



Casa abierta al tiempo



POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**“ESTUDIO DE LAS BALSAS LIPÍDICAS EN
ESPERMATOZOIDES DE CERDO CRIOPRESERVADOS”**

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

B. E. Marcos Manuel Reyes Romero

Director: Dr. Humberto González Márquez

Asesora: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Asesora: Dra. Concepción Sánchez Gómez

Asesor: Dr. José Antonio Herrera Barragán

México, D. F. a 25 de julio de 2012.

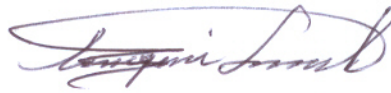
Los integrantes del jurado, designados por el posgrado en Biología Experimental aprobaron la tesis “**Estudio de las balsas lipídicas en espermatozoides de cerdo criopreservados**” realizada por el Alumno Marcos Manuel Reyes Romero y se realizó la disertación pública el día 26 de Agosto del 2012 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.



Presidenta

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa



Secretaria

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Hospital Infantil de México Federico Gómez.



Vocal

Dra. Edith Arenas Ríos

Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa



Vocal

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco

Comité Tutorial

DIRECTOR

Dr. Humberto González Márquez

Depto. de Ciencias de la Salud, DCBS UAM-I

hgm@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Depto. de Ciencias de la Salud, DCBS UAM-I

reyna@xanum.uam.mx

ASESORA

Dra. Concepción Sánchez Gómez

Lab. Inv. Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental

Hospital Infantil de México Federico Gómez

csgomez_2000@yahoo.com

ASESOR

Dr. José Antonio Herrera Barragán

Unidad de Manejo y Aprovechamiento Sustentable de Vida Silvestre.

DGVS-CR-IN-917-MEX/06

Depto. de Producción Agrícola y Animal, DCBS UAM-X

mvzjoseherrera@yahoo.com.mx

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Expresión Génica y de Andrología, del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Humberto González Márquez.

CON APOYO FINANCIERO DE:

a) CONACYT PROYECTO 0105961/I0110/194/09.

b) México-Francia SEP-CONACYT-ANUIES-ECOS PROYECTO M10-A02

c) UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyT (PNPC) registro 001481 y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”. Número de registro de la beca de Maestría, otorgada por CONACYT 336115/233535.

Dedicatorias

A Marisol que siempre estuvo en los momentos más complicados apoyándome.

A Héctor que vino en el mejor momento para inspirarme.

A Raquel y Herminio por el ejemplo, enseñanzas y valores.

A mis hermanos por creer en mí.

A mis asesores por su paciencia y su confianza

A mis sobrinos para que sea un ejemplo a seguir.

A Juan, Ana, Javier y Selene por su ayuda en momentos difíciles.

Resumen

Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana plasmática ricos en colesterol y esfingolípidos, además de proteínas que tienen tanto funciones estructurales como funciones en el reconocimiento celular y transducción de señales. En la membrana de espermatozoides de diferentes especies se han encontrado balsas lipídicas. Por otro lado se ha tratado de criopreservar espermatozoides de cerdo, resultando en baja eficiencia. El objetivo de este trabajo fue estudiar la composición de las proteínas de balsas lipídicas en espermatozoides de cerdo criopreservados, por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida, tanto unidimensional como bidimensional; se encontró una disminución en la concentración total de proteínas en los espermatozoides de cerdo criopreservados, además de un cambio en los patrones electroforéticos en ambos casos.

Abstract

Lipid rafts are plasma membrane microdomains rich in cholesterol and sphingolipids, as well as proteins that have structural functions as functions in cell recognition and signal transduction. In the membrane of sperm from different species have been found lipid rafts. On the other hand has tried to cryopreserve boar sperm, resulting in low efficiency. So, the objective of this work was to study the protein composition of lipid rafts in boar spermatozoa cryopreserved, using polyacrylamide gel electrophoresis both dimensional and two dimensional, finding a decrease in total protein concentration of cryopreserve boar sperm, and a change in the electrophoretic patterns in both cases.

Índice

Introducción	1
Balsas lipídicas	3
Descubrimiento.....	6
Estructura.....	8
Función	12
Membrana plasmática de espermatozoides	13
Criopreservación.....	16
Antecedentes.....	18
Justificación	21
Objetivo general	21
Objetivos particulares	21
Hipótesis	22
Metodología.....	22
Obtención y análisis de la muestra	22
Criopreservación de espermatozoides.....	23
Aislamiento de las balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo	23
Inmuno ensayo DotBlot.....	24
Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y medio reductor	24

Electroforesis bidimensional (2-D) en gel de poliacrilamida.....	25
Resultados.....	25
Evaluación espermática básica.....	25
Aislamiento de las balsas lipídicas.....	26
Concentración proteínica.....	26
Ensayos de inmunodetección sin electroforesis (Dotblot).....	28
PAGE-SDS.....	28
Electroforesis Bidimensional (2D) en geles de poliacrilamida.....	29
Discusión.....	30
Conclusiones.....	33
Perspectivas.....	33
Bibliografía.....	34

Introducción

Las membranas celulares son cruciales para la vida. La membrana plasmática envuelve la célula, define sus límites y mantiene las diferencias esenciales entre su contenido y el entorno. A pesar de que tienen diferentes funciones, todas las membranas biológicas comparten una estructura básica común: una doble capa de moléculas lipídicas además de proteínas integrales y periféricas, que se mantienen unidas, fundamentalmente, por interacciones no covalentes (Figura 1). La membrana celular es una estructura dinámica, fluida y la mayoría de sus moléculas son capaces de desplazarse en el plano de la membrana (Singer y Nicolson, 1972). En la actualidad el modelo de membrana biológica de mosaico fluido es el más aceptado. Esta bicapa lipídica constituye la estructura básica de la membrana y actúa de barrera, relativamente impermeable, al paso de la mayoría de moléculas hidrosolubles. Las moléculas proteicas que se localizan dentro de la bicapa lipídica son responsables de la mayoría de las funciones de la membrana (Alberts y col., 2002).

Todas las moléculas lipídicas de las membranas celulares son anfipáticas, es decir, tienen un extremo hidrofílico o polar y un extremo hidrofóbico o no polar. En la membrana plasmática de muchas células de mamíferos predominan cuatro grupos de fosfolípidos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y esfingomiélin. (Figura 1)

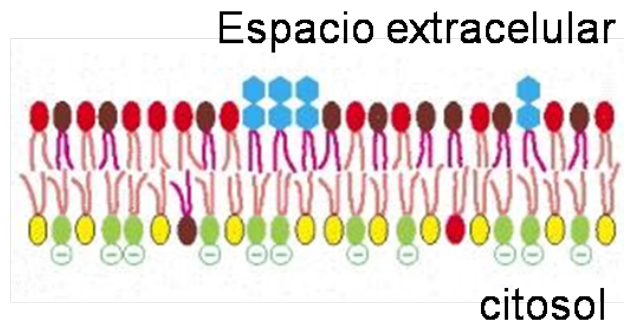
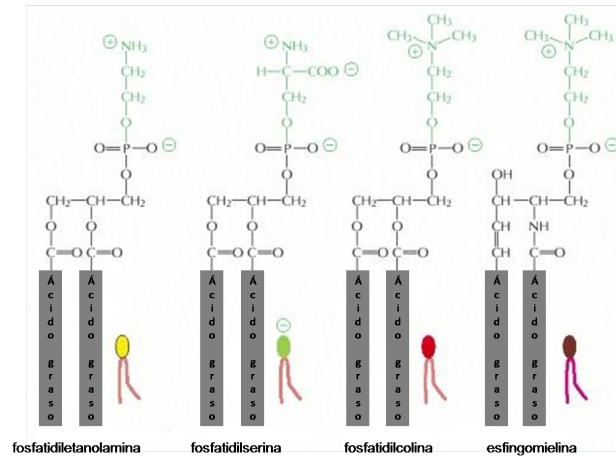


Figura 1. Principales fosfolípidos constituyentes de las membranas plasmáticas.

Tomada de Alberts, 2002.

En conjunto, estos cuatro fosfolípidos constituyen más de la mitad de la masa de lípidos de la mayoría de las membranas. Otros fosfolípidos, como los fosfolípidos de inositol, son funcionalmente importantes pero se hallan en cantidades relativamente pequeñas. Sin embargo, la bicapa lipídica de muchas membranas celulares no está compuesta exclusivamente por fosfolípidos, sino que contiene además colesterol y glicolípidos. Las moléculas de colesterol refuerzan el carácter de barrera permeable de la bicapa lipídica. Se orientan en la bicapa con sus grupos hidroxilos próximos a las cabezas polares de las moléculas de fosfolípidos. En esta posición, sus anillos esteroideos, planos y rígidos, interactúan con (y en parte inmovilizan) las regiones de las cadenas hidrocarbonadas que están

próximas a los grupos polares de la cabeza. El colesterol tiende a hacer menos fluidas las bicapas lipídicas, pero a las concentraciones en que se presenta en la mayoría de las membranas plasmáticas de las células eucariotas también impide que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen. Así pues, el colesterol inhibe posibles transiciones de fase (Alberts y col. , 2002).

Balsas lipídicas

Recientemente se ha propuesto un nuevo modelo para las membranas biológicas en donde hay regiones, dominios o balsas lipídicas. El principio básico del modelo es que en una región específica, se forman estructuras moleculares no fluidas, con la capacidad de seleccionar determinadas proteínas y excluyendo otras (de Laurentiis y col., 2007). La definición original de balsas lipídicas comprende una fracción de membrana enriquecida en colesterol y glicoesfingolípidos que permanece insoluble en presencia de detergente (Simons y van Meer, 1988). Las fracciones de membrana resistentes a detergente pueden distinguirse de la membrana de la que proceden por su menor densidad de flotación. La definición se basa en que la fracción de membrana resistente a detergentes es una entidad funcional en la membrana plasmática. Además de balsas lipídicas se les llama membranas resistentes a detergentes (DRM) (Brown y London, 1998b; Schuck y col., 2003; Nixon y Aitken, 2009), membranas enriquecidas en colesterol (CEM: cholesterol-enriched membranes), membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos (GEM: glycosphingolipid enriched membranes) (Rodgers y Rose, 1996); membranas enriquecidas en glicoesfingolípidos insolubles en detergente (DIG: detergent-insoluble, glycosphingolipid-enriched membranes) (Schroeder y col., 1998), y plataformas enriquecidas en gangliósidos (GM₁) (Selvaraj y col., 2006).

La difusión lateral de las balsas lipídicas en la membrana plasmática es un movimiento complejo y dinámicamente relacionado con los lípidos que las rodean. La fuerza que dirige la creación de grandes balsas es la interacción preferencial entre colesterol y esfingolípidos. Se sabe que tales interacciones forman una fase en la bicapa, con un arreglo de las cadenas hidrocarbonadas intermedio entre un líquido desordenado o fase fluida y un gel. Debido a que la mayoría de los fosfolípidos biológicos tienen bajas temperaturas de fusión, se pensaba que las membranas celulares existían como un líquido, en una fase de líquido cristalino (Lc). Sin embargo, la membrana plasmática y algunos organelos de secreción y endocitosis en las células, son ricos en esfingolípidos (que tienen elevada temperatura de fusión) y esteroides que tienen efectos profundos en la fase de membrana (Silvius y col., 1996). Esta mezcla de lípidos aumenta la posibilidad de comportamiento de **fase compleja** en las membranas en que se encuentran (Brown y London, 1998a) (figura 2). De hecho, las membranas plasmáticas de células eucariotas no son una fase de Lc convencional (Brown y London, 1998b). En su lugar, pueden ser, al menos parcialmente, una fase de líquido ordenado rico en colesterol (Lo). La fase Lo se caracteriza por un alto grado de orden las cadenas de acilo que favorecen una elevada temperatura de fusión por sus cadenas de acilo saturadas -como los esfingolípidos- mezclados con colesterol (Brown y London, 1998a).

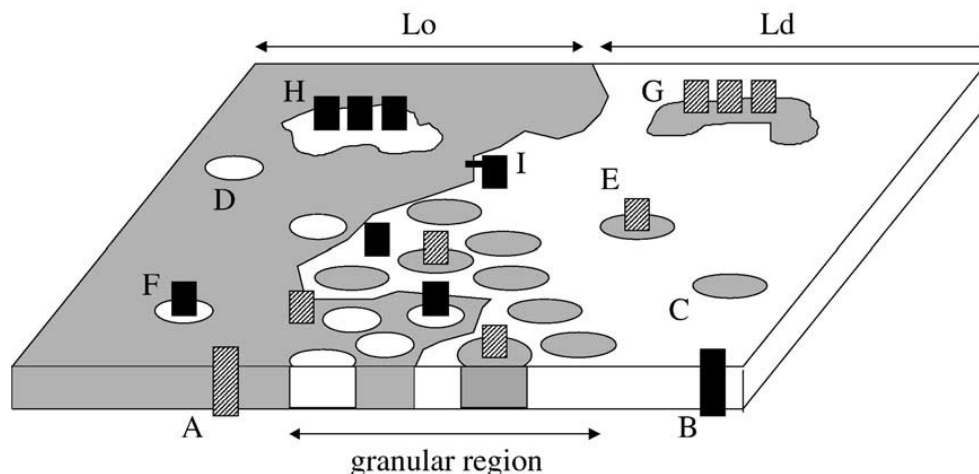


Figura 2. Arreglo de los dominios en fase Lo y Lc o líquido desordenado Ld. Los recuadros en gris representan proteínas ubicadas preferencialmente en balsas lipídicas, mientras que los recuadros en negro representan a las proteínas que prefieren Lc. Tomada de London, 2005.

La integración de proteínas ancladas a GPI en las balsas lipídicas está dada por puentes de hidrógeno intermoleculares y vacíos generados por impedimentos estéricos de las cabezas polares voluminosas ocupadas por colesterol (figura 3). La inclusión de proteínas intrínsecas de las balsas lipídicas todavía no queda muy claro en este modelo, aunque se cree que está se da por acilaciones en las proteínas (London, 2005).

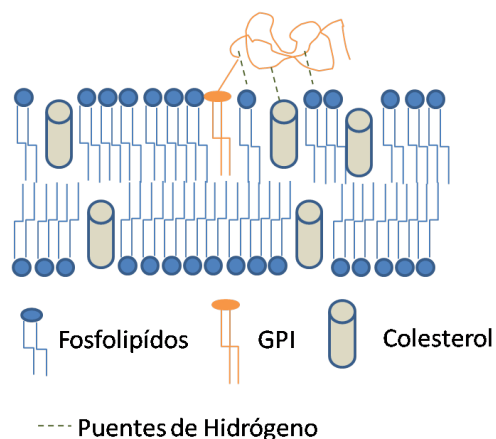


Figura 3. Representación de los puentes de hidrógeno de proteínas ancladas a GPI y los vacíos formados por el impedimento estérico del colesterol.

El método estándar de purificación de balsas lipídicas es tratar a la célula con Tritón X-100 a 4 °C y recuperar las membranas resistentes a detergentes de una fracción ligera en una centrifugación en un gradiente de densidad. Se ha postulado que este procedimiento podría remodelarla membrana original, de tal modo que el colesterol y los glicosfingolípidos se relocalicen en nuevas estructuras que no existían en la membrana original. Esta hipótesis se desechó empleando procedimientos alternativos de preparación de balsas lipídicas, sin utilizar detergentes, con resultados similares a la purificación con éstos últimos (Pilch y col., 2007).

Descubrimiento

Las células epiteliales definen y separan compartimentos funcionales en los tejidos y órganos. Estas son morfológica y funcionalmente polarizadas. La superficie apical de una célula epitelial típica es, química y funcionalmente, distinta de la superficie basolateral. La demarcación entre las dos superficies es una banda de uniones estrechas que unen las células adyacentes en la lámina basal. Esta banda de uniones estrechas permite fraccionamiento selectivo de las membranas plasmáticas apicales y basolaterales. Los lípidos de la fracción de membrana apical tienen un enriquecimiento relativo a la fracción basolateral de glicosfingolípidos. Este enriquecimiento se confirmó con el uso de virus con envoltura para probar la unión a membranas apicales o basolaterales en las células (Rodríguez Boulan y Sabatini, 1978; van Meer y Simons, 1982b). Por su parte Simons y van Meer (1982a) establecieron el modelo de microdominios de lípidos en base a estas observaciones biológicas y otros estudios físico-químicos que mostraban una alta propensión a enlaces de hidrógeno entre glicosfingolípidos, así como en las observaciones que glicosfingolípidos neutros, pero no glicosfingolípidos cargados, se encontraron en pequeños grupos, alrededor de 15 moléculas máximo, en modelos de bicapa y membranas nativas. Así, en el modelo de balsas lipídicas, los

microdominios son vistos como grupos de glicosfingolípidos con puentes de hidrógeno con las proteínas asociadas, ya sea atrapadas en la fase de puentes de hidrógeno de los esfingolípidos o asociadas específicamente con los esfingolípidos. Se asume que las proteínas tienen señales cortas para el tráfico de microdominios enteros a la superficie apical.

Muchas proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol se encontraron concentradas en las superficies apicales de las células epiteliales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Lisanti y col., 1988), su distribución es, a menudo, más polarizada que la de los glicosfingolípidos y el ancla de GPI parece ser la etiqueta de clasificación.

El paralelo entre la polaridad de los glicosfingolípidos y las proteínas ancladas a GPI sugirió que las dos moléculas de membrana se movían en una misma unidad, los microdominios de van Meer y Simons. Un análisis de dispersión de Rayleigh indicó que los esfingolípidos (Hagmann y Fishman, 1982) y las proteínas ancladas a GPI (Hoessli y Rungger-Brandle, 1985) eran insolubles en el detergente neutro Tritón X-100, especialmente cuando el colesterol estaba presente. Estos datos fueron apoyados por un estudio sistemático de Hooper y Turner (1988) demostrando que ectoenzimas ancladas a GPI de membranas apicales de epitelios renales eran insolubles en Tritón X-100 a 4 °C a una concentración de 5.9 mM, pero soluble en bajas concentraciones de otros detergentes. Brown y Rose (1992), utilizando este criterio de insolubilidad, siguieron la organización en la membrana de una fosfatasa alcalina anclada a GPI, y descubrieron cómo la proteína viajó a través del retículo endoplasmático y el complejo de Golgi en su camino hacia la superficie apical de las células de epitelio de riñón canino Madin-Darby (MDCK). El noventa por ciento de la fosfatasa alcalina naciente fue insoluble en Tritón X-100 una vez que sus cadenas de N-oligosacáridos habían madurado. Esto coloca el punto de conversión de formas solubles en detergente a

insoluble en detergente y la entrada en microdominios lipídicos en algún lugar antes de la cisterna medial del complejo de Golgi. Cuando los extractos de detergentes fueron fraccionados por densidad, la fosfatasa alcalina madura se encontró en la fracción rica en lípidos y de baja densidad, mientras que una proteína transmembranal usada como control se encontró en la fracción pobre en lípidos y de alta densidad. En las fracciones de baja densidad enriquecidas en fosfatasa alcalina aparecían vesículas de membrana de varios tamaños, pero típicamente cientos de nanómetros de diámetro. En los lípidos de la célula entera, las vesículas no tenían fosfatidiletanolamina (PE) ni fosfatidilcolina (PC) y estaban enriquecidas en colesterol y esfingolípidos. La relación molar de glicerofosfolípidos:esfingolípidos:colesterol era 34:36:32 o ~1:1:1. Esta relación se ha convertido en mezcla canónica de las balsas lipídicas.

Otras dos observaciones posteriores a Brown y Rose definieron una balsa lipídica. García y colaboradores (1993) utilizaron una extracción breve (5 minutos en Tritón X-100, en lugar del 20 minutos utilizado por Brown y Rose) y reportaron que 50%-60% de las proteínas ancladas a GPI marcadas fueron insolubles en Tritón X -100. Estos investigadores no encontraron ningún efecto de drogas que se unen al colesterol sobre la insolubilidad de proteínas ancladas a GPI. Otro grupo, utilizando un tiempo de extracción largo (30 minutos), encontró que la fosfatasa alcalina anclada a GPI fue casi toda soluble antes de la extracción, si las células eran tratadas con saponina (Cerneus y col., 1993).

Estructura

Las balsas presentan una estructura de bicapa asimétrica con esfingolípidos en la cara exoplásmica y glicerofosfolípidos, como la fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina, en la cara citoplásmica, con colesterol distribuido en ambas caras. Las balsas están rodeadas por bicapas

fluidas compuestas, principalmente, de fosfatidilcolina insaturada. Proteínas transmembranales específicas se insertan en la bicapa de las balsas junto con receptores anclados a GPI del lado exoplásmico y ácidos grasos unidos a proteínas efectoras en el lado opuesto. Ambos lados de la balsa están acoplados por interdigitación de las cadenas de N-acilo de los esfingolípidos, más largas que las de otros fosfolípidos, con colesterol intercalado con los glicerofosfolípidos en la cara citoplásmica (Quinn, 2010).

En cuanto a la forma de las balsas lipídicas existen al menos dos tipos principales: los dominios que son invaginaciones en la membrana en forma de omega invertida llamadas caveolas y los dominios de forma plana (figuras 4 y 5).

Caveolas

Las caveolas poseen una capa estriada en su cara citoplasmática, los componentes principales son proteínas conocidas como caveolinas. Hay tres miembros conocidos de la familia del gen de la caveolina: la caveolina-1 (dos isoformas α y β) (Kogo y col., 2004), la caveolina-2 (tres isoformas α , β y γ) (Scherer y col., 1996) y la caveolina-3 (Tang y col., 1996). Los grupos amino y carboxilo terminales de caveolinas son citoplásmica, lo que sugiere que forman una estructura de "horquilla" en la membrana, y estos tienen residuos de ácido palmítico en varios residuos (Dietzen y col., 1995) (figura 4). Las caveolinas 1 y 2 tienen una amplia distribución, (traslapándose en la misma caveola) estando presentes en la mayoría de tipos de células, siendo más abundante en las células endoteliales, fibroblastos, adipocitos, neumocitos y células epiteliales (Galbiati y col., 2001). En contraste, la caveolina-3 se expresa casi exclusivamente en el músculo liso y esquelético (Rubin y col., 2007).

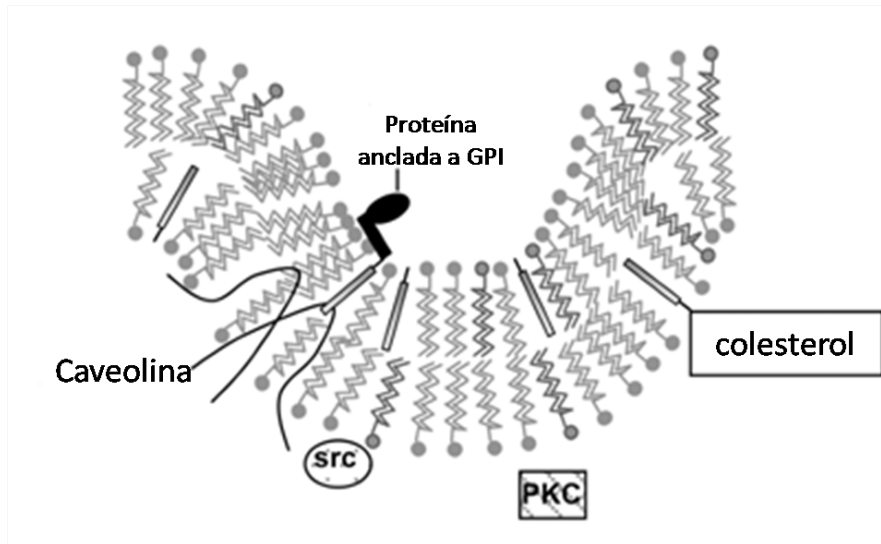


Figura 4. Estructura de las caveolas. Las caveolinas son representadas como horquillas y los grupos amino y carboxilo terminal están del lado citoplásmico. Mientras que las proteínas ancladas a GPI están del lado exoplásmico. Modificado de Laurentiis, 2007.

Se han identificado dos formas de caveolas, 'profundas' y 'superficiales', con distribución variada de las tres caveolinas y sus isoformas (Scherer y col. , 1996; Fujimoto y col., 2000). Es posible que estos dominios tengan diferencias funcionales, pero esto no ha sido estudiado suficientemente. Se piensa que las caveolinas tiene una función estructural en las caveolas y que, probablemente, estén relacionadas con la capacidad de unir colesterol (Murata y col., 1995) y esfingolípidos (Fra y col., 1995). Más precisamente, la expresión de caveolina-1 o la caveolina-3 en células que carecen de caveolina y caveolas, induce la formación de caveolas y la reconstitución de la capa de caveolar (Fra y col. , 1995). Sin embargo, la expresión de la caveolina-2 por sí sola no da lugar a la formación de caveolas, sino que requiere la co-transfección de la caveolina-1 (Mora y col., 1999; Parolini y col., 1999). Las caveolinas son fosforiladas en sitios Serina/Treonina por la fosfocinasa-C α y por Src en Tirosina (Stan, 2005).

El número de caveolas por célula y el nivel de expresión de caveolina están relacionados con la concentración de colesterol. El aumento del nivel de colesterol libre en los fibroblastos mediante el aumento de la concentración externa de lipoproteínas de baja densidad (LDL) dio lugar a una sobre expresión de RNAm de caveolina y aumentó el número de caveolas (Fielding y col., 1997), mientras que, al eliminar el colesterol, usando agentes que lo secuestran, provocó una disminución de los niveles de RNAm de caveolinas (Hailstones y col., 1998). A su vez, la disminución de la concentración de caveolina reduce la tasa de flujo de colesterol de las células, lo que sugiere que caveolas están involucrados en la homeostasis del colesterol (Fielding y col., 1997).

Además de las caveolinas, se ha demostrado que otra familia de proteínas es un componente integral de caveolas. Estas son las flotilinas, flotilina-1 y flotilina-2 (Bickel y col., 1997). Las flotilinas pueden formar complejos hetero-oligoméricos con las caveolinas y, probablemente, son componentes estructurales que participan en la formación de caveolas (Volonte y col., 1999).

Dominios planos

El descubrimiento de dominios insolubles en detergente presentes en las células que carecían de caveolas y caveolinas, sugirió que podrían existir microdominios de membrana distintos a las caveolas (Fra y col., 1995; Mirre y col., 1996). Estos dominios también pueden coexistir con caveolas en la misma célula y están presentes en la misma fracción de membrana que las caveolas (Schnitzer y col., 1995), utilizando métodos dependientes o independientes de detergente. Se ha estimado que su diámetro es de menos de 70 nm, pudiendo ser tan pequeños como 26 ± 13 nm (Pralle y col., 2000). Como las caveolas, los dominios planos están

enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, pero no parecen formar una estructura en particular como las caveolas. A diferencia de las caveolas, las balsas lipídicas, probablemente, se encuentran por doquier, mientras que las caveolas están excluidas de ciertas células, como los linfocitos T (Xavier y col., 1998).

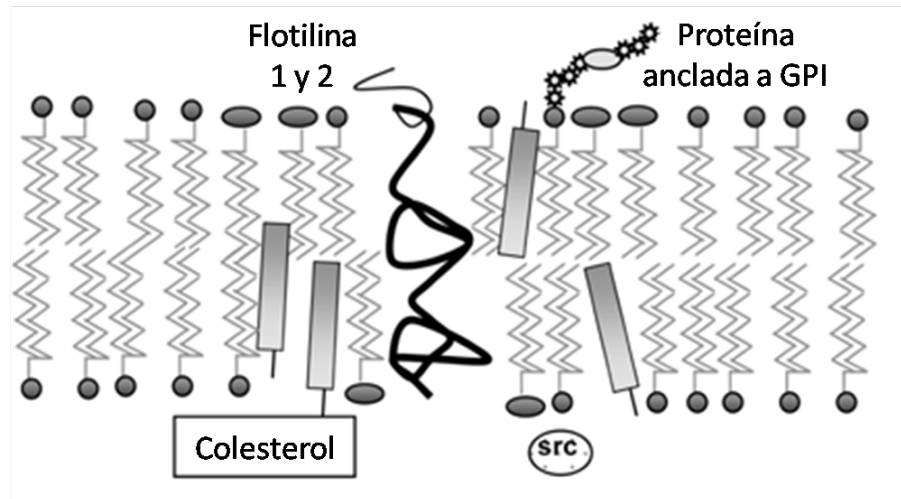


Figura 5. Estructura de los dominios planos. Las proteínas ancladas a GPI se encuentran en la cara exoplásmica. El colesterol y los esfingolípidos son abundantes en la cara exoplásmica mientras que la composición de la cara citoplásmica no está bien definida. Modificado de Laurentiis, 2007.

Función

Las balsas lipídicas están implicadas en diferentes funciones celulares como la transducción de señales, donde las proteínas de señalización de los DRM son específicas del tipo de célula y del estado fisiológico celular e incluyen proteínas receptoras y no receptoras con actividad de tirosina cinasa, proteínas G, fosfolípidos de inositol, proteínas ancladas a GPI, óxido nítrico sintasa y otras (Brown y London, 1998a; Kabouridis y col., 2000; Pinaud y col., 2009); el reconocimiento celular, como en el espermatozoide con la zona pelúcida (Jones

y col., 2010), y en la unión de varios virus a la membrana plasmática; también se les han implicado en el transporte y reutilización de receptores y en la proteólisis a nivel de membrana inhibiendo o activando señales.

Membrana plasmática de espermatozoides

Un rasgo característico de los espermatozoides es la subdivisión de su membrana plasmática en zonas que difieren en composición y función (Figura 6). La naturaleza heterogénea de la membrana plasmática del espermatozoide, incluyendo la detección de carga superficial (Yanagimachi y col., 1972), marcaje con lectinas (Robinson y col., 2005), congelación y fractura para observación en microscopía electrónica (Flechon, 1985), el uso de agentes intercalantes (Diaz-Fontdevila y col., 1992) y el marcaje con anticuerpos (Feng y col., 2008). El conocimiento de que la organización y composición de la membrana plasmática varía entre diferentes regiones del espermatozoide, llevó a la idea de que ésta es un mosaico de dominios restringidos que reflejan las funciones especializadas de los componentes intra y extracelulares del espermatozoide (Holt, 1984; Ladha, 1998). Estos dominios tienen características dinámicas que cambian la organización y composición durante la vida celular (Toshimori, 1998).

Las principales regiones de la membrana de la cabeza del espermatozoide en la mayoría de los mamíferos son de la región acrosomal (cabeza anterior) y la región postacrosomal (cabeza posterior). La membrana plasmática de la región acrosomal se puede subdividir en: (a) dominio del segmento marginal (dominio del segmento apical, dominio de la banda anterior, dominio borde periférico) a lo largo del margen anterior del acrosoma, (b) de dominio segmento principal (dominio anterior acrosomal) en la mayor parte del acrosoma y

(c) dominio del segmento ecuatorial (dominio acrosomal posterior) sobre la parte posterior del acrosoma. El tamaño y forma de estos dominios puede variar entre especies (Ladha, 1998).

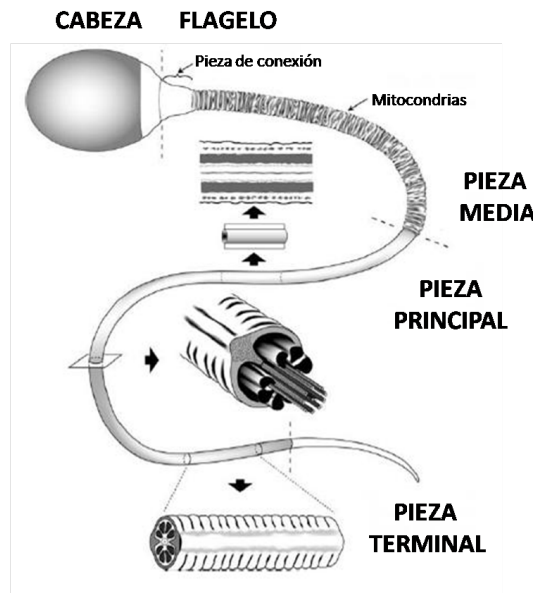


Figura 6. Características generales de espermatozoides de mamíferos. La cabeza del espermatozoide está pegada al flagelo por la pieza de conexión. Los dominios del flagelo son la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. En la pieza media se localizan las mitocondrias. Tomada de Eddy, 2006.

El dominio de la región postacrosomal incluye la membrana plasmática entre el margen posterior del acrosoma y la pieza de conexión. El margen entre las regiones acrosomal y postacrosomal está delimitada en algunas especies por la banda dentada (anillo subacrosomal), que rodea el cabeza del espermatozoide en el margen posterior del segmento ecuatorial.

El anillo posterior (anillo nuclear o anillo estriado), se encuentra en la unión entre la cabeza y pieza de conexión, se cree que forma un sello hermético entre los compartimentos citoplásmicos de las dos partes principales del espermatozoide. La membrana plasmática del flagelo se divide en dominio de la pieza media, dominio de la pieza principal y el dominio de

la pieza distal. Los dominios de la pieza media y la pieza principal están separados por el *annulus*, un anillo fibroso que es un componente del citoesqueleto flagelar.

Aunque se han observado variaciones en la composición lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide entre especies, también la distinguen de otros tipos celulares características comunes. Mientras que el contenido de colesterol o glicolípidos en la membrana plasmática del espermatozoide es común, contienen cantidades relativamente altas de plasmalógenos (Figura 7) (20-40%), otros fosfolípidos con enlace éter, y lípidos con cadenas alifáticas poli-insaturadas largas (Agrawal y col., 1988)

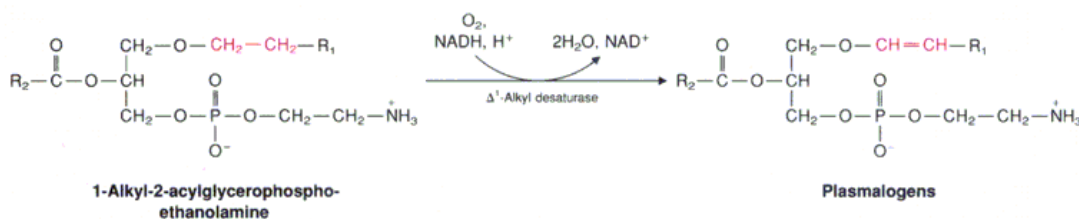


Figura 7. La desnaturalización de la 1-alkil-2-acilgliceroletanolamina (el análogo alquílico de la fosfatidiletanolamina) produce el correspondiente éter de vinilo o plasmalógeno. Tomada de Mathews, 2002.

Los fosfolípidos representan alrededor del 70% de los lípidos de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo (Nikolopoulou y col., 1985) y la fosfatidilcolina es casi dos tercios de los fosfolípidos de la membrana plasmática de la cabeza anterior de los espermatozoides de carnero (Parks y Hammerstedt, 1985). Los esteroides son los siguientes lípidos más abundantes, en una proporción molar de colesterol/fosfolípidos de aproximadamente 0,12. Los ácidos grasos libres comprenden una cantidad relativamente pequeña de los lípidos en los espermatozoides de cerdo, mientras que diacilgliceroles están presentes en la misma cantidad que los glicolípidos. La relación de fosfolípidos/proteína es de

aproximadamente 0.68 (Nikolopoulou y col., 1985) con respecto al peso en las membranas plasmáticas aisladas de espermatozoides de cerdo, lo que sugiere que la cantidad de lípidos totales y proteínas son aproximadamente 70:30. Sin embargo, esto es para la membrana plasmática total. La cantidad, tipo de lípidos y la relación de lípidos/proteína probablemente varían entre diferentes dominios (Mack y col., 1987).

Criopreservación

A pesar de casi 40 años de investigación en la criopreservación de espermatozoides de cerdo, los resultados de fertilidad no han sido satisfactorios para uso comercial como con otros animales domésticos (Selles y col., 2003). Esto es debido a la alta susceptibilidad de los espermatozoides de cerdo a los daños por la criopreservación. El semen fresco líquido asegura una tiempo de almacenamiento de aproximadamente 3-5 días, con un máximo de 7 días (Grossfeld y col., 2008), a una temperatura de 4-16 °C. Sin embargo, para el intercambio internacional de semen o el establecimiento de reservas de germoplasma, la criopreservación de espermatozoide de cerdo sigue siendo un requisito previo.

La criopreservación es el mantenimiento de tejidos biológicos en un estado viviente de animación suspendida a temperaturas de -70 a -196°C (Baker y Jeffries, 2006). A una temperatura de -196°C, la temperatura de evaporación del nitrógeno líquido, todas las reacciones químicas, procesos biológicos y actividades físicas intra y extracelulares se suspenden. Teóricamente, un tejido criopreservado puede durar indefinidamente. El principio de la criopreservación puede ser diferenciado del de congelación por el hecho de que, en el primero se adicionan agentes crioprotectores distintos y se utiliza una temperatura menor a -80°C (Bakhach, 2009).

En 1949 Polge, Parks y Smith reportaron la función crioprotectora del glicerol durante sus esfuerzos para preservar espermatozoides congelados de aves. En el año siguiente, Smith extendió esas observaciones al criopreservar con éxito eritrocitos humanos en glicerol, citado en: (Baust y col., 2009).

En la actualidad, la criopreservación se realiza en muy diversos tipos celulares. En el caso de los espermatozoides, su éxito se centra en que ha contribuido a mejorar la obtención de crías de especies de importancia pecuaria, a la conservación de especies en peligro de extinción y en las técnicas de reproducción asistida en humanos. No obstante, con excepción de los espermatozoides de toro, es generalmente aceptado que la fertilidad disminuye como consecuencia de la criopreservación (Watson, 2000).

La criopreservación provoca estrés osmótico, químico y mecánico, daño directo por cristales de hielo y daño secundario causado por el incremento progresivo en la concentración de solutos (Pesch y Bergmann, 2006). El daño a la membrana plasmática, generado por la criopreservación, se considera como la razón principal de la muerte celular. Como los lípidos son los componentes principales de la membrana plasmática, el daño en ella puede manifestarse por un cambio en su composición lipídica (Chakrabarty y col., 2007). Estos cambios en su estructura e integridad parecen ser un componente importante asociado con la reducción en la fertilidad de los espermatozoides criopreservados-descongelados. Después de la criopreservación de espermatozoides, se produce un cambio de los fosfolípidos en la membrana plasmática que resulta en la externalización neta de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (Watson, 2000).

Las proteínas integrales de la membrana plasmática, también se ven afectadas por la criopreservación, y esto puede alterar su función, en especial de proteínas que tienen una modulación estructural para realizar su función, como son las proteínas de canales iónicos. Se sabe que la permeabilidad de la membrana plasmática se incrementa después de la criopreservación. La regulación del calcio tiene consecuencias graves en términos de la función celular y, en casos severos, el cambio puede ser incompatible con la viabilidad celular. El consumo de calcio durante la criopreservación contribuye a cambios similares a la capacitación y a eventos de fusión entre la membrana plasmática y la cara externa de la membrana acrosomal (Watson, 2000).

El daño de la membrana plasmática del espermatozoide podría estar al nivel de los microdominiosmembranales o balsas lipídicas, estructuras lábiles involucradas en la señalización.

Antecedentes

Travis y colaboradores (2001) demostraron, por inmunoblot, que la caveolina-1 está presente en espermatozoides de ratón y cobayo. En espermatozoides maduros, la membrana fue tratada con Tritón X-100, posteriormente la fracción insoluble de la membrana se aisló mediante gradientes de sacarosa. Con análisis de inmunofluorescencia indirecta se reveló que está presente la caveolina-1 en las regiones del acrosoma y el flagelo en ambas especies animales.

Van Gestel y colaboradores (2005) estudiaron la organización de las balsas lipídicas durante la capacitación *in vitro* de espermatozoides de cerdo. Reportaron la presencia de proteínas específicas de balsas lipídicas (caveolina-1 y flotilina 1). La capacitación indujo un

cambio en la distribución de estas proteínas en la membrana. El análisis de los lípidos en DRM de los espermatozoides indicó que la capacitación produce una concentración de las balsas lipídicas en la cabeza del espermatozoide, en lugar de su desintegración. Por medio de un estudio proteómico identificaron varias proteínas de los DRM, incluyendo proteínas implicadas en procesos de capacitación y unión a la zona pelúcida. Lo cual indica que la reorganización de las balsas lipídicas en el espermatozoide puede facilitar eventos específicos de señalización en la capacitación y la unión a la zona pelúcida.

Chakrabarty y colaboradores (2007), usando un modelo de criopreservación desarrollado en su laboratorio, determinaron los cambios detallados en la composición de lípidos de membrana plasmática de espermatozoides epididimales de borrego debidos a la criopreservación. Los lípidos totales y sus componentes (lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos) decrecieron significativamente después de la criopreservación. Entre los esteroides lipídicos neutros, los ésteres de esteroides y 1-O-alkil-2,3-diacilglicerol decrecieron apreciablemente, mientras que entre los fosfolípidos se observó una pérdida mayor de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Los ácidos grasos no saturados unidos a fosfolípidos disminuyeron mientras que el porcentaje de ácidos saturados aumentó. Concluyeron que el incremento en la hidrofobicidad de la membrana plasmática es uno de los mecanismos principales para que los espermatozoides adquieran potencial para resistir o combatir factores de estrés provocados por el crio-daño.

Li y colaboradores (2010) utilizaron electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida y MALDI-TOF para analizar el perfil de proteínas de la carpa común (*Cyprinus carpio*), los espermatozoides después de la criopreservación. Catorce spots proteínicos se alteraron significativamente con la criopreservación. Once de ellos fueron identificados: 3

como proteínas específicas de membrana (proteína alfa unida a la proteína de fusión sensible a N-etilmaleimida, cofilina 2 y anexina A4) que participan en el tráfico de membrana, la organización y el movimiento celular, 6 enzimas citoplasmáticas (S-adenosilhomocisteína hidrolasa, S: proteína dkey-180p18.9, lactato deshidrogenasa B, fosfoglicerato quinasa 1, transaldolasa 1, y la esterasa D/formilglutacion hidrolasa) que participan en el metabolismo celular, la actividad oxidorreductasa, y la transducción de señales; y dos transferrinas, C y F. Con base en estos hallazgos, los autores estiman que la transferrina en el semen criopreservado puede proteger a los espermatozoides contra el daño oxidativo durante el proceso de congelación-descongelación. La criopreservación provocó cambios en los perfiles de proteínas de los espermatozoides que pueden conducir a una disminución en la velocidad de los espermatozoides, la motilidad, y el éxito de la fecundación.

Nixon y colaboradores (2011) demostraron que los espermatozoides humanos expresan marcadores reconocidos en balsas lipídicas. Además, la salida de colesterol de la membrana a través de la capacitación o por intervención farmacológica (por ejemplo β -metilciclodextrina), estas balsas parecen someterse a una redistribución polarizada en la región peri-acrosomal de la cabeza del espermatozoide. Este hallazgo alienta la especulación de que las balsas lipídicas representan plataformas para la organización de las proteínas implicadas en las interacciones de ovocito-espermatozoide. Para demostrar esta idea, aislaron balsas lipídicas en forma de DRM, y permitieron su unión con proteínas aisladas de la zona pelúcida. Además, un análisis proteómico de las DRM identificó una serie de proteínas conocidas por su afinidad con la zona pelúcida, aparte de otros candidatos implicados en la mediación en la unión y/o la fusión con el oolemma.

Justificación

La criopreservación de espermatozoides tiene importantes beneficios para la ganadería y como una forma de mantener un banco de semen para la protección de especies en peligro de extinción. Sin embargo, al utilizar espermatozoides congelados-descongelados, la tasa de efectividad de la inseminación artificial o la fertilización *in vitro* disminuye. La disminución en la viabilidad de los espermatozoides de cerdo después de la criopreservación es menor que la que se presenta en otras especies animales por lo que es importante determinar si las balsas lipídicas de su membrana plasmática se modifican con la criopreservación, pues esto nos ayudaría a entender la razón de la disminución de la capacidad fertilizante, o más aun la disminución en la viabilidad espermática.

Objetivo general

Determinar el efecto de la criopreservación en la composición de las balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo.

Objetivos particulares

- Determinar la movilidad, viabilidad, concentración y formas anormales de los espermatozoides.
- Criopreservar espermatozoides de cerdo durante dos semanas.
- Obtener balsas lipídicas de espermatozoides descongelados y frescos por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

- Analizar las proteínas en las balsas lipídicas de los espermatozoides mediante PAGE-SDS 1D y electroforesis 2D.

Hipótesis

Debido a que la criopreservación genera un estrés en la membrana plasmática de los espermatozoides de cerdo, este se verá reflejado en la composición de las balsas lipídicas después de la criopreservación.

Metodología

Obtención y análisis de la muestra

Los eyaculados se obtuvieron mediante el método de “la mano enguantada”, de sementales clínicamente sanos, de una granja comercial. En el laboratorio se analizó la calidad de las muestras, que consistió en determinar la concentración y movilidad espermáticas, el porcentaje de espermatozoides vivos, y número de formas anormales; con el fin de utilizar únicamente eyaculados de buena calidad, empleando los parámetros de Hafez (Hafez, 1993). La movilidad se determinó estimando el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva, por observación directa al microscopio óptico a 400X. La concentración se determinó utilizando una cámara de Neubauer para determinar el número de espermatozoides en el eyaculado. El porcentaje de espermatozoides vivos se realizó mediante una tinción vital con eosina-nigrosina, evaluando al menos 200 células en diferentes campos microscópicos de la preparación, y como espermatozoides vivos aquéllos que no presentaron tinción y muertos los teñidos en color rojo. En esta misma preparación, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos, con anomalías morfológicas.

Criopreservación de espermatozoides.

Los espermatozoides se centrifugaron en diluyente MR-A[®], KUBUS, S.A., para semen de cerdo, esto a 4000 x g. Después de la centrifugación la concentración final se estandarizó a 1×10^9 espermatozoides/ml en MR-A[®] con dimetilsulfóxido (DMSO) al 7% como crioprotector y fueron congelados de 25°C a 2°C a una tasa de -2 C min^{-1} . Los espermatozoides a 2 °C, fueron almacenados en pajillas de PVC de 0.5 ml (IMV Technologies), dejándolas congelar en vapor de nitrógeno líquido por 10 minutos para finalmente sumergirlas en nitrógeno líquido. Las pajillas permanecieron en el tanque de nitrógeno líquido al menos dos semanas antes de descongelar. La descongelación se realizó en un baño de circulación a 37°C por 30 segundos. De los espermatozoides se procedió a purificar las balsas lipídicas (modificado de (Hernandez y col., 2007)).

Aislamiento de las balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo

La muestra fue lavada con solución Tyrode-Lactato-Hepes (KCl 3.1 mM, NaCl 100 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.29 mM, HEPES 10 mM, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3\text{Na}$ 21.6 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.1 mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.5 mM y rojo de fenol) y centrifugada 3 veces a 4000 x g.

Los espermatozoides de cerdo se normalizaron a $\sim 10^9$ espermatozoides/ml en Tyrode-Lactato-HEPES, mezclado con un volumen igual de buffer salino de MES con Tritón (MBS) (MES 50 mM (pH 6.5), NaCl 150 mM, Tritón X-100 al 1% (p/v), Na_3VO_4 2 mM, AEBSF 4 mM) incubándolos por 20 min a 4°C. El sobrenadante (2 ml) de una centrifugación a baja velocidad (900 x g por 10 minutos a 4°C), que contiene el material insoluble al Tritón X-100 se mezcló con un volumen igual de sacarosa al 85% (p/v) en buffer salino de MES (mMBS) (MES [25 mM] (pH 6.5), NaCl 150 mM, Na_3VO_4 1 mM y AEBSF 2 mM). Tres ml de esta mezcla se colocaron en un tubo de ultracentrífuga, seguida de seis ml de sacarosa al 35% en

mMBS y tres ml de sacarosa al 5% en mMBS. Se centrifugó a 200,000 x g durante 18 horas a 4°C en un rotor Beckman SW41.TI. Al terminar la centrifugación se colectaron fracciones de 1 ml desde la parte superior de gradiente.

Inmuno ensayo DotBlot

Los inmuno ensayos de DotBlot se realizaron para examinar la presencia de gangliosido GM1, un marcador de balsas lipídicas, en las diferentes fracciones colectadas en el gradiente de sacarosa. Para esto, una alícuota de 3 µl de cada fracción aislada se absorbió directamente en una membrana de nitrocelulosa y fue secada al aire. Las membranas se bloquearon en buffer salino de Tris con Tween 20 (TBST) [Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM y Tween 20 0.1%] con leche en polvo al 5% por una hora a temperatura ambiente, seguido por una incubación con la subunidad B de la toxina del cólera acoplada a peroxidasa de rábano en TBST, a una concentración de 1 µg/ml, suplementada con leche en polvo al 0.5% por una hora. Las membranas se lavaron 5 veces con TBST (5 minutos cada lavado) y para el desarrollo de quimioluminiscencia se ocupó Immobilon Western, Millipore y se observó en un fotodocumentador Kodak LE Logic 1500

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y medio reductor

Las proteínas se prepararon calentando las muestras por 4 min a 100°C en el amortiguador de muestra de Laemmli (Tris 65 mM, glicerol al 10% (v/v) dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2% (p/v) β-mercaptoetanol al 5% (v/v)). Las proteínas reducidas se separaron en un gel de una dimensión al 12.5% de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) y se visualizaron por coloración de plata.

Electroforesis bidimensional (2-D) en gel de poliacrilamida

La primera dimensión se realizó en una cámara Protean IEF (isoelectroenfoco) de Bio-Rad, según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron bandeletas con gradiente de 3 a 10 de pH inmovilizado. Antes del isoelectroenfoco, las bandeletas se rehidrataron con la muestra y el amortiguador de rehidratación (Urea 9 M, CHAPS al 0.5 % (p/v), DTT 10 mM, anfotitas al 0.2% (v/v) de y azul de bromofenol al 0.001 % (p/v)). Se usaron de 100 µg de proteína por bandeleta para la tinción con plata. La bandeletas, después del isoelectroenfoco, se equilibraron con amortiguador de equilibrio I (Urea 6 M, SDS al 2% (p/v), glicerol al 20% (v/v), DTT 130 mM y Tris-HCl 0.375 M a pH 8.8) por 10 minutos, seguido de amortiguador de equilibrio II (Urea 6 M, SDS al 2% (p/v), glicerol al 20% (v/v), iodoacetamida 135 mM y Tris-HCl 0.375 M a pH 8.8), durante 10 minutos. Para la segunda dimensión se realizó una electroforesis PAGE-SDS (Laemmli, 1970). La bandeleta se colocó sobre un gel de acrilamida al 12,5%, se inmovilizó mediante agarosa al 1% en Tris-HCl pH 6.8 y se corrió en una cámara Mini-ProteanCell (Bio-Rad), a 120 V durante 2 horas. Posteriormente los geles fueron teñidos. Los experimentos se realizaron al menos en tres ensayos separados.

Resultados

Evaluación espermática básica

Las muestras presentaron una concentración de $134 \pm 44 \times 10^6$ espermatozoides/ml, movilidad del 83 ± 4 %, la viabilidad mayor del 91 ± 6 % y 5% de formas anormales para 7 muestras. La evaluación después de la descongelación dio como resultado una viabilidad de 30% y una movilidad de 20%. La concentración como se mencionó anteriormente se estandarizó a 1×10^9 espermatozoides/ml y los resultados de formas anormales no variaron.

Aislamiento de las balsas lipídicas

Después de la ultracentrifugación en el gradiente de sacarosa se observó una banda opalescente (figura 8), en la interface de las concentraciones de 5 y 35%, la cual fue consistente en todos los aislamientos de las balsas lipídicas.

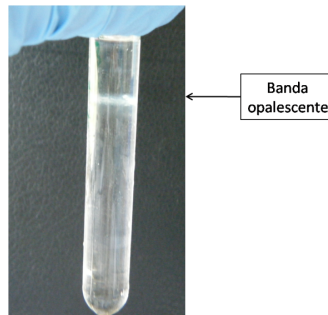


Figura 8. Gradiente de sacarosa después de la centrifugación donde se observa la banda opalescente correspondiente a las balsas lipídicas

Concentración proteínica

Se determinó la concentración de proteínas de las 12 fracciones colectadas, tanto de espermatozoides no criopreservados como de criopreservados (figuras 9 y 10). En las 2 primeras fracciones en ambos tratamientos la concentración es menor que en el resto de las fracciones. A partir de la fracción número 3 se incrementa la concentración, siendo mayor en las fracciones de los espermatozoides no criopreservados con 100 $\mu\text{g/ml}$ mientras que en espermatozoides criopreservados es de 34 $\mu\text{g/ml}$. En el intervalo de las fracciones 4-11 en espermatozoides no criopreservados la concentración de proteínas no se incrementó de manera relevante, estando entre 300 a 380 $\mu\text{g/ml}$, con un aumento significativo en la última fracción con valor de 800 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 9). La tendencia de la gráfica se mantiene en las fracciones de espermatozoides criopreservados, aunque la concentración de proteína disminuye en este

tratamiento, en el intervalo de 4-11 la concentración es de entre 200 $\mu\text{g/ml}$ a 280 $\mu\text{g/ml}$ y en la fracción 12 se encontró un valor de 510 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 10).

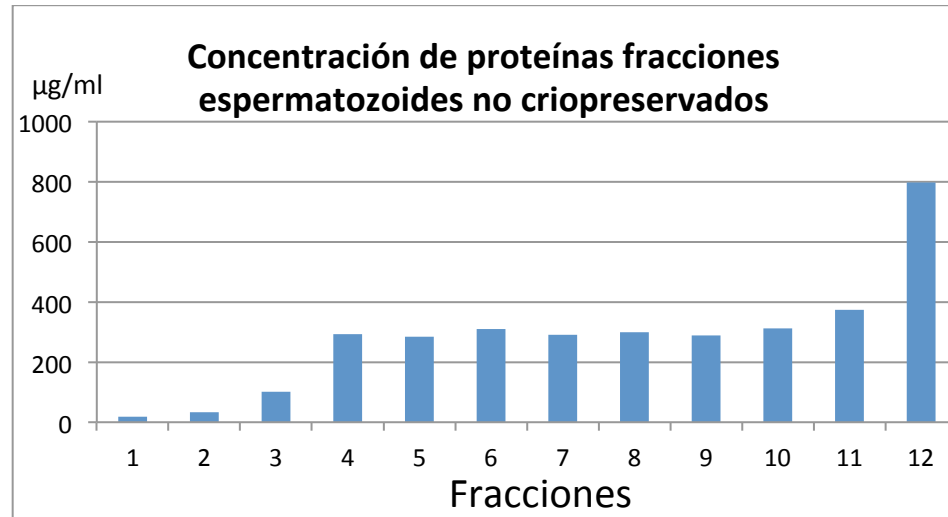


Figura 9. Concentración de proteínas de las 12 fracciones colectadas del gradiente de sacarosas de espermatozoides no criopreservados.

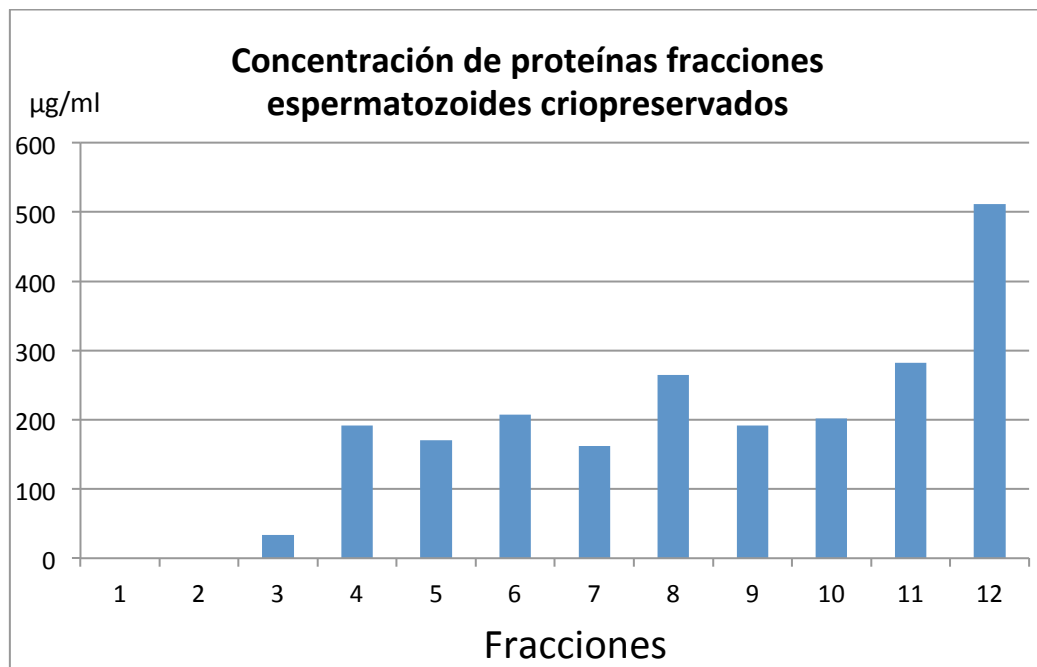


Figura 10. Concentración de proteínas de las fracciones colectadas del gradiente de sacarosa de los espermatozoides criopreservados.

Ensayos de inmunodetección sin electroforesis (Dotblot)

Para determinar en qué fracción (o fracciones) se aislaron las balsas lipídicas se realizaron ensayos de dotblot, como marcador de las balsas lipídicas se utilizó GM1. En las fracciones 3 y 4 tanto de espermatozoides no criopreservados como de criopreservados se obtuvo respuesta positiva, denominando las fracciones de DRM, aunque de las fracciones 11 y 12 dieron respuesta positiva, no se consideraron DRM por no tener baja densidad de flotación. Como un control positivo se incluyó a las proteínas extraídas antes de la ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, la cual se le denominó proteína total (figura 11).

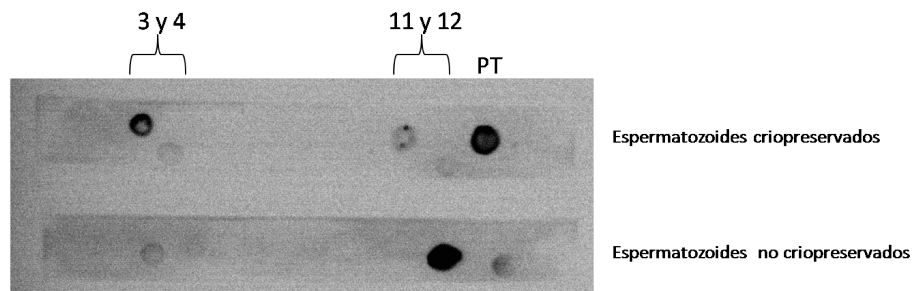


Figura 11. Dotblot de proteínas de espermatozoides de cerdo después de ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. La respuesta positiva se observa en las fracciones 3, 4, 11 y 12, además de la proteína total (PT).

PAGE-SDS

Una vez que se determinó cuáles eran las fracciones que contenían los DRM, se realizaron PAGE-SDS. En el gel se encontraron 8 bandas de proteínas principales (figura 12). En las bandas con peso de 134 y 14 kDa no se encontraron diferencias. Cuatro bandas de proteínas, que corresponden a los pesos de 62, 26, 17 y 15 kDa, se ve una disminución en la cantidad de proteína en las fracciones de espermatozoides criopreservados. Mientras que, en las bandas de proteína correspondientes a 47 y 35 kDa, aumenta la cantidad de proteína en las fracciones de espermatozoides criopreservados.

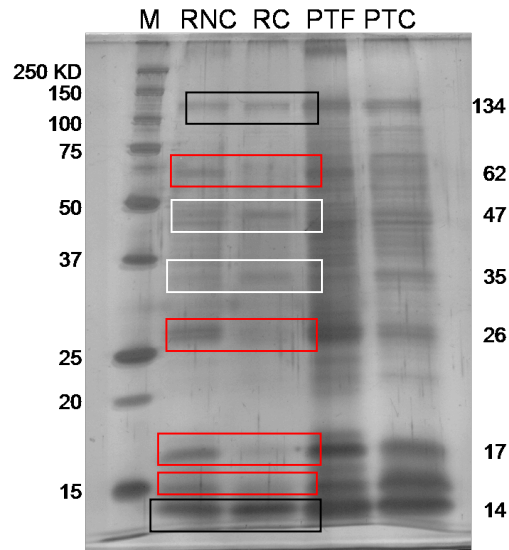


Figura 12. PAGE-SDS, en el primer carril se muestra en marcador de pesos moleculares, seguido de la fracción de DRM de espermatozoides no criopreservados (RNC) y fracción de DRM de espermatozoides criopreservados (RC). Además de la proteína total de ambos tratamientos como control (PTF y PTC). Los recuadros negros muestran las bandas de proteína donde no hay diferencia. Los recuadros rojos muestran donde la cantidad de proteína disminuye en la fracción de espermatozoides criopreservados. Los recuadros blancos exponen las bandas de proteína donde aumenta la cantidad de proteína en los espermatozoides criopreservados.

Electroforesis Bidimensional (2D) en geles de poliacrilamida

En general, la concentración de proteína disminuye en el caso de la fracción de espermatozoides criopreservados. En la electroforesis bidimensional también se encontraron diferencias en las fracciones de DRM. En el recuadro 1 que corresponde a 75 kDa de la figura 8 en espermatozoides no criopreservados hay 3 spots mientras que en espermatozoides criopreservados hay 2. En el recuadro 2 con 50 kDa, el spot de proteína es mayor en los

espermatozoides criopreservados. En el recuadro 3 con 37 kDa de espermatozoides criopreservados existen 3 spots entre tanto no hay spot en espermatozoides no criopreservados. En los DRM de espermatozoides criopreservados del recuadro 4 con 25 kDa se presentan 3 spots en tanto que en espermatozoides no criopreservados hay 5 spots. Por último, en el recuadro 5 con 15 kDa de espermatozoides criopreservados se observaron 4 spots, en contraste, hay 10 spots en espermatozoides no criopreservados.

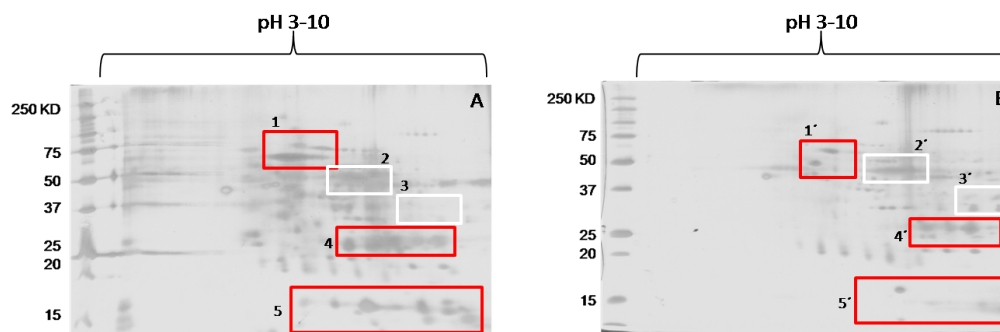


Figura 13. Electroforesis bidimensional. En A se muestra la fracción de espermatozoides no criopreservados, mientras que en B se observa la fracción de DRM de espermatozoides criopreservados. Los recuadros rojos resaltan los puntos donde la cantidad de proteína disminuye y los recuadros blancos donde la cantidad de proteína aumenta en la fracción de DRM de espermatozoides criopreservados.

Discusión

Aunque la criopreservación causa un daño en los espermatozoides, en especial en los espermatozoides de cerdo, los mecanismos a nivel de membrana y en particular en las balsas lipídicas no están bien estudiados. Es sabido que la criopreservación causa daños mecánicos en las membranas plasmáticas por la formación de cristales de hielo, además de un estrés

osmótico. Otro daño que se observó en este estudio fue la disminución en la concentración de proteína aislada, tanto proteína total como de proteína en las balsas lipídicas. Una disminución en la cantidad de proteína se reportó en espermatozoides criopreservados en la carpa común (Li y col. , 2010). Los espermatozoides son incapaces de fertilizar al ovulo inmediatamente después de que son eyaculados y el paso por el tracto reproductor femenino desencadena una serie de eventos para llevar a cabo la fertilización, a este proceso se le conoce como capacitación (Gadella y Van Gestel, 2004). Durante la capacitación, colesterol y otros esteroides son removidos de la membrana de los espermatozoides y glicoproteínas, unidas de forma no covalente, que se adquieren durante su paso por el epidídimo son liberadas (Ikawa y col., 2010). Una posible explicación para la disminución en la proteína total, es que las glicoproteínas, al tener uniones lábiles con la membrana, pueden ser liberadas por el procedimiento de criopreservación y descongelación.

El aislamiento de las balsas lipídicas realizado en otros trabajos reporta la formación de una banda opalescente en la interface de 5 y 30% en el gradiente de sacarosa (Asano y col., 2009; Nixon y col. , 2011), que se observó al realizar el aislamiento en este trabajo. También se reporta que un marcador de balsas lipídicas, GM1, se encuentra en la fracción donde es colectada la banda opalescente (Nixon y col. , 2011), lo que es similar a los resultados obtenidos en los ensayos de DotBlot.

Existen estudios proteómicos de balsas lipídicas en espermatozoides de varias especies (van Gestel y col., 2007; Asano y col. , 2009; Jakop y col., 2009; Miranda y col., 2009; Nixon y col. , 2011). Como se observó en las electroforesis, tanto unidimensional como bidimensional, hay un cambio en las proteínas. Este cambio se podría deber a la característica dinámica de las balsas lipídicas, es decir, la interacción proteína-proteína o proteína-lípido

cambia dependiendo del momento fisiológico de la célula incluyendo o excluyendo proteínas (van Gestel y col. , 2005).

De acuerdo con su masa molecular, se podría especular sobre la identidad de las proteínas que cambiaron en las electroforesis. Las proteínas que disminuyen en las fracciones de DRM de espermatozoides, tienen pesos de 62, 26, 17 y 14 kDa. Pre SP32 tiene un peso molecular cercano a 60 kDa, lo que es un valor aproximado a una banda que disminuye criopreservados con un valor de 62 kDa. Esta proteína está implicada en la maduración de la acrosina (Dube y col., 2005). La proteína precursora de caseína alfa-s1, tiene una masa aproximada (24 kDa), a otra banda de masa molecular de 26 kDa. Con un peso molecular de 17 kDa podemos encontrar a la superóxido dismutasa, que cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Y por último, la espermadhesina AQN-3, una proteína que puede inhibir la capacitación *in vitro* (Vadnais y Roberts, 2010), con un peso de 13 kDa se aproxima al valor de 14 kDa encontrado en una banda en las electroforesis. Las bandas que aumentan la cantidad de proteína en las fracciones de DRM en los espermatozoides criopreservados tienen un peso de 47 y 35 kDa. En este caso, para la banda de 47 kDa existen 2 candidatos la preproacrosina, una enzima clave en el proceso de fertilización en mamíferos con actividad de proteasa de serina (Klemm y col., 1991), con un peso de 46 kDa y la proteína P47 con un peso de 45 kDa. Para la banda de 35 kDa se puede hablar de aldehído reductasa, ya que tiene un peso aproximado de 35 kDa (van Gestel y col. , 2005; van Gestel y col. , 2007). Para poder comprobar lo anterior se pueden utilizar anticuerpos específicos para las proteínas propuestas o determinar su secuencia de aminoácidos por espectrometría de masas.

Conclusiones.

- La criopreservación cambia la composición en las balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo.
- La concentración de proteínas disminuye en las balsas lipídicas después de la criopreservación. En PAGE-SDS, hay disminución de las proteínas de 62, 26, 17 y 15 kDa en las balsas lipídicas de espermatozoides criopreservados y un incremento en las proteínas de 47 y 35 kDa.
- En la electroforesis 2-D el patrón de los blots es diferente, disminuyendo los spots en pesos de 75, 25 y 15 kDa y aumentando a 50 y 37 kDa en los espermatozoides criopreservados.

Perspectivas

- Secuenciación las proteínas de las balsas lipídicas de espermatozoides criopreservados mediante espectrometría de masas.
- Confirmar por medio de Western Blot la presencia de las proteínas secuenciadas.
- Estudiar la distribución de los lípidos en las balsas lipídicas de espermatozoides criopreservados.

Bibliografía

- Agrawal, P., Magargee, S. F. y Hammerstedt, R. H., (1988) Isolation and characterization of the plasma membrane of rat cauda epididymal spermatozoa, *J Androl*, **9**: 178-189.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Science.
- Asano, A., Selvaraj, V., Buttke, D. E., Nelson, J. L., Green, K. M., Evans, J. E. y Travis, A. J., (2009) Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct sub-types of membrane rafts, *J Cell Physiol*, **218**: 537-548.
- Baker, M. y Jeffries, P., (2006) Use of commercially available cryogenic vials for long-term preservation of dermatophyte fungi, *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 617-618.
- Bakhach, J., (2009) The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues, *Organogenesis*, **5**: 119-126.
- Baust, J. G., Gao, D. y Baust, J. M., (2009) Cryopreservation: An emerging paradigm change, *Organogenesis*, **5**: 90-96.
- Bickel, P. E., Scherer, P. E., Schnitzer, J. E., Oh, P., Lisanti, M. P. y Lodish, H. F., (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins, *J Biol Chem*, **272**: 13793-13802.
- Brown, D. y London, E., (1998a) Function of lipid rafts in biological membrane, *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**: 111-136.
- Brown, D. A. y London, E., (1998b) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes, *J Membr Biol*, **164**: 103-114.
- Brown, D. A. y Rose, J. K., (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell*, **68**: 533-544.

- Cerneus, D. P., Ueffing, E., Posthuma, G., Strous, G. J. y van der Ende, A., (1993) Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol, *J Biol Chem*, **268**: 3150-3155.
- Chakrabarty, J., Banerjee, D., Pal, D., De, J., Ghosh, A. y Majumder, G. C., (2007) Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation, *Cryobiology*, **54**: 27-35.
- de Laurentiis, A., Donovan, L. y Arcaro, A., (2007) Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors, *Open Biochem J*, **1**: 12-32.
- Diaz-Fontdevila, M., Bustos-Obregon, E. y Fornes, M., (1992) Distribution of filipin-sterol complexes in sperm membranes from hypercholesterolaemic rabbits, *Andrologia*, **24**: 279-283.
- Dietzen, D. J., Hastings, W. R. y Lublin, D. M., (1995) Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae, *J Biol Chem*, **270**: 6838-6842.
- Dube, C., Leclerc, P., Baba, T., Reyes-Moreno, C. y Bailey, J. L., (2005) The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm, *J Androl*, **26**: 519-528.
- Eddy, E. M. (2006). The Spermatozoon. en Knobil and Neill's Physiology of Reproduction P. D. Jimmy D. Neill, Tony M. Plant, Ph.D., Donald W. Pfaff, Ph.D., John R.G. Challis, D.Sc., F.R.S.C., David M. de Kretser, M.D., A.O., JoAnne S. Richards, Ph.D., and Paul M. Wassarman, Ph.D.: pp. 3-54.
- Feng, H. L., Han, Y. B., Sparks, A. E. y Sandlow, J. I., (2008) Characterization of human sperm antigens reacting with anti-sperm antibodies from an infertile female patient's serum, *J Androl*, **29**: 440-448.
- Fielding, C. J., Bist, A. y Fielding, P. E., (1997) Caveolin mRNA levels are up-regulated by free cholesterol and down-regulated by oxysterols in fibroblast monolayers, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**: 3753-3758.

- Flechon, J. E., (1985) Sperm surface changes during the acrosome reaction as observed by freeze-fracture, *Am J Anat*, **174**: 239-248.
- Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K. y Parton, R. G., (1995) De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 8655-8659.
- Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R. y Une, T., (2000) Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure, *J Cell Sci*, **113 Pt 19**: 3509-3517.
- Gadella, B. M. y Van Gestel, R. A., (2004) Bicarbonate and its role in mammalian sperm function, *Anim Reprod Sci*, **82-83**: 307-319.
- Galbiati, F., Razani, B. y Lisanti, M. P., (2001) Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy, *Trends Mol Med*, **7**: 435-441.
- Garcia, M., Mirre, C., Quaroni, A., Reggio, H. y Le Bivic, A., (1993) GPI-anchored proteins associate to form microdomains during their intracellular transport in Caco-2 cells, *J Cell Sci*, **104 (Pt 4)**: 1281-1290.
- Grossfeld, R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W. M. y Rath, D., (2008) New aspects of boar semen freezing strategies, *Theriogenology*, **70**: 1225-1233.
- Hafez, E. S. E. (1993). Reproduction in farm animals. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Hagmann, J. y Fishman, P. H., (1982) Detergent extraction of cholera toxin and gangliosides from cultured cells and isolated membranes, *Biochim Biophys Acta*, **720**: 181-187.
- Hailstones, D., Sleer, L. S., Parton, R. G. y Stanley, K. K., (1998) Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells, *J Lipid Res*, **39**: 369-379.
- Hernandez, M., Roca, J., Calvete, J. J., Sanz, L., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J. A., Vazquez, J. M. y Martinez, E. A., (2007) Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars, *J Androl*, **28**: 689-697.

- Hoessli, D. y Rungger-Brandle, E., (1985) Association of specific cell-surface glycoproteins with a triton X-100-resistant complex of plasma membrane proteins isolated from T-lymphoma cells (P1798), *Exp Cell Res*, **156**: 239-250.
- Holt, W. V., (1984) Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon, *Int Rev Cytol*, **87**: 159-194.
- Hooper, N. M. y Turner, A. J., (1988) Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor, *Biochem J*, **250**: 865-869.
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M. y Okabe, M., (2010) Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte, *J Clin Invest*, **120**: 984-994.
- Jakop, U., Fuchs, B., Suss, R., Wibbelt, G., Braun, B., Muller, K. y Schiller, J., (2009) The solubilisation of boar sperm membranes by different detergents - a microscopic, MALDI-TOF MS, (31)P NMR and PAGE study on membrane lysis, extraction efficiency, lipid and protein composition, *Lipids Health Dis*, **8**: 49.
- Jones, R., Howes, E., Dunne, P. D., James, P., Bruckbauer, A. y Klenerman, D., (2010) Tracking diffusion of GM1 gangliosides and zona pellucida binding molecules in sperm plasma membranes following cholesterol efflux, *Dev Biol*, **339**: 398-406.
- Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L. y Ley, S. C., (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes, *Eur J Immunol*, **30**: 954-963.
- Klemm, U., Muller-Esterl, W. y Engel, W., (1991) Acrosin, the peculiar sperm-specific serine protease, *Hum Genet*, **87**: 635-641.
- Kogo, H., Aiba, T. y Fujimoto, T., (2004) Cell type-specific occurrence of caveolin-1alpha and -1beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs, *J Biol Chem*, **279**: 25574-25581.
- Ladha, S., (1998) Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon, *J Membr Biol*, **165**: 1-10.

- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**: 680-685.
- Li, P., Hulak, M., Koubek, P., Sulc, M., Dzyuba, B., Boryshpolets, S., Rodina, M., Gela, D., Manaskova-Postlerova, P., Peknicova, J. y Linhart, O., (2010) Ice-age endurance: the effects of cryopreservation on proteins of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L, *Theriogenology*, **74**: 413-423.
- Lisanti, M. P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A. R. y Rodriguez-Boulan, E., (1988) Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**: 9557-9561.
- London, E., (2005) How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells, *Biochim Biophys Acta*, **1746**: 203-220.
- Mack, S. R., Zaneveld, L. J., Peterson, R. N., Hunt, W. y Russell, L. D., (1987) Characterization of human sperm plasma membrane: glycolipids and polypeptides, *J Exp Zool*, **243**: 339-346.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. y Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. Madrid, Pearson Educación, S.A.
- Miranda, P. V., Allaire, A., Sosnik, J. y Visconti, P. E., (2009) Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm, *Biol Reprod*, **80**: 897-904.
- Mirre, C., Monlauzeur, L., Garcia, M., Delgrossi, M. H. y Le Bivic, A., (1996) Detergent-resistant membrane microdomains from Caco-2 cells do not contain caveolin, *Am J Physiol*, **271**: C887-894.
- Mora, R., Bonilha, V. L., Marmorstein, A., Scherer, P. E., Brown, D., Lisanti, M. P. y Rodriguez-Boulan, E., (1999) Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1, *J Biol Chem*, **274**: 25708-25717.

- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V. y Simons, K., (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 10339-10343.
- Nikolopoulou, M., Soucek, D. A. y Vary, J. C., (1985) Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation, *Biochim Biophys Acta*, **815**: 486-498.
- Nixon, B. y Aitken, R. J., (2009) The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa, *J Reprod Immunol*, **83**: 8-13.
- Nixon, B., Mitchell, L. A., Anderson, A. L., McLaughlin, E. A., O'Bryan M, K. y Aitken, R. J., (2011) Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes, *J Cell Physiol*, **226**: 2651-2665.
- Parks, J. E. y Hammerstedt, R. H., (1985) Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane, *Biol Reprod*, **32**: 653-668.
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J. A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P. E., Mora, R., Rodriguez-Boulan, E., Peschle, C. y Lisanti, M. P., (1999) Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex, *J Biol Chem*, **274**: 25718-25725.
- Pesch, S. y Bergmann, M., (2006) Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation, *Micron*, **37**: 597-612.
- Pilch, P. F., Souto, R. P., Liu, L., Jedrychowski, M. P., Berg, E. A., Costello, C. E. y Gygi, S. P., (2007) Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae, *J Lipid Res*, **48**: 2103-2111.
- Pinaud, F., Michalet, X., Iyer, G., Margeat, E., Moore, H. P. y Weiss, S., (2009) Dynamic partitioning of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-rich microdomains imaged by single-quantum dot tracking, *Traffic*, **10**: 691-712.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K. y Horber, J. K., (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *J Cell Biol*, **148**: 997-1008.
- Quinn, P. J., (2010) A lipid matrix model of membrane raft structure, *Prog Lipid Res*, **49**: 390-406.

- Robinson, A., Fang, J. M., Chou, P. T., Liao, K. W., Chu, R. M. y Lee, S. J., (2005) Probing lectin and sperm with carbohydrate-modified quantum dots, *Chembiochem*, **6**: 1899-1905.
- Rodgers, W. y Rose, J. K., (1996) Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains, *J Cell Biol*, **135**: 1515-1523.
- Rodriguez Boulan, E. y Sabatini, D. D., (1978) Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**: 5071-5075.
- Rubin, J., Schwartz, Z., Boyan, B. D., Fan, X., Case, N., Sen, B., Drab, M., Smith, D., Aleman, M., Wong, K. L., Yao, H., Jo, H. y Gross, T. S., (2007) Caveolin-1 knockout mice have increased bone size and stiffness, *J Bone Miner Res*, **22**: 1408-1418.
- Scherer, P. E., Okamoto, T., Chun, M., Nishimoto, I., Lodish, H. F. y Lisanti, M. P., (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 131-135.
- Schnitzer, J. E., McIntosh, D. P., Dvorak, A. M., Liu, J. y Oh, P., (1995) Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins, *Science*, **269**: 1435-1439.
- Schroeder, R. J., Ahmed, S. N., Zhu, Y., London, E. y Brown, D. A., (1998) Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains, *J Biol Chem*, **273**: 1150-1157.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A. y Simons, K., (2003) Resistance of cell membranes to different detergents, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 5795-5800.
- Selvaraj, V., Asano, A., Buttke, D. E., McElwee, J. L., Nelson, J. L., Wolff, C. A., Merdiushev, T., Fornes, M. W., Cohen, A. W., Lisanti, M. P., Rothblat, G. H., Kopf, G. S. y Travis, A. J., (2006) Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm, *J Cell Physiol*, **206**: 636-646.

- Selles, E., Gadea, J., Romar, R., Matas, C. y Ruiz, S., (2003) Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility, *Reprod Domest Anim*, **38**: 66-72.
- Silvius, J. R., del Giudice, D. y Lafleur, M., (1996) Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain length, *Biochemistry*, **35**: 15198-15208.
- Simons, K. y van Meer, G., (1988) Lipid sorting in epithelial cells, *Biochemistry*, **27**: 6197-6202.
- Singer, S. J. y Nicolson, G. L., (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720-731.
- Stan, R. V., (2005) Structure of caveolae, *Biochim Biophys Acta*, **1746**: 334-348.
- Tang, Z., Scherer, P. E., Okamoto, T., Song, K., Chu, C., Kohtz, D. S., Nishimoto, I., Lodish, H. F. y Lisanti, M. P., (1996) Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle, *J Biol Chem*, **271**: 2255-2261.
- Toshimori, K., (1998) Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization, *Cell Tissue Res*, **293**: 177-187.
- Travis, A. J., Merdushev, T., Vargas, L. A., Jones, B. H., Purdon, M. A., Nipper, R. W., Galatioto, J., Moss, S. B., Hunnicutt, G. R. y Kopf, G. S., (2001) Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa, *Dev Biol*, **240**: 599-610.
- Vadnais, M. L. y Roberts, K. P., (2010) Seminal plasma proteins inhibit in vitro- and cooling-induced capacitation in boar spermatozoa, *Reprod Fertil Dev*, **22**: 893-900.
- van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Brouwers, J. F. y Gadella, B. M., (2007) Multiple proteins present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona pellucida of the oocyte, *Mol Hum Reprod*, **13**: 445-454.

- van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Helms, J. B., Brouwers, J. F. y Gadella, B. M., (2005) Capacitacion-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells, *Mol Hum Reprod*, **11**: 583-590.
- van Meer, G. y Simons, K., (1982a) Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions, *EMBO J*, **1**: 847-852.
- van Meer, G. y Simons, K., (1982b) Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions, *EMBO J*, **1**: 847-852.
- Volonte, D., Galbiati, F., Li, S., Nishiyama, K., Okamoto, T. y Lisanti, M. P., (1999) Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe, *J Biol Chem*, **274**: 12702-12709.
- Watson, P. F., (2000) The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim Reprod Sci*, **60-61**: 481-492.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. y Seed, B., (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation, *Immunity*, **8**: 723-732.
- Yanagimachi, R., Noda, Y. D., Fujimoto, M. y Nicolson, G. L., (1972) The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa, *Am J Anat*, **135**: 497-519.