentro, o por asociación de talina y kindlnas con el domino citoplasmático de las subunidades β en respuesta a una señal intracelular. Tomado de Pouwels et al., 2012 [77] 18

Figura 5. Las principales vías de señalización mediadas por integrinas en los contactos focales. Aquí se muestran las cuatro principales vías de señalización activadas por integrinas en los complejos de adhesión focal. El elemento clave en todas estas vías es FAK. La activación de FAK por autofosforilación permite la unión de Src, paxilina y/o Fyn para una fuerte fosforilación y total activación. La unión de Grb2, p130Cas, la PI3K y Graf a FAK dependiendo del sitio de fosforilación despiertan las siguientes vías de señalización: La proliferación, migración, apoptosis/sobrevivencia y una vía alterna para la migración respectivamente. La unión directa de la paxilina y su asociación con la proteína tirosina fosfatasa PTP-PEST es importante para la regulación dinámica de ciclos de fosforilación y desfosforilación estimulados por integrina. Tomado de Rüegg et al., 2003 [96]..... 24

Figura 6. Las proteínas de adhesión focal son expresadas en espermatozoides del cobayo. (A) Para la detección de proteínas de adhesión focal en los espermatozoides del cobayo, 100 μ g de extractos de esperma se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las proteínas fueron detectadas usando anticuerpos específicos. (1) Integrina β 1, (2) paxilina, (3) FAK, (4) vinculina, (5) α -actinina, y (6) talina. (B) Ensayos de inmunocitoquímica se realizaron para determinar la localización de las proteínas de adhesión focal en los espermatozoides del cobayo. Los paneles de la izquierda corresponden a la localización de la Integrina β 1, paxilina, FAK, vinculina, α -actinina, y talina. Los paneles de la derecha corresponden a imágenes de campo claro. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. 42

Figura 7. Paxilina co-localiza con FAK y integrina- β 1. Para determinar la posible interacción de paxilina con FAK e integrina- β 1, se llevaron a cabo ensayos de co-localización. La co-localización de paxilina (azul) con FAK e integrina- β 1 (rojo) fue

visualizada mediante ensayos inmunocitoquímicos en espermatozoides fijados en formaldehído. Las imágenes de co-localización (rosa) y de contraste de fases (CF) son mostrados. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes ... 44

Figura 8. Talina y vinculina están asociados con el complejo de adhesión focal durante la capacitación. (A) Estudio de co-localización de vinculina y talina (rojo) con paxilina (azul) visualizada mediante ensayos inmunocitoquímicos en espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (Cap). Se incluyen las imágenes de superposición (rosa) y de contraste de fases (CF). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (B) Ensayos de co-inmunoprecipitación de paxilina con las proteínas de adhesión focal de esperma de cobayo no capacitados y capacitados, utilizando el anti- anticuerpo anti paxilina. Las proteínas precipitadas fueron separadas por SDS-PAGE y se realizaron inmunoblots utilizando los anticuerpos anti-paxilina, anti-FAK, anti- Integrina- β , anti-vinculina, anti-talina y anti- α -actinina. La imagen es representativa de cinco experimentos independientes. (C) Análisis densitométrico de la co-inmunoprecipitación de las proteínas de adhesión focal (media \pm S.E.M. n = 3 experimentos independientes). (D) Inmunoblot que muestra que la cantidad de vinculina, talina, y α -actinina no cambian durante la capacitación. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. 47

Figura 9. La fosforilación de FAK y paxilina aumentan durante capacitación. Para determinar el estado de fosforilación de FAK y paxilina, extractos totales de espermatozoides capacitados de cobayos (0-90 min) se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron por inmunoblot. (A) Panel superior: FAK fosforilada detectada con el anticuerpo anti-p-FAK (Tyr397). Panel inferior: FAK total detectada con anticuerpo anti-FAK. (B) Aumento de p-FAK durante la capacitación (media \pm s.e.m., N = 3 independiente Experimentos). (C) Panel superior: p-paxilina detectada con anti-p-paxilina (Tyr118); panel inferior: paxilina total detectada con anticuerpo anti-paxilina. (D) Aumento de la p-paxilina durante la capacitación (media \pm s.e.m., N = 3 experimentos independientes). (E) Panel superior: Inmunoblot mostrando el efecto de PF-573228 sobre la fosforilación de FAK (Tyr397) y paxilina (Tyr118) detectada con los respectivos anticuerpos anti-fosfosfatos. Panel inferior: FAK total y paxilina detectada con los anticuerpos anti- FAK y anti-paxilina. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes..... 50

Figura 10. Aumento de la fosforilación de FAK y paxilina en la región del acrosoma y en la pieza media durante la capacitación. Para determinar en qué región subcelular la fosforilación aumenta durante la capacitación, espermatozoides de cobayo fueron capacitados (15-90 minutos) y fijados con formaldehído y la fosforilación se analizó utilizando un anticuerpo anti-p-FAK (Tyr397) o anti-p-paxilina (Tyr118). Para determinar si la tinción fue específica, los espermatozoides se trataron con PF573224 (PF). Las imágenes de la derecha corresponden a la Imágenes de contraste de fase. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes..... 51

Figura 11. Efectos de PF573228 y Latrunculina-A en la capacitación y la RA. Los espermatozoides de cobayo fueron capacitados a diferentes tiempos en presencia de Los inhibidores de FAK [PF573228 (PF)], inhibidor de la polimerización de actina [Latrunculina-A (Lat- A)], o el inhibidor de la PKA (H89) a las concentraciones indicadas. (A) Para la detección de p-Tyr, 100 µg de los extractos de esperma completo se resolvieron por SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa, y las proteínas fueron detectadas usando un anticuerpo específico contra p-Tyr. La imagen representa cinco experimentos independientes de cada tratamiento. (B) El análisis densitométrico de la p-Tyr aumenta durante Capacitación (Cap) (media ± s.e.m., N = 3 experimentos independientes). 52

Figura 12. Patrones de tinción con CTC en Cobayo. Patrón F no capacitado, patrón B Capacitado y patrón RA con reacción acrosomal. Media +/- s. d. n = 3. 54

Figura 13. Efecto de PF573228 sobre la fosforilación en residuos de tirosina. Los espermatozoides se incubaron bajo condiciones de capacitación en presencia o ausencia del inhibidor de FAK PF573228 a diferentes tiempos y se usaron para el ensayo de inmunomarcaje utilizando un anticuerpo específico anti-p-Tyr. A) espermatozoides capacitados. B) espermatozoides incubados en presencia de PF573228 (5 µM). Las imágenes de la izquierda corresponden a fosfotirosina y las de la derecha corresponden a las de contraste de fases. 55

Figura 14. Efectos de PF-573228 y Latrunculina-A en la capacitación y la RA. Los espermatozoides de cobayo fueron capacitados en diferentes momentos en presencia del inhibidor de FAK PF-573228 (PF) y de Latrunculina-A (Lat- A) a las concentraciones indicadas. Para determinar el efecto de PF573228 o Lat-A en la RA, espermatozoides

capacitados fueron incubados en presencia de estas drogas. La RA fue evaluada en espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de Ca^{2+} (media \pm s.e.m., N = 3 experimentos independientes)..... 57

Figura 15. El inhibidor de FAK y Latrunculina-A evitan la polimerización de actina durante la capacitación. (A) Los efectos de Inhibición de FAK y Lat-A sobre polimerización de actina, en espermatozoides de cobayo que fueron capacitados por 60 min en presencia o en ausencia de PF573228 (5 μ M) o Lat - A (50 μ M). La actina-F se tiñó usando faloidina marcada con TRITC. Las imágenes de fluorescencia son representativas de tres experimentos. B) y C) Los niveles de fluorescencia de la faloidina marcada con TRITC fueron cuantificados utilizando el software Nis Elements versión 3.1 para definir el curso tiempo de actina-F durante la capacitación en presencia o ausencia de PF573224 o Lat-A (media \pm s.e.m., n = 5 experimentos independientes). 60

Figura 16. Co-localización de vinculina y actina-F durante la capacitación. En la determinación de la a interacción del complejo de adhesión focal con el citoesqueleto de actina, vinculina y actina-F estas fueron co-localizadas en espermatozoides no capacitados y capacitados y en aquellos capacitados en presencia de PF573228. Los espermatozoides se fijaron con formaldehído y las proteínas fueron detectadas utilizando el anticuerpo anti-vinculina (verde) y faloidina marcada con TRITC (rojo). También se muestran las imágenes de contraste de fases (CF). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. 61

Figura 17. Co-localización de α -actinina y actina-F durante la capacitación. Para determinar la interacción de α -actinina con el citoesqueleto. α - actinina y actina-F fueron co-localizados en los espermatozoides no capacitados y capacitados y en aquellos capacitados en presencia de PF-573228. Los espermatozoides se fijaron con formaldehído y las proteínas se detectaron utilizando el anticuerpo anti α -actinina (rojo) y faloidina marcada con FITC (verde). También se muestran las imágenes de contraste de fases (CF). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. .. 63

Figura 18. Presencia de $\alpha 6$, $\alpha 5$, $\beta 3$, αv y fibronectina (FN) en los espermatozoides del cobayo no capacitados y capacitados. A) Ensayos de inmunocitoquímica se realizaron para determinar la localización de las integrinas $\alpha 6$, $\alpha 5$, $\beta 3$, αv y FN, B), por

inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas. Para la detección de las integrinas α_6 , α_5 , β_3 , α_v A) y FN B), en los espermatozoides del cobayo, 100 μg extractos de esperma se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las proteínas fueron detectadas usando anticuerpos específicos. (A) integrina α_5 , integrina α_6 , α_v , β_3 ; B) FN. 64

Figura 19. Ensayos de adhesión a fibronectina (FN) *in vitro*. (A) Proporción de espermatozoides que se adhirieron a FN (promedio \pm S.D.) durante 7 horas de incubación en medio Tyrode. (B) Promedio de rosetas formadas. (C) Porcentaje de espermatozoides que sufrieron RA (promedio \pm S.D., N=3 experimentos independientes). 65

Figura 20. Efecto de fibronectina (FN) sobre la reacción y acrosomal del esperma de cobayo en suspensión. Espermatozoides móviles se incubaron durante 3 h en medio Tyrode en presencia de diferentes concentraciones de FN 0, 50 y 100 μg / ml y en ausencia. Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos con diferentes cobayos (*P <0.05). 66

Figura Suplementaria 1. Proteínas de adhesión focal en extractos de células de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 y en espermatozoides de ratón y humano respectivamente (datos no mostrados). Detección de proteínas de adhesión focal en extractos de: A) células MDA, (B) extractos de espermatozoides del ratón y (C) humano que se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las proteínas fueron detectadas usando anticuerpos específicos. (1) integrina- β_1 , (2) paxilina, (3) FAK, (4) vinculina, (5) α -actinina, y (6) talina. 87

Figura Suplementaria 2. Ensayos de inmunocitoquímica para determinar la localización subcelular de las proteínas de adhesión focal en los espermatozoides de ratón y humano. Los paneles de la izquierda corresponden a la localización de integrina- β_1 , paxilina, FAK, vinculina, α -actinina, y talina. Los paneles de la derecha corresponden a las imágenes de campo claro. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. 88

Figura Suplementaria 3. Viabilidad de los espermatozoides tratados con PF573228. A). IF de los espermatozoides capacitados 60 min y tratados con PF573228 (5 μM) y espermatozoides capacitados 30 min y permeabilizados con tritón X 100 0.01% en PBS (el control positivo). B) Cuantificación de la fluorescencia del IP de las muestras tratadas

y no tratadas Los espermatozoides capacitados en ausencia del inhibidor después de 60 min de capacitación mostraron un $96.33\% \pm 0.84$ (media \pm s.e.m., N=3) de viabilidad, mientras que los espermatozoides capacitados en presencia de $10 \mu\text{M}$ de PF573228, la concentración más alta probada, fue de, $95.67\% \pm 1.46$ (media \pm s.e.m., N=3), una diferencia no significativa. 89

Figura Suplementaria 4. Determinación de la concentración de PF5732228. Los espermatozoides fueron capacitados en medio MCM-PL en presencia de diferentes concentraciones de PF573228 ($0.5\text{-}10 \mu\text{m}$) y la ra fue cuantificada. El máximo efecto se observó entre los 2.5 y $5 \mu\text{m}$ de PF573228..... 90

1 INTRODUCCIÓN

El paso de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino está regulado para maximizar las probabilidades de fertilización y asegurar que los espermatozoides con morfología normal y movilidad vigorosa sean los que tengan éxito en la fecundación. Los ovocitos son fecundados, por lo general, pocas horas después de la ovulación [1, 2]. En algunas especies, el espermatozoides puede almacenarse por un día (caballos, vacas y cerdos) o incluso por meses (algunas especies de murciélagos) antes de la llegada de los ovocitos. En los seres humanos, hay evidencia de que la fertilización se produce cuando el coito tiene lugar hasta cinco días antes de la ovulación [3].

Debido a que los espermatozoides son células diferenciadas terminales, carentes de una transcripción activa y de un equipo de traducción, deben sobrevivir en el aparato reproductor de la hembra sin el beneficio de los mecanismos de renovación de proteínas disponibles que tienen muchas otras células. Los espermatozoides son sometidos a esfuerzos físicos debido a que ellos se desplazan en un medio viscoelástico durante la eyaculación y en la entrada al cérvix, también son sometidos a contracciones del tracto femenino, y también pueden soportar daño oxidativo. Debido a que los espermatozoides son alergénicos para la hembra, se enfrentan con las defensas del sistema inmunológico destinadas a organismos infecciosos [4]. Por lo que el espermatozoides debe utilizar sus escasos recursos para mantener su potencial fertilizante frente a las numerosas dificultades. Así, de millones de espermatozoides inseminados

en el coito, sólo unos cientos llegan a las trompas de Falopio y, normalmente, sólo un espermatozoide fertiliza un óvulo.

1.1 Capacitación

En general los espermatozoides eyaculados no poseen la habilidad de fecundar al óvulo, aunque sean móviles y morfológicamente maduros. Es conocido que los espermatozoides requieren de un periodo de tiempo finito en el aparato reproductor de la hembra, o *in vitro* bajo ciertas condiciones muy específicas, para que adquieran la capacidad de fertilizar al óvulo. Chang [5] y Austin [6] definieron este tiempo como capacitación. Más tarde Yanagimachi [7] precisó que los espermatozoides deben presentar una serie de cambios, bioquímicos, fisiológicos y estructurales, que les permite llevar a cabo la reacción acrosomal para, posteriormente, fecundar al óvulo. Algunos de los cambios que se presentan durante la capacitación son: en la composición y fluidez de la membrana plasmática por sustracción del colesterol, redistribución y/o aparición de proteínas en la superficie espermática, incremento del Ca^{2+} intracelular, incremento del pH citoplasmático, activación de canales iónicos, generación de especies reactivas de oxígeno y aumento de proteínas fosforiladas en residuos tirosina [8, 9]. Durante la capacitación se ha observado también un cambio en el patrón de movilidad de los espermatozoides, a este proceso se le denomina hiperactivación y se caracteriza porque el movimiento del flagelo es muy amplio, asociado con un batido asimétrico y que le permite a los espermatozoides atravesar las envolturas del óvulo [10].

Aunque la capacitación espermática no es específica del sitio, el ambiente uterino puede activarla, el órgano principal en donde se realiza la capacitación es el oviducto [12, 13]. Durante la capacitación se combinan eventos secuenciales y paralelos, que se producen tanto en la cabeza del espermatozoide (preparación para la reacción acrosomal), como en el flagelo (movilidad hiperactivada). Estos eventos han sido divididos en tempranos y tardíos: 1) Los tempranos están relacionados con la sustracción de colesterol de la membrana, el aumento de su fluidez, así como el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} y HCO_3^- y la hiperpolarización de la membrana plasmática; y b) Los eventos tardíos provocan los cambios en el patrón de movilidad, el batido flagelar es más vigoroso y asimétrico (movilidad hiperactivada), la capacidad para llevar a cabo la reacción del acrosomal es estimulada por un agonista fisiológico, y la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Ambos se regulan por la activación de la vía AMPc/PKA [14, 15]. También ocurren modificaciones post-traduccionales a través de la fosforilación de proteínas en residuos de serina/treonina (Ser/Thr) y/o tirosina (Tyr) cinasas (PKs) y/o la desfosforilación de estos residuos por fosfatasas (PT), las que tienen un papel central en muchos procesos espermáticos [14, 15].

Aunque la capacitación normalmente se produce en el tracto genital de la hembra, también se puede lograr *in vitro* mediante la incubación de los espermatozoides en medios de cultivo apropiados que imitan las condiciones fisiológicas. Entre ellos se encuentran los lavados con albúmina, lavados en gradientes de densidad o simplemente centrifugación e incubación en un medio rico en Ca^{2+} y HCO_3^- [16].

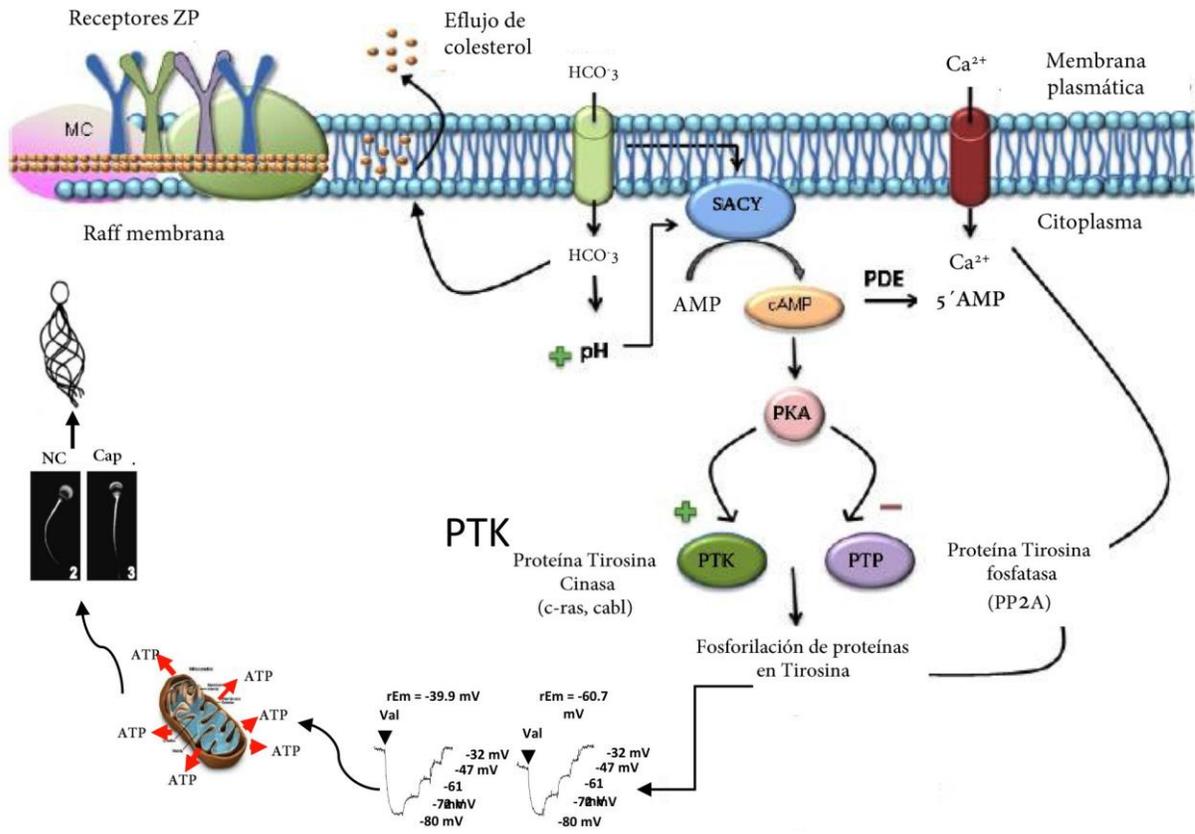


Figura 1. Principales eventos que ocurren durante la capacitación. Cambios en la fluidez de la membrana por la salida de colesterol de la membrana plasmática, por lo que hay un cambio en el potencial de membrana, también hay una remodelación de los lípidos de la membrana (PL), activación de las fosfolipasas (PLA y PLCγ), entrada de los iones calcio Ca²⁺ y bicarbonato (HCO₃⁻), fosforilación de proteínas asociado con la capacitación por la entrada de (HCO₃⁻) el cual activa la enzima adenilato ciclasa (AC) con un incremento de AMPc y la subsecuente activación de la proteína cinasa A (PKA). La activación de la PKA activa la fosforilación de tirosinas cinasas (TK). Otro modulador fisiológico de la fosforilación de tirosinas durante la capacitación son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). También es registrado un aumento en la producción de ATP que es necesario para que se lleve a cabo la hiperactivación flagelar. Modificado de Kate et al [11]

La composición del medio para capacitar a los espermatozoide *in vitro* varía de acuerdo con la especie pero, comúnmente, estos contienen iones Ca^{2+} y HCO_3^- , sustratos energéticos (pirúvico y lactato) y albúmina [17]. Además, para algunas especies es necesario incluir un agente capacitante, por ejemplo, taurina o hipotaurina para el esperma de hámster o heparina para esperma de bovinos [17].

1.2 Reacción Acrosomal

La reacción acrosomal (RA) es un tipo de exocitosis regulada que requiere de una señal extracelular para que se lleve a cabo, ésta es el aumento de la concentración de iones calcio (Ca^{2+}). También necesita nucleótidos endógenos y exógenos, así como calmodulina y la remodelación del citoesqueleto de actina [145]. Generalmente se lleva a cabo la fusión y fenestración de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa lo cual comienza en el segmento principal del acrosoma y continúa hacia el segmento ecuatorial. La RA en el segmento ecuatorial también involucra la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa, lo que mantiene la integridad celular. Este proceso se puede producir durante el contacto del espermatozoide con la matriz extracelular del ovocito (cumulus oophorus) o con la zona pelúcida [18] y desencadena la liberación de las enzimas acrosomales que degradan las envolturas del óvulo, lo que favorece el paso de los espermatozoides a través de la zona pelúcida. Como consecuencia se expone la membrana acrosomal interna como el nuevo dominio de membrana en la superficie celular, y adquiere la capacidad fusogénica de la membrana plasmática sobre el segmento ecuatorial y post-euatorial del espermatozoide [19, 20] (Fig. 2). Una vez que se exponen nuevos

dominios en la región ecuatorial, el espermatozoide está listo para fusionarse con la membrana plasmática del ovocito.

Hay evidencias que señalan que la RA *in vivo* comienza con la estimulación de un agonista natural como es la progesterona o la glicoproteína ZP3 de la zona pelúcida (ZP). Este estímulo provoca una entrada de Ca^{2+} al espermatozoide. Por otro lado, se sabe que es posible inducir la RA *in vitro* con el ionóforo A23187, el cual provoca la entrada masiva de Ca^{2+} . La RA también puede ocurrir espontáneamente, y es posible inducirla *in vitro* [23]. Se ha propuesto un modelo en el que intervienen ATPasas de las membranas cuya función es mantener niveles bajos de Na^+ y Ca^{2+} y niveles altos de K^+ . También es inducida por agentes fusogénicos como la lisofosfatidilcolina en presencia de Ca^{2+} [19, 21]. También se han identificado moléculas, como ácido gamma-aminobutírico (GABA), que estarían presentes en el útero y también tendrían una función en la inducción de la RA [22].

1.3 El papel del Citoesqueleto de Actina en la Capacitación y la Reacción Acrosomal

Uno de los eventos importantes que suceden durante la capacitación es la polimerización del citoesqueleto de actina, evento que ha sido involucrado en la RA y la movilidad espermática. Se ha sugerido que la polimerización de actina tiene diferentes funciones para los espermatozoides. Durante la capacitación se estructura una barrera de filamentos de actina entre la membrana plasmática (MP) y la membrana acrosomal externa (MAE) que acopla a ambas membranas para su futura fusión [24-26]. Adicionalmente, esta barrera funciona como un andamio que sujeta a la MP

proteínas de señalización como la fosfolipasa C (PLC) [24]. El incremento de la polimerización de actina también está directamente relacionado con el desarrollo de la hiperactivación [27-29] y es esencial en la migración de proteínas fundamentales para la interacción espermatozoide-óvulo, como la proteína Izumo [30].

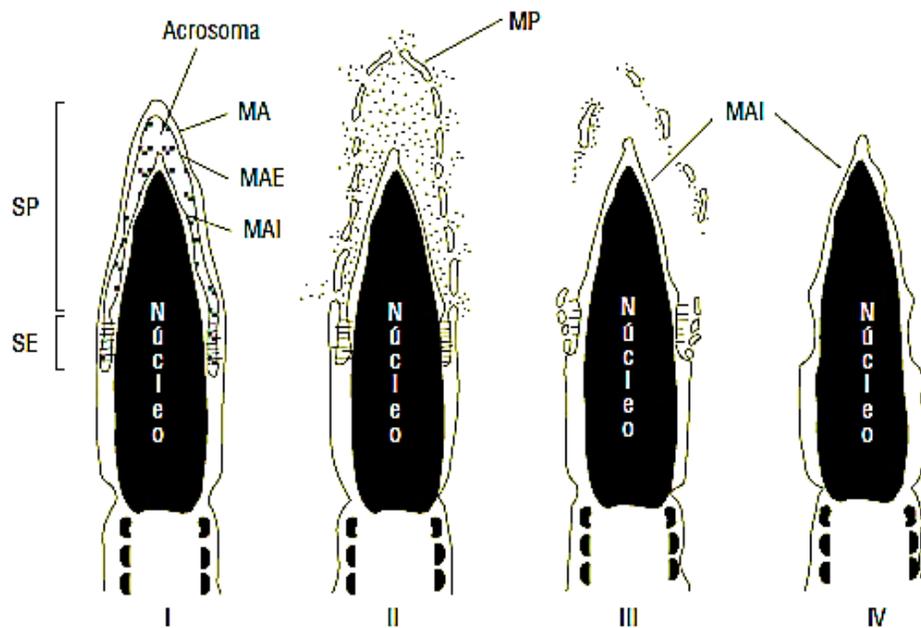


Figura 2. Reacción del acrosoma en el espermatozoide humano. I. Espermatozoide con el acrosoma intacto (no reaccionado). II. Reacción del segmento principal (SP) del acrosoma: fusión de la membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática (MP) en el segmento principal del acrosoma. III. Reacción acrosómica en el segmento ecuatorial (SE). IV. Espermatozoide con reacción acrosómica del segmento principal y ecuatorial. La membrana acrosómica interna se continúa con la membrana plasmática del segmento postecuatorial. Tomado de del Rio et al., 2007 [23].

La polimerización de actina durante la capacitación no solo implica el incremento de filamentos de actina, también conlleva la remodelación del citoesqueleto de actina, es decir que este cambia su localización o se acumula en sitios específicos de los

espermatozoides. Por ejemplo, se ha observado polimerización de actina en la región postacrosomal y el segmento ecuatorial de los espermatozoides de cobayo [31, 32] y en la región apical del acrosoma en espermatozoides capacitados de cobayo, cerdo, bovino y carnero, formando una diadema sobre el acrosoma [32-35]. Lo anterior sugiere que el citoesqueleto de actina formado en la región acrosomal está relacionado con mantener estructurado al acrosoma y que no suceda tempranamente la RA, como lo ha sugerido Spungin et al [24].

Tres vías de señalización han sido involucradas en la polimerización de actina durante la capacitación: 1) Cdc42/Profilina/ARP2/3 [32, 36]; 2) RhoA/PKC/PLD [37, 38]; 3) PKA/proteína Rho (A, B o C)/ROCK-1/PAK/LIMK-1 o -2/Cofilina [39, 40]. Interesantemente, en las tres vías, las proteínas Rho tienen un papel preponderante, pero solamente RhoA y Cdc42 se han relacionado con la polimerización de actina y con su participación en los procesos espermáticos como la capacitación, la RA o la movilidad [29, 40, 41].

1.4 Transporte y Supervivencia Espermática

El tracto genital femenino no es favorable para la supervivencia espermática, el tránsito se realiza mediante una combinación de la movilidad espermática propia y los movimientos peristálticos del tracto reproductivo de la hembra [42]. En el eyaculado hay entre 250-500 millones de espermias por mililitro en especies como el verraco, el caballo, y el perro en el caso del ser humano el valor normal actualmente es de 15 millones por cada mililitro de eyaculado o 39 millones en la totalidad de la muestra. A un hombre se le considera infértil o subfértil si produce menos de cinco millones de

espermatozoides por mililitro, condición que afecta a uno de cada 20 hombres, y de estos solo unos cientos llegan a las trompas de Falopio y normalmente solo uno fertiliza al óvulo [147]. En la vagina diferentes factores dañan a los espermatozoides: las defensas del cuerpo, así como el ácido (pH 5.0) producido por los lactobacilos anaerobios que se alimentan del glucógeno que se encuentra en las células epiteliales vaginales. Posteriormente, los espermatozoides nadan de la vagina hacia el canal cervical, donde se encuentran con el moco cervical, producido bajo la influencia de los estrógenos, este moco es muy hidratado y está compuesto por mucopolisacáridos y glicoproteínas [43]. El moco cervical cumple la función de una barrera fisiológica para los espermatozoides, dependiendo de su viscosidad, ya que la microarquitectura del moco muestra que es compacto [44]. Enseguida, los espermatozoides que han logrado atravesar este moco se dirigen al útero. Se sugiere que el útero ayuda al transporte del espermatozoide por contracciones del miometrio, durante el periodo periovulatorio [45, 46]. Este transporte rápido a través del útero puede mejorar la sobrevivencia de los espermatozoides propulsándolos más allá de las defensas inmunológicas de la hembra. Los espermatozoides que han logrado llegar hasta aquí se dirigen y se distribuyen en las dos trompas uterinas u oviductos. El lumen de la unión uterotubal (UTB) es muy estrecho y se puede llenar con moco viscoso que pueden impedir el avance de los espermatozoides (revisado por Suarez, 2016 [10]). El paso por la UTB es uno de los mecanismos principales de selección, ya que sólo es atravesada por espermatozoide que presenta movilidad progresiva y lineal con una composición bioquímica determinada a nivel de membrana [47, 48]. La integridad molecular de la superficie del espermatozoide es determinante para su entrada a la UTB. Por tanto la capacitación

que produce modificaciones en la membrana plasmática disminuye la habilidad del espermatozoide para llegar al oviducto y unirse a las células del istmo [49]. Se ha determinado que aproximadamente el 70% de los espermatozoides en la UTB están en un estado no capacitado o de baja capacitación [50].

1.5 El Reservorio Oviductal

Los espermatozoides que pasan la unión UTB entran a las trompas, y en la región del istmo se adhieren a las células epiteliales de las criptas oviductales y forman un reservorio en la porción caudal del oviducto durante el periodo pre y peri-ovulatorio [51, 52] (Fig. 3). Este reservorio fue descubierto en el hámster por Yanagimachi y Chang [53] y más tarde se encontró en gran variedad de mamíferos, como conejos [54], porcinos [55], ovinos [56] y bovinos [57]. Una vez que los espermatozoides llegan al reservorio, se mantienen ahí hasta el momento de la ovulación, que puede variar de 36 a 48 horas dependiendo del momento del ciclo estral [57], situándose tanto en el lumen como unidos al epitelio oviductal, principalmente a las células ciliadas [58]. El reservorio oviductal tiene un carácter multifuncional: primero selecciona a los espermatozoides con mejor morfología, modula la capacitación espermática, mantiene la viabilidad del gameto masculino y sincroniza el tiempo de maduración espermática con el momento de la ovulación [59].

La unión con las células oviductales permite que un número adecuado de gametos viables y fértiles estén disponibles para la fecundación en el momento que tiene lugar la ovulación y, por otro lado, reduce el riesgo de polispermia, al permitir que un número reducido de espermatozoides asciendan en conjunto hasta el lugar de fecundación.

La adhesión de los espermatozoides al oviducto juega un papel clave en la selección de subpoblaciones, ya que únicamente pueden unirse al mismo espermatozoides con acrosoma intacto [60, 61], en estado no capacitado o de baja capacitación [49, 62], con bajo contenido de Ca^{2+} intracelular, bajos niveles de proteínas fosforiladas en residuos tirosina [63], con morfología normal [64] y con estructura normal de la cromatina [65]. Esto indica que, *in vivo*, el reservorio selecciona a los espermatozoides con mejor calidad y los mantiene vivos y con bajos niveles de capacitación, hasta el momento en el que las señales asociadas con la ovulación desencadenan su liberación para lograr una fecundación exitosa [66].

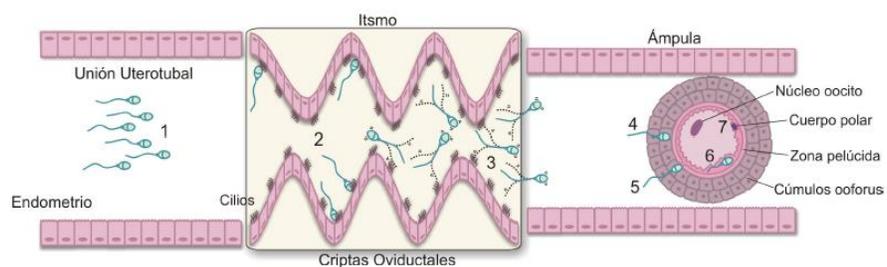


Figura 3. Esquema de la región del istmo. En el istmo se observan las criptas lugar donde los espermatozoides se unen al epitelio. También se muestra el orden de los procesos por los que pasa el espermatozoide en el tracto reproductor de la hembra: 1) Activación, 2) Capacitación, 3) Hiperactivación, 4) Reconocimiento entre gametos, 5) Reacción acrosomal, 6) Adhesión y 7) Fusión. Tomado de Olivera et al [148].

La vida fértil del espermatozoide varía de acuerdo con la especie, según Bedford [67] la clasificó en tres grupos, de acuerdo con la relación entre la vida útil del espermatozoide y del ovocito.

- 1) Especies roedoras, la vida útil es de 12 a 15h
- 2) Los rumiantes y el cerdo, la vida útil del espermatozoide es de 24 a 48h siendo un poco más extensa que la de los ovocitos (8-20h)
- 3) En el conejo, visón y caballo, los espermatozoides tienen una vida útil considerablemente más larga que los ovocitos de 6 a 8h, de 30 a 36h y de 20h, respectivamente.

1.6 Mecanismo de Adhesión al Epitelio del istmo

Diferentes moléculas han sido relacionadas con mediar la interacción de los espermatozoides con el epitelio del istmo, entre las que encontramos a una familia de proteínas denominadas como espermadhesinas: AQN1 y DQH para cerdo, PDC-109 (heparin bovine protein) y BSP (bovine seminal protein) en bovinos, así como E-cadherina en espermatozoides de humano, y cuyos receptores en la superficie del epitelio son anexina-1, -2, -4, -5 y E-cadherina, respectivamente [61, 68]. Diferentes experimentos muestran que la adición de estas proteínas a explantes del epitelio oviductal inhibe de manera dependiente de concentración la adhesión de los espermatozoides [68-70]. Sin embargo, no se ha reportado que estas moléculas induzcan vías de señalización al interior de los espermatozoides o estén relacionadas con el incremento de la sobrevivencia espermática.

1.7 Las Integrinas en la Adhesión Celular

Las integrinas son una gran familia de receptores celulares de superficie que se encuentra en muchas especies de animales. Esta familia está constituida por dos subunidades polipeptídicas transmembranales denominadas cadenas α y β y tienen dos funciones principales: 1) La adhesión célula-célula, así como la adhesión de células a proteínas de la matriz extracelular (ECM); y 2) La transducción de señales, las integrinas tienen la capacidad de transmitir información en ambas direcciones a través de la membrana plasmática [71, 72]. Sin embargo, también están implicadas en muchas otras funciones biológicas, incluyendo patrullaje inmune, la migración celular y la unión a las células de ciertos virus.

Las integrinas se dividen en varias subfamilias, dependiendo de la cadena β que poseen, la cual puede asociarse en una forma restringida con las cadenas α . Hasta el momento, se han identificado 18 cadenas α y 8 cadenas β , las cuales dan lugar a 24 integrinas diferentes (Tabla 1). Las cadenas α de las integrinas corresponden a glicoproteínas cuya masa molecular (120 -180 kDa) es mayor que el de las cadenas β (90-110 kDa), con las que se asocian en forma no covalente. El extremo amino terminal es pequeño (de 30 a 50 aminoácidos), estas cadenas poseen 7 u 8 regiones homólogas (dominios tipo Integrina), de las cuales 3 o 4 pueden unir cationes divalentes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y el Mn^{2+} . Los dominios tipo integrina ejercen un papel clave en la función adherente de la integrina, ya que influyen directamente sobre su conformación, estabilizando la conformación extendida de alta afinidad. Las cadenas β son glicoproteínas transmembranales que poseen regiones muy conservadas en la

porción extracelular, y parecen formar parte del sitio de interacción con el ligando. Estas cadenas también poseen regiones ricas en cisteína, a partir de las cuales se forman puentes disulfuro intracatenarios, uno de ellos con la región amino terminal de la cadena polipeptídica. El sitio de combinación con el ligando está formado por regiones de las dos cadenas polipeptídicas, aunque la especificidad de la interacción con el ligando está determinada principalmente por la cadena α . La afinidad por un ligando específico depende del tipo de combinación y del ambiente que rodea a la célula. De acuerdo con su función las integrinas son divididas en tres grupos principales: 1) Integrinas de adhesión célula-célula; 2) integrinas vasculares; y 3) integrinas de adhesión célula matriz extracelular [74]. Las integrinas que tienen la subunidad $\beta 1$ constituyen la mayoría de los receptores para los componentes de la matriz extracelular.

1.8 Activación de las Integrinas

La unión de las integrinas con sus ligandos las activan y las regulan alostéricamente, de tal manera que el dominio intracelular y extracelular de ambas subunidades sufren cambios conformacionales [76]. Existen varios estados de activación donde el ligando y la estabilización de la unión está relacionado con el estado de activación del receptor. Con excepción de las células hematopoyéticas circulantes, las células tienden a mantener a las integrinas en una conformación inactiva, la mayoría de las células expresan tanto la forma activa como la inactiva. En la conformación inactiva (de baja afinidad para los componentes de la MEC), las subunidades α y β están en una forma cerrada, esto es con las cabezas dobladas en dirección a la membrana plasmática.

Se ha descrito que cuando se liberan a la membrana plasmática de la célula, los dímeros de integrina recién sintetizados se encuentran en la conformación "doblada" lo cual les impide interactuar con sus ligandos (Fig. 4) [149, 150]. La conformación de alta afinidad se da cuando el ligando se une y provoca cambios estructurales. La unión al ligando causa desplazamiento de residuos dentro del sitio de unión al ligando y promueve rearrreglos estructurales fuertes del ectodominio que, en última instancia, causan la separación de los tallos intracelulares [72, 76]. Esta separación parcial facilita la formación de las adhesiones focales y complejos de señalización requeridos para efectos río abajo [72, 77]; estos rearrreglos activan la unión de la integrina e incrementan su afinidad por el ligando. Los movimientos dentro de la región transmembranal del dímero promueven la extensión del dominio extracelular lo cual conduce a un incremento en la avidéz por el ligando, lo que resulta en la conformación abierta o de alta afinidad. Esta conformación puede ser disparada por la unión a componentes de la MEC al dominio extracelular de la integrina (*señalización de afuera hacia adentro*) o por asociación de talina o kindlinas en el dominio citoplasmático de la subunidad β de la integrina, en respuesta a una señal intracelular (*señalización de adentro hacia afuera*) [77]. Los cambios conformacionales de las integrinas son dinámicos y están en un constante equilibrio entre las conformaciones inactivas y activas. Esta característica funcional de las integrinas contrasta con la de otras moléculas de adhesión celular, por ejemplo; las cadherinas, las que, en condiciones fisiológicas, poseen una avidéz alta y constante por su ligando, lo cual tiene como consecuencia que las interacciones celulares mediadas por éstas sean, en general,

TABLA 1 LIGANDOS DE LAS INTEGRINAS

Ligandos	Integrinas
Sialoproteína del hueso	$\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_5$
Molécula de adhesión L-1	$\alpha v\beta_3$
<i>Candida albicans</i>	$\alpha M\beta_2$
Colágenos a9b1, a5b1	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{11}\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_{10}\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$,
Condroadherina	$\alpha_{10}\beta_1$
Citotactina/tenascina-C	$\alpha_8\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_6$
E cadherina	$\alpha E\beta_7$
Factor X	$\alpha M\beta_2$
Fibronectina a	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha v\beta_1$, $\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_5$, $\alpha v\beta_6$, $\alpha v\beta_8$, $\alpha_{IIb}\beta_3$
Fibrinógeno	$\alpha_5\beta_1$, $\alpha M\beta_2$, $\alpha v\beta_3$, $\alpha X\beta_2$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha v\beta_1$
Invasina	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$,
Laminina	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_7\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_9\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$
Vinculina	$\alpha_{11}\beta_1$
Vitronectina	$\alpha v\beta_1$, $\alpha v\beta_3$, $\alpha v\beta_5$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_8\beta_1$
Factor von Willebrand	$\alpha v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$
Fertilina	$\alpha_6\beta_1$
Factor +/-Plasminógeno	$\alpha v\beta_3$
Trombospondina	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha v\beta_3$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$
VCAM-1	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$
Metaloproteinasa-2	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$
ICAM-2,3,4,5	$\alpha L\beta_2$, $\alpha D\beta_2$

Tomado de Plow et al., 2000 [73].

estáticas y no relacionadas con movilidad celular [78].

Los primeros análisis funcionales y estructurales de las integrinas han permitido definir las secuencias de reconocimiento del ligando mediante el empleo de péptidos que se han deducido de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la matriz extracelular [79]. Un ejemplo prototipo es la secuencia RGD (tripéptido formado por Arg-Gly-Asp), identificada originalmente como el motivo de la fibronectina y que ahora se conoce como zona de reconocimiento de múltiples ligandos. Otros estudios han demostrado que la especificidad en el reconocimiento del ligando por parte de la integrina está reducida a pequeñas secuencias peptídicas. Así, tan importante como la secuencia RGD, es el contexto estructural en el que se encuentra y el tipo de residuos de aminoácidos que la flanquean [73].

La activación de afuera *hacia* adentro regula muchos procesos celulares, como migración, proliferación, expresión génica, al receptor de señalización de la tirosina cinasa y sobrevivencia [80, 81]. Por el contrario, los cambios en el medio intracelular pueden alterar la unión de integrinas a sus ligandos a través de la señalización de adentro hacia afuera. A pesar de cierta controversia sobre los detalles, ahora es ampliamente aceptado que la unión de las proteínas citoplasmáticas talina-1 y -2 (Tln1, también conocido como KIND1-KIND3) a la cola citoplasmática de la subunidad β de la integrina son cruciales para la activación de las integrinas [77]. Una vez que se activan las integrinas, los eventos intracelulares convergen en su dominio citoplasmático. Las integrinas no tienen una actividad intrínseca de cinasa, pero sirven como un sitio de unión para varias cinasas y proteínas adaptadoras relacionadas con

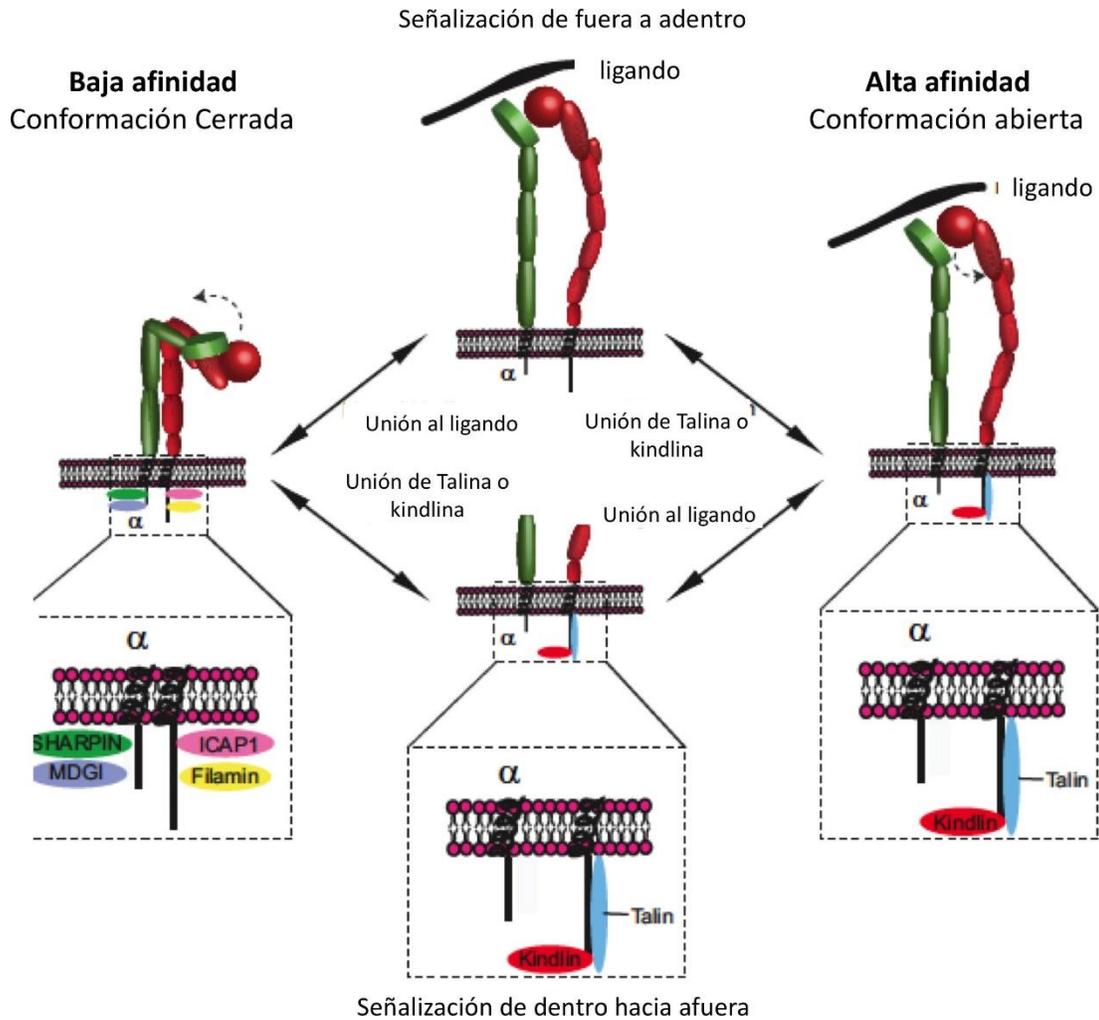


Figura 4. Representación esquemática del estado conformacional las integrinas. Las integrinas muestran 2 estados conformacionales: El inactivo y el activo. El inactivo (es decir, baja afinidad para componentes ECM) las subunidades α y β están con la cabeza inclinada hacia la membrana plasmática y la unión por ejemplo de SHARPIN o MDGI (a las subunidades), O ICAP1 o filamina (a las subunidades) al dominio citoplásmico de integrinas estabiliza el heterómero de Integrina, en su conformación de baja afinidad. La conformación de alta afinidad requiere de la extensión del dominio extracelular y la separación de las subunidades α y β resultando en la conformación llamada de cabeza abierta y extendida. Esta conformación es disparada por la unión a componentes de la MEC en el dominio extracelular llamada señalización de afuera hacia adentro, o por asociación de talina y kindlnas con el domimo citoplasmático de las subunidades β en respuesta a una señal intracelular lo cual es Tln2) y de las kindlinas (los miembros de la familia fermitina 1-3, FERMT1-FERMT3; llamado señalización de adentro hacia afuera como se muestra en el centro de la figura. Tomado de Pouwels et al., 2012 [77].

la formación de las adhesiones focales. El dominio citoplasmático de la subunidad β es el primer sitio de contacto para la formación de las adhesiones focales, donde proteínas adaptadoras conectan a las integrinas con el citoesqueleto, cinasas citoplásmica y receptores de factores de crecimiento [76, 82].

1.9 Adhesiones Focales

Las adhesiones focales (AFS) son complejos macromoleculares asociados a la membrana que sirven para conectar físicamente el citoesqueleto de actina a través de integrinas con la MEC que la rodea. Las AFS maduran crecen y cambian su composición diferencialmente, esto para proporcionar la tracción y la transducción de las señales que dirigen la migración celular y que es crucial para diversos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, la cicatrización de heridas y la metástasis del cáncer [146]. Las AFS forman redes de señalización relacionadas y modulan dinámicamente la fuerza de vinculación entre las integrinas y la actina, lo cual controla la organización del citoesqueleto de actina.

La adhesión celular tiene dos funciones la tracción y la transducción. La tracción se genera vinculando el sustrato extracelular de filamentos de actomiosina y organiza las redes de señalización que regulan la migración y otros procesos celulares incluyendo proliferación, expresión de genes, y la sobrevivencia de las células. La vinculación entre la matriz extracelular y la actina se ha conocido durante más de 30 años basado en estudios de microscopía electrónica y de fluorescencia [146]. Aunque varias moléculas están implicadas, los vínculos moleculares precisos que se forman entre la integrina y el citoesqueleto de actina siguen sin estar del todo claros. Los candidatos

más probables a incluir son: talina, vinculina y α -actinina. Fuerzas celulares de transmisión al sustrato a través del sistema de enlace de la integrina-actina tiene un profundo efecto sobre la migración celular. Por un lado, regulan la tasa de protuberancia, mientras que, en la ausencia de una adhesión, hay resistencia de la membrana para la polimerización de actina en el frente de migración, lo que llevaría a un flujo retrógrado de actina [85]. Además, la maduración de las adhesiones y las señales generadas por la misma, están reguladas por tensión en la adhesión [86].

1.9.1 Formación de las Adhesiones Focales

Cuando las integrinas se unen a ligandos de la MEC se agrupan en la membrana a través de la unión de talina, kindlina o paxilina, lo que activa el dominio β . Este es el primer evento en la formación de los contactos de adhesión focal. Inmediatamente después, las integrinas se agrupan y proveen sitios de unión a moléculas del citoesqueleto como talina y α -actinina, que a su vez interaccionan con proteínas unidas al citoesqueleto como vinculina, tensina y actina, promoviendo la reorganización de los filamentos de actina en fibras grandes de estrés, esto causa que más integrinas se agrupen, incrementando así la unión a la matriz y la organización por integrinas en un sistema de retroalimentación positiva. Como resultado, las proteínas de la matriz, las integrinas y las proteínas del citoesqueleto se ensamblan en agregados en cada lado de la membrana, conocidos como adhesiones focales y contactos con la MEC [76, 82]. La asociación de talina con vinculina promueve el crecimiento de la adhesión focal mientras que el entrecruzamiento de vinculina con actina a través de talina provee una adhesión estable [72].

En estos complejos moleculares, la cinasa de adhesión focal FAK (FAK: *Focal Adhesion Kinase*) es reclutada en las adhesiones focales nacientes debido a que interactúa con el tallo citoplasmático de la subunidad β , ya sea directamente o a través de proteínas del citoesqueleto como talina y paxilina [83]. En estos complejos también se asocia la proteína cinasa C (PKC: *Protein Kinase C*). Ambas cinasas, FAK y PKC, generan cascadas de señalización celular que dirigen fenómenos como la reorganización del citoesqueleto o la inducción de genes. Estas señales pueden tener efecto sinérgico o antagónico con rutas activadas por otros receptores celulares, produciéndose procesos de integración de señales que convergen en puntos comunes y, finalmente, resultan en respuestas de activación, proliferación, diferenciación o muerte celular. La destrucción de las adhesiones focales evita la adhesión celular mediada por integrinas, y daña la movilidad celular y la migración [84].

1.9.2 Contactos Focales, FAK y Sobrevivencia Celular

Como ya se mencionó, las adhesiones focales son complejos macromoleculares de la membrana, sirven para conectar físicamente el citoesqueleto de actina a través de integrinas con la MEC que la rodea. [82, 85]. La cara interna de la membrana celular se conecta con las mallas de fibras derivadas del citoesqueleto, que se ensamblan como puntos de adhesión focal, los cuales, además de controlar la forma celular, son capaces de transmitir señales extracelulares hacia el citosol. La regulación de estos puntos de adhesión focal (AF) es relativamente sencilla, mediante paxilina y FAK, que se activan cuando son fosforiladas por cascadas de señalización con propiedad de tirosina cinasa [85]. Al ser estimuladas, ocurre un reordenamiento del citoesqueleto,

que propicia el ensamblaje de los puntos de adhesión focal, generando así las fibras de estrés [81].

FAK, también conocida como p125FAK, es una tirosina-quinasa intracelular que participa en la señalización mediada por integrinas. FAK fue descrita por primera vez en 1992 como una proteína tirosina quinasa no receptora localizada principalmente dentro de las adhesiones focales.[78, 86]. FAK se expresa en casi todos los tejidos y tipos celulares y juega un papel central en las interacciones adhesivas al funcionar como andamio para componentes de adhesión focal, incluyendo Src, Cas y paxilina [85, 87]. FAK también funciona como un integrador de la señalización mediada por integrinas para regular la migración, progresión del ciclo celular, la diferenciación y la sobrevivencia [88].

FAK puede asociarse con varias proteínas señalización y estructurales funcionando dentro de una red de vías de señalización. La activación de FAK se inicia por la adhesión mediada por integrinas, permitiendo la autofosforilación en el residuo de tirosina 397 (Tyr397), y de esta forma se asocian a FAK varias moléculas que contienen dominios SH, como Src y PI3K. Después, Src fosforila a FAK en los residuos de Tyr407, 576, 577, 861 y 925. La fosforilación de los residuos Tyr576 y 577, que pertenecen al loop de quinasa, incrementa la actividad de FAK y la fosforilación del residuo Tyr861 y 925 la activan completamente. Mientras que la fosforilación en Tyr861 y 925 incrementan la afinidad por la proteína Grb2 que se asocia al residuo de tirosina 925 y la cual es la vía de activación de la vía Ras/MAPK/ERK (Fig. 5) [91].

La unión de PI3K a FAK ocurre a través de su subunidad p85, resultando en la activación de PI3K, la cual genera segundos mensajeros: fosfoinositol trifosfato (PIP3) y fosfoinositol bifosfato (PIP2). Estos fosfolípidos reclutan a la proteína cinasa B (PKB o Akt) en la membrana plasmática y, posteriormente, PKB es fosforilada por PKD. Akt una vez activada, a su vez, estimula la vía de señalización de supervivencia, inactivando proteínas pro-apoptóticas. Esta ruta de supervivencia PI3K/Akt puede ser inhibida por la proteína codificada por el gen supresor de tumores PTEN, que desfosforila tanto lípidos PIP3 como a las proteínas cinasas Shc y FAK, promoviendo la apoptosis (Fig.5) [92, 93]. La fosforilación de FAK en el residuo 925 crea un sitio de unión para el dominio SH2 de la proteína adaptadora Grb2, la fosforilación de Grb2, activa la vía de señalización de ERK1/2, a través de Grb2/SOS (a través del intercambio de GDP/GTP) vía Ras-MAPK, como consecuencia ERK1/2 (factor de transcripción nuclear) se traslada al núcleo y fosforila a factores de transcripción nuclear, en donde desempeña una importante función como la transcripción de genes. La vía Grb2/Ras/MAPK/ERK también ha sido relacionada con la supervivencia celular al bloquear el anoikis, mediante la inhibición de las proteínas pro-apoptóticas Bad y Bim, y la activación de proteínas anti-apoptóticas Bcl₂ y Bclxl [84].

FAK también participa en la supervivencia al regular la remodelación del citoesqueleto, a través de dos vías diferentes. La primera implica la activación de Rac1 mediante FAK/p130Cas/Crk/DOCK. La activación de Rac1 actúa sobre la familia WASP/WAVE que a su vez activan a Arp2/3 para estimular la polimerización de actina, promoviendo el “*fruncido*” de la membrana, la formación de lamelipodio y la reorganización de actina

2 ANTECEDENTES

Los espermatozoides de ratón, bovino y humano presentan en su superficie tres tipos de integrinas: $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$, las cuales han sido localizadas en la región acrosomal. Durante la reacción acrosomal, estas integrinas migran al segmento ecuatorial [97-99], región reconocida como el sitio de adhesión y fusión de los espermatozoides con la membrana plasmática del óvulo. El uso de anticuerpos específicos contra las cadenas α o β , así como el péptido RGD o la FN, ha permitido determinar la participación de estas proteínas en la interacción espermatozoide-óvulo [97-100]. Aunque recientemente se ha mostrado la presencia de una proteína similar a FAK en espermatozoides de ratón y caballo, no se le han atribuido funciones en la capacitación, reacción acrosomal o movilidad [101, 102]. De esta misma forma, no existen evidencias que muestren la presencia de proteínas de adhesión focal como talina, vinculina, α -actinina y otras más, en los espermatozoides de los mamíferos. Por tanto, resulta relevante conocer si el proteoma de los espermatozoides contiene proteínas de adhesión focal y su posible participación en la fisiología espermática.

3 JUSTIFICACIÓN

La existencia de integrinas ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$) en los espermatozoides de ratón, bovino y humano sugiere la presencia de moléculas de adhesión focal que pudieran asociarse con las integrinas $\beta 1$ o $\beta 3$, las cuales podrían formar puntos de adhesión focal y que en caso de estar en contacto con alguna matriz extracelular formarían contactos de adhesión focal. La formación de contactos de adhesión focal traería consigo la remodelación del citoesqueleto de actina y la activación de diferentes vías de señalización, donde FAK juega un papel relevante en diferentes procesos celulares como movilidad y sobrevivencia celular. Aunque, las integrinas presentes en los espermatozoides de mamífero solo se han involucrado en los procesos de adhesión y fusión óvulo-espermatozoide, nosotros sugerimos que los espermatozoides deben contener proteínas relacionadas con las adhesiones focales como son FAK, paxilina, talina, vinculina y α -actinina, que ellas formarían adhesiones focales y que estarían involucradas en la regulación de los procesos fisiológicos espermáticos como la capacitación, la reacción acrosomal y la remodelación del citoesqueleto de actina. Estas adhesiones estarían también involucradas en la adhesión a las proteínas de la matriz extracelular presente en la superficie de las células epiteliales del oviducto, y que posiblemente podrían regular la sobrevivencia de los espermatozoides durante su estancia en este lugar.

4 HIPÓTESIS

Si el espermatozoide del cobayo posee proteínas como las integrinas, entonces es probable que posean otras proteínas relacionadas con la formación de complejos de adhesión focal como paxilina, vinculina, integrina- β 1, α -actinina, talina y FAK. De ser así, formarían contactos de adhesión focal que podrían estar implicados en la regulación de la capacitación y/o la reacción acrosomal, así como en la sobrevivencia de los espermatozoides cuando interaccionan con proteínas de la matriz extracelular.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de proteínas relacionadas con las adhesiones focales, específicamente FAK, paxilina, α -actinina, vinculina, talina e integrinas β 1 y β 3 en espermatozoides del cobayo, así como su función durante la capacitación, la reacción acrosomal y la sobrevivencia a través de su interacción con proteínas de la matriz extracelular y la activación de la vía de señalización mediada por FAK.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Detectar y localizar proteínas asociadas con los contactos de adhesión focal (paxilina, vinculina, FAK, talina, α -actinina, y las cadenas β 1, β 3, α 5, α 6 y α v de las integrinas) en espermatozoides del cobayo no capacitados y capacitados.
2. Determinar el estado de activación de FAK y paxilina durante la capacitación, mediante el análisis de fosforilación en los residuos de Tyr397 y Tyr118, respectivamente.
3. Estudiar el efecto de un inhibidor de FAK (PF573228) sobre la capacitación y la reacción acrosomal.
4. Determinar si las proteínas relacionadas con la formación de adhesiones focales, forman complejos en los espermatozoides y si dichos complejos sufren cambios durante la capacitación.
5. Investigar la relación de las proteínas de adhesión focal del espermatozoide, especialmente vinculina y α -actinina, con el citoesqueleto de actina y los posibles cambios que sufran durante la capacitación.
6. Indagar si los espermatozoides son capaces de adherirse a componentes de la MEC como son Fibronectina, colágeno y laminina.
7. Definir si la adhesión de los espermatozoides a una MEC altera la capacitación, la reacción acrosomal y la sobrevivencia de los espermatozoides.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Reactivos

Piruvato sódico, ácido láctico, DL-ditiotreitol, sacarosa, Tritón X-100, iodoacetamida, benzamidina, aprotinina, leupeptina, pepstatina, paraminobenzamidina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Tris base, FITC o TRITC-faloidina, ortovanadato sódico y fluoruro sódico fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Proteína A / G agarosa y los inhibidores de proteasas (Complete™ cóctel comprimidos) se obtuvieron de Roche Diagnostics and Molecular Biochemicals (Mannheim, Alemania). Las membranas de nitrocelulosa, acrilamida, N, N'-metilen-bisacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS) se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Las membranas de Immobilón se adquirieron de Millipore (Billerica, MA). Anti - FAK (sc - 558, sc - 1688), anti - paxilina (sc - 5574), anti - vinculina (sc - 7648 y sc - 5573), anti -integrina- β 1 (sc - 6622 y Sc-8978), anti-p-FAK (sc-11765-R), α -actinina (sc-15335) y anti-paxilina (Sc-365020) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti - Talina (T3287) y α - actinina (A - 2543) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP), TRITC, FITC, o Cy5 de Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. (West Grove, PA). El reactivo de quimioluminiscencia (ECL) mejorado se adquirió de Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido) o Millipore (Billerica, MA). El inhibidor de FAK PF573228 (número de catálogo 3239) se obtuvo de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). Placas de cultivo

de 24 pozos activadas (número de catálogo 0030 722.116) se obtuvo de Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

7.2 Animales

Todos los experimentos con animales y los procedimientos de manipulación fueron aprobados por el Comité Interno para el cuidado de animales de laboratorio del CINVESTAV-IPN (CICUAL 012211). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el dolor de los animales, el estrés y/o la angustia. Se usaron cobayos machos adultos de más de 800 g de peso, de la cepa CIEA-HART.

7.3 Preparación de los Espermatozoides de Cobayo

Los espermatozoides se obtuvieron como describe previamente Cabello-Agüero et al [26] y Pasten-Hidalgo et al [103]. Los espermatozoides de cobayo se obtuvieron de los conductos deferentes y se lavaron en una solución de NaCl 154 mM. Las células espermáticas (3.5×10^7 células / ml) fueron capacitadas por incubación a 37°C por 1 h en medio mínimo de cultivo que contenía lactato y ácido pirúvico (MCM-PL, ver anexo). Las células se incubaron en presencia del inhibidor PF573228 (5 μ M) de 20 a 60 min en MCM-PL. Inmediatamente después de la capacitación, las muestras fueron fijadas en formaldehído al 1.5% (concentración final) en PBS. Dependiendo del experimento, las células control se incubaron en un medio que no soporta la capacitación (MCM-PL sin NaHCO_3^- y sin CaCl_2 , tamponado con 25 mM HEPES, pH 7.4), MCM-PL, o MCM-PL más un vehículo. En todos los casos, las células control fueron incubadas y fijadas al mismo tiempo que las muestras tratadas.

7.4 Extractos de las Células Espermáticas, Electroforesis e Inmunoblot

Las células (3.5×10^7) se suspendieron en amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM a pH 7.4, EGTA 1 mM, PMSF 1 mM, cóctel de inhibidores de proteasas complete™ de Roche, 1 mg / ml de aprotinina, ortovanadato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 25 mM y 1% Tritón X-100) [103]. Las muestras se centrifugaron a 14,000 x g durante 20 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante. La concentración de proteínas de los lisados provenientes de los diferentes tratamientos se realizó mediante la técnica de Bradford[104], cuyo reactivo fue obtenido de BIO-RAD Laboratories (Hércules, CA). Las muestras fueron entonces hervidas durante 5 min en amortiguador de muestra (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% azul de bromofenol y 0.125M de Tris HCl, pH 6.8 [105]. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% o 10% en presencia de SDS (SDS-PAGE) y transferidas enseguida a membranas de PVF o nitrocelulosa, la primera para transferir las proteínas que se inmunoprecipitaron y la segunda para las proteínas en general. Las membranas se bloquearon utilizando solución salina tamponada con Tris (TBS) que contenía 0.1% de Tween-20 y 5% de leche en polvo sin grasa. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo respectivo (anti-FAK 1: 100, anti-vinculina 1:1000, anti - paxilina 1:1000, anti - talina 1:1000, anti – integrina- β 11:1000, o anti- α -actinina 1: 1000). Las membranas fueron lavadas cinco veces durante 7 min cada vez. Después se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con HRP apropiado (1:10000). Las proteínas inmunoreactivas se detectaron por quimioluminiscencia utilizando un kit de detección ECL inmunoblot (Amersham o

Millipore). Para verificar la especificidad de los anticuerpos, se hicieron tres tipos de controles: (1) La inmunodetección se realizó usando solo el anticuerpo secundario, (2) inmunodetección utilizando anticuerpos primarios inespecíficos y (3) anticuerpos primarios preincubados con su respectivos péptidos de bloqueo antes de la inmunodetección (datos no mostrados).

7.5 Ensayos de Inmunofluorescencia

Las células se fijaron en formaldehído al 1.5% en PBS por 60 min e incubadas en NH_4Cl 50 mM en PBS durante 15 minutos y se lavaron dos veces por centrifugación/resuspensión en PBS. Los espermatozoides fueron permeabilizados con acetona enfriada a -20°C durante 7 min y se lavaron tres veces en PBS y una vez en agua destilada. Con los espermatozoides se prepararon frotis, que se secaron al aire a temperatura ambiente. Los frotis se incubaron con anticuerpo primario (anti-FAK 1:100, anti-vinculina 1:100, anti-paxilina 1:100, anti-talina 1:100, anti-integrina- β 1 1:100, o anti- α -actinina 1:100) en solución de bloqueo (1% de albúmina de suero bovino en PBS) durante 12 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Después se lavaron con PBS y las células se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado marcado con TRITC- o Cy⁵ durante 2 h a 37°C . En todos los casos, los frotis se lavaron extensivamente con PBS y se montaron con cubreobjetos de vidrio utilizando 25 μl de gelvatol (Sigma Chemical Co.). Para confirmar la especificidad de los anticuerpos, se ensayaron tres tipos de controles: (1) Los espermatozoides se incubaron solo con el anticuerpo secundario, (2) se incubaron a los espermatozoides con un anticuerpo primario no específico, y (3) los anticuerpos primarios utilizados se preincubaron con

sus respectivos péptidos de bloqueo antes del ensayo de inmunofluorescencia. Los espermatozoides teñidos bajo estas condiciones mostraron patrones muy débiles de fluorescencia (datos no mostrados).

7.6 Co-Inmunoprecipitación

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación, el anticuerpo anti-paxilina se unió a la proteína A/G-agarosa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Kit de inmunoprecipitación, Pierce®). Se inyectaron 20 µg del anticuerpo anti-paxilina a 20 µl de la resina e inmovilizándolo covalentemente sobre el soporte por entrecruzamiento con disucianimil suberato 2,5 mM (DSS) a temperatura ambiente durante 60 minutos y lavado para eliminar el exceso del anticuerpo no entrecruzado. Los extractos de proteína de esperma procedentes de los espermatozoides no capacitados y capacitados se incubaron con agitación constante por 12 h a 4 ° C. Las proteínas unidas al anticuerpo anti-paxilina /proteína A/G-agarosa se recuperaron por centrifugación a 4000 x g después de tres lavados. Las proteínas asociadas se eluyeron y se recuperaron por centrifugación a 4000 x g y se hirvieron en amortiguador de Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) durante 5 min. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a análisis de inmunoblot.

7.7 Análisis de la Fosforilación de Proteínas en Residuos de Tirosina

Las muestras se analizaron mediante inmunoblot, siguiendo las indicaciones descritas en el apartado 6.4. Los espermatozoides (3.5×10^7) se resuspendieron en

amortiguador de lisis,(ver anexo) se centrifugaron a 14,000 x g durante 20 min a 4°C y las concentraciones de proteína de los sobrenadantes fueron determinadas por la técnica de Bradford [104]. Cien µg de cada muestra se incubaron en amortiguador de muestra, se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVF [106]. Las membranas se bloquearon e incubaron con el anticuerpo contra la fosfotirosina (anti-p-Tyr) diluido 1:1000. Luego de lavar, se incubaron con el anticuerpo secundario (1: 10,000) marcado con peroxidasa de rábano fuerte (HRP). Las proteínas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia.

7.8 Evaluación del Estado de la Capacitación Mediante Tinción con Clortetraciclina (CTC)

Se siguió el método descrito por Shi y Roldan [108] para evaluar el estado de capacitación con clortetraciclina (CTC). CTC es un antibiótico que emite fluorescencia cuando se une al Ca^{2+} acoplado a fosfolípidos de membrana [109]. El patrón de fluorescencia cambia cuando la membrana del espermatozoide sufre cambios durante la capacitación y/o reacción acrosomal, distinguiéndose tres patrones: espermatozoides intactos (no capacitados), espermatozoides capacitados, y espermatozoides reaccionados (ver Fig. 12). Para la tinción, se tomó un volumen 45 µl de solución de CTC-HCl 750 mM diluida en el amortiguador de incubación (130 mM de NaCl, 5 mM de cisteína, 20mM de Tris-HCl, pH 7.8) y se mezcló con 45 µl de la suspensión espermática, se incubaron durante 20 segundos a 37°C en la oscuridad. Las células se fijaron con 0.7 µl de glutaraldehído al 12.5% en amortiguador Tris-HCl

1 M (pH 8.0). Después de la incubación, 15 μ l de la suspensión de esperma se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se le puso un cubreobjetos. Las muestras se examinaron con un microscopio Nikon de fluorescencia equipado con un objetivo 40 X plan de 40 / 0.65 y se tomaron fotografías con una cámara digital Olympus BX50 utilizando el software NIS-Element versión 3.07. La fluorescencia de la CTC se evaluó con luz ultravioleta, analizando 300 espermatozoides en cada muestra los cuales se clasificaron de acuerdo con el patrón que presentaron [109]: patrón "F", con fluorescencia uniforme en la cabeza, que es característica de los espermatozoides no capacitados y con acrosoma intacto; patrón "B", con fuerte fluorescencia en la región apical del acrosoma, pieza media y segmento ecuatorial, corresponden a espermatozoides capacitados; y patrón "RA", con fluorescencia fuerte fluorescencia en el segmento ecuatorial o la región postacrosomal, que es característica de las células con acrosoma reaccionado. La presencia del acrosoma en cada célula se verificó bajo el microscopio de contraste de fases (Fig.12).

7.9 Evaluación de la Actina-F

Espermatozoides fijados fueron permeabilizados e incubados con 30 μ M de faloidina-TRICT, a temperatura ambiente durante 60 min. Los frotis se lavaron exhaustivamente con PBS y se montaron poniendo un cubreobjetos de vidrio utilizando gelvatol, y se observaron bajo un fotomicroscopio Olympus BX50 equipado con contraste de fase y epifluorescencia o un microscopio Leica confocal. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital y la fluorescencia se analizó y valoró utilizando un software NIS-Element versión 3.07.

7.10 Determinación de la Concentración Óptima de PF573228

Para investigar la posible participación de FAK en la capacitación o la RA, se utilizó un inhibidor específico FAK el PF573228 [110-112]. Los espermatozoides fueron capacitados en presencia de diferentes concentraciones de PF573228 (0.5-10 μ M) y después de 20 min la RA fue cuantificada.

7.11 Ensayo de Viabilidad Espermática

La viabilidad espermática se determinó debido a que no se conocían los efectos del inhibidor PF573228 en los espermatozoides de mamíferos. Se estimó determinando la integridad de la membrana celular utilizando el principio de exclusión de yoduro de propidio (IP) [113]. Los espermatozoides se centrifugaron para retirar el medio, la pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS y se añadió 15 μ l de IP de una solución de IP (1 μ g/ml), se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Los espermatozoides fueron lavados y se hicieron frotis para determinar el número de espermatozoides teñidos y sin teñir (500 célula/muestra, n = 3) bajo un microscopio de epifluorescencia. Como control positivo se trataron células con PBS-Tritón al 0.01% por 5-10 min.

7.12 Estimación de la Reacción Acrosomal

La RA se determinó mediante el examen en una cámara Neubauer bajo microscopía óptica. Los espermatozoides fueron fijados (formaldehído 1.5%, en PBS) y la RA se cuantificó basado en el porcentaje de espermatozoides sin acrosoma antes y después de la capacitación. Cuatro alícuotas se contaron separadamente (300 células cada una). Para los espermatozoides capacitados, la RA se normalizó respecto a los valores

observados en los espermatozoides no capacitados, mediante la substracción de este último.

7.13 Preparación de las Placas para el Ensayo de Adhesión

Para los ensayos de adhesión se usaron placas activas de 96 pozos de fondo plano marca Eppendorf. Se lavaron con PBS estéril, se les agregaron 50 µg/ml de FN, colágeno I o laminina en amortiguador de fosfatos (PBS) y se dejaron incubando toda la noche a 4° C. Se les retiro la proteína no unida y se lavó de nuevo tres veces con PBS estéril. Después, se saturaron los sitios libres del plástico con albúmina de suero de bovino al 1% (BSA) por 1 hora a 37° C, se lavó tres veces con PBS. Como control de adhesión, placas fueron tratadas solo con BSA.

7.14 Experimentos de Adhesión Celular

Para estandarizar el ensayo de unión, la concentración de saturación espermática se buscó incubando las placas con FN, laminina o colágeno I con concentraciones crecientes de espermatozoides (0.5, 1, 2, 5 y 10 x10⁶ sptz/ml) en un medio no capacitante y dos medios capacitante, el MCM-PL y Tyrode-PL (ver anexo), previamente ajustados a 3.5 X 10⁷/ml. Las placas se incubaron a 37°C bajo una atmosfera humidificada que contiene 5% de CO₂ y 95% de aire, por 30 min para permitir que las células se adhirieran. Las células adheridas se observaron con un microscopio invertido ICM 405 (Germany) y los videos tomados con una cámara Nikon 5X Coolpix S4100 (China). Los videos se tomaron a un aumento de 20X durante 1 min. Enseguida, los pocillos se lavaron en tres ocasiones con medio sin calcio, MCM-PL o Tyrode según se necesitó. Las muestras se incubaron hasta por 8 horas y se

registraron videos de 1 min a cada hora. En los videos se valoró el número de espermatozoides unidos, no unidos, con RA y la formación de rosetas. Esto se contó por campo, evaluando un total de 5 campos por tratamiento. Los resultados se expresaron como el porcentaje de espermatozoides unidos a fibronectina, laminina y colágeno I respecto del total de espermatozoides inoculados.

7.15 Obtención de Extractos Proteicos de MDA-MB-231

La línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se cultivó usando el medio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado con 3.7 g / l de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y 5% de suero fetal de bovino. Se mantuvieron a 37°C bajo una atmosfera humidificada que contiene 5% de CO_2 y 95% de aire. Cuando las células fueron confluentes, el medio fue eliminado por aspiración y las células fueron solubilizadas en amortiguador RIPA (HEPES 50 mM a pH 7.4, NaF 150 mM, 10 mM de pirofosfato de sodio, 10% de glicerol, 1% de Tritón X-100, 1% de desoxicolato de sodio, MgCl_2 1.5 mM, SDS al 0.1%, e inhibidores de proteasa). Los lisados se clarificaron por centrifugación a 12,000 X g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos y la concentración de proteína fue determinada por Bradford.

7.16 Evaluación de la movilidad espermática

La movilidad de los espermatozoides durante la unión a placas cubiertas con FN *in vitro* se evaluó utilizando un microscopio invertido y los videos tomados con una cámara Nikon 5X Coolpix S4100 (China). Las imágenes adquiridas fueron analizadas visualmente.

7.17 Análisis estadístico y densitométrico

Los datos se expresan como promedios \pm SEM. Las medias se compararon usando la prueba t de Student pareada o la prueba t de Student apropiada. La diferencia estadística entre muestras fue considerada con una significancia de $P < 0.05$.

Los datos de quimioluminiscencia se normalizaron con respecto a los resultados de espermatozoides no capacitados a 1, y para obtener el incremento de quimioluminiscencia, la relación de capacitados/no capacitados fue obtenida y expresada como un incremento en la quimioluminiscencia.

Los análisis densitométricos se realizaron con el software ImageJ (Research Services Rama del NIH). Para la formación del complejo de adhesión focal los resultados se expresaron como la relación N/No , donde N : es la intensidad de la señal dada por la quimioluminiscencia emitida por cada proteína co-inmunoprecipitada y No : intensidad de la señal quimioluminiscente de paxilina inmunoprecipitada. Para FAK y paxilina fosforiladas, así como como fosforilación de Tyr, la fosforilación de la proteína se expresó como la relación N/No , donde N : la intensidad de la señal dada por la quimioluminiscencia de la proteína fosforilada para cada tiempo de capacitación y tratamiento y No : intensidad de la señal de las proteínas fosforiladas para los espermatozoides no capacitados.

8 RESULTADOS

8.1 Caracterización de las Proteínas de Adhesión Focal en los espermatozoides

8.1.1 Presencia de las proteínas de adhesión Focal en espermatozoides del cobayo

La presencia de las proteínas de adhesión focal en los espermatozoides de cobayo fue determinada por inmunoblot en lisados de espermatozoides completos no capacitados, y capacitados. En el análisis de inmunoblot se observaron bandas específicas con masas moleculares relativas (Mr) de ~130, 70, 125, 120, 100 y 230 kDa que fueron detectados para Integrina- β 1, paxilina, FAK, vinculina, α -actinina y talina, respectivamente (Fig. 6A). Debido a que ninguna de estas proteínas había sido detectada en espermatozoides de mamífero, validamos los anticuerpos usados en este estudio, se hicieron controles positivos con extractos de células de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 y en espermatozoides de ratón y humano¹, observándose que las seis proteínas analizadas presentaron una movilidad relativa similar a aquellas descritas para el espermatozoide de cobayo (Fig. S1). Estos resultados indican que las proteínas Integrina- β 1, paxilina, FAK, vinculina, α -actinina y talina se encuentran en los espermatozoides del cobayo, ratón y humano.

La localización subcelular de las seis proteínas fue realizada por inmunocitoquímica. Las seis proteínas fueron localizadas en la región acrosomal de los espermatozoides

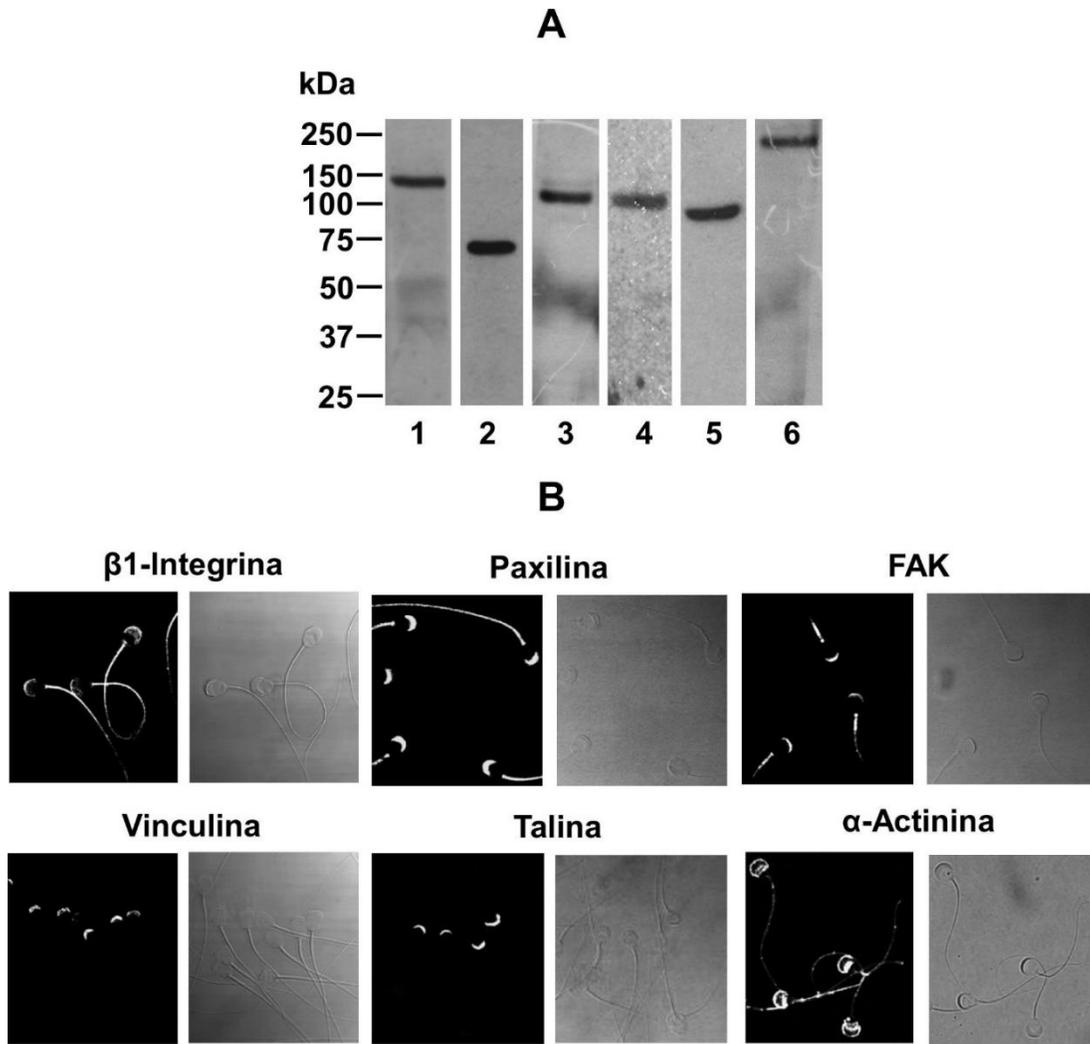


Figura 6. Las proteínas de adhesión focal son expresadas en espermatozoides del cobayo. (A) Para la detección de proteínas de adhesión focal en los espermatozoides del cobayo, 100 μ g de extractos de esperma se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las proteínas fueron detectadas usando anticuerpos específicos. (1) Integrina β 1, (2) paxilina, (3) FAK, (4) vinculina, (5) α -actinina, y (6) talina. (B) Ensayos de inmunocitoquímica se realizaron para determinar la localización de las proteínas de adhesión focal en los espermatozoides del cobayo. Los paneles de la izquierda corresponden a la localización de la Integrina β 1, paxilina, FAK, vinculina, α -actinina, y talina. Los paneles de la derecha corresponden a imágenes de campo claro. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

del cobayo (Fig. 6B). Integrina- β 1, paxilina y FAK también fueron localizadas en el flagelo. Los patrones de localización fueron similares en espermatozoides no capacitados y capacitados (datos no mostrados). La única diferencia observable fue para α -actinina, ya que ella bordea la periferia de la región acrosomal y la señal fluorescente disminuye a lo largo del flagelo. Resultados similares fueron encontrados para los espermatozoides de humano y ratón (Fig. S2).

8.1.2 Formación de los complejos de adhesión focal durante la capacitación.

Debido a que todas las proteínas fueron localizadas en la región acrosomal, nos preguntamos si estas proteínas forman los complejos y si tienen cambios durante la capacitación. Para contestar la pregunta, se llevaron a cabo ensayos de co-localización y co-inmunoprecipitación. Para estos ensayos utilizamos a la proteína de andamiaje paxilina como referencia, ya que contiene varios dominios que median interacciones proteína-proteína para Integrina- β 1, FAK, vinculina y talina [115]. En los ensayos de co-localización en los espermatozoides no capacitados, la paxilina co-localiza con FAK y con Integrina- β 1 en la región acrosomal y en la pieza media, el patrón se mantuvo para los espermatozoides capacitados (Fig. 7).

En espermatozoides no capacitados se observó mucho menor intensidad de la fluorescencia en la co-localización de paxilina con vinculina y talina; sin embargo, en la co-localización incrementó la intensidad de la fluorescencia durante la capacitación, particularmente en la región apical del acrosoma (Fig. 8A), lo que sugiere la formación de complejos de adhesión focal en los espermatozoides durante la capacitación.

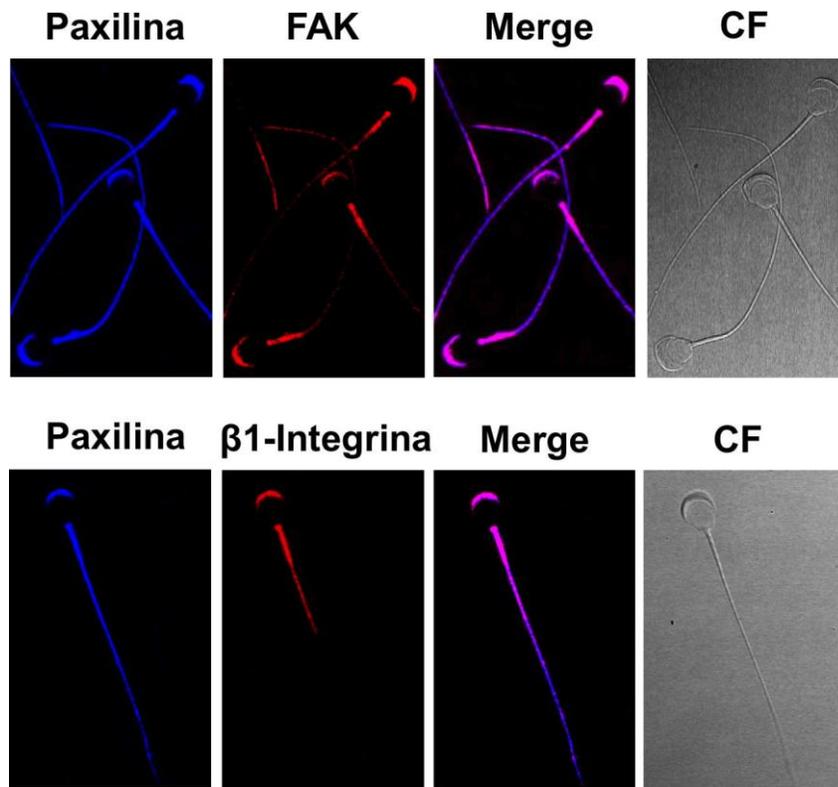


Figura 7. Paxilina co-localiza con FAK y integrina- β 1. Para determinar la posible interacción de paxilina con FAK e integrina- β 1, se llevaron a cabo ensayos de co-localización. La co-localización de paxilina (azul) con FAK e integrina- β 1 (rojo) fue visualizada mediante ensayos inmunocitoquímicos en espermatozoides fijados en formaldehído. Las imágenes de co-localización (rosa) y de contraste de fases (CF) son mostrados. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes

Para probar esta hipótesis, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación para aislar a las proteínas asociadas a paxilina en espermatozoide no capacitados y en capacitados. Los análisis por inmunoblot y densitometría realizados usando como control a paxilina mostraron que, en los extractos de espermatozoides no capacitados y capacitados, FAK e integrina- β 1 co-inmunoprecipitaron con paxilina en cantidades similares según la intensidad de la señal quimioluminiscente (Fig. 8B, C). Por otro lado,

en los espermatozoides no capacitados, vinculina y talina co-inmunoprecipitaron con paxilina en una cantidad significativamente menor. Mientras que, en espermatozoides capacitados, la cantidad de vinculina y talina co-inmunoprecipitada con paxilina fue similar (Fig. 8B, C). Tanto en los espermatozoides no capacitados como en los capacitados, sólo una pequeña cantidad de α -actinina co-inmunoprecipita con paxilina (Fig. 8B, C). Adicionalmente, la inmunodetección de vinculina, talina y α -actinina en espermatozoides no capacitados y capacitados no mostró diferencias en la señal quimioluminiscente, indicando que los cambios observados en los ensayos de co-inmunoprecipitación no son debidos a un incremento de la cantidad de estas proteínas durante la capacitación (Fig. 8D). Estos resultados sugieren que las proteínas de adhesión focal encontradas en los espermatozoides forman complejos que se ensamblan durante la capacitación.

8.2 La fosforilación de FAK y paxilina se incrementan durante la capacitación de los espermatozoides de cobayo.

Con el fin de determinar si tanto FAK como paxilina son activadas durante la capacitación, se analizaron sus estados de fosforilación en Tyr397 y Tyr118 respectivamente. Los espermatozoides no capacitados presentaron una fosforilación basal para FAK en el residuo de Tyr397 (p-FAK) y paxilina en el residuo Tyr118 (p-Pax) (Fig.9). La fosforilación en ambas proteínas incrementó gradualmente durante la capacitación, pero solo fue significativo a los 60 min de capacitación y alcanzó un máximo a los 90 minutos según los valores de la densitometría realizada (Fig.9). Para determinar si el incremento en la fosforilación fue específico, los espermatozoides

fueron capacitados en presencia de PF573228 (5 μ M), el cual inhibe la fosforilación tanto en FAK como de paxilina (Fig.9E).

Con la finalidad de definir los sitios donde suceden los incrementos de fosforilación de FAK y paxilina se estudió su localización subcelular. En espermatozoides no capacitados, p-FAK and p-Pax se localizaron inicialmente en la pieza media, y con una fluorescencia débil en la región acrosomal (Fig. 10). Después de 30 min de capacitación, la fluorescencia incrementó en la pieza media y en la región acrosomal, alcanzando un máximo a los x de 90 min (Fig. 10). Estos resultados indican que FAK y paxilina tienen un nivel basal de actividad en espermatozoides no capacitados que incrementa durante la capacitación. Para determinar si el incremento en la fluorescencia de p-FAK y p-Pax durante la capacitación fue específico, los espermatozoides se capacitaron en presencia de PF573228. Después 60 min de capacitación, los espermatozoides no mostraron fluorescencia ni para p-FAK ni para p-Pax (Fig 10).

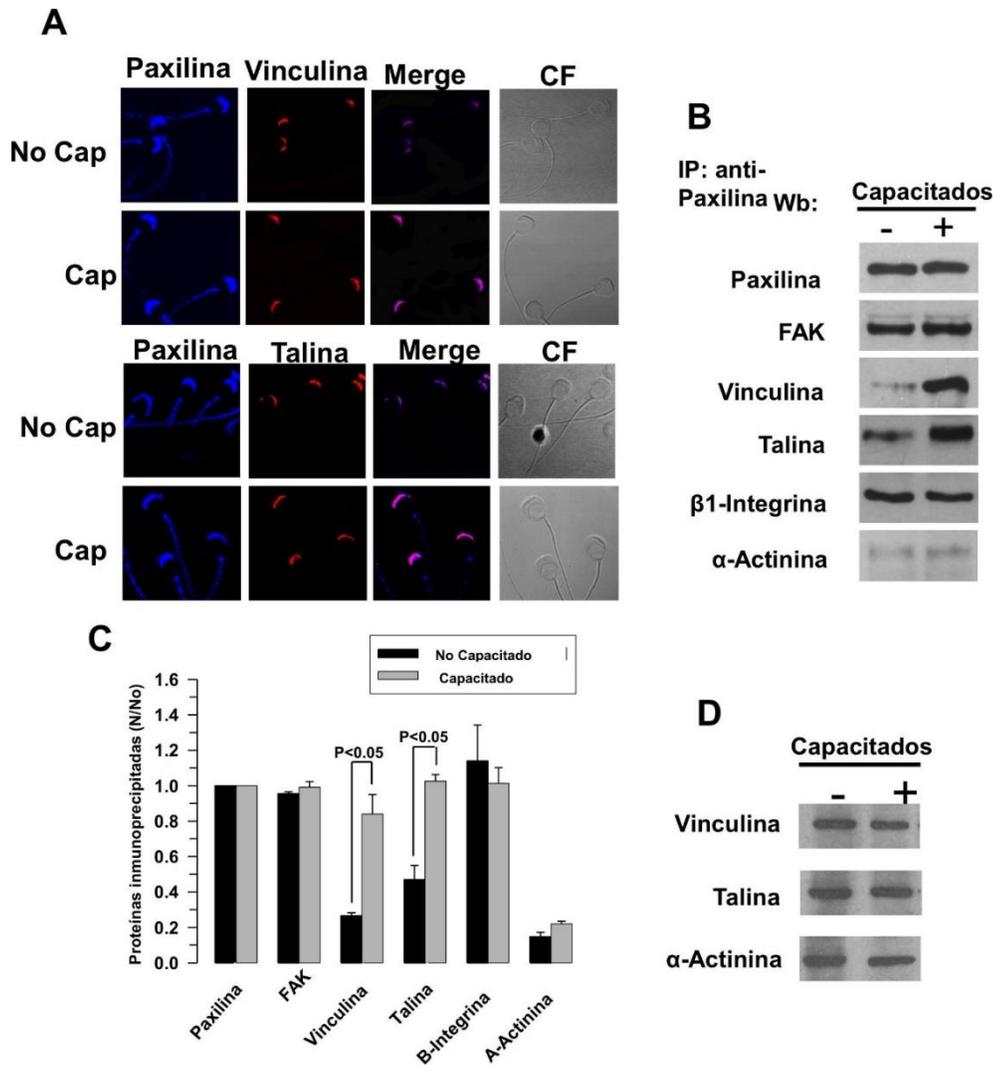


Figura 8. Talina y vinculina están asociados con el complejo de adhesión focal durante la capacitación. (A) Estudio de co-localización de vinculina y talina (rojo) con paxilina (azul) visualizada mediante ensayos inmunocitoquímicos en espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (Cap). Se incluyen las imágenes de superposición (rosa) y de contraste de fases (CF). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (B) Ensayos de co-inmunoprecipitación de paxilina con las proteínas de adhesión focal de espermatozoides no capacitados y capacitados, utilizando el anti- anticuerpo anti paxilina. Las proteínas precipitadas fueron separadas por SDS-PAGE y se realizaron inmunoblots utilizando los anticuerpos anti-paxilina, anti-FAK, anti- Integrina- β , anti-vinculina, anti-talina y anti- α -actinina. La imagen es representativa de cinco experimentos independientes. (C) Análisis densitométrico de la co-inmunoprecipitación de las proteínas de adhesión focal (media \pm S.E.M. n = 3 experimentos independientes). (D) Inmunoblot que muestra que la cantidad de vinculina, talina, y α -actinina no cambian durante la capacitación. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

8.3 Papel de FAK en la Capacitación y en la Reacción Acrosomal.

8.3.1 La inhibición de FAK no altera la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina durante la capacitación.

Visconti et. al. [116] han reportado que una característica importante de la capacitación es el incremento de la fosforilación en residuos de Tyr. Debido a que se ha involucrado a la cinasa de adhesión focal PYK2 en la regulación de la fosforilación en residuos de tirosina [117], en este trabajo estudiamos el efecto de la inhibición de FAK sobre la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina. Encontramos que hay una fosforilación basal en espermatozoides no capacitados, que se incrementa conforme los espermatozoides se capacitan, y ese incremento se inhibió por el antagonista de la proteína cinasa A (PKA) el H-89 (Fig.11A, B). Cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia del inhibidor de FAK (PF573228), la fosforilación en residuos de tirosina no se inhibió (Fig. 11A, B). Como la fosforilación de proteínas no se inhibió, entonces se valoró la capacitación por la técnica de CTC (Fig. 12), esto para confirmar que se llevó acabo la fosforilación de proteínas durante la capacitación. Los resultados muestran que la proporción de espermatozoides capacitados incrementó durante la capacitación (30 min= 53.07 ± 5.82 y 60 min= 70.70 ± 8.05 , N=3). En presencia del inhibidor (5 μ M), se obtuvo una menor proporción de espermatozoides capacitados (30 min= 12.86 ± 6.89 y 60 min= 15.24 ± 9.73 , N=3), pero un alto porcentaje del patrón RA (63.27 ± 4.54 a los 30 min y 70.55 ± 4.84 para 60 min, n=3). Estos resultados sugieren que la inhibición de FAK lleva a una rápida capacitación y consecuentemente a que los espermatozoides experimenten RA muy tempranamente. Para sustentar esta hipótesis, mediante inmunocitoquímica se analizó el estado de fosforilación de los

residuos de Tyr durante la capacitación espermática en presencia de PF537228. Los espermatozoides no capacitados mostraron fluorescencia pálida en la pieza media, que aumentó gradualmente durante el transcurso de capacitación. Después de 30 min de capacitación, la fluorescencia fue evidente a lo largo del flagelo y en el acrosoma, mientras que se observó mayor fluorescencia a los 60 min (Fig.13A). En cambio, los espermatozoides capacitados en presencia de PF573228 mostraron una fluorescencia fuerte a lo largo de los flagelos y en sus acrosomas durante los primeros 10 min de incubación. La intensidad de fluorescencia fue mayor que la exhibida por espermatozoides capacitados durante 10 min y similares a los exhibidos por espermatozoides capacitados durante 30 minutos en ausencia de PF573228 (Fig. 13B). Los resultados confirman que la inhibición de FAK podría acelerar la capacitación y la ocurrencia de la RA.

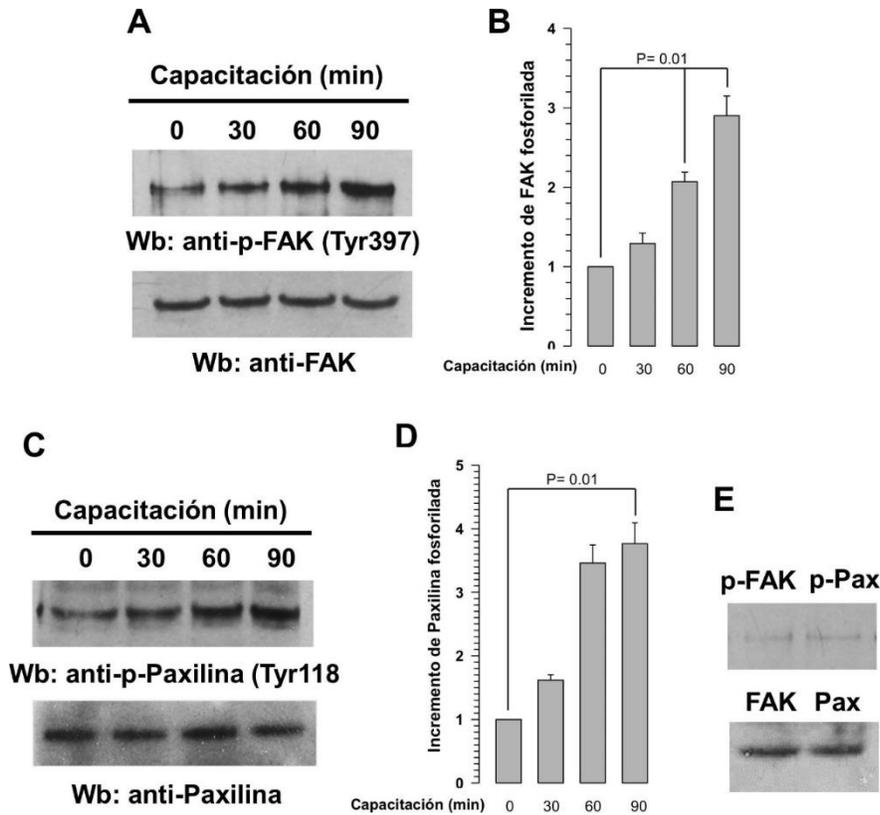


Figura 9. La fosforilación de FAK y paxilina aumentan durante capacitación. Para determinar el estado de fosforilación de FAK y paxilina, extractos totales de espermatozoides capacitados de cobayos (0-90 min) se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron por inmunoblot. (A) Panel superior: FAK fosforilada detectada con el anticuerpo anti-p-FAK (Tyr397). Panel inferior: FAK total detectada con anticuerpo anti-FAK. (B) Aumento de p-FAK durante la capacitación (media \pm s.e.m., N = 3 independiente Experimentos). (C) Panel superior: p-paxilina detectada con anti-p-paxilina (Tyr118); panel inferior: paxilina total detectada con anticuerpo anti-paxilina. (D) Aumento de la p-paxilina durante la capacitación (media \pm s.e.m., N = 3 experimentos independientes). (E) Panel superior: Inmunoblot mostrando el efecto de PF-573228 sobre la fosforilación de FAK (Tyr397) y paxilina (Tyr118) detectada con los respectivos anticuerpos anti-fosfatos. Panel inferior: FAK total y paxilina detectada con los anticuerpos anti- FAK y anti-paxilina. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

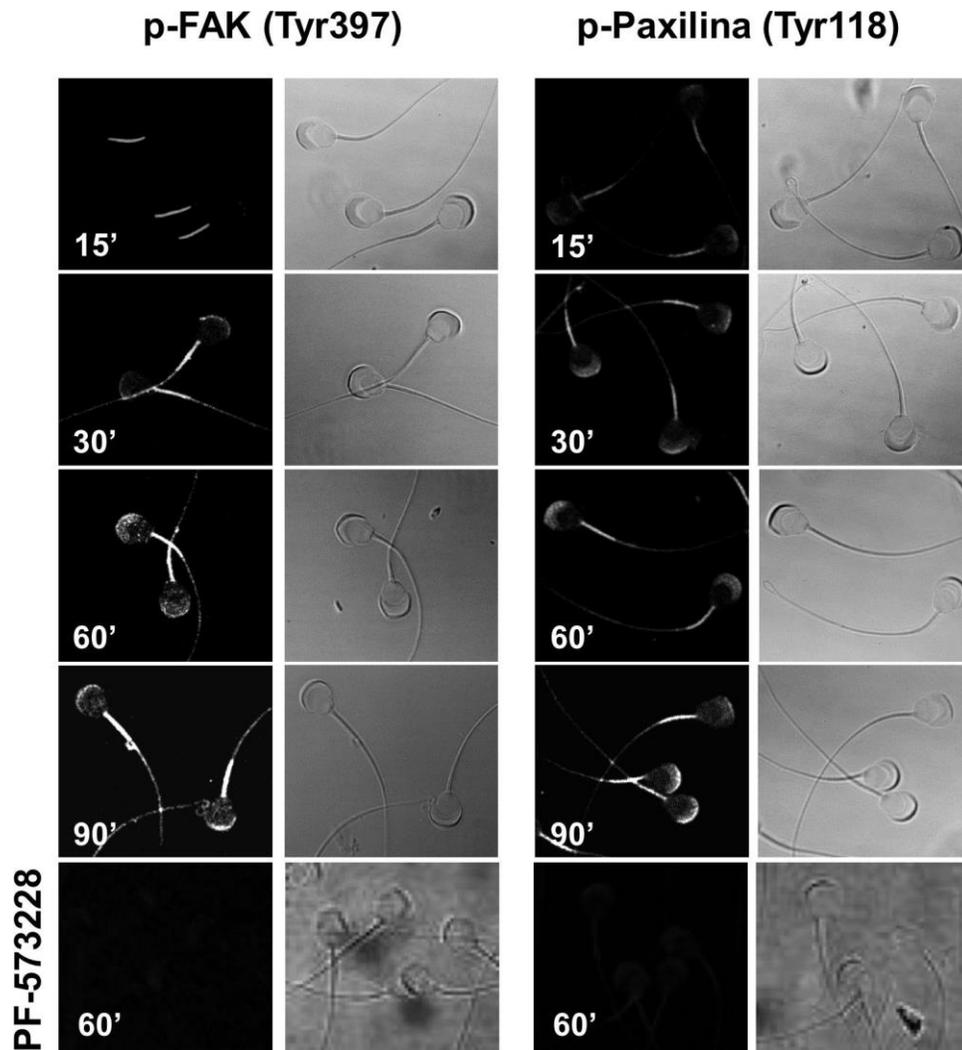


Figura 10. Aumento de la fosforilación de FAK y paxilina en la región del acrosoma y en la pieza media durante la capacitación. Para determinar en qué región subcelular la fosforilación aumenta durante la capacitación, espermatozoides de cobayo fueron capacitados (15-90 minutos) y fijados con formaldehído y la fosforilación se analizó utilizando un anticuerpo anti-p-FAK (Tyr397) o anti-p-paxilina (Tyr118). Para determinar si la tinción fue específica, los espermatozoides se trataron con PF573224 (PF). Las imágenes de la derecha corresponden a la imágenes de contraste de fase. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

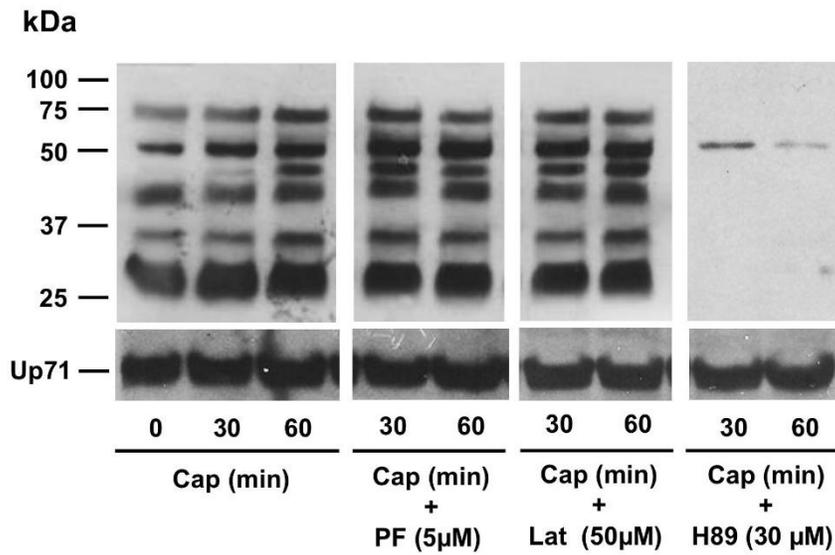
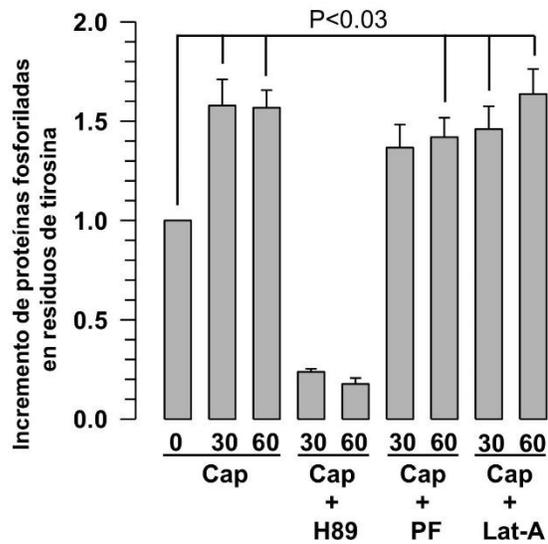
A**B**

Figura 11. Efectos de PF573228 y Latrunculina-A en la capacitación y la RA. Los espermatozoides de cobayo fueron capacitados a diferentes tiempos en presencia de Los inhibidores de FAK [PF573228 (PF)], inhibidor de la polimerización de actina [Latrunculina-A (Lat- A)], o el inhibidor de la PKA (H89) a las concentraciones indicadas. (A) Para la detección de p-Tyr, 100 μg de los extractos de espermatozoides completos se resolvieron por SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa, y las proteínas fueron detectadas usando un anticuerpo específico contra p-Tyr. La imagen representa cinco experimentos independientes de cada tratamiento. (B) El análisis densitométrico de la p-Tyr aumenta durante Capacitación (Cap) (media ± s.e.m., N = 3 experimentos independientes).

8.4 La inhibición de FAK induce la RA dependiente de calcio.

Para determinar el papel FAK sobre la RA, espermatozoides fueron capacitados en presencia del inhibidor de FAK PF573228 (5 μ M) y se cuantificó la RA. A los 20 min de incubación, bajo condiciones de capacitación la RA se incrementó significativamente en los espermatozoides tratados con PF573228 comparado con los espermatozoides no tratados. Después de 60 min de capacitación, la RA se incrementó en ambos grupos tratados y no tratados. (Fig. 14). Para definir el efecto del PF573228 sobre la RA, involucraba la polimerización de actina, se realizaron experimentos similares usando un inhibidor de la polimerización de actina, Latrunculina-A (Lat-A). Después de 20 min de incubación bajo condiciones capacitantes, la RA procedió de manera similar tanto para espermatozoides tratados o no con Lat-A; sin embargo, después de 60 min la RA incrementó significativamente en espermatozoides tratados con Lat-A, alcanzando valores similares a aquellos tratados con PF573228 (Fig. 14).

Como es sabido, la RA depende del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, y que esta no se lleva a cabo cuando los espermatozoides se incuban en medio de capacitación en ausencia de Ca^{2+} [118]. Para distinguir si el incremento en la RA en presencia del PF573228 o Lat-A es una RA genuina, los espermatozoides fueron capacitados en ausencia de Ca^{2+} . Después de 60 min de capacitación, los espermatozoides capacitados en presencia de PF573228 y Lat-A muestran una RA

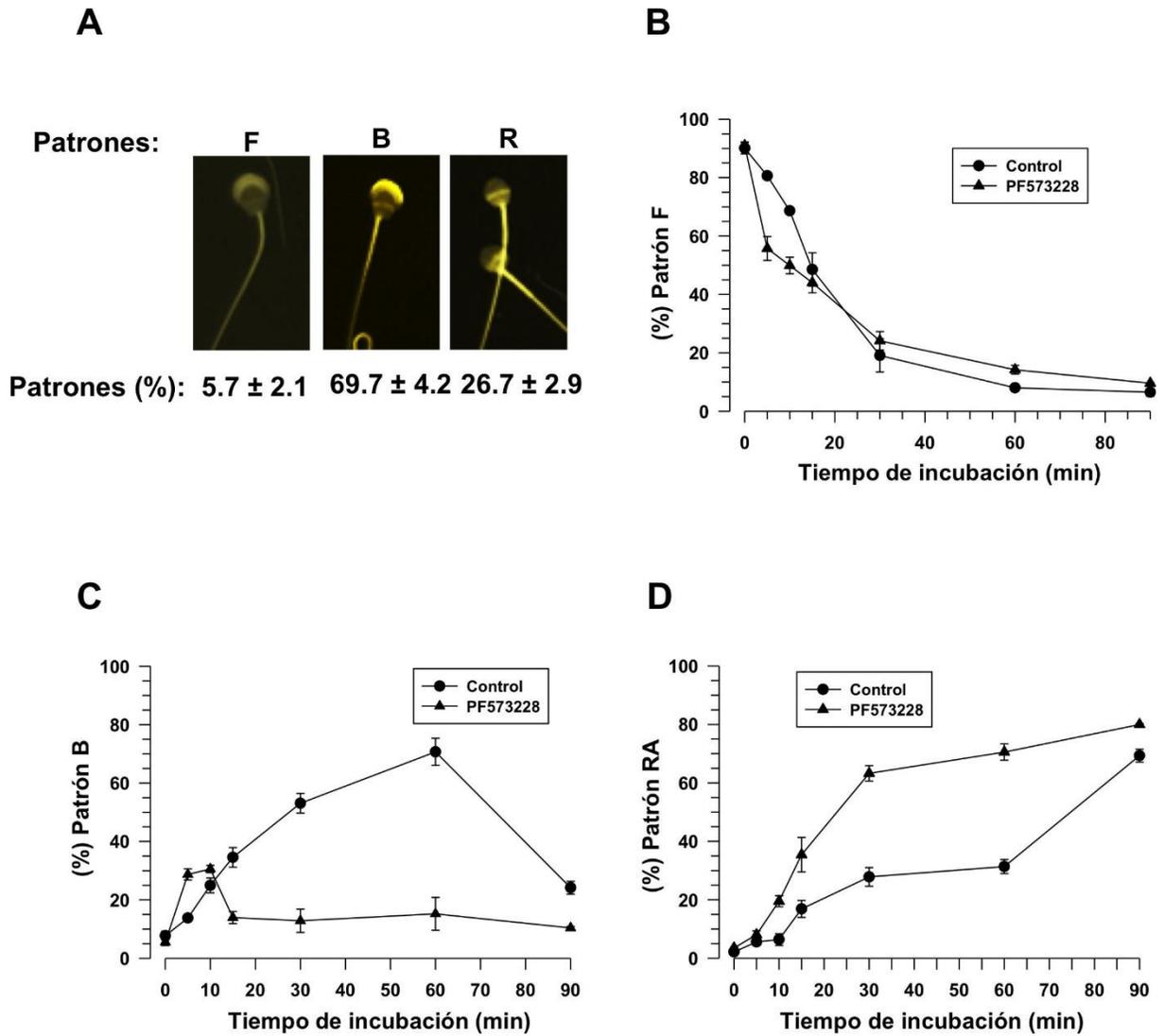


Figura 12. Patrones de tinción con CTC en Cobayo. Patrón F no capacitado, patrón B Capacitado y patrón RA con reacción acrosomal. Media \pm s. d. n = 3.

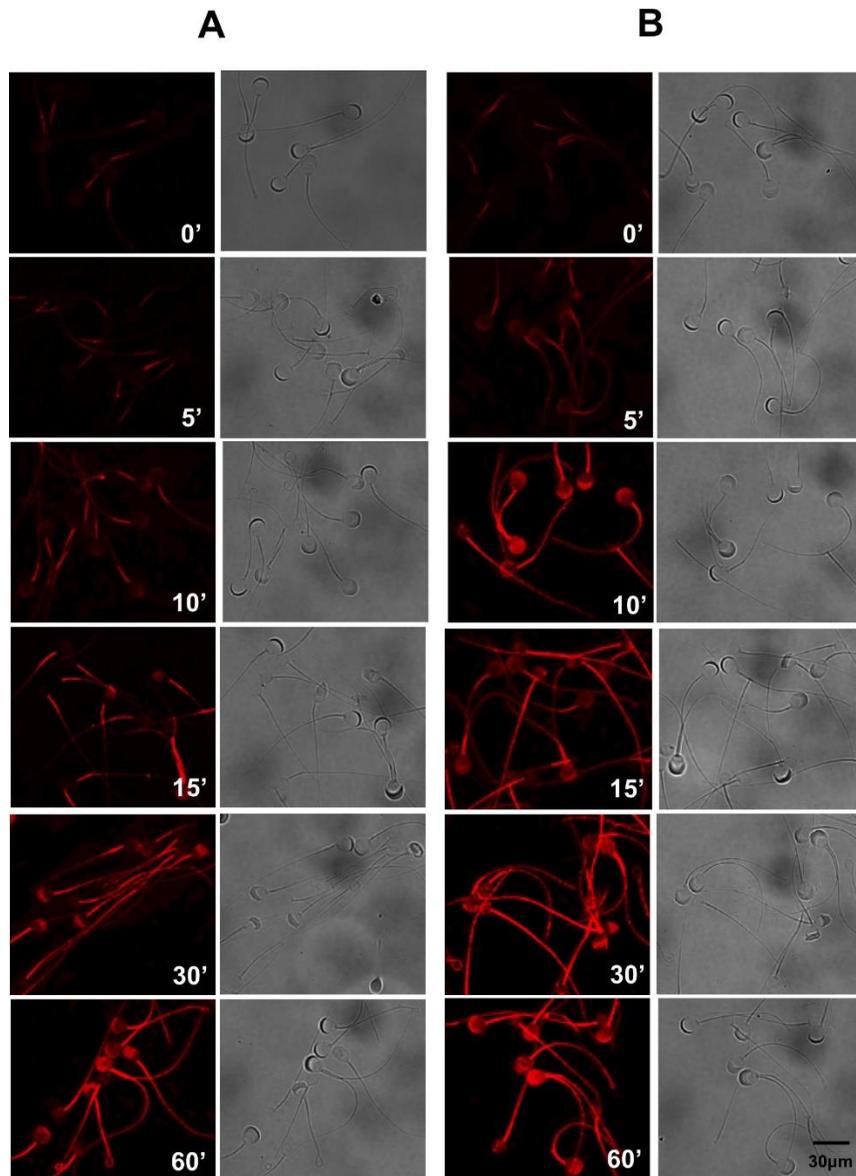


Figura 13. Efecto de PF573228 sobre la fosforilación en residuos de tirosina. Los espermatozoides se incubaron bajo condiciones de capacitación en presencia o ausencia del inhibidor de FAK PF573228 a diferentes tiempos y se usaron para el ensayo de inmunomarcaje utilizando un anticuerpo específico anti-p-Tyr. A) espermatozoides capacitados. B) espermatozoides incubados en presencia de PF573228 (5 μ M). Las imágenes de la izquierda corresponden a fosfotirosina y las de la derecha corresponden a las de contraste de fases.

significativamente reducida (Fig. 14). Los resultados sugieren que la inhibición de FAK por PF573228 induce la RA, probablemente como consecuencia de los cambios en el citoesqueleto de actina y otras vías relacionadas con la capacitación.

Para descartar que la pérdida del acrosoma se debía a que el PF573228 tuviera un efecto tóxico sobre los espermatozoides, se determinó su viabilidad utilizando la exclusión de yoduro de propidio (IP), observándose diferencias no significativas (Fig. S3).

8.4.1 La inhibición de FAK evita la polimerización de actina durante la capacitación.

Debido al efecto de FAK en la capacitación y la RA, surgió la pregunta de si FAK participa en la polimerización de actina. Para esto, la actina-F se cuantificó en espermatozoides con acrosoma intacto evaluando el grado de fluorescencia emitida por la faloidina marcada con TRITC (Fig. 15A, B). Durante los primeros 30 min de incubación en medio capacitante se observó un incremento de fluorescencia, alcanzando un máximo a los 60 min de capacitación, pero en presencia de PF573228 los espermatozoides no mostraron incremento en la fluorescencia. Como control positivo utilizamos Lat-A, la cual interrumpe la polimerización de microfilamentos debido a una unión 1:1 con actina-G. En espermatozoides capacitados en presencia de Lat-A. A los pocos minutos después de iniciada la capacitación se incrementó la fluorescencia, a los 10 min de incubación en condiciones capacitantes hubo un decremento y después de 30 min de incubación se observó niveles de fluorescencia similares a aquellos de espermatozoides no capacitados (Fig. 15A y C). Estos

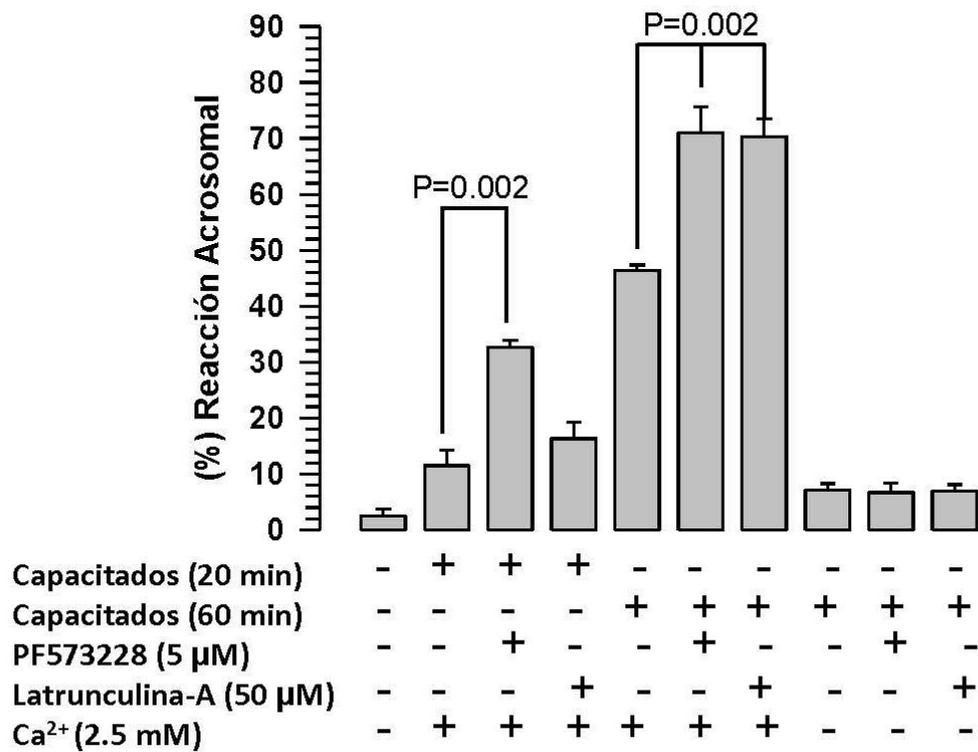


Figura 14. Efectos de PF-573228 y Latrunculina-A en la capacitación y la RA. Los espermatozoides de cobayo fueron capacitados en diferentes momentos en presencia del inhibidor de FAK PF-573228 (PF) y de Latrunculina-A (Lat- A) a las concentraciones indicadas. Para determinar el efecto de PF573228 o Lat-A en la RA, espermatozoides capacitados fueron incubados en presencia de estas drogas. La RA fue evaluada en espermatozoides capacitados en presencia o ausencia de Ca²⁺ (media \pm s.e.m., N = 3 experimentos independientes).

resultados sugirieron la posibilidad de que durante la capacitación FAK puede ser importante en la polimerización de actina y la organización del citoesqueleto.

8.5 Los Complejos de Adhesión Focal Interaccionan con la Actina-F Durante la Capacitación.

Los complejos de adhesión focal están muy vinculados a la actina-F a través de las proteínas vinculina y α -actinina [119-121]. Debido a que se identificó a ambas proteínas en la región acrosomal, estudiamos su correlación con la actina-F y sus cambios durante la capacitación. Usando microscopia confocal, se identificó a vinculina y actina-F co-localizando en la región acrosomal de los espermatozoides no capacitados (Fig. 16). A los 60 minutos de capacitación aumenta la cantidad de moléculas de proteína interaccionando entre sí, en el acrosoma. Después de 90 min, la co-localización fue intensa y limitada a la región apical de acrosoma. Se realizaron ensayos similares para estudiar la interacción de α -actinina y actina-F, encontrándose que ambas co-localizan débilmente en la periferia del acrosoma, en espermatozoides no capacitados, y aumenta la intensidad en la señal fluorescente en los espermatozoides capacitados (Fig. 17). Estos resultados demuestran que ambas proteínas de adhesión focal podrían participar tanto en la formación de los complejos de adhesión focal, como en la remodelación del citoesqueleto de actina. Para determinar si FAK interviene también en estos cambios, se realizaron ensayos de co-localización de actina-F/vinculina y actina-F/ α -actinina, en presencia del inhibidor de FAK, PF573228. La inhibición después de 90 minutos de capacitación, actina-F mostró una intensidad en la fluorescencia menor en presencia de PF573228 y baja o nula

intensidad fluorescente en la co-localización de actina-F con vinculina o α -actinina (Figs. 16 y 17). Estos resultados sugieren que durante la capacitación FAK está involucrada en la organización y mantenimiento del citoesqueleto de actina.

8.6 Caracterización de la Adhesión de Espermatozoides con la Matriz Extracelular In Vitro.

8.6.1 Adhesión de los espermatozoides a proteínas de la matriz extracelular

Los espermatozoides de los mamíferos [97-99] presentan varias integrinas ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$) con capacidad de asociarse con matrices extracelulares compuestas por fibronectina, laminina o colágeno. En los espermatozoides del cobayo, detectamos mediante inmunoblot la presencia de las cadenas $\alpha 5$, $\alpha 6$ y αV , así como $\beta 1$ y $\beta 3$, las cuales fueron localizadas en la región acrosomal y el flagelo (Fig. 18). Lo sugiere que estas células pueden tener la capacidad de asociarse con matrices compuestas de fibronectina, laminina o colágeno, por lo que se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad de adhesión de los espermatozoides a matrices extracelulares y sus potenciales efectos sobre la fisiología espermática. Respecto a matrices de FN, los espermatozoides capacitados se adhirieron en un rango de 50-100 $\mu\text{g/ml}$ (datos no mostrados). La adherencia se presenta en la cabeza, y mantienen su flagelo batiendo. En cambio, los espermatozoides no se adhirieron a matrices de laminina ni colágeno tipo I, en el mismo rango de concentración. Luego determinamos en qué momento los espermatozoides son capaces de adherirse a FN; los espermatozoides no capacitados fueron incapaces de adherirse a la matriz (dato no mostrado), mientras

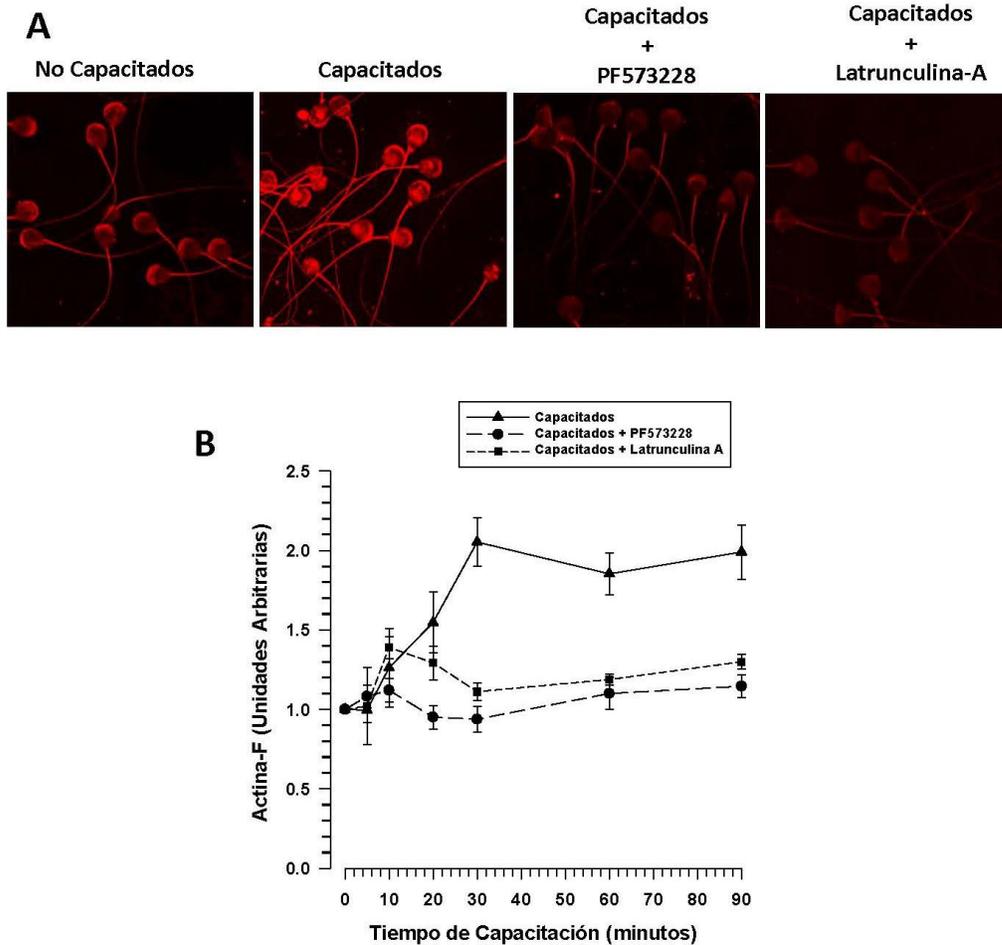


Figura 15. El inhibidor de FAK y Latrunculina-A evitan la polimerización de actina durante la capacitación. A) Los efectos de Inhibición de FAK y Lat-A sobre polimerización de actina, en espermatozoides de cobayo que fueron capacitados por 60 min en presencia o en ausencia de PF573228 (5 μ M) o Lat - A (50 μ M). La actina-F se tiñó usando faloidina marcada con TRITC. Las imágenes de fluorescencia son representativas de tres experimentos. B) Los niveles de fluorescencia de la faloidina marcada con TRITC fueron cuantificados utilizando el software Nis Elements versión 3.1 para definir el curso tiempo de actina-F durante la capacitación en presencia o ausencia de PF573224 o Lat-A (media \pm s.e.m., n = 5 experimentos independientes).

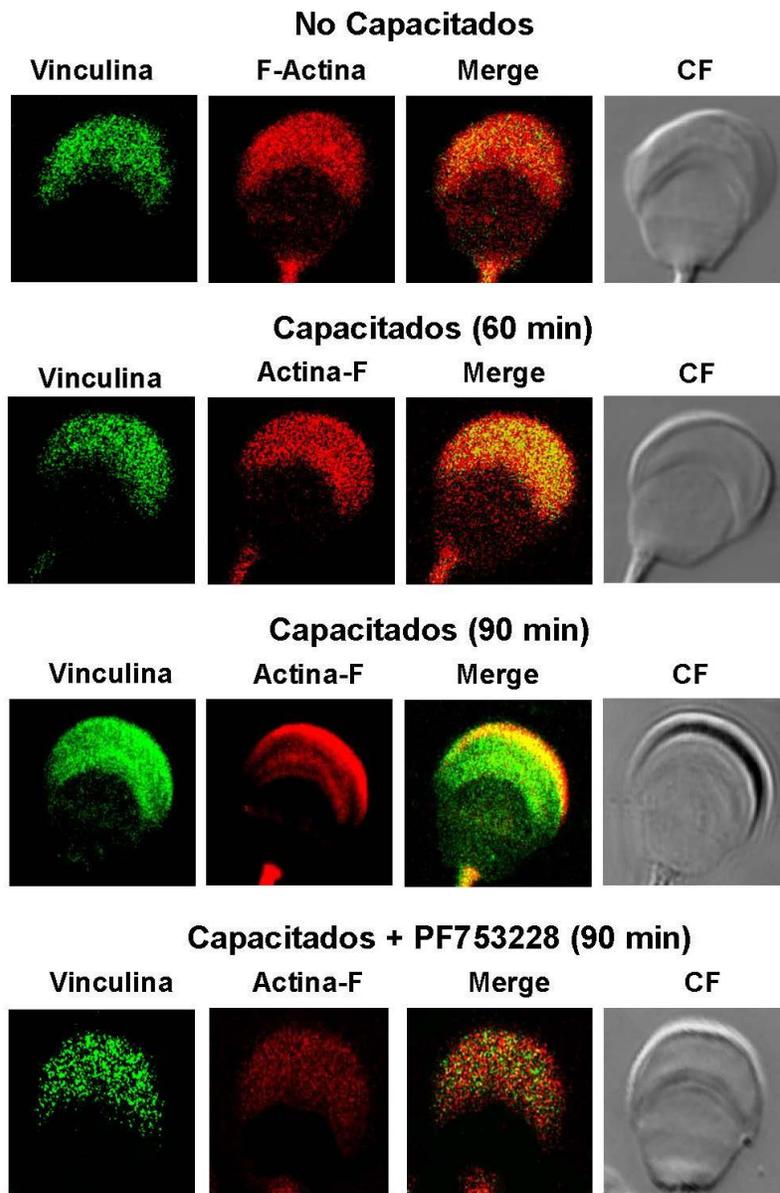


Figura 16. Co-localización de vinculina y actina-F durante la capacitación. En la determinación de la a interacción del complejo de adhesión focal con el citoesqueleto de actina, vinculina y actina-F estas fueron co-localizadas en espermatozoides no capacitados y capacitados y en aquellos capacitados en presencia de PF753228. Los espermatozoides se fijaron con formaldehído y las proteínas fueron detectadas utilizando el anticuerpo anti-vinculina (verde) y faloidina marcada con TRITC (rojo). También se muestran las imágenes de contraste de fases (CF). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

que después de 30 minutos de capacitación sí se adhirieron a la matriz de FN (~93%) (Fig. 19A), y conforme transcurre el tiempo de incubación el número de espermatozoides adheridos disminuye gradualmente, de tal forma que a partir de 5 horas de incubación se observó un mínimo de espermatozoides adheridos (~1%) (Fig. 19A); interesantemente estos espermatozoides mantuvieron su movilidad durante toda la incubación.

Se ha descrito que durante la capacitación, se forman agregados [122]. Debido a esto se valoró el número de agregados o rosetas que se forman durante la capacitación, observándose un incremento gradual del número de rosetas durante las primeras horas de incubación, alcanzando un máximo a las 6 horas, seguido de una disminución drástica en el número rosetas (Fig. 19B), debido a que los espermatozoides se separan unos de otros, es importante mencionar que los espermatozoides que se disgregaron de las rosetas se percibieron en estado hiperactivado; sin embargo, al evaluar la RA, se observó que, bajo estas condiciones de incubación, los espermatozoides muestran una tasa muy baja de RA (Fig. 19C).

8.6.2 Efecto de la fibronectina soluble sobre la reacción acrosomal

Con el fin de comparar los efectos de la adhesión de los espermatozoides a una matriz de FN con respecto a la interacción de los espermatozoides con FN soluble, los espermatozoides se capacitaron en presencia de FN (0, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados muestran que los espermatozoides capacitados en presencia de FN soluble experimentaron una RA rápida dependiente de la concentración de FN; después de 120 min de incubación, la RA fue significativamente más alta en espermatozoides

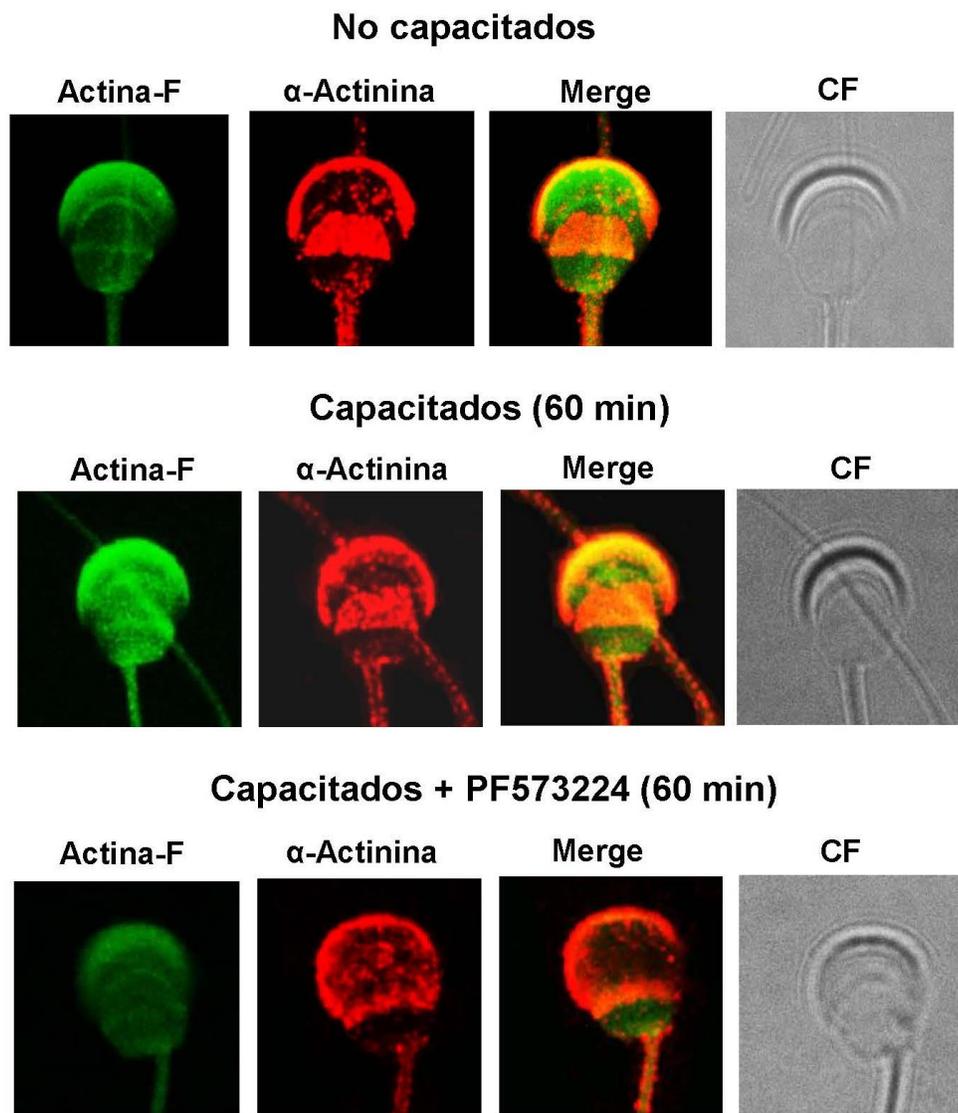


Figura 17. Co-localización de α-actinina y actina-F durante la capacitación. Para determinar la interacción de α-actinina con el citoesqueleto, α-actinina y actina-F fueron co-localizados en los espermatozoides no capacitados y capacitados y en aquellos capacitados en presencia de PF-573228. Los espermatozoides se fijaron con formaldehído y las proteínas se detectaron utilizando el anticuerpo anti α-actinina (rojo) y faloidina marcada con FITC (verde). También se muestran las imágenes de contraste de fases (CF). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

capacitados en presencia de las dos concentraciones de FN ensayadas ($P=0.01$, $P=0.03$, respectivamente) con respecto al control (Fig. 20). Los resultados sugieren que dependiendo de la forma en que los espermatozoides interactúan con FN, los efectos sobre la fisiología espermática son diferentes.

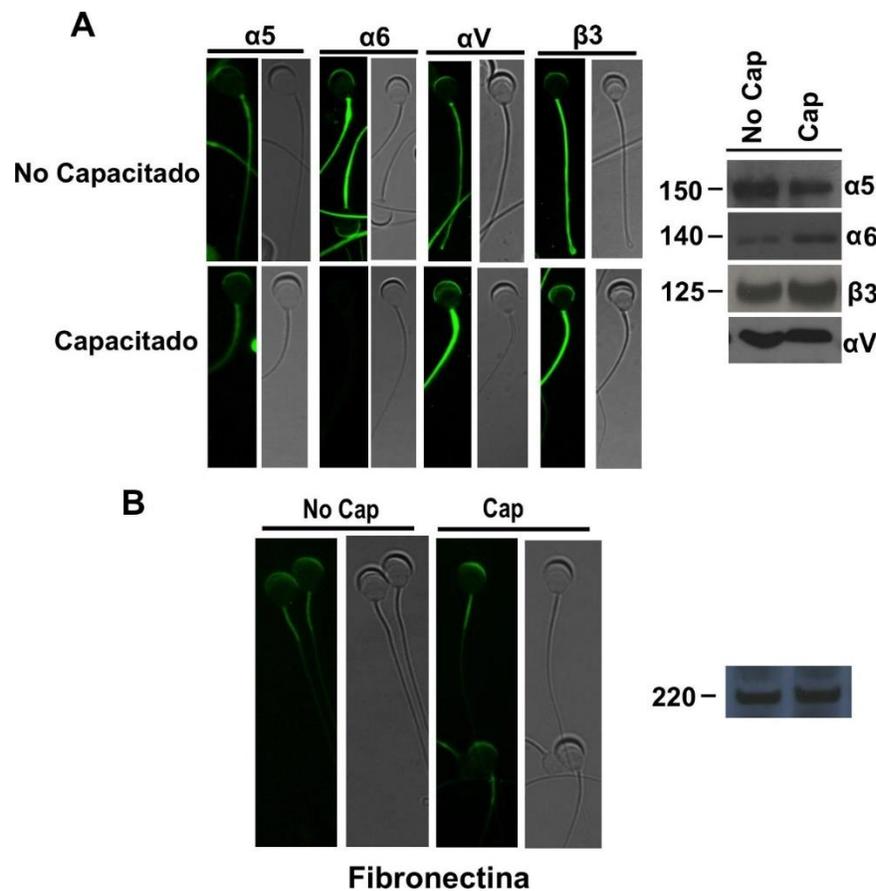


Figura 18. Presencia de $\alpha 6$, $\alpha 5$, $\beta 3$, αv y fibronectina (FN) en los espermatozoides del cobayo no capacitados y capacitados. A) Ensayos de inmunocitoquímica se realizaron para determinar la localización de las integrinas $\alpha 6$, $\alpha 5$, $\beta 3$, αv y FN, B), por inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas. Para la detección de las integrinas $\alpha 6$, $\alpha 5$, $\beta 3$, αv A) y FN B), en los espermatozoides del cobayo, 100 μg extractos de espermatozoides se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las proteínas fueron detectadas usando anticuerpos específicos. (A) Integrina $\alpha 5$, integrina $\alpha 6$, αv , $\beta 3$; B) FN.

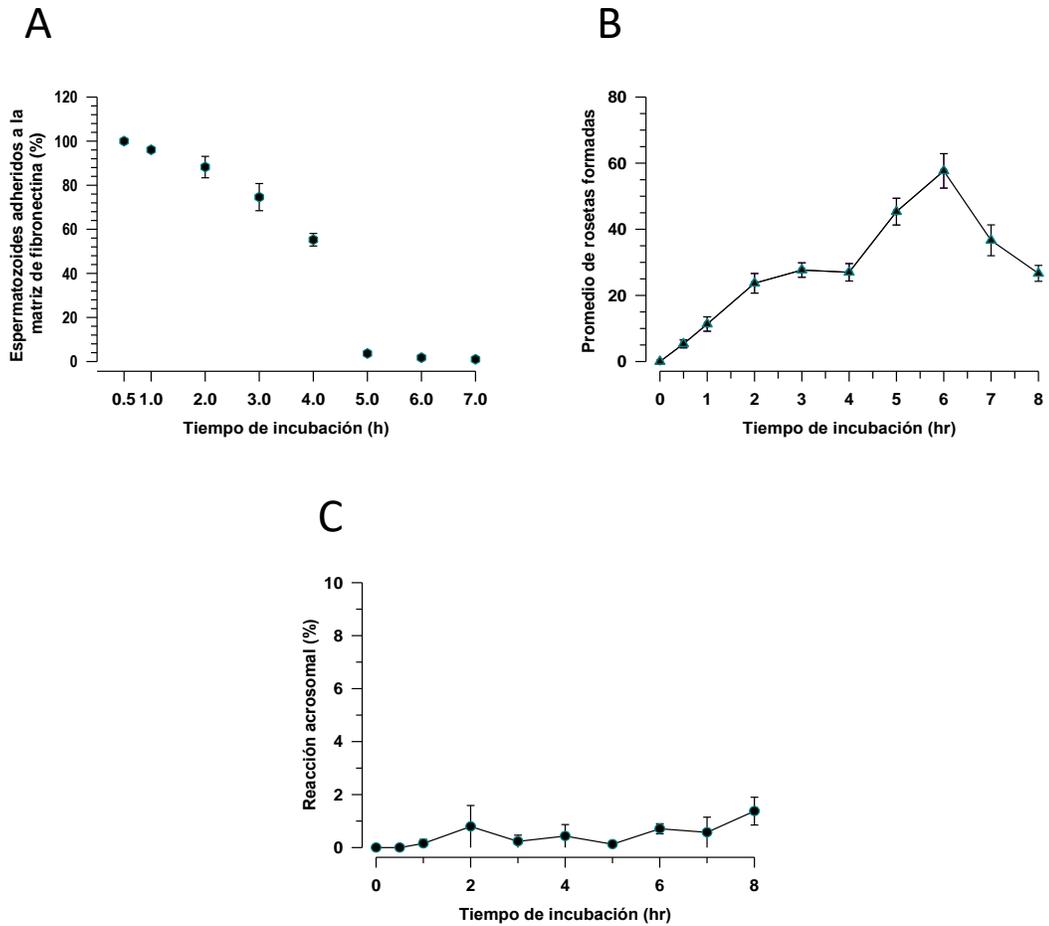


Figura 19. Ensayos de adhesión a fibronectina (FN) *in vitro*. (A) Proporción de espermatozoides que se adherieron a FN (promedio \pm S.D.) durante 7 horas de incubación en medio Tyrode. (B) Promedio de rosetas formadas. (C) Porcentaje de espermatozoides que sufrieron RA (promedio \pm S.D., N=3 experimentos independientes).

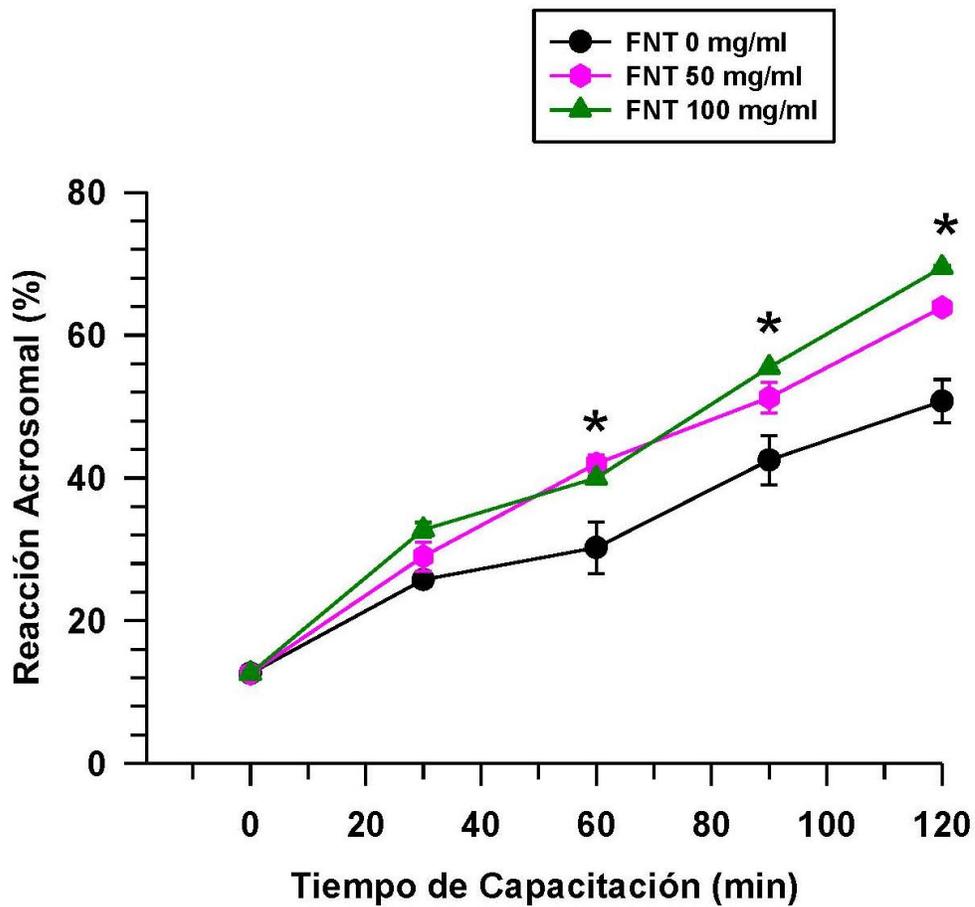


Figura 20. Efecto de fibronectina (FN) sobre la reacción y acrosomal del esperma de cobayo en suspensión. Espermatozoides móviles se incubaron durante 3 h en medio Tyrode en presencia de diferentes concentraciones de FN 0, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y en ausencia. Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos con diferentes cobayos (* $P < 0.05$).

9 DISCUSIÓN

Se sabe desde hace tiempo que las integrinas $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$ se encuentran en los espermatozoides de ratón, bovino y ser humano, y se ha sugerido su participación en la adhesión y fusión de gametos [97-99]. La presencia de estas proteínas sugiere la existencia de proteínas de adhesión focal en los espermatozoides de mamíferos, las cuales podrían participar en procesos específicos del espermatozoide, como la capacitación, la RA o la sobrevivencia espermática. FAK, paxilina, vinculina, talina y α -actinina son las proteínas que constituyen principalmente el complejo de adhesión focal y están unidas a la membrana plasmática a través de las integrinas $\beta 1$ o $\beta 3$. Paxilina actúa como una proteína importante en el andamiaje para complejos de adhesión focal, facilitando estas interacciones [115]. Nuestros resultados claramente indican que este conjunto de proteínas está presente en espermatozoide de cobayos, ratones y humanos, donde posiblemente forman dos complejos: el primero, compuesto de integrina- $\beta 1$, FAK, paxilina, vinculina, α -actinina, y talina localizadas en la región del acrosoma, y el segundo formado de integrina- $\beta 1$, FAK, paxilina y α -actinina localizadas en la pieza media del flagelo. La presencia y localización similar de las proteínas de adhesión focal en los espermatozoides de las tres diferentes especies, sugieren que son importantes para los procesos de capacitación y la RA. Proponemos que el complejo localizado en el acrosoma está involucrado en el mantenimiento de su integridad, tal vez a través de un citoesqueleto de actina que es remodelado durante la capacitación. Probablemente, FAK y la estructuración correcta del citoesqueleto son necesarios para mantener el acrosoma y llevar a cabo la RA en el tiempo apropiado.

También se propone que el complejo asociado con la pieza media contribuye a la estructura de esta región y podría estar implicado en la activación de vías de señalización relacionadas con su movilidad; sin embargo, es necesario investigar más a fondo para confirmar este papel.

Los resultados obtenidos en este trabajo detallan cambios en la co-localización y co-inmunoprecipitación de paxilina con vinculina y talina, sugiriendo que, en los espermatozoides no capacitados, las proteínas talina y vinculina se asocian débilmente con paxilina y, por lo tanto, con el complejo de adhesión focal. Por el contrario, en los espermatozoides capacitados, tanto talina como vinculina se asociaron fuertemente con el complejo, sugiriendo que el complejo de adhesión focal se estabiliza durante la capacitación. Se ha propuesto por Lawson y colaboradores en el 2012 que en los complejos de adhesión nacientes, talina y vinculina no están asociadas con el complejo y se reclutan en entre 30 y 60 minutos, después de la interacción de FN con integrina- β 1, formando así un complejo de adhesión maduro [123-125]. De hecho, la asociación de talina con el complejo de adhesión es un requisito previo para que vinculina interactúe con el complejo de adhesión focal [123, 125]. Recientemente, la interacción de vinculina con el complejo talina-integrina ha demostrado impulsar el reclutamiento, liberación y reorganización de los componentes clave de la adhesión focal [125]. Estas observaciones apoyan nuestros resultados y podrían implicar que los complejos de adhesión focal son nacientes en espermatozoides no capacitados y maduros en espermatozoides capacitados. De la misma manera, talina y vinculina se encuentran asociadas con el complejo

aproximadamente a los 60 min de capacitación, que es similar a lo reportado para la formación de un complejo de adhesión maduro en fibroblastos [124].

El principal evento que caracteriza la fosforilación de FAK es su autofosforilación en Tyr397. También se sabe que FAK fosforila a paxilina en Tyr31 y Tyr118 y que, como resultado de esta fosforilación, paxilina genera sitios de unión para el reclutamiento de muchas moléculas de señalización relacionadas con la dinámica de adhesión focal [85]. Nuestros resultados muestran que un aumento en la autofosforilación de FAK se relaciona con un aumento en la fosforilación de paxilina. Es importante resaltar que el aumento en la fosforilación observada en la región acrosomal y la pieza intermedia se correlacionan con los sitios donde FAK y paxilina se localizan. Este hallazgo sugiere que la fosforilación de FAK y paxilina podrían facilitar el reclutamiento de talina y vinculina. Además, la asociación directa de vinculina con actina-F indica que el reclutamiento de talina y vinculina está relacionado con una mayor interacción de estos complejos de adhesión focal con el citoesqueleto de actina [119, 120]. Durante esta interacción, vinculina incrementa su co-localización con actina-F alrededor de 60 minutos de la capacitación. Poco después, su co-localización se limita a la región apical del acrosoma, lo que sugiere una remodelación del citoesqueleto en la región del acrosoma, de tal manera que se forma una barrera entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa para evitar una RA temprana. Se ha descrito una remodelación similar del citoesqueleto de actina, donde se polariza una cantidad significativa de actina-F en la región apical del acrosoma, en espermatozoides capacitados de cerdo, bovino, cobayo y carnero [32-35]. Por otra parte, la inhibición de FAK evita la polimerización de actina y la co-localización de vinculina y α -actinina con

actina-F, lo que sugiere que FAK puede dirigir la remodelación del citoesqueleto de actina. El aumento de co-localización de α -actinina y actina-F puede sugerir que la α -actinina aumenta el entrecruzamiento de los filamentos de actina. Sin embargo, no pudimos confirmar una interacción entre α -actinina y las proteínas de adhesión focal porque la α -actinina fue coimmunoprecipitada en cantidades muy pequeñas con paxilina. Este resultado puede explicarse por la fuerte asociación de α -actinina con filamentos de actina, más que con los complejos de adhesión focal [121].

La fosforilación de las proteínas en residuos de Tyr pareciera ser un evento determinante de la capacitación [126]. Un estudio reciente realizado en espermatozoides de ratón propuso que FAK no está involucrada en la fosforilación en Tyr, ya que cuando FAK es inhibido por PF537228 la fosforilación en residuos de Tyr no se ve afectada [101]. En el presente trabajo, obtuvimos un resultado similar; pero también se encontró que la inhibición de FAK tiene otros efectos sobre la fosforilación de Tyr. La inhibición de FAK resultó en una fosforilación temprana de Tyr en el flagelo y el acrosoma, lo cual conduce, probablemente, a una capacitación temprana, y por lo tanto a una RA anticipada. Proponemos que el incremento controlado de la fosforilación de proteínas en Tyr durante la capacitación requiere de la activación de FAK, donde es relevante la polimerización de actina que se produce durante la capacitación, en conjunto estos dos factores regularían la normal y controlada fosforilación de proteínas en Tyr. Tres pruebas apoyan esta suposición: 1) la inhibición de FAK bloqueó la polimerización de actina, pero no la fosforilación de proteínas en Tyr y aumento la RA ; 2) Lat-A, un inhibidor significativo de la polimerización de actina, produjo un resultado similar al observado por la inhibición de FAK, y la fosforilación de

proteínas en Tyr no se bloqueó y aumento la RA; y 3) un trabajo anterior también demostró que la inhibición de la polimerización de actina durante la capacitación por citocalasina-D no impide la capacitación o la fosforilación en Tyr proceda normalmente [127]. En conclusión, la estructuración adecuada del citoesqueleto de actina durante la capacitación conduce a una fosforilación en Tyr apropiada y controlada la que podría formar parte del mecanismo que regula la actividad de PKA. Por lo tanto, el bloqueo de la polimerización de actina asociada con la capacitación, podría conducir a un incremento en la actividad de PKA y, por consiguiente, a un incremento temprano de la fosforilación de Tyr. De manera interesante, la desestructuración del citoesqueleto de actina por citocalasina-D mejora la producción de AMPc y la fosforilación de los sustratos de PKA, en respuesta a la prostaciclina [128].

Es importante considerar que en los espermatozoides no capacitados de humanos y ratones la fosforilación en residuos de Tyr es muy baja [117, 129]; mientras que en cobayos muestra un estado basal que incrementa durante la capacitación y es disminuida en presencia del inhibidor H89, un antagonista de la PKA, Por tanto, proponemos que tal vez PKA tiene una actividad basal en espermatozoides de cobayo no capacitados, de tal manera que las tirosinas cinasas permanecen activas.

El análisis funcional de la inhibición de FAK muestra dos efectos importantes sobre los espermatozoides. En primer lugar, los tratados con un inhibidor de FAK, el PF573228, tuvo una RA acelerada dependiente de Ca^{2+} . El segundo efecto se asocia con una RA temprana cuando inhibimos la polimerización de actina, la cual en células somáticas es crítica para controlar los procesos de exocitosis, ya que los filamentos de actina crean una barrera física que evita la fusión de membranas [24]. En espermatozoides

de mamíferos, esta barrera se forma durante la capacitación [24, 26] manteniendo intacto el acrosoma hasta su encuentro con el óvulo. Sugerimos que la inhibición de FAK altera la polimerización de actina, evitando así la remodelación del citoesqueleto de actina en la región apical del acrosoma, hasta el punto en que la barrera de filamentos de actina no se produce. Como consecuencia, la concentración de Ca^{2+} incrementa durante la capacitación permitiendo la fusión temprana de membranas a, y por lo tanto la RA. Esta hipótesis es soportada por la inhibición de la polimerización de actina por Lat-A, la cual incrementa también la RA después de 60 minutos de capacitación. Potencialmente, Lat-A puede tomar más tiempo para destruir los filamentos de actina que el inhibidor de FAK.

FAK es una cinasa que está involucrada en la polimerización de actina, la remodelación del citoesqueleto y la formación y desensamble de las estructuras de adhesión celular, lo que en parte, se logra regulando la actividad de las GTPasas de la familia de Rho, como RhoA o Rac1, proteínas involucradas en la polimerización de actina [88, 94, 130], y que han sido encontrada en los espermatozoides de los mamíferos [32, 131]. RhoA fue relacionada recientemente con la polimerización de actina en espermatozoides del ratón [40]. Resultados recientes en nuestro laboratorio muestran que RhoA se activa durante la capacitación y que la inhibición de FAK por PF573228 evita su activación (datos no mostrados).

Una pregunta que surge de estos resultados es ¿Cómo se activa FAK durante la capacitación? FAK es una tirosina cinasa no receptora que recluta a las proteínas agrupadas por las integrinas. Modelos canónicos postulan que las integrinas activan a FAK (vía autofosforilación en el residuo 397), en respuesta a la unión de las integrinas

a sus ligandos en la matriz extracelular, tales como FN, colágeno o laminina [124]. Es sabido que los espermatozoides, durante la capacitación *in vitro*, interactúan a través de la región de la cabeza, formando rosetas, fenómeno llamado conjugación espermática [122]. Debido a que, una parte de este trabajo la capacitación se realizó *in vitro* y en un medio que no contenía proteínas de la MEC, propusimos que FN, una proteína encontrada en la superficie de las cabezas de espermatozoides de humanos, porcino, bovino y carnero [70, 99, 126, 132], podría estar implicada en la activación de FAK, a través de la interacción de FN con alguna de las integrinas presentes en los en la superficie de los espermatozoides.

FAK es el componente clave en la vía de señalización mediada por integrinas y puede ser activada por ellas. Cuando las integrinas se unen a la MEC, se agrupan en la membrana celular y se asocian con el citoesqueleto formando un complejo de señalización que promueve el ensamblaje de actina-F y, finalmente, unen las adhesiones focales al citoesqueleto de actina, desencadenando cascadas de transducción de señales, principalmente la vía MAPK [133].

En este trabajo reportamos que los espermatozoides se unen solamente a la matriz rica en FN. La FN se encuentra en las células epiteliales del istmo oviductal [135, 136] y su receptor principal es la integrina $\alpha 5\beta 1$, presente en los espermatozoides del cobayo. El istmo es el lugar donde los espermatozoides con morfología normal, buena movilidad e integridad de membrana, bajos niveles de Ca^{2+} citosólico o estado de capacitación y fosforilación de proteínas en tirosina reducidos, se unen y mantienen vivos hasta el momento de la fecundación [49, 60, 65, 137]. Por tanto, sugerimos que la interacción FN- $\alpha 5\beta 1$ puede participar en el incremento de la sobrevivencia

espermática cuando se mantiene adherido a las células epiteliales del istmo. La interacción FN- $\alpha 5\beta 1$ es una de las vías de señalización relacionada con la sobrevivencia celular en fibroblastos [138-140]. Se sabe que la unión de las integrinas a sus ligandos activan vías de transducción de señales diferentes, tales como un aumento intracelular de Ca^{2+} o la activación de cinasas, tales como PKA, IP3K, PKC y Src, las cuales están involucradas en la regulación de la función espermática [9].

En conjunto los resultados de la adhesión de los espermatozoides a la matriz de FN, muestran que los espermatozoides requieren de un tiempo mínimo de capacitación para poder adherirse a la matriz, lo que podría estar relacionado con el armado de los complejos de adhesión que requieren de 30-60 minutos de capacitación para formarse [141]. Al parecer, al asociarse con la matriz, los espermatozoides se detienen en un estado de capacitación baja ya que, hasta que se despegan de la matriz, continúan con el proceso de capacitación y logran formar rosetas. El hecho de que los espermatozoides adheridos a la matriz de FN no continúen su capacitación nos hace pensar que la adhesión activa vías de señalización que permiten la sobrevivencia de los espermatozoides, en las que tanto FAK, como las vías de mecanotensión y el citoesqueleto de actina estarían involucrados. Cuando los espermatozoides se desprenden de la matriz forman rosetas [122]. Sugerimos que la interacción entre los espermatozoides permite una sincronía en la capacitación, esto a través de la activación de vías de señalización que regulan la capacitación. Es interesante que la interacción espermática que llevan a cabo es a través de su cabeza y proponemos podrían también participar las integrinas, ya que, como es sabido, los espermatozoides contienen FN en su superficie externa [70, 99, 132, 142].

En este trabajo, además, se mostró que los espermatozoides unidos a la matriz rica en FN se mantienen vivos por más tiempo (7 h), en buenas condiciones y casi no sufren RA, probablemente porque su citoesqueleto se mantiene bien estructurado, en comparación con los que se capacitaron en suspensión en presencia de FN, que desde los 30 min experimentan RA, alcanzado un máximo a las dos horas de incubación. Estos resultados sugieren que dependiendo de la forma en que los espermatozoides interactúen con FN, se activan vías de señalización diferentes. Cuando se capacitan espermatozoides de humano en presencia de FN o laminina soluble, se activan vías de señalización que incrementan rápidamente la fosforilación en Tyr y la captación de Ca^{2+} , lo que lleva a una RA temprana [143, 144]. Es posible que la interacción de los espermatozoides con la matriz de FN active vías de señalización relacionadas con la sobrevivencia celular (FAK/Grb/ERK1/2, FAK/Src/PIK3-AKT), y aquellas relacionadas con la mecanotensión (FAK/ERK1/2/GEFH1/RhoA) [39, 40]. Se puede concluir que la relación FN-integrina-FAK tiene un papel preponderante en el proceso de sobrevivencia espermática.

Es posible que el modelo desarrollado en este trabajo refleje parte del comportamiento de los espermatozoides en la región del istmo. Las evidencias hasta ahora muestran que: 1) Solo espermatozoides con niveles de capacitación bajos son lo que se adhieren al epitelio del istmo; 2) Los espermatozoides adheridos al epitelio no terminan la capacitación sino hasta que se desprenden del epitelio; y 3) Los espermatozoides adheridos incrementan su vida media por varias horas [2, 10]. Todos estos puntos concuerdan con los resultados obtenidos en nuestro modelo.

10 CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides de cobayo, al igual que los de ratón y del humano, presentan proteínas de adhesión focal, que forman complejos de adhesión focal durante la capacitación.
2. La actividad de FAK se relaciona con la regulación de la capacitación a través de la fosforilación en residuos de Tyr de las proteínas espermáticas.
3. La actividad de FAK regula la reacción acrosomal al no permitir que suceda tempranamente, esto regulando la polimerización y estructuración del citoesqueleto de actina, durante la capacitación.
4. La formación de complejos de adhesión durante la capacitación está asociada con la remodelación del citoesqueleto de actina y su interacción con este.
5. Los espermatozoides capacitados pueden adherirse a una matriz de fibronectina, pero no a las a matrices de laminina o colágeno tipo I.
6. La adhesión de espermatozoides a una matriz de FN cambia su fisiología, incrementando su sobrevivencia por varias horas, al evitar la reacción acrosomal por un periodo de tiempo largo.
7. El modelo desarrollado en este trabajo simula, en parte, el comportamiento de los espermatozoides cuando se adhieren al epitelio del istmo.

11 PERSPECTIVAS

Después de la descripción, análisis y discusión de los resultados de esta tesis doctoral, se abren varias vertientes para el desarrollo de investigaciones futuras que se resumen a continuación:

1. Determinar cuál de las integrinas presentes en los espermatozoides es la encargada de asociarse con la matriz de FN y activar las vías de señalización relacionadas con mecanotensión y sobrevivencia.
2. Determinar el estatus acrosomal de los espermatozoides adheridos a la matriz de FN.
3. Valorar la fosforilación en residuos de Tyr de los espermatozoides adheridos.
4. Establecer si existe una relación entre el citoesqueleto de actina y la sobrevivencia dependiente de FN asociada con una matriz de FN.
5. Determinar el papel de las vías de mecanotensión y sobrevivencia en el incremento de la vida media de los espermatozoides asociados con una matriz de FN.
6. Establecer el papel de FAK en el incremento de la sobrevivencia espermática.
7. Desarrollar este modelo en espermatozoides de humano y establecer su posible uso en la clínica.

12 BIBLIOGRAFIA

1. Austin, C.R., *Fate of spermatozoa in the uterus of the mouse and rat.* J Endocrinol, 1957. **14**(4): p. 335-42.
2. Harper, M.J.K., *Gamete and zygote transport.* The Physiology of Reproduction. Vol. 1. 1994. 123–187.
3. Wilcox, A.J., C.R. Weinberg, and D.D. Baird, *Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby.* N Engl J Med, 1995. **333**(23): p. 1517-21.
4. Menge, A.C., Edwards, R.P., *Mucosal immunity of the reproductive tract and infertility.* Immunology of Reproduction, ed. R.K. Zaz. 1993, Boca Raron, FL.: CRC Press. 19–36.
5. Chang, M.C., *Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes.* Nature, 1951. **168**(4277): p. 697-8.
6. Austin, C.R., *The capacitation of the mammalian sperm.* Nature, 1952. **170**(4321): p. 326.
7. Yanagimachi, R., *Sperm capacitation and gamete interaction.* J Reprod Fertil Suppl, 1989. **38**: p. 27-33.
8. Gervasi, M.G. and P.E. Visconti, *Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective.* Mol Reprod Dev, 2016. **83**(10): p. 860-874.
9. Jin, S.K. and W.X. Yang, *Factors and pathways involved in capacitation: how are they regulated?* Oncotarget, 2017. **8**(2): p. 3600-3627.
10. Suarez, S.S., *Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract.* Cell Tissue Res, 2016. **363**(1): p. 185-94.
11. Kate A. Redgrove, R. John Aitken and Brett Nixon *More Than a Simple Lock and Key Mechanism: Unraveling the Intricacies of Sperm-Zona Pellucida Binding.* Binding Proteins ed Kotb Abdelmohsen. Chapter 4, 2012. London UK. InTech.
12. Chian, R.C., S. Lapointe, and M.A. Sirard, *Capacitation in vitro of bovine spermatozoa by oviduct epithelial cell monolayer conditioned medium.* Mol Reprod Dev, 1995. **42**(3): p. 318-24.
13. Chian, R.C. and M.A. Sirard, *Fertilizing ability of bovine spermatozoa cocultured with oviduct epithelial cells.* Biol Reprod, 1995. **52**(1): p. 156-62.
14. Salicioni, A.M., et al., *Signalling pathways involved in sperm capacitation.* Soc Reprod Fertil Suppl, 2007. **65**: p. 245-59.
15. Visconti, P.E., *Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(3): p. 667-8.
16. Matas, C., et al., *Effect of sperm preparation method on in vitro fertilization in pigs.* Reproduction, 2003. **125**(1): p. 133-41.
17. Yanagimachi, R., *Mammalian Fertilization.* The Physiology of Reproduction, ed. E.a.N. Knobil, J.D. Vol. 1. 1994, New York: Raven Press.
18. Sun, T.T., C.M. Chung, and H.C. Chan, *Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8.* Protein Cell, 2011. **2**(2): p. 92-8.

19. Gadella, B.M. and C. Luna, *Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface*. Theriogenology, 2014. **81**(1): p. 74-84.
20. Belmonte, S.A., L.S. Mayorga, and C.N. Tomes, *The Molecules of Sperm Exocytosis*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2016. **220**: p. 71-92.
21. Beltran, C., et al., *Role of Ion Channels in the Sperm Acrosome Reaction*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2016. **220**: p. 35-69.
22. Erdo, S.L., P. Villanyi, and A. Laszlo, *Gestational changes of GABA levels and GABA binding in the human uterus*. Life Sci, 1989. **44**(26): p. 2009-14.
23. del Río M.J., G., A., Torob, A., Orellanab, R., Cortésb, M.E., Morenob, R.E., Vigilb, P., *La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes*. Rev Int Androl, 2007. **5**(4): p. 368-373.
24. Spungin, B., I. Margalit, and H. Breitbart, *Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion*. J Cell Sci, 1995. **108 (Pt 6)**: p. 2525-35.
25. Brener, E., et al., *Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction*. Biol Reprod, 2003. **68**(3): p. 837-45.
26. Cabello-Agueros, J.F., E.O. Hernandez-Gonzalez, and A. Mujica, *The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction*. Cell Motil Cytoskeleton, 2003. **56**(2): p. 94-108.
27. Itach, S.B., et al., *Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization*. Dev Biol, 2012. **362**(2): p. 154-61.
28. Azamar, Y., S. Uribe, and A. Mujica, *F-actin involvement in guinea pig sperm motility*. Mol Reprod Dev, 2007. **74**(3): p. 312-20.
29. Angeles-Florian, T., et al., *Absence of aryl hydrocarbon receptor alters CDC42 expression and prevents actin polymerization during capacitation*. Mol Reprod Dev, 2016. **83**(11): p. 1015-1026.
30. Sosnik, J., et al., *Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 15): p. 2741-9.
31. Moreno-Fierros, L., et al., *F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction*. Mol Reprod Dev, 1992. **33**(2): p. 172-81.
32. Delgado-Buenrostro, N.L., et al., *Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins*. Mol Reprod Dev, 2005. **70**(2): p. 198-210.
33. Castellani-Ceresa, L., M.F. Brivio, and G. Radaelli, *F-actin in acrosome-reacted boar spermatozoa*. Mol Reprod Dev, 1992. **33**(1): p. 99-107.
34. Colas, C., et al., *Changes in actin distribution of ram spermatozoa under different experimental conditions*. Reprod Domest Anim, 2009. **44**(2): p. 221-7.
35. Oikonomopoulou, I., et al., *Relocation of myosin and actin, kinesin and tubulin in the acrosome reaction of bovine spermatozoa*. Reprod Fertil Dev, 2009. **21**(2): p. 364-77.
36. Delgado-Buenrostro, N.L., et al., *Role of Wasp and the small GTPases RhoA, RhoB, and Cdc42 during capacitation and acrosome reaction in spermatozoa of English guinea pigs*. Mol Reprod Dev, 2016. **83**(10): p. 927-937.

37. Breitbart, H., G. Cohen, and S. Rubinstein, *Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction*. *Reproduction*, 2005. **129**(3): p. 263-8.
38. Walker, S.J. and H.A. Brown, *Specificity of Rho insert-mediated activation of phospholipase D1*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 26260-7.
39. Fiedler, S.E., M. Bajpai, and D.W. Carr, *Identification and characterization of RHOA-interacting proteins in bovine spermatozoa*. *Biol Reprod*, 2008. **78**(1): p. 184-92.
40. Romarowski, A., et al., *PKA-dependent phosphorylation of LIMK1 and Cofilin is essential for mouse sperm acrosomal exocytosis*. *Dev Biol*, 2015. **405**(2): p. 237-49.
41. Breitbart, H., *Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2003. **49**(3): p. 321-7.
42. Coy, P. and M. Aviles, *What controls polyspermy in mammals, the oviduct or the oocyte?* *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2010. **85**(3): p. 593-605.
43. Katz, D.F., D.A. Slade, and S.T. Nakajima, *Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability*. *Adv Contracept*, 1997. **13**(2-3): p. 143-51.
44. Yudin, A.I., F.W. Hanson, and D.F. Katz, *Human cervical mucus and its interaction with sperm: a fine-structural view*. *Biol Reprod*, 1989. **40**(3): p. 661-71.
45. Lyons, E.A., et al., *Characterization of subendometrial myometrial contractions throughout the menstrual cycle in normal fertile women*. *Fertil Steril*, 1991. **55**(4): p. 771-4.
46. de Ziegler, D., et al., *Contractility of the nonpregnant uterus: the follicular phase*. *Ann N Y Acad Sci*, 2001. **943**: p. 172-84.
47. Gaddum-Rosse, P., *Some observations on sperm transport through the uterotubal junction of the rat*. *Am J Anat*, 1981. **160**(3): p. 333-41.
48. Shalgi, R., T.T. Smith, and R. Yanagimachi, *A quantitative comparison of the passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction*. *Biol Reprod*, 1992. **46**(3): p. 419-24.
49. Fazeli, A., et al., *Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species*. *Biol Reprod*, 1999. **60**(4): p. 879-86.
50. Tienthai, P., A. Johannisson, and H. Rodriguez-Martinez, *Sperm capacitation in the porcine oviduct*. *Anim Reprod Sci*, 2004. **80**(1-2): p. 131-46.
51. Suarez, S.S., *Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct*. *Int J Dev Biol*, 2008. **52**(5-6): p. 455-62.
52. Topfer-Petersen, E., et al., *Function of the mammalian oviductal sperm reservoir*. *J Exp Zool*, 2002. **292**(2): p. 210-5.
53. Yanagimachi, R. and M.C. Chang, *Sperm Ascent through the Oviduct of the Hamster and Rabbit in Relation to the Time of Ovulation*. *J Reprod Fertil*, 1963. **6**: p. 413-20.
54. Harper, M.J., *Relationship between sperm transport and penetration of eggs in the rabbit oviduct*. *Biol Reprod*, 1973. **8**(4): p. 441-50.

55. Hunter, R.H., *Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation*. J Reprod Fertil, 1981. **63**(1): p. 109-17.
56. Hunter, R.H. and R. Nichol, *Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus*. J Exp Zool, 1983. **228**(1): p. 121-8.
57. Hunter, R.H. and I. Wilmut, *Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct*. Reprod Nutr Dev, 1984. **24**(5A): p. 597-608.
58. Mburu, J.N., et al., *Distribution, number and membrane integrity of spermatozoa in the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation*. Anim Reprod Sci, 1996. **45**(1-2): p. 109-21.
59. Topfer-Petersen, E., *Molecules on the sperm's route to fertilization*. J Exp Zool, 1999. **285**(3): p. 259-66.
60. Gualtieri, R. and R. Talevi, *Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the Fallopian tube epithelium in vitro*. Reproduction, 2003. **125**(2): p. 251-8.
61. Talevi, R. and R. Gualtieri, *Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release*. Theriogenology, 2010. **73**(6): p. 796-801.
62. Lefebvre, R. and S.S. Suarez, *Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium*. Biol Reprod, 1996. **54**(3): p. 575-82.
63. Petrunkina, A.M., et al., *Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells*. Reproduction, 2001. **122**(3): p. 469-80.
64. Thomas, P.G., et al., *A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers*. Biol Reprod, 1994. **51**(2): p. 303-9.
65. Ellington, J.E., et al., *Human sperm function in co-culture with human, macaque or bovine oviduct epithelial cell monolayers*. Hum Reprod, 1998. **13**(10): p. 2797-804.
66. Suarez, S.S., *Formation of a reservoir of sperm in the oviduct*. Reprod Domest Anim, 2002. **37**(3): p. 140-3.
67. Bedford, J.M., *Biology of primate spermatozoa*. Contrib Primatol, 1974. **3**: p. 97-139.
68. Caballero, J.N., et al., *Epithelial cadherin is present in bovine oviduct epithelial cells and gametes, and is involved in fertilization-related events*. Theriogenology, 2014. **81**(9): p. 1189-206.
69. Calvete, J.J., et al., *Monoclonal antibodies against boar sperm zona pellucida-binding protein AWN-1. Characterization of a continuous antigenic determinant and immunolocalization of AWN epitopes in inseminated sows*. Biol Reprod, 1997. **57**(4): p. 735-42.
70. Ekhlesi-Hundrieser, M., et al., *Sperm-binding fibronectin type II-module proteins are genetically linked and functionally related*. Gene, 2007. **392**(1-2): p. 253-65.
71. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.

72. Legate, K.R., S.A. Wickstrom, and R. Fassler, *Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling*. Genes Dev, 2009. **23**(4): p. 397-418.
73. Plow, E.F., et al., *Ligand binding to integrins*. J Biol Chem, 2000. **275**(29): p. 21785-8.
74. van der Flier, A. and A. Sonnenberg, *Function and interactions of integrins*. Cell Tissue Res, 2001. **305**(3): p. 285-98.
75. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
76. Moser, M., et al., *The tail of integrins, talin, and kindlins*. Science, 2009. **324**(5929): p. 895-9.
77. Pouwels, J., et al., *Negative regulators of integrin activity*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 14): p. 3271-80.
78. Mousa, S.A., *Cell adhesion molecules: potential therapeutic and diagnostic implications*. Methods Mol Med, 2004. **93**: p. 157-74.
79. Pasqualini, R., E. Koivunen, and E. Ruoslahti, *Peptides in cell adhesion: powerful tools for the study of integrin-ligand interactions*. Braz J Med Biol Res, 1996. **29**(9): p. 1151-8.
80. Ivaska, J. and J. Heino, *Interplay between cell adhesion and growth factor receptors: from the plasma membrane to the endosomes*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 111-20.
81. Zaidel-Bar, R., *Job-splitting among integrins*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(6): p. 575-7.
82. Calderwood, D.A., *Talin controls integrin activation*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt3): p. 434-7.
83. Chen, H.C., et al., *Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16995-9.
84. Paoli, P., E. Giannoni, and P. Chiarugi, *Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(12): p. 3481-98.
85. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 56-68.
86. Keiper, T., et al., *The role of junctional adhesion molecules in cell-cell interactions*. Histol Histopathol, 2005. **20**(1): p. 197-203.
87. Mitra, S.K. and D.D. Schlaepfer, *Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(5): p. 516-23.
88. Schaller, M.D., *Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
89. Lim, S.T., et al., *Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation*. Mol Cell, 2008. **29**(1): p. 9-22.
90. Owens, T.W., et al., *Apoptosis commitment and activation of mitochondrial Bax during anoikis is regulated by p38MAPK*. Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1551-62.
91. Schlaepfer, D.D. and T. Hunter, *Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5623-33.

92. Downward, J., *PI 3-kinase, Akt and cell survival*. Semin Cell Dev Biol, 2004. **15**(2): p. 177-82.
93. Hennessy, B.T., et al., *Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(12): p. 988-1004.
94. Ridley, A.J., *Rho GTPase signalling in cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 103-12.
95. Lu, Q. and S. Rounds, *Focal adhesion kinase and endothelial cell apoptosis*. Microvasc Res, 2012. **83**(1): p. 56-63.
96. Ruegg, C. and A. Mariotti, *Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(6): p. 1135-57.
97. Barraud-Lange, V., et al., *Alpha6beta1 integrin expressed by sperm is determinant in mouse fertilization*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 102.
98. Boissonnas, C.C., et al., *Role of sperm alphavbeta3 integrin in mouse fertilization*. Dev Dyn, 2010. **239**(3): p. 773-83.
99. Thys, M., et al., *Expression and putative function of fibronectin and its receptor (integrin alpha(5)beta(1)) in male and female gametes during bovine fertilization in vitro*. Reproduction, 2009. **138**(3): p. 471-82.
100. Baessler, K.A., Y. Lee, and N.S. Sampson, *Beta1 integrin is an adhesion protein for sperm binding to eggs*. ACS Chem Biol, 2009. **4**(5): p. 357-66.
101. Alvau, A., et al., *The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm*. Development, 2016. **143**(13): p. 2325-33.
102. Gonzalez-Fernandez, L., et al., *Focal adhesion kinases and calcium/calmodulin-dependent protein kinases regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm*. Biol Reprod, 2013. **88**(6): p. 138.
103. Pasten-Hidalgo, K., et al., *Presence, processing, and localization of mouse ADAM15 during sperm maturation and the role of its disintegrin domain during sperm-egg binding*. Reproduction, 2008. **136**(1): p. 41-51.
104. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
105. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
106. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
107. Harlow, E. and D. Lane, *Mounting samples in gelvatol or mowiol*. CSH Protoc, 2006. **2006**(1).
108. Shi, Q.X. and E.R. Roldan, *Bicarbonate/CO2 is not required for zona pellucida- or progesterone-induced acrosomal exocytosis of mouse spermatozoa but is essential for capacitation*. Biol Reprod, 1995. **52**(3): p. 540-6.
109. Ward, C.R. and B.T. Storey, *Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay*. Dev Biol, 1984. **104**(2): p. 287-96.

110. Cabrita, M.A., et al., *Focal adhesion kinase inhibitors are potent anti-angiogenic agents*. Mol Oncol, 2011. **5**(6): p. 517-26.
111. Jones, M.L., et al., *Characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor in human platelets*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **389**(1): p. 198-203.
112. Slack-Davis, J.K., et al., *Cellular characterization of a novel focal adhesion kinase inhibitor*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14845-52.
113. Brito, L.F., et al., *Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate*. Theriogenology, 2003. **60**(8): p. 1539-51.
114. Yanagimachi, R. and A. Bhattacharyya, *Acrosome-reacted guinea pig spermatozoa become fusion competent in the presence of extracellular potassium ions*. J Exp Zool, 1988. **248**(3): p. 354-60.
115. Brown, M.C. and C.E. Turner, *Paxillin: adapting to change*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1315-39.
116. Visconti, P.E., et al., *Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation*. Asian J Androl, 2011. **13**(3): p. 395-405.
117. Battistone, M.A., et al., *Evidence for the involvement of proline-rich tyrosine kinase 2 in tyrosine phosphorylation downstream of protein kinase A activation during human sperm capacitation*. Mol Hum Reprod, 2014. **20**(11): p. 1054-66.
118. Darszon, A., et al., *Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa*. Physiol Rev, 2011. **91**(4): p. 1305-55.
119. Humphries, J.D., et al., *Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin*. J Cell Biol, 2007. **179**(5): p. 1043-57.
120. Janssen, M.E., et al., *Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments*. Mol Cell, 2006. **21**(2): p. 271-81.
121. Kanchanawong, P., et al., *Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions*. Nature, 2010. **468**(7323): p. 580-4.
122. Monclus, M.A. and M.W. Fornes, *Sperm conjugation in mammal reproductive function: Different names for the same phenomenon?* Mol Reprod Dev, 2016. **83**(10): p. 884-896.
123. Carisey, A. and C. Ballestrem, *Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(2-3): p. 157-63.
124. Lawson, C., et al., *FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility*. J Cell Biol, 2012. **196**(2): p. 223-32.
125. Carisey, A., et al., *Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner*. Curr Biol, 2013. **23**(4): p. 271-81.
126. Aitken, R.J. and B. Nixon, *Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored*. Mol Hum Reprod, 2013. **19**(12): p. 785-93.
127. Bernabo, N., et al., *The role of actin in capacitation-related signaling: an in silico and in vitro study*. BMC Syst Biol, 2011. **5**: p. 47.
128. Raslan, Z. and K.M. Naseem, *Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling in blood platelets: The role of lipid rafts and actin polymerisation*. Platelets, 2015. **26**(4): p. 349-57.

129. Visconti, P.E., et al., *Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation*. *Development*, 1995. **121**(4): p. 1129-37.
130. Tomar, A. and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(5): p. 676-83.
131. Ducummon, C.C. and T. Berger, *Localization of the Rho GTPases and some Rho effector proteins in the sperm of several mammalian species*. *Zygote*, 2006. **14**(3): p. 249-57.
132. Leahy, T., et al., *Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins from flow cytometrically sorted ram sperm*. *Theriogenology*, 2011. **75**(5): p. 962-71.
133. Howe, A.K. and R.L. Juliano, *Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(9): p. 593-600.
134. Baldi, E., et al., *Signal transduction pathways in human spermatozoa*. *J Reprod Immunol*, 2002. **53**(1-2): p. 121-31.
135. Makrigiannakis, A., et al., *The expression of receptivity markers in the fallopian tube epithelium*. *Histochem Cell Biol*, 2009. **132**(2): p. 159-67.
136. Osycka-Salut, C.E., et al., *Fibronectin From Oviductal Cells Fluctuates During the Estrous Cycle and Contributes to Sperm-Oviduct Interaction in Cattle*. *J Cell Biochem*, 2017.
137. Petrunkina, A.M., et al., *Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro*. *Reproduction*, 2001. **121**(6): p. 889-96.
138. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011. **75**(1): p. 50-83.
139. Nixon, B., et al., *Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa*. *J Cell Physiol*, 2010. **224**(1): p. 71-83.
140. de Lamirande, E. and C. Gagnon, *The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion*. *Mol Hum Reprod*, 2002. **8**(2): p. 124-35.
141. Roa-Espitia, A.L., et al., *Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation*. *Biol Open*, 2016. **5**(9): p. 1189-99.
142. Vuento, M., et al., *Characterization of fibronectin on human spermatozoa*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1984. **365**(7): p. 757-62.
143. Diaz, E.S., M. Kong, and P. Morales, *Effect of fibronectin on proteasome activity, acrosome reaction, tyrosine phosphorylation and intracellular calcium concentrations of human sperm*. *Hum Reprod*, 2007. **22**(5): p. 1420-30.
144. Tapia, S., et al., *The laminin-induced acrosome reaction in human sperm is mediated by Src kinases and the proteasome*. *Biol Reprod*, 2011. **85**(2): p. 357-66.

145. Dikeakos, J.D. and T.L. Reudelhuber, *Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot of sort out*. J Cell Biol, 2007. **177**: p.191-196.
146. Jockusch BM¹, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rüdiger M, Schlüter K, Stanke G, Winkler J. The molecular architecture of focal adhesions. Annu Rev Cell Dev Biol. 1995;**11**: p.379-416.
147. Holt, W.V. and K.J.W. Look. *Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory test of semen quality* Reproduction **2004**. 127: p 527-535.
148. Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A. y C. Giraldo. *El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización*. Rev Col Cienc Pec 2006. 19(4): p 426-436.
149. Calderwood, D. A., Tai, V., Di Paolo, G., De Camilli, P. and Ginsberg, M. H. *Competition for talin results in trans-dominant inhibition of integrin activation*. J. Biol. Chem, 2004. **279**: p. 28889-28895.
150. Moser, M., Legate, K. R., Zent, R. and Fässler, R. The tail of integrins, talin, and kindlins. Science, 2009. **324**: p. 895-899.

13 FIGURAS SUPLEMENTARIAS

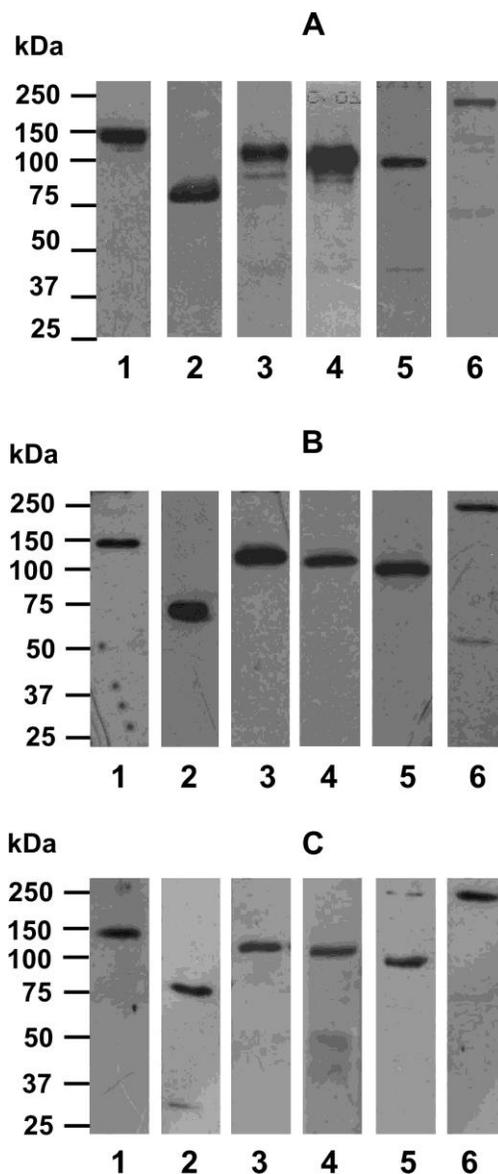


Figura Suplementaria 1. Proteínas de adhesión focal en extractos de células de la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 y en espermatozoides de ratón y humano respectivamente (datos no mostrados). Detección de proteínas de adhesión focal en extractos de: A) células MDA, (B) extractos de espermatozoides del ratón y (C) humano que se resolvieron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y las proteínas fueron detectadas usando anticuerpos específicos. (1) integrina-β1, (2) paxilina, (3) FAK, (4) vinculina, (5) α-actinina, y (6) talina.

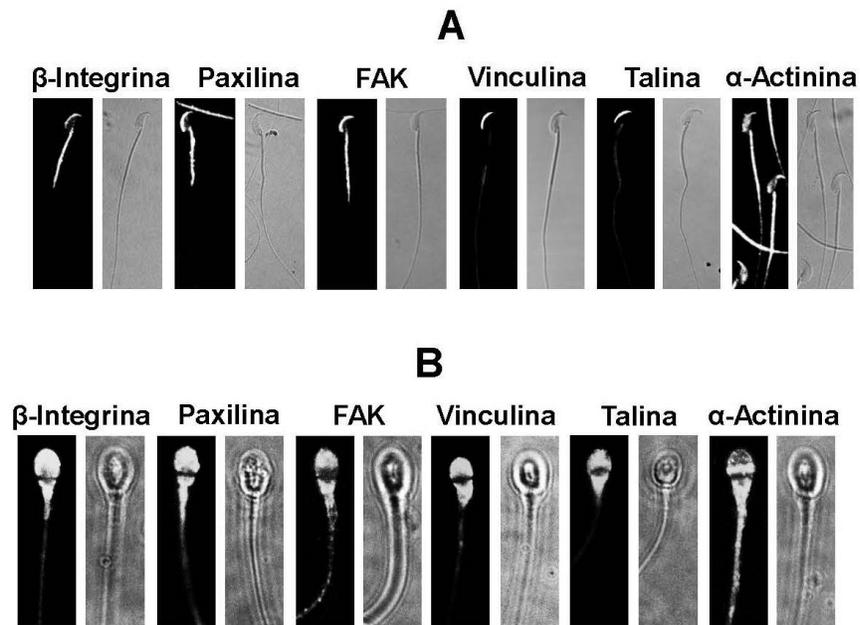


Figura Suplementaria 2. Ensayos de inmunocitoquímica para determinar la localización subcelular de las proteínas de adhesión focal en los espermatozoides de ratón y humano. Los paneles de la izquierda corresponden a la localización de integrina- β 1, paxilina, FAK, vinculina, α -actinina, y talina. Los paneles de la derecha corresponden a las imágenes de campo claro. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

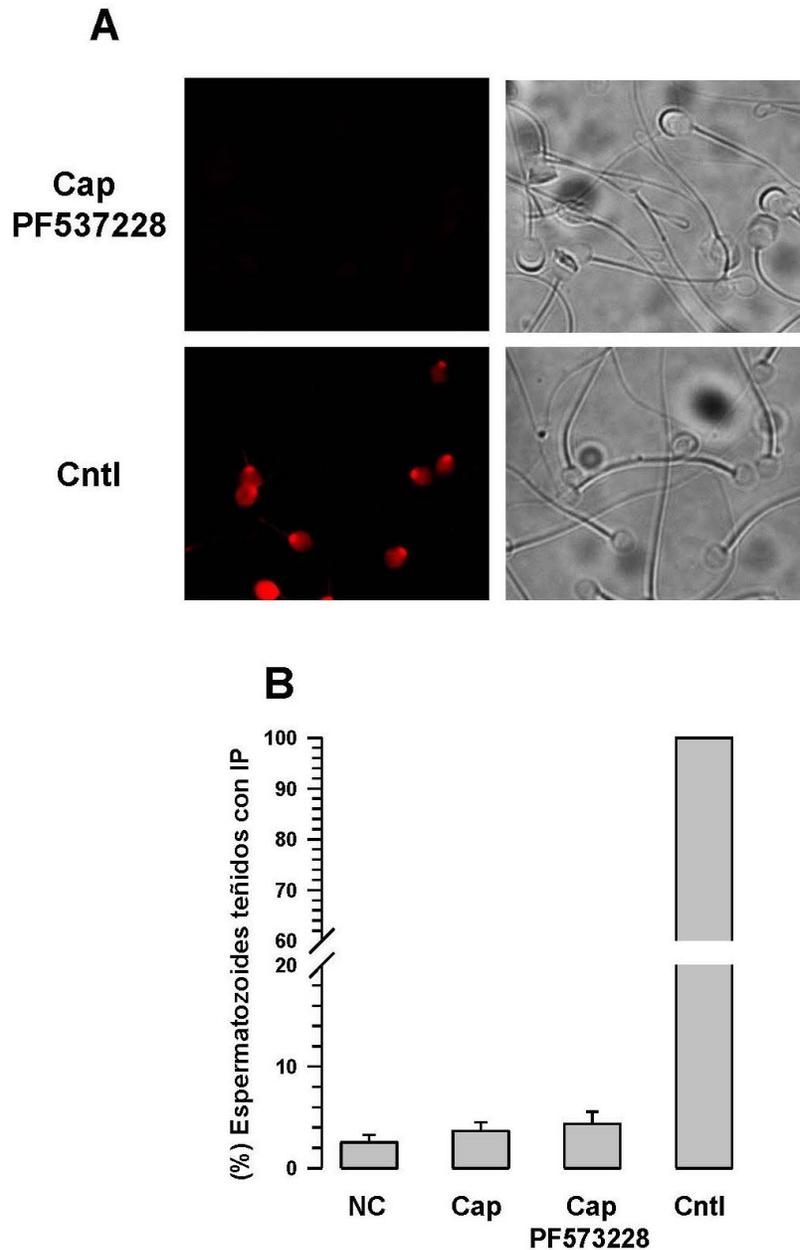


Figura Suplementaria 3. Viabilidad de los espermatozoides tratados con PF573228. A). IF de los espermatozoides capacitados 60 min y tratados con PF573228 (5 μ M) y espermatozoides capacitados 30 min y permeabilizados con tritón X 100 0.01% en PBS (el control positivo). B) Cuantificación de la fluorescencia del IP de las muestras tratadas y no tratadas. Los espermatozoides capacitados en ausencia del inhibidor después de 60 min de capacitación mostraron un 96.33% \pm 0.84 (media \pm s.e.m., N=3) de viabilidad, mientras que los espermatozoides capacitados en presencia de 10 μ M de PF573228, la concentración más alta probada, fue de, 95.67% \pm 1.46 (media \pm s.e.m., N=3), una diferencia no significativa.

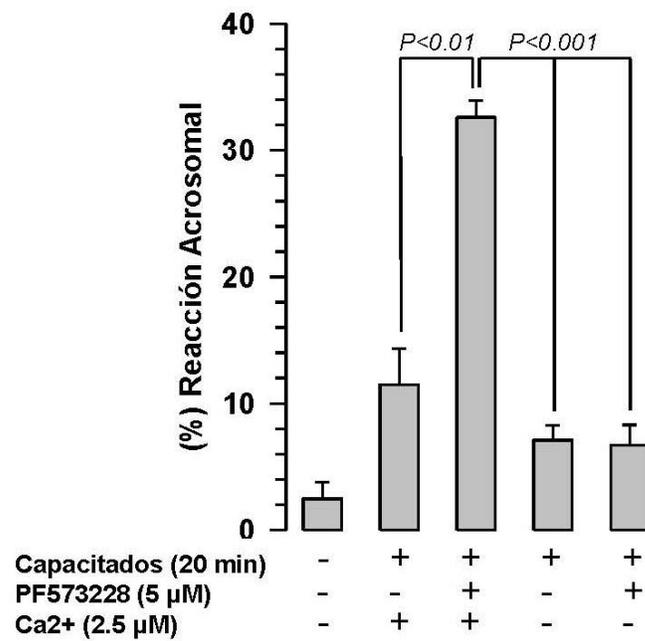
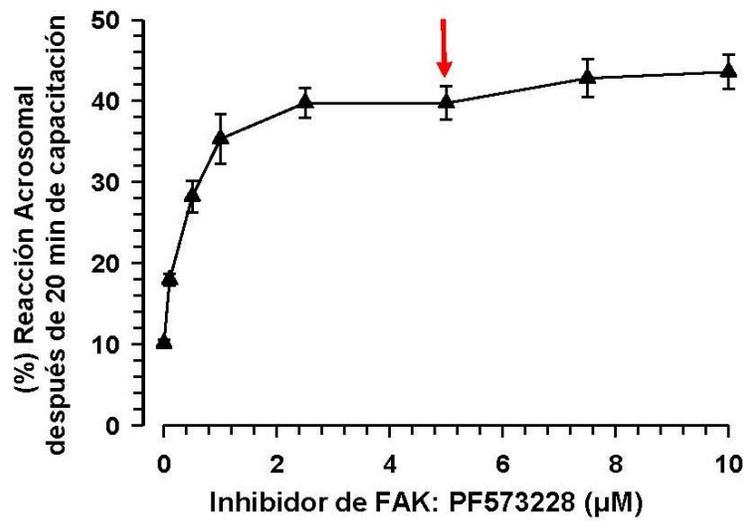


Figura Suplementaria 4. Determinación de la concentración de PF5732228. Los espermatozoides fueron capacitados en medio MCM-PL en presencia de diferentes concentraciones del inhibidor PF573228 (0.5-10 µm) y la RA fue cuantificada. El máximo efecto se observó entre los 2.5 y 5 µm de PF573228

14 ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_i: Calcio intracelular

AMPC Adenosín monofosfato cíclico

ATP Adenosín trifosfato

Ca²⁺ Calcio

Cap Capacitado

FAK Cinasa de adhesión focal

FN Fibronectina

FP-Tyr Fosforilación de proteínas en residuos tirosina

GAP Proteína activadora de GTPasa

GEF Factor intercambiador de nucleótido de guanina

Lat-A Latrunculina A

MCM-PL Medio mínimo de cultivo que contiene piruvato y lactato

NC No capacitado

PBS Buffer fosfato salino

PF-573228 Inhibidor de FAK

PKA Proteína cinasa A

RA Reacción acrosomal

ZP Zona pelúcida

15 ANEXOS

15.1 Solución isotónica [NaCl a 0.154 M]

Diluir 4.5 g de NaCl en 500 ml de agua destilada

15.2 PBS 10X

Para preparar un litro de PBS 10X pH 7.4

Se pesan los siguientes reactivos:

Cloruro de Sodio NaCl 0.14 M

Fosfato de Potasio Monobásico KH_2PO_4 1.5 mM

Fosfato de Sodio Dibásico 7•hidrato $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.1 M

Cloruro de Potasio KCl 2.7mM

Se ajusta el pH a 7.4

15.3 PBS-Tritón X 100 al 0.1%

Tomar 99.9 ml de PBS 1X y 0.1 ml de tritón X-100 y mezclar.

15.4 Medio MCM-PL (medio capacitante)

Se realizaron stocks 10X para los cuales se pesaron:

3.0705 g de NaCl

0.1257 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1.05305 g de NaHCO_3 -

Cada uno se diluye en 50 ml de agua destilada.

Se Toma 5ml de cada stock, se adicionó 87.5 μl de ácido láctico (pureza 89.4%),

también se adicionó 0.00138 g de piruvato de sodio, se mide el pH para ajustar a 7.8

y posteriormente se aforó a 50 ml. Se realizan alícuotas para uso posterior -20°C

Tomado de Roger & Yanagimachi, 1951 (Biol. Rep 13: 568-575)

15.5 Solución de Tyrode

Piruvato de sodio 0.25

Ácido láctico 20mM

0.36 NaH₂PO₄

118 mM NaCl

2.8 mM KCl

11.9 mM NaHCO₃⁻

5.56 mM Glucosa

1.8 mM CaCl₂

2.8 mM MgCl₂

pH 7.8

Cada uno se diluye en 50 ml de agua destilada excepto el ácido láctico y el piruvato de sodio. Se Toma 5ml de cada stock, se adicionó 87.5 µl de ácido láctico (pureza 89.4%), también se adicionó 0.00138 g de piruvato de sodio, se mide el pH para ajustar a 7.8 y posteriormente se aforó a 50 ml. Se realizan alícuotas para uso posterior -20° C

Tomado de Roger & Yanagimachi, 1975 (Biol. Rep 13: 568-575)

15.6 Amortiguador de lisis para proteínas No fosforiladas

Sustancia	Cantidad	Stocks	Concentración deseada
NP40	20µl		
Iodoacetamida	20µl	1mg/ml	10mg/ml
Inhibidor de Tripsina	2µl	1mg/ml	1µg/ml
Benzamidina	100µl	1mg/ml	50µg /ml
Pepstatina	5µl	2mg/ml	2µg/ml
Leupeptina	5µl	2mg/ml	2µg/ml
Aprotinina	5µl	2mg/ml	4µg/ml
PMSF 10X	50µl	10X(DMSO)	1mM
Complete	50µl	1tableta/1mlde H ₂ O	
PBS	1733µl		

15.7 Amortiguador de lisis para proteínas fosforiladas modificado para proteínas que se degradan como FAK

Sustancia	Cantidad	Stocks	Concentración deseada
NP40	20µl		
Iodoacetamida	20µl	1mg/ml	10µg/ml
Inhibidor de Tripsina	5µl	1mg/ml	5µg/ml
Benzamidina	0.0006g	Disuelto en Tris 50 mM, EDTA 4 mM pH 7.4 (100 µl)	2mM
Pepstatina	5µl	2mg/ml	2µg/ml
Leupeptina	5µl	2mg/ml	2 µg/ml
Aprotinina	5µl	2mg/ml	4µg/ml
Complete	50µl	1tableta/ 1ml de H ₂ O	
Ortovanadato de Na ⁺	920µl	108.75mM	50mM
NaF ⁺	20µl	950mM	10mM
Glicerol	200µl	Directo	10%
p-ABA	0.0008 g	Disuelto en Tris50 mM, EDTA 4mM pH 7.4 (100 µl)	2mM
PHMB	0.0014 g	Disuelto en Tris 50 mM, EDTA 4 mM pH 7.4 (100 µl + unos granitos de Tris base)	2mM
PMSF	0.0006 g	Disolver en 10 µl (MEOH,DMS o DMF)	2mM
TLCK	20 µl	10mM	100µM
ALLN	20 µl	26.7mM	250µM
Suma	1600 µl		

15.8 Gel separador

En un tubo limpio se adicionan los siguientes reactivos para el gel separador al 10% para 10 ml:

- 4 ml de Agua
- 3.3 ml de 30% de Acrilamida mix
- 2.5 ml de 1.5M tris (pH 8.8)
- 0.1 ml de 10% SDS
- 0.1 ml de 10% APS

15.9 Gel Concentrador

En un tubo limpio se adicionan los siguientes reactivos para el gel concentrador para 4 ml:

- 2.7 ml de agua
- 0.67 ml de 30% de acrilamida mix
- 0.5 ml de 1 M tris (pH 6.8)
- 0.04 ml de 10% SDS
- 0.04 ml de 10% APS
- 0.004 ml de TEMED

Solución de monómeros o 30% de Acrilamida mix

1. En un recipiente se adiciona:

- 30 g de Acrilamida
- 0.8 g de Bis acrilamida
- 100 ml agua desionizada cbp

2. Se filtra y se guarda en la oscuridad

Lauril sulfato de sodio (SDS) Al 10%

1. Se pesa 10 g de lauril sulfato de sodio en un recipiente

2. Se afora a 100 ml con agua desionizada

Persulfato de amonio (APS) Al 10%

1. Se pesó 0.1 g de Persulfato de Amonio en un tubo eppendorf

2. Adicionar 1 ml de agua desionizada.

Tris 1.5 M pH 8.8

1. Se pesó 91 g de Tris y se diluyen en 300 ml de agua desionizada

2. Se ajusta el pH a 8.8

3. Se afora a 500 ml y se filtra.

Tris 1 M pH 6.8

4. Se pesó 24.22 g de Tris y se diluyen en 100 ml de agua desionizada

5. Se ajusta el pH a 6.8

6. Se afora a 200 ml y se filtra 004 m de TEMED

15.10 Amortiguador de Tricina10X

En un recipiente se diluyen con agua destilada:

121.1 g de Tris base al 0.1 M

179.2 g de Tricina 0.1 M

10 g de SDS al 1%

Se afora a 1 L de agua desionizada. Para 1X se toman 100 ml de 10X y aforar 1 L con agua destilada

15.11 Buffer de Laemmli 3X

Para 10 ml de buffer se disuelven:

1.5 ml Tris 0.125 M pH=6.8

3 ml de glicerol al 50%

5 ml de SDS al 10%

0.5 ml de 2 – mercaptoetanol al 10%

1 mg de azul de bromofenol al 0.005%

15.12 Buffer de Corrida: [tris 0.025 M – Glicina 0.192 M – SDS 0.1%] 10X

En un recipiente se diluyeron con agua desionizada:

30 g de Trizma base

144 g de Glicina

10 g de SDS

Se afora a 1 L de agua desionizada

15.13 Amortiguador de Transferencia

100 ml de Glicina 10X

200 ml de Metanol

Se afora a 1L con agua hélix

15.14 Solución de bloqueo para WB

Para 100 ml de solución se pesan 5 g de leche se diluyen en 100 ml de PBS–Tritón o PBS-Tween

15.15 Solución Stripping

Para 1 Litro

Se pesa 7.5 g Glicina para tener 25 mM

Se pesa 9 g de NaCl para tener 0.9% w/v

Se disuelve en agua destilada y se ajusta el pH a 2.3

10 g de SDS 1% w/v

Y se afora a un litro.

15.16 Solución fijadora:

Formaldehído al 4% y Glutaraldehído al 0.2%

Del Gultaraldehído al 25% se tomaron 800 µl para obtener una concentración de 0.2%

Del Formaldehido al 36% se tomaron 8.3 mL para obtener una concentración al 4%

Se afora a 100 ml con PBS 1X

15.17 Cloruro de amonio [NH₄Cl a 50 mM]

Se pesan 0.1337 g de NH₄Cl

Se diluye en 50 ml de PBS 1X



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00100

Matrícula: 2131800203

EL PAPEL DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN FOCAL EN LA CAPACITACIÓN, LA REACCIÓN ACROSOMAL Y LA SOBREVIVENCIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL COBAYO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 16 del mes de febrero del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ
- DRA. MAYEL CHIRINOS ESPIN
- DRA. KARINA PASTEN HIDALGO
- DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ANA LILIA ROA ESPITIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

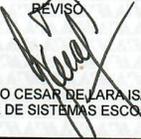
Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Ana Lilia Roa

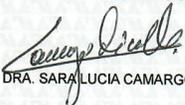
ANA LILIA ROA ESPITIA
ALUMNA

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISSASI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

VOCAL



DRA. MAYEL CHIRINOS ESPIN

VOCAL



DRA. KARINA PASTEN HIDALGO

SECRETARIO



DR. EDMUNDO BÓNILLA GONZALEZ