

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**



Casa abierta al tiempo

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**“Participación de la GTPasa Rac1 en la capacitación y reacción
acrosomal”**

TESIS

Para obtener el grado de
Maestra en Biología Experimental

Presenta:

B.E. Danelia Ramírez Ramírez

Co-Directores

Dr. Enrique Othón Hernández González

Dr. Humberto González Márquez

Asesor:

Dr. Edmundo Bonilla González

MÉXICO, D.F., 29/Octubre/2013

“El programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 266048

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, en el área de Biología Celular y Molecular, en el Laboratorio de Expresión Génica y en Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en el laboratorio 51 del Departamento de Biología Celular, bajo la co-dirección del Dr. Enrique Othón Hernández González y del Dr. Humberto González Márquez y la asesoría de Dr. Edmundo Bonilla González.

Durante la realización del presente trabajo, la B. E. Danelia Ramírez Ramírez recibió la beca otorgada por CONACyT 266048 para realizar sus estudios de maestría. Así mismo se agradece al proyecto CONACyT No. 79921 del Dr. Enrique Othón Hernández González.

Para la realización de este trabajo, se contó con la ayuda de la M. C. Ana Lilia Roa Espitia (auxiliar de investigación) en la asesoría de cada técnica realizada y supervisión constante; también al C. Filiberto Hernández González por su servicio técnico y al M. en C. Jaime Escobar Herrera (auxiliar de investigación) en asesoría en el manejo del microscopio confocal.

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, aprobó la Tesis titulada: "Participación de la GTPasa Rac1 en la capacitación y reacción acrosomal" que presentó

Danelia Ramírez Ramírez

El día 29 de Octubre del año 2013-10-29

JURADO DE EXAMEN

Presidente

Dr. Edmundo Bonilla González.
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Secretaria:

Dra. Irma Jiménez Morales
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



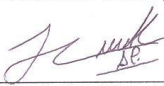
Vocal:

Dra. Edith Arenas Rios
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Vocal:

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Comité Tutorial

Co-Director Interno

Dr. Humberto González Márquez

Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Co-director Externo

Dr. Enrique Othón Hernández González

Departamento de Biología Celular
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional

Asesor

Dr. Edmundo Bonilla González

Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dedicatorias

Dedico este trabajo a Dios y a mis padres, quienes han sido los pilares fundamentales en todo lo que soy, sin duda he sido afortunada en la vida. Papá Uriel, este es uno de los logros que he deseado compartir contigo, agradezco las lecciones de vida que me has enseñado, el apoyo y el amor con el que me has guiado a través de este camino que no ha sido fácil. A mi mamá Josefina le agradezco el darme la vida y el amor que me dio mientras tuvo la oportunidad de estar a mi lado. Pero sin duda agradezco aún más a Dios por elegirlos como mis padres y otorgarme una doble bendición con otros padres, mamá Rebeca y papá Marcelino, que a pesar de no serlo biológicamente, me cuidaron y me criaron como una hija, sin duda me han regalado una felicidad que jamás en la vida volveré a vivir. Mamá Rebeca, gracias por siempre creer en mí, por protegerme, gracias a ti nunca sentí la ausencia del amor de una madre porque te tuve siempre a ti. Papá Marcelino sin duda los mejores recuerdos los llevo en mi memoria y en el corazón, donde quiera que te encuentres te doy las gracias, por tus consejos y sobre todo el ejemplo que fuiste y serás para toda la familia. Los amo.

A mi única hermana, así como a mis sobrinos César y Virginia quienes me enseñan en cada segundo una nueva cosa que da sentido a mi vida. Los adoro.

También dedico este trabajo a mis mejores amigos, Darío Arturo, Elizabeth, Janet, Rodolfo, Noemí, Luis Manuel, Víctor Manuel, Oscar Bello, Tzitzijanik, Montserrat. Sin duda después del amor de mi familia, el segundo que he conocido es el de cada uno de ustedes, gracias por estar en los momentos más difíciles de mi vida, creo que sin ustedes no hubiese logrado este pequeño reto. Espero continúen en este largo camino que aún me falta por recorrer y espero re contribuir algo de lo mucho que han hecho por mí. Los quiero.

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Othón Hernández González y a la M. en C. Ana Lilia Roa Espitia, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, así como sus relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación y por ser parte fundamental en mi formación científica. Mil gracias por todo su apoyo, cariño y enorme calidad humana.

Al Dr. Humberto González Márquez, por su apoyo emocional y laboral, por las innumerables horas que dedicó a enseñarme a pensar, escribir y razonar como investigadora, por los conocimientos transmitidos y su paciencia constante, siempre le estaré agradecida y en deuda con usted.

Al Dr. Edmundo Bonilla González con mucho cariño, por ser la primera persona que me brindó la oportunidad de iniciar mi formación científica abriéndome las puertas de su laboratorio, por su invaluable ayuda que he recibido durante estos años y por continuar orientándome en mi formación científica, mil gracias.

A la Dra. María Dolores Saavedra Leos, por ser mi guía en el laboratorio durante una parte de mi estancia en la UAM, por su paciencia, cariño y amistad, pero sin lugar a duda por ser mi ejemplo a seguir. Mis más sinceros agradecimientos con admiración y respeto.

A mi familia, por ser parte fundamental en mí vida, tíos, primos, sobrinos, gracias por sus consejos y palabras de aliento, la ayuda y el cariño que he recibido.

A mis amigos, Bruno, Deneb, Aidé, Rodolfo, Eva, Mónica, Iván, Doris, Alma Delia, Mariel, Saul, Tomas, que ahora comparten conmigo esta etapa y de quienes he recibido un apoyo incondicional. Y a todos aquellos amigos que formaron parte de mi vida y que por la distancia y circunstancias ahora no están, pero que sin duda dejaron huella en mi vida.

Mis compañeros de laboratorio Tania, Vero, Rafa, Cesar, Fili, Mariana, por su apoyo y trabajo en equipo y por hacer del laboratorio un ambiente agradable y saludable.

Resumen

Durante la capacitación, la polimerización de actina y el desarrollo de la movilidad hiperactivada son procesos muy importantes para la adquisición de la capacidad fecundante de los espermatozoides. Sin embargo, el mecanismo molecular que los regula no ha sido completamente dilucidado. En células somáticas, la proteína Rac1 promueve la polimerización de la actina a través de su interacción con WAVE (WASP-like verprolin-homologous protein) y la activación del complejo Arp2/3. Aunque Rac1 se ha localizado en espermatozoides de mamíferos, su papel en la fisiología espermática es desconocido. El objetivo del presente trabajo fue elucidar la función de Rac1 en los espermatozoides. Mediante microscopía confocal se estudiaron los cambios que sufría Rac1 durante la capacitación. Los resultados muestran que Rac1 cambia de localización durante la capacitación; en espermatozoides no capacitados Rac1 se localizó en todo el acrosoma y a lo largo del flagelo, mientras que en los capacitados, en la zona apical del acrosoma y a lo largo del flagelo. Para determinar si Rac1 actúa a través de WAVE, primero se verificó su presencia, encontrando a la isoforma WAVE3 (Mr.de 60 KDa) a lo largo del flagelo, tanto en espermatozoides no capacitados como en capacitados. Por doble marcaje, se observó la colocalización de Rac1 y WAVE3 únicamente a lo largo del flagelo. Con el fin de determinar el papel de Rac1 en la capacitación, los espermatozoides se capacitaron en presencia de un inhibidor específico de Rac1 (NCS23766), observándose cambios en la movilidad y la morfología del flagelo, que fueron dependientes de la concentración del inhibidor: la movilidad disminuyó en comparación con los controles, mientras que el flagelo adquirió una morfología curva. Para determinar si estos cambios se debían a cambios en la actina-F, esta se analizó mediante faloidina-TRITC. Los espermatozoides tratados con NCS23766 mostraron una fluorescencia baja, a lo largo del flagelo, en comparación a los espermatozoides capacitados. En conjunto, los resultados nos sugieren que Rac1 puede estar involucrado en la estabilidad morfológica y en la movilidad del flagelo de los espermatozoides a través de la polimerización de actina, la cual podría estar mediada por WAVE3.

Abstract

During sperm capacitation, the actin polymerization and the flagellar hyper-motility are important to acquire the sperm fertilizing capacity. However, the molecular mechanisms that regulate such events are not completely elucidated. In somatic cells, the protein Rac1 promotes actin polymerization, through its interaction with WAVE (WASP-like verprolin-homologous protein) and by activating the Arp2/3 complex. Although Rac1 is identified in the mammalian sperm, its role in sperm physiology is still unknown. The aim of this study is elucidate the role of Rac1 in the spermatozoon. The changes that Rac1 has during capacitation were studied by confocal microscopy. The results showed that Rac1 was located in non-capacitated sperms in acrosome and along the flagellum, while in capacitated sperms; in the apical region of the acrosome and along the flagellum. To determine whether Rac1 acts through WAVE, it was determined the presence of WAVE3, found the WAVE3 isoform throughout the sperm flagellum in non-capacitated and capacitated states. Furthermore, we observed co-localization between WAVE3 and Rac1 along the flagellum. In order to determine the role of Rac1 during capacitation, sperms were capacitated in the presence of the specific inhibitor of Rac1 (NCS23766), this produced changes dependent on the inhibitor concentration. The sperm motility decreased compared to the controls, whereas the flagellum acquired a pronounced curved shape. To determine whether these changes are due to changes in the amount F-actin, we analyzed the changes of F-actin using TRITC-phalloidin. NCS23766 treated sperm showed a fluorescence decrease in the flagellum, compared to capacitated sperms. The results suggest a possible participation of Rac1 in the stability of the morphology and motility through actin polymerization, which could be mediated by WAVE3.

Abreviaturas

- ATP: adenosin trifosfato
- ADP: adenosin difosfato
- AMPc: adenosin monofosfato cíclico
- ENac: Canales de Na⁺ epiteliales
- FS: Vaina Fibrosa
- GAP: Proteína Activadora de GTPasas.
- GEF: Factor Intercambiador de Nucleótidos
- GDI: Inhibidor de Disociación de Guanina
- Mr: Movilidad relativa
- MS: Vaina mitocondrial
- Na⁺: Ión Sodio
- ODFs: Fibras densas externas
- RA: Reacción Acrosomal
- MP: Membrana plasmática

Índice

Resumen	VI
Abstract	VII
Abreviaturas	VIII
Introducción	1
El espermatozoide	1
Capacitación espermática.....	5
Reacción Acrosomal.....	8
Proteínas Rho.....	12
Antecedentes	21
Justificación	22
Pregunta de investigación	23
Hipótesis	23
Objetivo General	24
Objetivos particulares	24
Material y Métodos	25
Obtención y capacitación de espermatozoides de Cobayo	25
Preparación de Laminillas para inmunofluorescencia Indirecta	25
Inmunofluorescencia Indirecta	26
Doble marcaje.....	26
Obtención de extractos proteínicos de espermatozoides del cobayo	27
Electroforesis y Western Blot.....	28
Capacitación de espermatozoides de cobayo en ausencia y presencia de NSC23766	29

Detección de actina F.....	30
Análisis de resultados.....	30
Resultados.....	31
Presencia de la proteína Rac1 en los espermatozoides del cobayo.....	31
Rac1 es localizada en cabeza y flagelo en espermatozoides.....	31
.....	32
WAVE3 presente en el espermatozoide del cobayo.....	33
WAVE3 se localiza en el flagelo del cobayo.....	34
Rac1 con WAVE3 co-localizan en el flagelo.....	34
La capacitación y la reacción acrosomal no son inhibidas por NSC23766, inhibidor específico de Rac1.....	36
La inhibición de Rac1 altera la morfología y movilidad espermática.....	37
Efecto del inhibidor de Rac1 en la polimerización de actina.....	39
Discusión.....	41
Conclusiones.....	48
Perspectivas.....	49
Bibliografía.....	50
Anexo.....	56

Introducción

El espermatozoide

El espermatozoide es el producto final del proceso de la espermatogénesis, la cual se realiza dentro de los tubos seminíferos del testículo y consiste de divisiones mitóticas, meióticas y fases postmeióticas. Estos eventos culminan en una célula altamente diferenciada en estructura y función, capaz de transportar el genoma haploide masculino hasta el óvulo, para que se pueda combinar con el genoma haploide femenino, e iniciar el desarrollo de un nuevo organismo (Eddy, 2006). Morfológicamente, es una célula alargada que mide hasta 60 micrómetros de longitud. Está cubierto por la membrana plasmática (Alberts *et al*, 1989).

Los espermatozoides de los mamíferos se componen de dos secciones principales, la cabeza y el flagelo, unidos por la pieza conectora. La cabeza se compone de tres regiones principales: región acrosomal, segmento ecuatorial y segmento postacrosomal. Contiene al núcleo y al acrosoma, así como estructuras del citoesqueleto. El núcleo contiene el genoma haploide masculino, condensado por protaminas, y el acrosoma, que es una gran vesícula citoplasmática que, en su interior, contiene enzimas hidrolíticas y otras proteínas que conforman la matriz acrosomal (Fig. 1) (Eddy & O'Brien, 1994).

Por otro lado, el flagelo es el aparato móvil del espermatozoide en muchos organismos, se compone de cuatro regiones: pieza de conexión, pieza media, pieza principal y pieza final (Fig.1) y varía en longitud dependiendo de la especie (10-100mm) (Darszon *et al.* 2005).

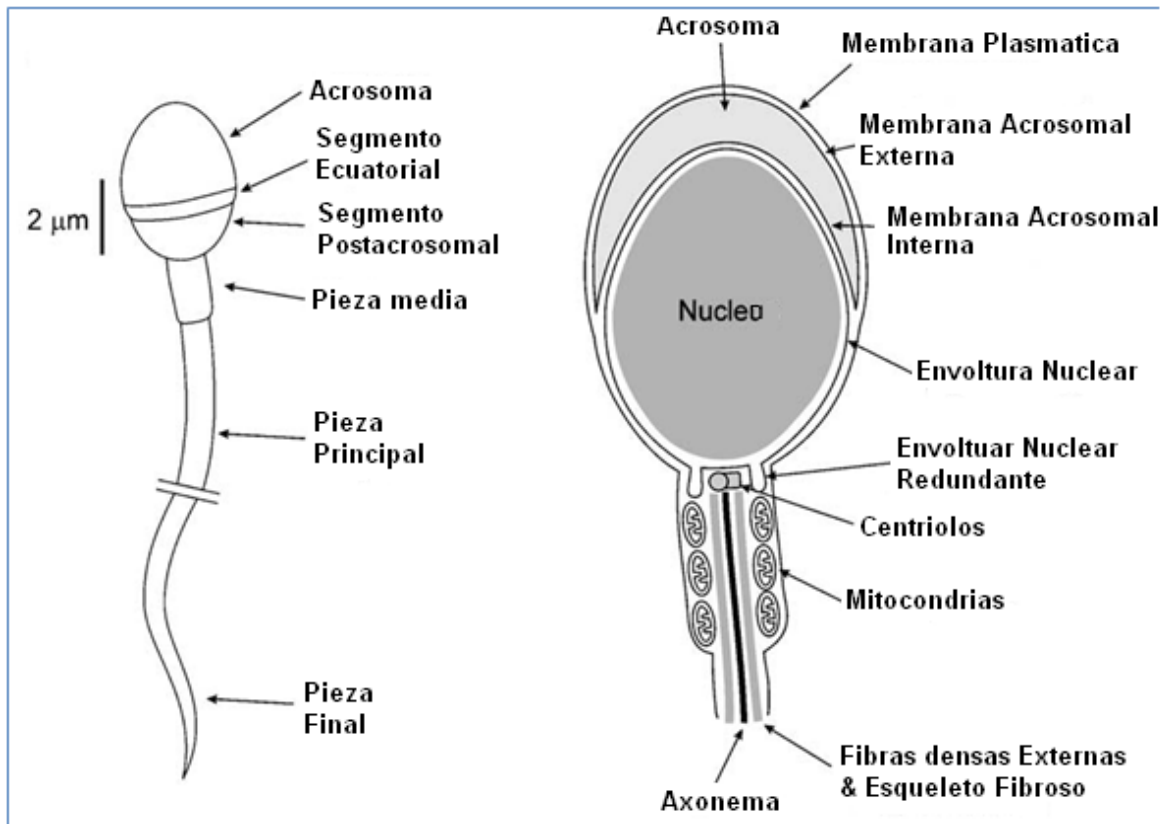


Figura 1. Diagrama del espermatozoide humano (izquierda). Distribución de las regiones y membranas de la cabeza del espermatozoide y estructura de la región pieza media. Tomado y modificado de Darzon, Nishigaki *et al.* 2005.

Todo el flagelo contiene un axonema que es una estructura del citoesqueleto y es la maquinaria que da impulso al espermatozoide.

La gran mayoría de los axonemas tienen una estructura característica que comprende 9 dobletes externos de microtúbulos, cada doblete posee un microtúbulo A completo y uno B incompleto (de 13 y 10 protofilamentos respectivamente) dispuestos en un anillo alrededor de dos microtúbulos centrales, llamada estructura 9 + 2 (Inaba 2003).

A partir de cada microtúbulo A de los dobletes externos se proyectan dos brazos de dineína (proteína motora dependiente de ATP, asociada con microtúbulos) uno interno y otro externo, que tocan al microtúbulo B del doblete adyacente en dirección de las manecillas del reloj esto, con la finalidad de promover el movimiento de curvatura axonemal, que se basa en el deslizamiento activo de los dobletes de microtúbulos axonemales, jugando papeles diferentes en la producción y regulación de la movilidad flagelar (Inaba 2011).

Los espermatozoides de mamíferos, así como los de otros vertebrados, poseen estructuras accesorias entre el axonema y la membrana plasmática, tales como las mitocondrias, y dos estructuras accesorias, fibras densas externas (ODFs) y la vaina fibrosa (FS) como se muestra en la Figura 2.

Las vainas mitocondriales se localizan exclusivamente en la pieza media, la cual abarca un cuarto del total del flagelo y finaliza a nivel del annulus. Dichas vainas se encuentran enrolladas alrededor de las ODFs, bajo la membrana plasmática (Fawcett 1975; Phillips 1977). La disposición de esta vaina mitocondrial alrededor de la pieza media aporta el ATP para la movilidad flagelar (Curry & Watson 1995).

Mientras que las fibras densas externas, también uno de los elementos del citoesqueleto, se extiende desde la pieza conectora hasta la parte posterior de la pieza principal y constan de nueve fibras que abarcan el axonema. En mamíferos las ODFs están conformadas, mínimo, por 14 polipéptidos de 11 a 87 kDa, que forman parte de la familia de filamentos intermedios tipo I y II (Hinsch *et al.* 2003), lo que sugiere que la función principal de las ODFs es permitir el retroceso elástico del axonema (Inaba 2003) y proporcionarle fuerza de tensión, evitando de esta manera su ruptura al transitar por medios viscoelásticos (Baltz *et al.* 1990).

Por otro lado, la FS, otro elemento del citoesqueleto, que caracteriza la pieza principal, abarca dos tercios del flagelo, desde el annulus hasta la pieza terminal; es un cilíndrico cónico formado por dos columnas longitudinales y conectadas por dos costillas circunferenciales y que rodea al axonema y las fibras densas externas (Fawcett 1975; Si & Okuno 1993). Está compuesta por mínimo 18 polipéptidos, entre los más importantes se encuentran AKAP3, AKAP4 y TAKAP80, tres proteínas de anclaje de tipo cinasa dependiente de AMPc (Eddy *et al.* 2003), a las cuales se asocian otras proteínas que participan en la reorganización del citoesqueleto como RhoGTPasa que a la vez se asocia con la GTPasa pequeña Rho (Bishop & Hall 2000).

La función de la FS es aún desconocida, debido a las moléculas que posee, se ha sugerido que participa en la movilidad flagelar, funcionando como andamio de muchas moléculas involucradas en el metabolismo energético y en la transducción de señales relacionadas con la movilidad (Escalier & Albert 2006).

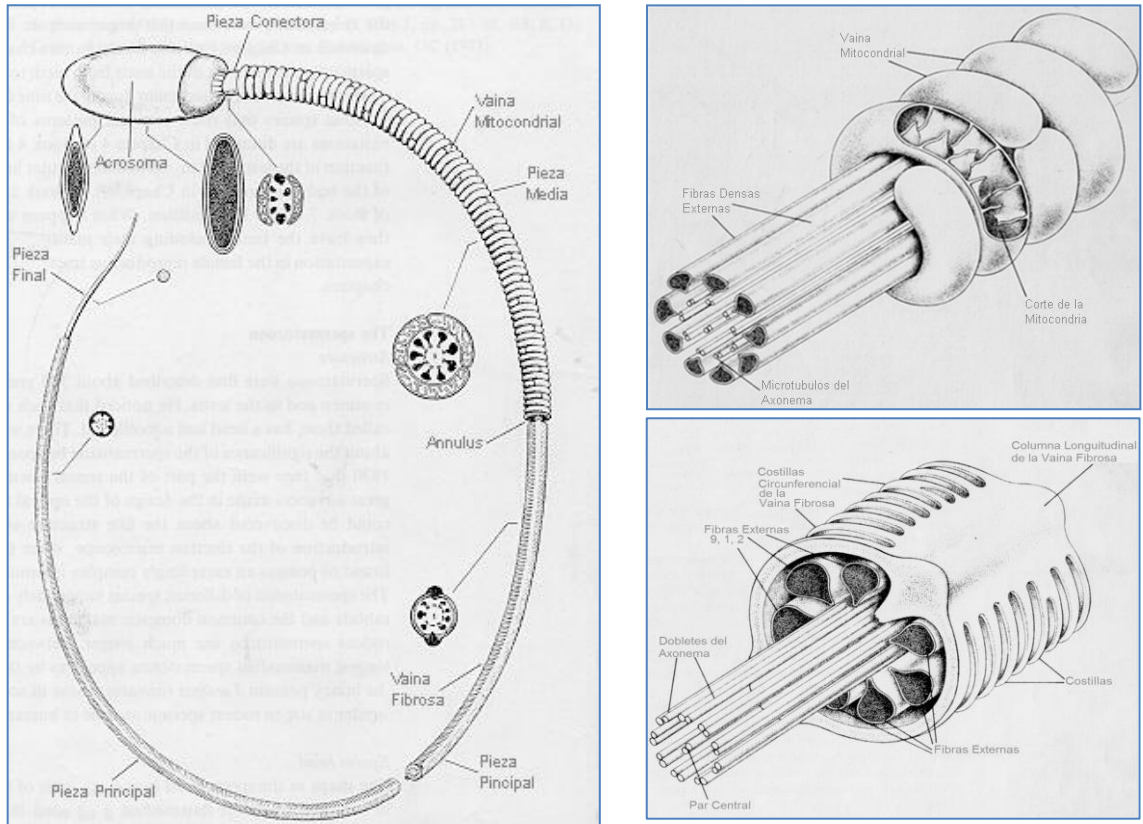


Figura 2. Composición del flagelo de los espermatozoides de mamíferos. Se encuentra dividido en 4 regiones: pieza de conexión, la pieza media, pieza principal y pieza terminal. Conteniendo un axonema a lo largo del flagelo. La pieza media está delimitada en su superficie por la membrana plasmática (MP), por debajo se encuentra la vaina mitocondrial (MS) la cual rodea a la región conformada por 9 fibras densas (ODFs). A nivel de la pieza principal, se observa el lugar que ocupaba la MS es sustituido por la vaina fibrosa y a nivel de la pieza terminal el axonema solo está rodeado por la MP. Tomado y modificado de Austin, 1982.

Capacitación espermática

La fecundación en mamíferos es un evento especie-específico, siendo el resultado neto de eventos moleculares complejos. Para que el óvulo pueda ser fecundado, el espermatozoide sufre cambios durante: 1) su formación y desarrollo en los testículos (espermatogénesis); 2) su maduración en el epidídimo; y 3) su capacitación en el tracto reproductivo femenino.

Esta última es necesaria para que el espermatozoide pueda realizar la reacción acrosomal, que libera las enzimas contenidas en el acrosoma y poder atravesar la zona pelúcida para interactuar con el óvulo y así fecundarlo (Abou-Haila & Tulsiani 2000).

La capacitación se define, a grosso modo, como el conjunto de modificaciones bioquímicas y fisiológicas que sufre el espermatozoide en su paso a través del tracto reproductor femenino (Abou-Haila & Tulsiani 2000). Este proceso sucede *in vivo* en el oviducto o útero en los mamíferos (Suarez & Pacey 2006); puede ser mimetizado *in vitro* incubando a los espermatozoides en un medio definido, cuya composición se basa en la del fluido del oviducto: NaHCO_3 , Ca_2^+ , baja concentración de K^+ y concentraciones fisiológicas de Na^+ (Ehrenwald *et al.* 1990). En muchos de los casos, este medio contiene sustratos energéticos como piruvato, lactato y glucosa (Yanagimachi 1994; Rodriguez-Martinez 2007).

En algunas especies, para que se realice eficazmente la capacitación *in vitro* se requiere de un aceptor de colesterol como la albúmina sérica, aunque ésta puede ser sustituida por agentes que secuestran colesterol como lipoproteínas de alta densidad y derivados de las ciclodextrinas: HO- β -ciclodextrina o metil- β -ciclodextrina (Visconti *et al.* 1995a; Visconti *et al.* 1995b).

La capacitación se regula tanto por factores extrínsecos como intrínsecos, siendo los reguladores extrínsecos principales los aceptores de colesterol, el bicarbonato y el calcio (Yanagimachi 1994; Visconti *et al.* 1995a).

Algunos eventos asociados con la capacitación son:

(i) La remoción del colesterol de la membrana plasmática, que provoca un incremento en la fluidez de la membrana y del transporte de iones Ca^{2+} , HCO_3^- y Cl^- ; (ii) el aumento del metabolismo que se observa como una disminución del contenido intracelular de ATP; (iii) el aumento de Ca^{2+} y HCO_3^- intracelulares, provocando la activación de la ruta de señalización Adenilato ciclasa soluble / Adenosín monofosfato cíclico / Proteína cinasa A (ACs/AMPC/PKA) y de la proteína tirosina cinasa (PTK), que produce la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y una alcalinización intracelular; (iv) el cambio de localización de fosfolípidos en la membrana plasmática por una probable actividad de “escramblasa” inducida por bicarbonato; (v) la hiperpolarización de la membrana plasmática; (vi) el cambio de localización de proteínas de superficie como efecto de la fluidez de la membrana; (vii) la remodelación del citoesqueleto de actina por la fosfolipasa D, para la formación de filamentos de actina; (viii) la reorientación de la movilidad en respuesta al gradiente de agentes quimio-atrayentes y (ix) la adquisición de la hiperactivación de la movilidad, como evento final (Yanagimachi 1994; Visconti *et al.* 1995a; Visconti *et al.* 1995b; Travis & Kopf 2002; Breitbart *et al.* 2005; Sun *et al.* 2005; Salicioni *et al.* 2007; Vadnais *et al.* 2007).

Reacción Acrosomal

El espermatozoide en especies de fecundación interna, presenta un acrosoma, el cual se trata de una gran vesícula secretora derivada del aparato de Golgi, localizada en la región apical de la cabeza, superpuesta con el núcleo (Eddy y O'Brien, 1994). El contenido de esta vesícula se libera por medio de exocitosis regulada, que consta de un proceso de fusión-fisión entre la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática del óvulo (Honda *et al.* 2002).

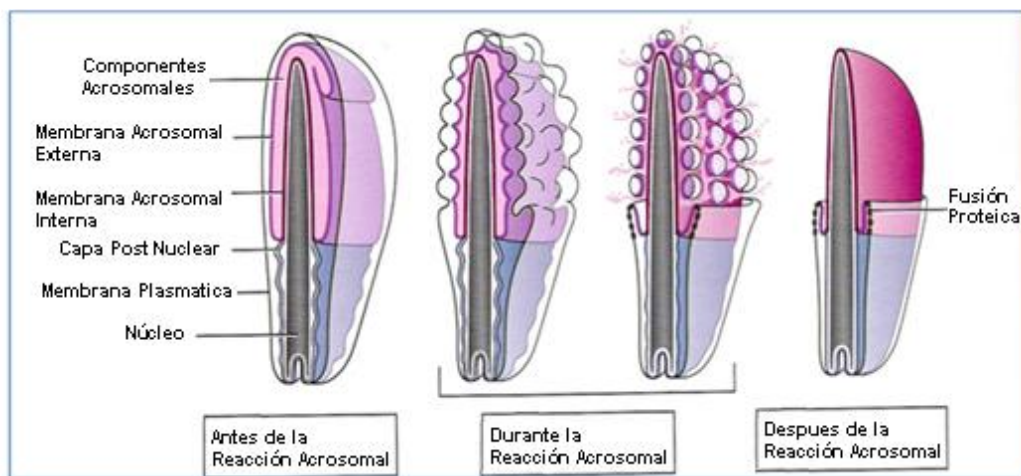


Figura 3. Representación esquemática de los cambios morfológicos que tiene lugar durante la reacción acrosomal en los espermatozoides de mamíferos. De lado izquierdo se muestra las estructuras y el acrosoma intacto; después la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, las cuales forman vesículas mixtas (compuestas de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa). Liberación de las enzimas hidrolíticas y exposición de la membrana acrosomal interna.

Durante la reacción acrosomal (RA) las enzimas hidrolíticas y proteolíticas disuelven parcialmente la matriz de la zona pelúcida, justo en la dirección inmediata donde la célula espermática penetra lo que, en última instancia, asegura la entrada del espermatozoide (Llanos *et al.* 1993).

Los óvulos maduros que se encuentran rodeados de numerosas células del cumulus incrustadas en una matriz extracelular conformada principalmente, por proteoglicanos ricos en ácido hialurónico, se someten a expansión o mucificación, que causa que las células se separen. Finalmente el óvulo en metafase II, aun rodeado por las células del cumulus expandidas, es ovulado dentro del oviducto listo para la fecundación (Buccione *et al.* 1990). En conjunto, este complejo se conoce como cumulus oophorus-óvulo. Aunque es seguro que los espermatozoides, con la ayuda de la hiperactivación flagelar, sufren la RA para fecundar al óvulo, el lugar donde los espermatozoides comienzan su RA es y sigue siendo objeto de controversia (Figura 4) (Yanagimachi 1994; Inoue *et al.* 2011).

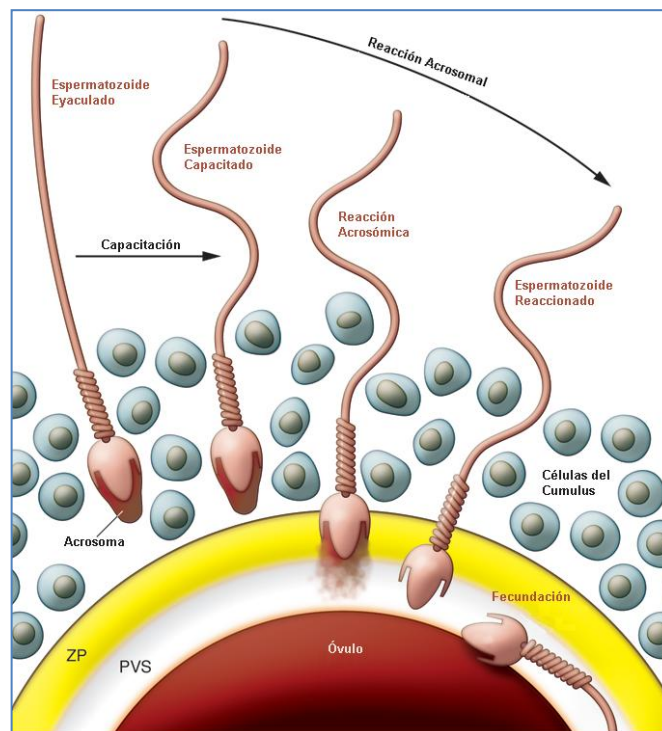


Figura 4. Mecanismo de interacción espermatozoide-ovocito. Cerca del ovulo, probablemente estimulada por las células del cumulus y la zona pelúcida (ZP), el espermatozoide libera su contenido acrosomal por exocitosis acrosomal y penetran la ZP. PVS: Espacio perivitelino. Tomado y modificado de Ikawa *et al.*, 2010.

Se han sugerido varias teorías acerca de los inductores de la RA. En el ratón y otras especies, se cree que la señal que inicia la reacción acrosomal está dada por medio de un reconocimiento receptor-ligando entre zona pelúcida y el espermatozoide capacitado (Gupta & Bhandari ; Bleil & Wassarman 1983; Cross *et al.* 1988; Franken *et al.* 2000). El gran poder hidrolítico de las enzimas secretadas, en conjunto con la hipermovilidad, hacen posible que el espermatozoide pueda penetrar la zona pelúcida y fecundar el óvulo (Tulsiani *et al.* 1998). Por otro lado, recientemente se ha reportado que el factor espermático (NYD-SP8), al asociarse a un receptor hipotético localizado en la MP de las células del cumulus, promueve la producción y secreción de progesterona de una manera dependiente de calcio, la cual induce la RA al asociarse con su receptor que se localiza en la MP espermática (Yin *et al.* 2009), como se puede observar en la figura 5.

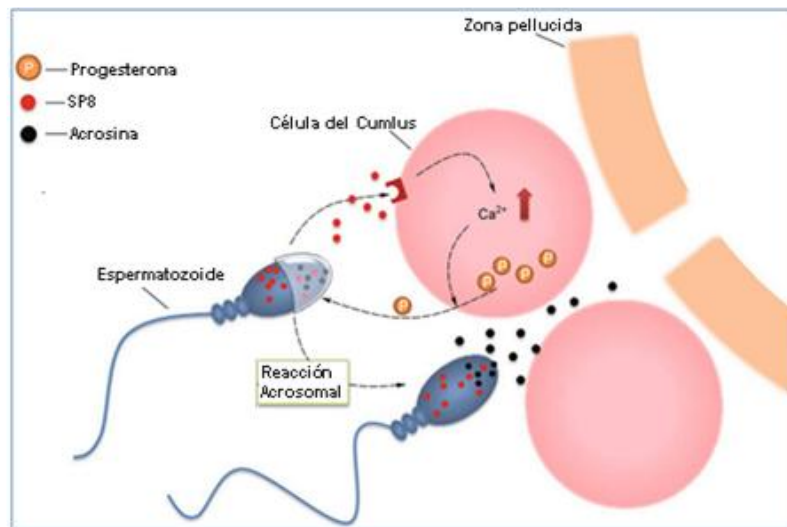


Figura 5. Representación esquemática de la liberación espermática de NYD-SP8 (SP8) y su interacción con las células del cumulus. Como resultado de la unión de SP8 a la superficie celular del cumulus, el calcio intracelular de las células del cumulus se incrementa y conduce a la liberación de progesterona, que posteriormente desencadena la RA y facilita la penetración espermática de los cumulos. Tomado y modificado de Sun *et al.*, 2011.

El citoesqueleto de actina de una célula eucariota es central para procesos tales como locomoción, fagocitosis, contractilidad, cambios en la forma, citocinesis y mantenimiento de la polaridad (Machesky & Insall 1999). En varios estudios se ha demostrado que la polimerización de actina es importante durante la capacitación (Castellani-Ceresa *et al.* 1992) (Fig. 6).

Se ha reportado que la actina G se polimeriza formando actina F durante la capacitación y es despolimerizada por incremento intracelular de las concentraciones de Ca^{2+} , provocando la RA (Brener *et al.* 2003). Se ha sugerido que la presencia de actina en el flagelo puede ser importante para la regulación de la movilidad y su presencia en la cabeza sugiere que probablemente está involucrada en la reacción acrosomal (Breitbart *et al.* 2005; Itach *et al.* 2011).

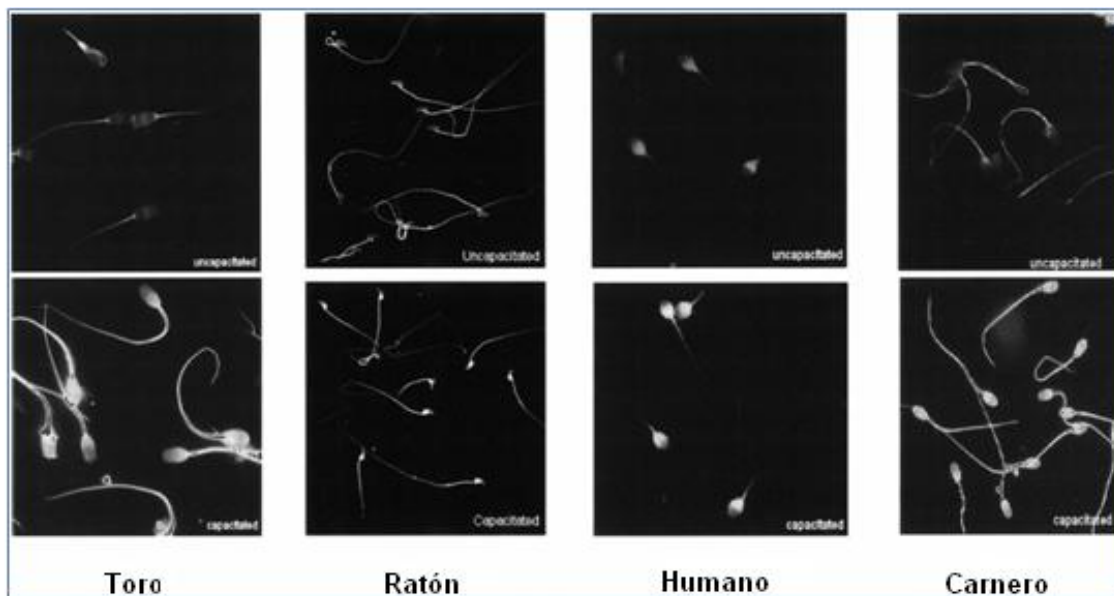


Figura 6. Polimerización de actina durante la capacitación de los espermatozoides de toro, ratón, humano y carnero. Tomado y modificado de Brener *et al.*, 2003

En estas mismas regiones también se ha reportado la presencia de la familia de las GTPasas Rho y sus efectores, en espermatozoides del cobayo (Delgado-Buenrostro *et al.* 2005), del verraco, toro, elefante, humano, carnero y rata (Ducummon & Berger 2006). Los miembros de la familia Rho han surgido como reguladores clave del citoesqueleto de actina y a través de su interacción con otras proteínas diana, garantiza el control coordinado de otras actividades celulares (Hall 1998).

Proteínas Rho

Las proteínas de la familia Rho constituyen una rama importante de la superfamilia Ras de GTPasas pequeñas (trifosfatasa de guanosina pequeñas) (Wennerberg & Der 2004). Esta superfamilia está clasificada estructuralmente en por lo menos 5 familias: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf y Ran. Regulando una amplia variedad de funciones celulares como temporizadores biológicos que inician y terminan las funciones celulares específicas. Además, la superfamilia Ras de GTPasas pequeñas, son proteínas conservadas evolutivamente y participan en procesos celulares diversos y complejos (Takai *et al.* 2001).

Las proteínas GTPasas Rho, (homólogo de Ras), son unas GTPasas de tamaño pequeño homólogas de Ras que están muy conservadas en eucariotas, desde las levaduras hasta mamíferos (Narumiya 1996). La familia Rho de GTPasas pequeñas, está formada por varios miembros: RhoA, B, C, D y E; Rac 1, 2 y 3; Cdc42, TC10 y otras (Aspenstrom *et al.* 2004).

Estas proteínas son estructuralmente muy parecidas (40 a 95% de identidad en su composición peptídica), además de tener un tamaño muy similar (190-195 aminoácidos) (Ellenbroek & Collard 2007).

Basándose en la identidad de la secuencia primaria de los aminoácidos, los motivos estructurales y la función biológica, la familia Rho se pueden dividir en seis subfamilias que muestran propiedades similares pero no idénticas. Estas son: la subfamilia relacionada con RhoA (RhoA, RhoB y RhoC), la subfamilia relacionada con Rac1 [Rac1 (y su variante empalme Rac1b), Rac2, Rac3 y RhoG], la subfamilia relacionada con Cdc42 [Cdc42 (y su variante empalme C terminal cerebro específica G25K), TC10, TCL, chp/wrch2 y wrch1], la subfamilia Rnd (Rnd1, Rnd2 y RhoE/Rnd3), la subfamilia RhoBTB y la subfamilia Miro, descrita recientemente (Fig.7) (Wennerberg & Der 2004).

La mayoría de los miembros de las proteínas Rho experimentan una modificación C-terminal pos-traducciona mediante lípidos isoprenoides, junto con otras modificaciones en las secuencias C-terminales, la adición de isoprenoides facilita su localización subcelular y la asociación con membranas específicas, lo cual es crucial para llevar a cabo sus funciones (Wennerberg & Der 2004).

Las proteínas Rho más comunes son pequeñas y consisten solo del dominio GTPasa y extensiones cortas en los extremos N- y C-terminales. Sin embargo, algunos de los miembros de la familia más atípicos contienen dominios adicionales bien definidos y pueden ser de longitud mayor a 700 aminoácidos.

Dentro de su dominio GTPasa comparten, aproximadamente, 30 % de identidad de aminoácidos con las proteínas Ras y del 40-50% de identidad dentro de la familia. Uno de los dominios que caracterizan a la familia de proteínas Rho es el dominio GTPasa tipo Rho, llamado dominio G y el cual tiene una estructura y un mecanismo de interruptor universal. El dominio G plegado consiste de una mezcla de seis hojas β enlazadas y cinco hélices localizadas en ambos lados (Vetter & Wittinghofer 2001).

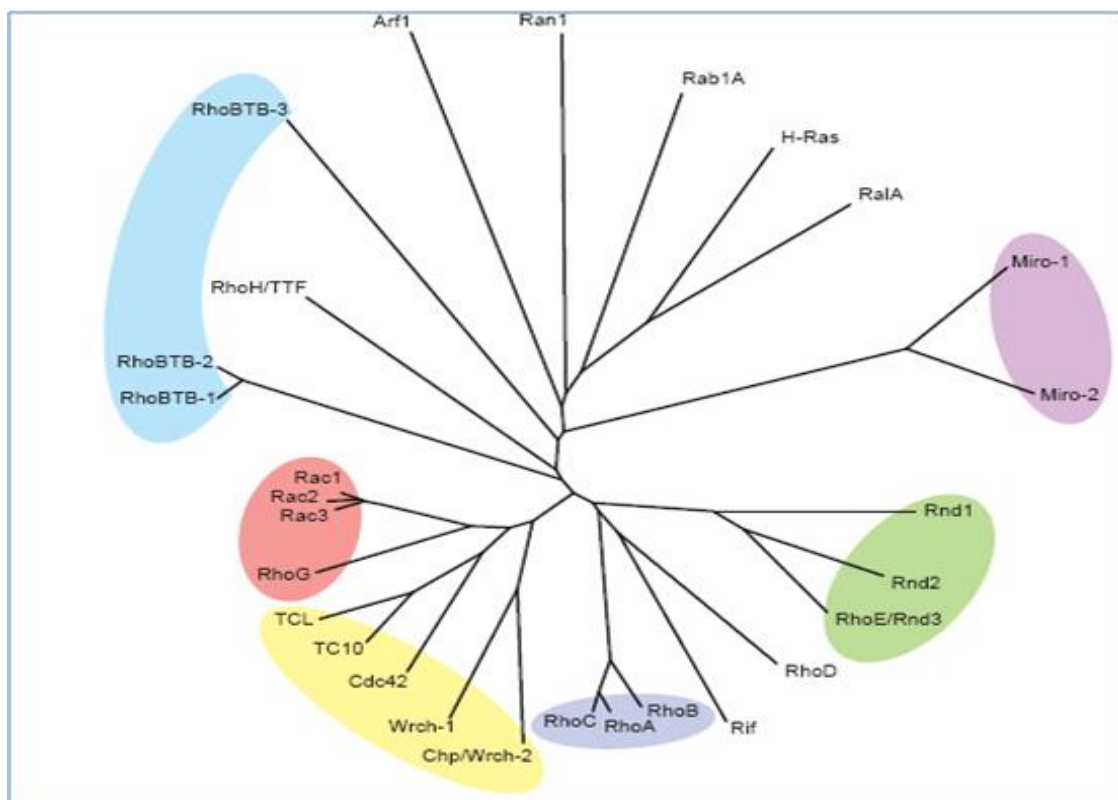


Figura 7. Representación del árbol filogenético de la familia de las GTPasas Rho y de otros representantes de la superfamilia de las GTPasas Ras. Según el análisis de la secuencia de aminoácidos, se pueden diferenciar 6 grandes subfamilias de las GTPasas Rho: las que se relacionan con RhoA (azul y en la zona inferior), Rac (rosa fucsia), Cdc42 (amarillo), las proteínas Rnd (verde), las proteínas RhoBTB (azul claro y en la zona superior/izquierda) y las proteínas Miro (violeta). Tomado de Wennerberg & Der 2004.

Una característica que distingue las proteínas Rho de otras GTPasas pequeñas, es el llamado dominio inserto Rho, localizado entre la quinta cadena β y la cuarta hélice α en el dominio GTPasa (Valencia *et al.* 1991). En común con Ras y otras GTPasas pequeñas, los estados de unión a GDP y GTP de las GTPasas Rho clásicas difieren en conformación, principalmente en 2 regiones localizadas, Switch I y II y esta característica es probablemente compartida por todas las Rho GTPasas (Vetter & Wittinghofer 2001).

Todos los miembros de las Rho GTPasas contienen dominios característicos que se unen a GDP (estado inactivo) y GTP (estado activo) (Wennerberg & Der 2004). La alternancia entre los estados inactivo-activo de las proteínas Rho está altamente regulada por proteínas que regulan ya sea la actividad de GTPasa o el intercambio de nucleótidos.

Existen cuatro clases de proteínas reguladoras: (a) los factores intercambiadores de nucleótido de guanina de la familia Dbl (GEF, del inglés guanine exchange factors), que activan a las GTPasas incrementando la tasa de liberación del nucleótido unido y, por lo tanto, facilitando el intercambio de GDP por GTP. Este intercambio de nucleótido provoca cambios conformacionales importantes en las regiones estructurales denominados Switch 1 (residuos 24-40) y Switch 2 (residuos 57-75) (Sprang 1997; Vetter & Wittinghofer 2001); (b) las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP, del inglés GTPase-activating protein) que estimulan la actividad de GTPasa endógena y así facilitan la hidrólisis de GTP a GDP, regenerando la forma inactiva de las Rho; (c) los inhibidores de la disociación de

GDP (GDI, del inglés GDP-dissociation inhibitors), que inhiben la disociación del GDP previniendo su reemplazo por GTP (Mertens *et al.* 2003; Coleman *et al.* 2004) d) y los factores de desplazamiento de GDI (GDF, del inglés GDI- displacement factors) (Bement *et al.* 2006).

La perturbación de estas proteínas reguladoras de las Rho puede afectar el ciclo de activación y tener consecuencias severas para todos los eventos celulares orquestados por la señalización dependiente de Rho (Ortiz-Sanchez *et al.* 2012).

Mucha de la información adicional sobre la familia de las proteínas Rho proviene de estudios en RhoA, Rac1 y Cdc42. Todas estas promueven la reorganización de actina en el citoesqueleto pero tienen efectos diferentes en la forma y el movimiento celular (Hall 1998; Schmitz *et al.* 2000), por ejemplo, la activación de proteínas RhoA o B conlleva a la formación de fibras de estrés, la activación de Rac1 induce la formación de lamelipodios, mientras que la activación de Cdc42 lleva a la formación de protrusiones celulares tipo filopodio (Hartwig *et al.* 1995; Ridley *et al.* 1995; Norman *et al.* 1996).

Los cambios morfológicos inducidos por las formas activadas de esta familia de GTPasas comparten muchos aspectos: incremento en la polimerización de actina, agrupamiento de integrinas y ensamblaje de complejos de proteínas del citoesqueleto (contactos focales). Los contactos focales tienen una función importante en los mecanismos de transducción de señales (Menna *et al.* 2010)

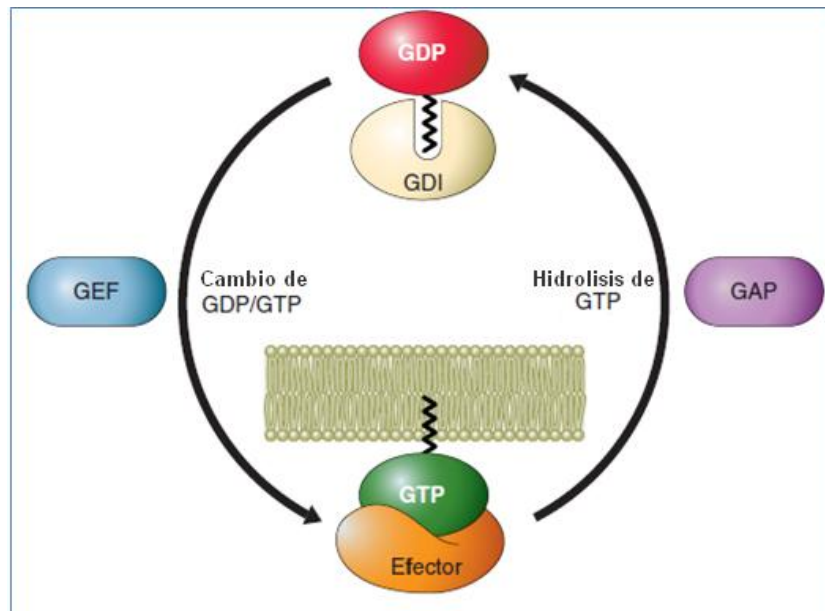


Figura 8. Proteínas reguladoras de las GTPasas Rho. Las GTPasas Rho ciclan entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. Su actividad es regulada por: 1) los factores intercambiadores de guanina (GEF, del inglés guanine exchange factors), 2) las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP, del inglés GTPase-activating protein), 3) los inhibidores de la disociación de GDP (GDI, del inglés GDP-dissociation inhibitors). Tomado y modificado de Cherfils & Zeghouf, 2013.

En células somáticas, Rac se activa por factores de crecimiento como el derivado de plaquetas (PDGF), el de crecimiento epidérmico (EGF) o la insulina, dando lugar a la formación de lamelipodios y ondulaciones de membrana conocidas como ruffles (Kjoller & Hall 1999; Takai *et al.* 2001; Sahai & Marshall 2002).

Rac es capaz de activar el complejo Arp2/3 mediante la interacción con WAVE (WASP-like verprolin-homologous protein) provocando la formación de lamelipodios. Otro de los efectores importantes, tanto de Rac como de Cdc42, es la familia de PAK (p21-activated kinase), que estimula la actividad de la cinasa PAK capaz de activar a

LIM cinasa y así modular a la actina F en la longitud de sus microfilamentos. Al parecer PAK se une a Rac1 de manera dependiente de GTP (Menna *et al.* 2010); (Brown *et al.* 1996; Frost *et al.* 1996).

Todas las proteínas relacionadas con Rac promueven la polimerización de la actina, con lo que estimulan la formación de lamelipodios y las ondulaciones “ruffles” de la membrana presuntamente a través de la interacción con el complejo PIR121-Nap125-HSPC300-WAVE (Eden *et al.* 2002). Los lamelipodios son extensiones como-cortina que consisten en protuberancias delgadas de hojas de actina que están en el borde principal de células migratorias (Wennerberg & Der 2004).

Rac 1 se expresa de forma ubicua y existe en dos estados conformacionales, una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP. En respuesta a señales extracelulares, la interconversión de estos estados ocurre vía factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEFs) los que convierten a Rac1 a su forma activa y las proteínas activadoras de GTPasa (GAPs) inactivan a Rac1 (Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997; Etienne-Manneville & Hall 2002).

Rac1 interactúa con efectores específicos a través de dominios que coordinan la activación de cascadas de señalización que influyen en respuesta fisiológicas diversas, como se muestra en la figura 9.

También se ha demostrado que Rac1 influye en la señalización nuclear a través de los efectores MLK2/3 que activan la vía JNK (Teramoto *et al.* 1996; Nagata *et al.* 1998).

Existen otros estudios que aclaran la función de Rac1 en la remodelación de la actina F en células somáticas. Actualmente, se ha reportado la participación de la cascada de señalización de Rac1 en la translocación de GLUT4 dependiente de insulina, para la captación de glucosa en células musculares esqueléticas a través de la reorganización de actina cortical (Chiu *et al.* 2011).

También, se ha reportado la remodelación del citoesqueleto en células epiteliales infectadas por *Helicobacter pylori*, a través de la vía β 1 integrina/FAK/Src involucrada en la remodelación del citoesqueleto, la cual se le ha implicado, principalmente, en la regulación de la actividad de Rac1, a través de dos vías río-abajo que implican las proteínas de andamio p130Cas y paxilina bien caracterizadas. Tras la fosforilación por Src, p130Cas puede reclutar un complejo Crk (del inglés, (v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog)/ DOCK180 (del inglés, dedicator of cytokinesis) que tiene actividad GEF hacia Rac1 (Kiyokawa *et al.* 1998; Gu *et al.* 2001).

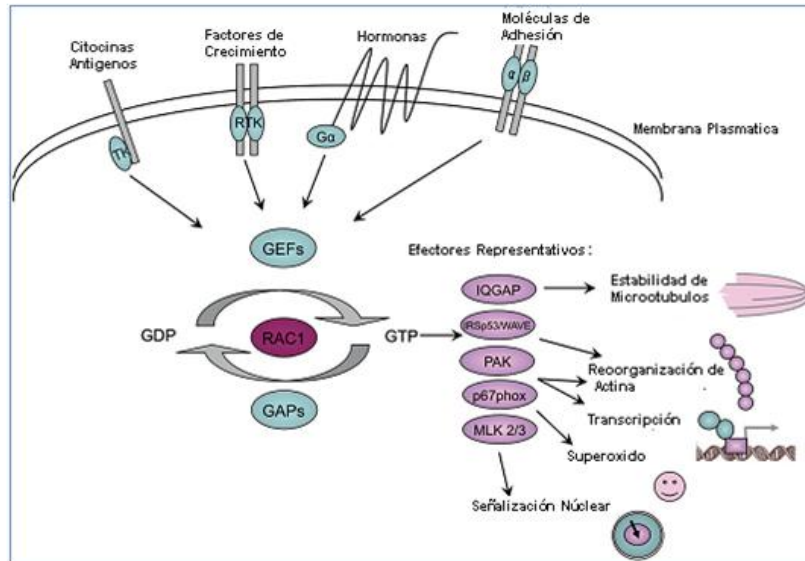


Figura 9. Modelo de señalización de Rac1. Rac 1 actúa como un transductor de señal mediante la recepción de información a través de GEFs activadas de una variedad de estímulos extracelulares tales como receptores de cinasas, receptores acoplados a proteínas G o integrinas. Rac 1 unido a GTP adopta una conformación activa capaz de unirse a moléculas efectoras, tales como IQGAP, IRSp53/WAVE, PAK, MLK2/3. Estos efectoras regulan funciones, tales como la remodelación del citoesqueleto, estabilidad de microtúbulos, transcripción y producción de superóxido. Tomado y de Bosco *et al*, 2009.

Por otra parte, FAK fosforila paxilina la cual también puede contribuir a la actividad del complejo Crk/DOCK180 pero, adicionalmente, suprime RhoA. Como RhoA puede inhibir a Rac1, esta vía podría ser interesante para la activación de Rac1 estimulada por la integrina (Siesser & Hanks 2006). Se ha estudiado la función de Rac1 en la remodelación de la actina F en varios tipos celulares, y se ha observado que presenta respuestas específicas en cada tipo celular. En el caso de los espermatozoides de mamíferos, se desconoce qué función tenga Rac1 ya que, aunque está presente no ha sido estudiada a profundidad. Por tanto, es de interés saber qué función lleva a cabo Rac1 en los espermatozoides de los mamíferos.

Antecedentes

Las GTPasas de la familia Rho tienen un papel especial en células somáticas ya que regular procesos dependientes del citoesqueleto de actina, tráfico vesicular y transcripción génica, entre otros (Schmandke & Strittmatter 2007). Se ha postulado la hipótesis de que las proteínas Rho regulan la polimerización de actina en el proceso acrosomal de los espermatozoides de erizo (Castellano *et al.* 1997); función consistente con su actividad conocida en otras células (Van Aelst & D'Souza-Schorey 1997). Sin embargo, la función de Rac1 durante la capacitación y la reacción acrosomal aún no ha sido caracterizada.

Recientemente, se ha reportado que algunos miembros de la familia de GTPasas Rho, como Cdc42, Rho A y Rho B, son reguladores de la polimerización de actina en las regiones ecuatorial y postacrosomal en el espermatozoide de cobayo durante la reacción acrosomal (Delgado-Buenrostro *et al.* 2005), sugiriendo que estas GTPasas están involucradas en el mecanismo de polimerización de actina. En otro estudio, Rac1 se encontró en la cabeza entera y en el flagelo en espermatozoides de seis especies diferentes, excepto en el flagelo del espermatozoide humano (Ducummon & Berger 2006), y se sugirió su participación posible en la capacitación y reacción acrosomal.

Justificación

Tanto la capacitación como la reacción acrosomal son procesos por los que tienen que pasar los espermatozoides de los mamíferos para llevar a cabo la fecundación. A pesar de que la polimerización de actina y su regulación han sido estudiadas en los espermatozoides de los mamíferos, la participación de las proteínas Rho no se ha dilucidado. Dada la presencia de Rac1 en los espermatozoides de mamíferos y su participación conservada en la polimerización de actina, es importante conocer su función en los procesos fisiológicos que habilitan a los espermatozoides para fecundar.

La identificación, localización y bloqueo de la actividad de Rac1, así como su correlación con la remodelación del citoesqueleto, permitirá explicar su participación, tanto en la capacitación como en la reacción acrosomal. La inhibición o alteración de alguno de ellos, hará que el espermatozoide no sea capaz de atravesar las envolturas del óvulo, ni de adherirse y/o fusionarse con la membrana plasmática de los óvulos

El espermatozoide del cobayo es un modelo que ha demostrado facilidad para estudiar la capacitación y sobre todo la reacción acrosomal ya que el porcentaje de espermatozoides capacitados y reaccionados es muy alto.

Pregunta de investigación

¿Participa Rac1 en la vía de transducción de señales de la remodelación del citoesqueleto de Actina F durante la capacitación y reacción acrosomal en espermatozoides de cobayo?

Hipótesis

Diferentes GTPasas pequeñas han sido detectadas en la región acrosomal y en el flagelo de los espermatozoides de los mamíferos. En estas mismas regiones, ha sido reportada la presencia de un citoesqueleto de actina, el cual sufre una remodelación durante la capacitación, que repercute en la reacción acrosomal. Si Rac1 está presente en los espermatozoides de cobayo, ya que es una de las GTPasas pequeñas más importantes en la regulación de la remodelación del citoesqueleto, podría estar participando en la remodelación del citoesqueleto espermático y desempeñar un papel importante en la capacitación y en la reacción acrosomal.

Objetivo General

Estudiar la participación de Rac1 en la regulación del citoesqueleto de actina F durante la capacitación y la reacción acrosomal en espermatozoides del cobayo.

Objetivos particulares

- 1.- Localizar a la proteína Rac1 en espermatozoides no capacitados y capacitados del cobayo.
2. Investigar si Rac1 participa en la capacitación o la reacción acrosomal
3. Estudiar el papel de Rac1 en la polimerización de actina durante la capacitación.

Material y Métodos

Se utilizaron cobayos de la línea y cepa CIEA:HART con peso promedio de 800g, siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, que dicta la Norma Oficial Mexicana (NOM- 062-ZOO-1999).

Obtención y capacitación de espermatozoides de Cobayo. Los espermatozoides se obtuvieron de los conductos eferentes y de la cola del epidídimo del cobayo sacrificado por anestesia con éter. Las células se extrajeron por perfusión con solución salina isotónica (NaCl 0.154M) (anexo A), los espermatozoides recién extraídos se observaron al microscopio de luz para analizar su movilidad. Después, se lavaron por centrifugación/resuspensión a 800g por 3 minutos y para determinar la concentración de los espermatozoides, se tomó una alícuota de la suspensión de espermatozoides diluida con PBS- Tritón X100 al 0.1% (anexo C) y se contó utilizando una cámara de Neubauer para ajustar a una concentración de 60×10^6 espermatozoides/ml para el Medio MCM-PL (medio capacitante) (anexo D). Se obtuvieron dos grupos de espermatozoides, los no capacitados y los capacitados durante 60 minutos.

Preparación de Laminillas para inmunofluorescencia Indirecta. Los espermatozoides no capacitados y capacitados, se fijaron adicionando un volumen de solución fijadora: formaldehído al 3% y glutaraldehído al 0.1%, disueltos en PBS (anexo M); la fijación se realizó por una hora a 25°C. Posteriormente, se

centrifugaron a 735g por 5 min, se retiró el exceso de fijador y las células se resuspendieron en una solución de NH₄Cl 50 mM_(anexo N) diluido en PBS 1X, se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los espermatozoides se lavaron por centrifugación/resuspensión (1130.5g por 5 minutos) tres veces con PBS. Con las muestras espermáticas se realizaron frotis en portaobjetos de microscopio y se dejaron secar al aire antes de su uso.

Inmunofluorescencia Indirecta. Los espermatozoides adheridos a las laminillas de vidrio se rehidrataron con PBS 1X por 5 minutos; después, se permeabilizaron con acetona fría por 7 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas se lavaron tres veces con PBS 1X, por 7 minutos cada vez. Se adicionó el primer anticuerpo anti-Rac, diluido 2:100 y anti-WAVE, diluido 2:100, en solución de bloqueo (BSA al 1% disuelto en PBS) (anexo O) y se dejó incubar toda la noche a 25°C en cámara húmeda. Posteriormente, se retiró el exceso del anticuerpo con tres lavados en PBS durante 7 minutos cada uno, se secaron con gasa y se les añadió el anticuerpo secundario apropiado conjugado con TRIC y diluido 2:100 en solución de bloqueo para Rac1 y para WAVE, el anticuerpo secundario conjugado a CY5 y diluido 2:100; las muestras se incubaron durante 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Nuevamente se retiró el exceso de anticuerpo y se lavaron tres veces con PBS por 7 minutos. Las muestras se montaron y se observaron en el microscopio confocal agregando 10 µL de gelvatol entre porta y cubreobjetos y, finalmente, se sellaron con barniz de uñas.

Doble marcaje. Los espermatozoides, adheridos a las laminillas de vidrio, se rehidrataron en PBS 1X por 5 minutos, después se permeabilizaron con acetona fría

por 7 minutos a 25°C. Las laminillas se lavaron tres veces con PBS 1X, por 7 minutos cada vez. Se adicionó el primer anticuerpo anti-Rac1 diluido 2:100, en solución de bloqueo (BSA al 1% en PBS) y se dejó 2 hrs a 37° C en cámara húmeda. Posteriormente se retiró el exceso del anticuerpo con tres lavados en PBS durante 7 minutos cada lavado. Se añadió el anticuerpo secundario apropiado conjugado a TRIC, diluido 2:100 en solución de bloqueo por 1 hr a 37°C en cámara húmeda. Se retiró el exceso del anticuerpo con tres lavados en PBS durante 7 minutos cada uno. Se adicionó el primer anticuerpo anti-WAVE, diluido 2:100, en solución de bloqueo (BSA al 1% disuelto en PBS) y se dejó 2 hrs a 37° C en cámara húmeda. Se retiró el exceso del anticuerpo con tres lavados en PBS 1X durante 7 minutos cada uno. Se añadió el anticuerpo secundario apropiado conjugado a CY5 y diluido 2:100 en solución de bloqueo por 1 hr a 37°C en cámara húmeda. Se retiró el exceso de anticuerpo y se lavaron tres veces con PBS por 7 minutos. Las muestras se montaron para su observación al microscopio del confocal agregando 10 µL de gelvatol entre porta y cubreobjetos y finalmente se sellaron con barniz de uñas.

Obtención de extractos proteínicos de espermatozoides del cobayo. Los extractos proteínicos se hicieron por el método de Pasten-Hidalgo et al., (2008), los espermatozoides de cobayo se centrifugaron a 800g por 5 minutos, el sobrenadante se retiró y a las pastillas se les agregó amortiguador de lisis (Anexo E), se incubaron en hielo por 20 minutos y se centrifugaron a 16000g por 20 minutos a 4°C recuperando el sobrenadante. La concentración de proteínas se calculó por el método de Bradford (1976) y las muestras se conservaron a -70°C hasta su uso.

Electroforesis y Western Blot. Para la detección de la proteína Rac1 y WAVE en espermatozoides de cobayo. A los extractos proteínicos se les agregó 1/3 de su volumen de amortiguador de muestra (anexo I) y se incubaron a 100°C durante 7 minutos. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (anexo F y G) para realizar la separación electroforética (Laemmli, 1970), enseguida fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (immobilon PSQ) (70 mAmp por 16 h), utilizando el amortiguador de transferencia (anexo K).

Para la inmunodetección, las membranas se bloquearon por 2 hrs a 25°C con solución de bloqueo (leche descremada al 5% disuelta en PBS-Tritón) y lavadas siete veces con PBS-Tritón por 7 minutos cada lavado. El anticuerpo primario diluido 2:1000 en la solución bloqueadora, se incubó por 12 horas a temperatura de 4 °C y en agitación constante (tanto para Rac1 como para WAVE). Las membranas se lavaron siete veces con PBS-Tritón, por 7 minutos cada lavado, nuevamente las membranas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario respectivo conjugado con peroxidasa y diluido 1:10,000 en solución de bloqueo. Una vez incubado el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 7 veces con PBS-Tritón por 7 minutos cada lavado. Los anticuerpos se revelaron mediante quimioluminiscencia, usando el kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech) y placas radiográficas (X-Omat, Kodak).

Capacitación de espermatozoides de cobayo en ausencia y presencia de

NSC23766. Los espermatozoides de los conductos deferentes del cobayo fueron obtenidos y lavados en solución NaCl 0.154 M, las células espermáticas (3.5×10^7 cel/mL) fueron capacitadas en un medio mínimo de cultivo que contiene lactato y piruvato (MCM-PL) a 37 °C durante 60 min. Al medio de capacitación se le agregó diferentes concentraciones de NSC23766 (0,10, 25, 50 y 100 μ M). Para la obtención de los espermatozoides no capacitados, fueron incubados en solución NaCl 0.154 M. Después del tiempo de incubación, las muestras de no capacitados, capacitados (sin NCS23766) y capacitados con las diferentes concentraciones de NCS23766 fueron fijados (anexo M) por 1hr. Las células capacitadas (control) fueron incubadas y fijadas en paralelo con las células tratadas. Posteriormente se tomaron alícuotas de 50 μ L de cada muestra para conteo. Las muestras fueron centrifugadas a 735g por 5 min, se retiró el exceso de fijador y las células se resuspendieron en una solución de NH_4Cl (50 mM) (anexo N), se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los espermatozoides se lavaron por centrifugación/re suspensión (735g por 5 minutos) tres veces con PBS y tres con agua destilada. Con las diferentes muestras espermáticas se realizaron frotis en los portaobjetos de microscopio y se dejaron secar al aire antes de su uso.

Detección de actina F. Los frotis en los portaobjetos de microscopio se rehidrataron en PBS 1X por 5 minutos, después se permeabilizaron con acetona fría por 7 minutos a temperatura ambiente. Las laminillas se lavaron tres veces con PBS 1X, en intervalos de 7 minutos, se secaron al aire, y se incubaron con faloidina-TRITC (1:20 en PBS 1X) durante unas 2 hrs a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X, a intervalos de 7 min y se pasaron por agua y se dejaron secar al aire y se montaron agregando 10 μ L de gelvatol entre porta y cubreobjetos y finalmente se sellaron con barniz de uñas, para su observación en el microscopio de epifluorescencia.

Análisis de resultados. Los resultados fueron analizados con la prueba estadística T-student pareada, con una significancia de $P < 0.05$.

Resultados

Presencia de la proteína Rac1 en los espermatozoides del cobayo. Para detectar la presencia de Rac1 en los espermatozoides de cobayo, las proteínas de extractos totales fueron separadas por PAGE-SDS y transferidas a membranas de Immobilon, las cuales fueron usadas para la inmunodetección. El anticuerpo específico contra Rac1 mostró una banda proteínica con una Mr (Movilidad relativa) aproximada de 28 kDa fue detectada en espermatozoides del cobayo no capacitado y capacitado, la cual es muy aproximada a la Mr reportada para Rac1 de 22 kDa. Además, no se observó ningún cambio en la movilidad relativa de la proteína entre los espermatozoides no capacitados y capacitados, UP71 se usó como control de carga y se corroboró por análisis densitométrico, como se muestra en la figura 10.

Rac1 es localizada en cabeza y flagelo en espermatozoides. Una vez que se determinó la presencia de Rac1, se procedió a realizar su localización en espermatozoides del cobayo no capacitado y capacitado mediante inmunofluorescencia indirecta. En los cuales se usó el mismo anticuerpo anti-Rac1 y visualizado con un anticuerpo secundario marcado con TRITC, mediante microscopia confocal se encontró que en los espermatozoides no capacitados Rac1 fue localizada en todo el acrosoma y a lo largo del flagelo, mientras que en los espermatozoides capacitados la proteína fue localizada en la zona apical del acrosoma y a lo largo del todo el flagelo (Fig.11).

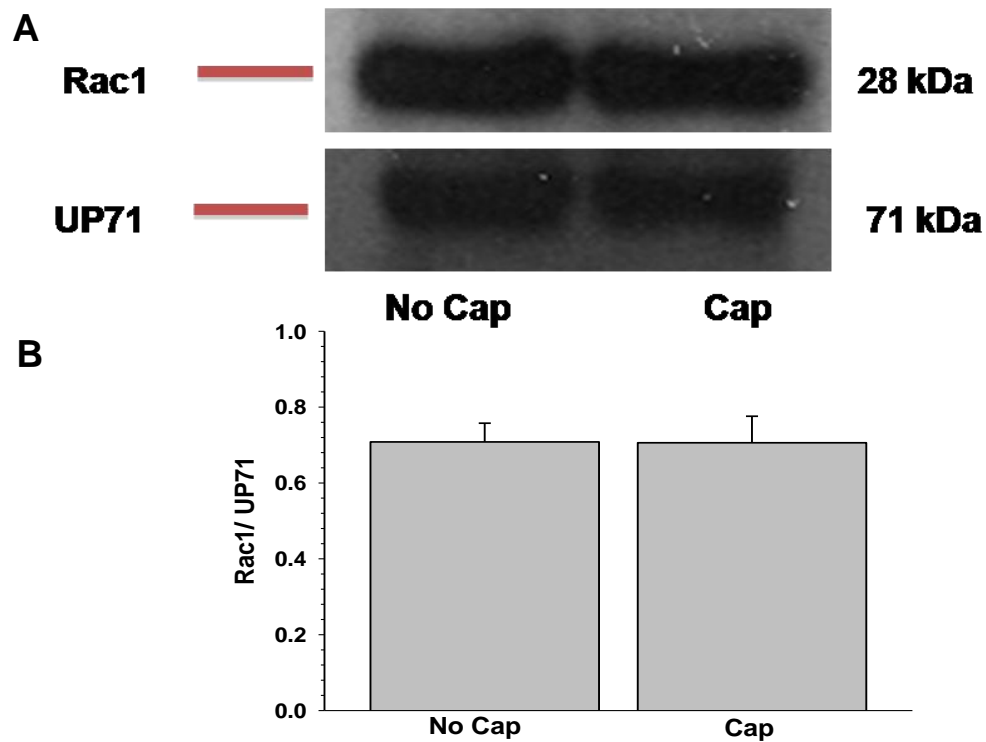


Figura 10. Inmunodetección de Rac1. (A) Extracto total proteínico de los espermatozoides del cobayo. Espermatozoides no capacitados= (No Cap) y espermatozoides capacitados por 60 minutos = (Cap) fueron sometidos a SDS-PAGE y a Western blot. Imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes. (B) Análisis densitométrico de los Wb de Rac1 (Promedio \pm S.E.M, n=3).

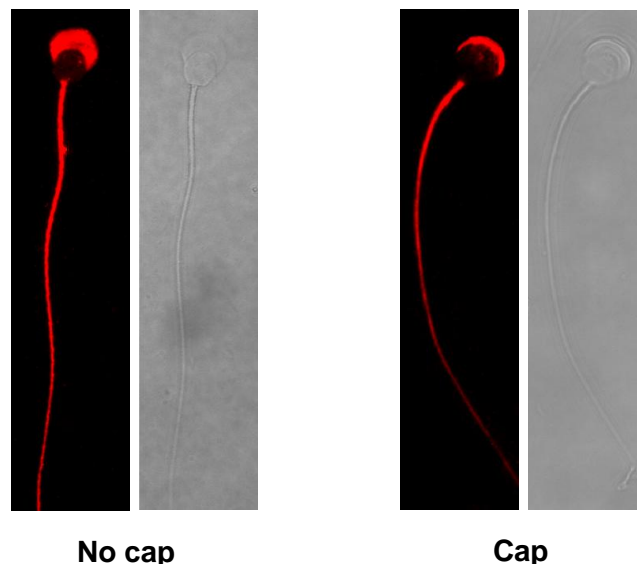


Figura 11. Localización de Rac1 por inmunofluorescencia indirecta en espermatozoides del cobayo. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. No Cap = no capacitados, Cap = capacitados por 60 min.

WAVE3 presente en el espermatozoide del cobayo. De acuerdo con los resultados anteriores y con los estudios realizados en otros tipos celulares que indican que Rac1 promueve la polimerización de la actina a través de su interacción con WAVE (Aspenstrom *et al.* 1996; Rohatgi *et al.* 2000), se evaluó la presencia de WAVE en los espermatozoides del cobayo, como efector, río abajo de Rac1, en el proceso de polimerización de actina F.

Para la inmunodetección de WAVE, las proteínas de extractos totales fueron separadas por PAGE-SDS y transferidas a membranas de Immobilon. Mediante el anticuerpos específicos contra las isoformas de WAVE 1/2/3, una banda proteínica con una Mr de 60 KDa se detectó tanto en espermatozoides del cobayo no capacitados como en los capacitados, que, por su Mr corresponde a la isoforma WAVE3 (Fig 12).

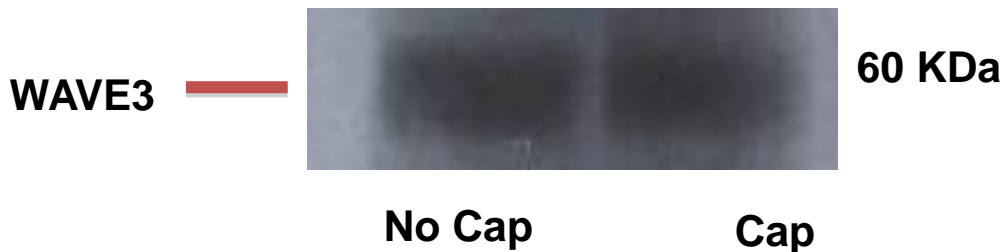


Figura 12. Inmunodetección de WAVE3. Extracto proteínico de espermatozoides del cobayo. Espermatozoides no capacitados (No Cap) y espermatozoides capacitados por 60 min. (Cap) fueron sometidos a SDS-PAGE y a Western Blot. Imagen representativa de al menos 3 experimentos independientes.

WAVE3 se localiza en el flagelo del cobayo. Una vez que se determinó la presencia de la isoforma 3 de WAVE, se procedió a localizarla en espermatozoides del cobayo no capacitados y capacitados mediante inmunofluorescencia indirecta. Para esto se usó el mismo anticuerpo anti-WAVE y se visualizó con un anticuerpo secundario marcado con CY5. Mediante microscopia confocal, WAVE3 se localizó a lo largo del flagelo tanto en los espermatozoides no capacitados como en los espermatozoides capacitados (Figura 13).

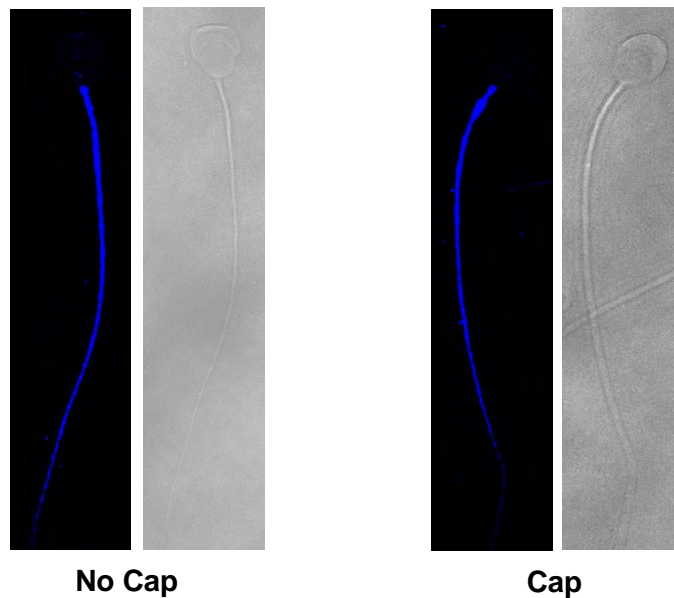


Figura 13. Localización de WAVE3 en espermatozoides de cobayo. Imágenes representativas de al menos 2 experimentos independientes. No Cap= no capacitados, Cap = capacitados por 60 min.

Rac1 con WAVE3 co-localizan en el flagelo. Para analizar la posible co-localización de Rac1 con WAVE3, se realizó inmunofluorescencia indirecta con marcaje doble y se analizó con microscopia confocal (Fig. 14). Tanto en espermatozoides no capacitados como en los capacitados, se utilizaron los mismos anticuerpos primarios para cada proteína y se acoplaron anticuerpos secundarios

conjugados con TRITC para Rac1 y con CY5 para WAVE3. La co-localización de Rac1 con WAVE3 fue observada predominantemente en el flagelo (Fig. 14).

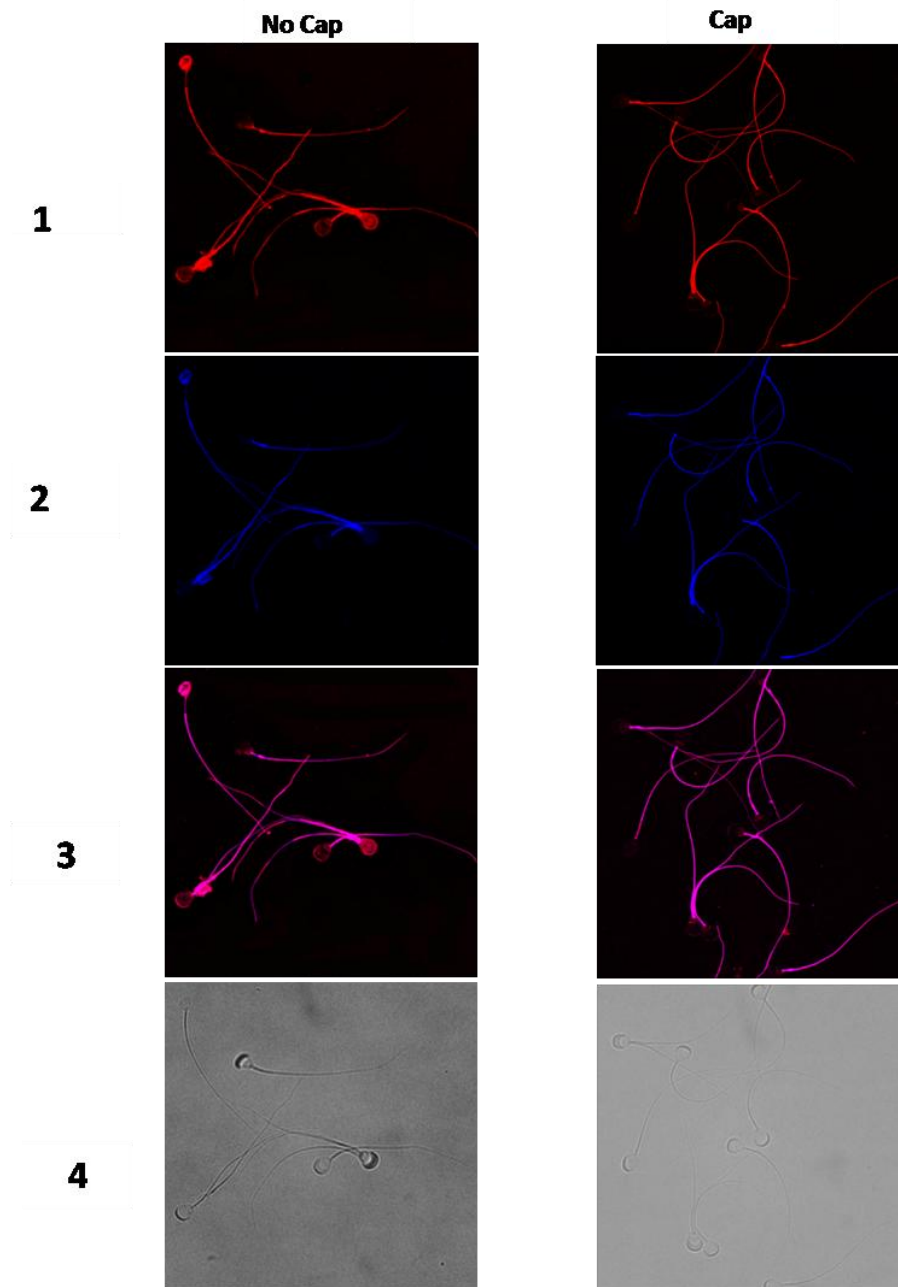


Figura 14. Co-localización de Rac1 con WAVE3 en espermatozoides del cobayo. 1) Localización de Rac1 (rojo). 2) Localización de WAVE3 (azul). 3) Merge (magenta). 4) Campo claro. No Cap= no capacitados, Cap = capacitados por 60 min. Imágenes representativas de al menos 2 experimentos independientes.

La capacitación y la reacción acrosomal no son inhibidas por NSC23766, inhibidor específico de Rac1. Para determinar el papel de Rac1 durante la capacitación de espermatozoides del cobayo, se utilizó NSC23766, un inhibidor específico de Rac1 utilizando las concentraciones 0, 10, 25, 50 y 100 μM durante 60 min. La reacción acrosomal se evaluó mediante la pérdida del acrosoma. El inhibidor NSC23766 no tuvo efecto sobre el proceso de capacitación ($P < 0.05$), como se muestra en la Fig. 15.

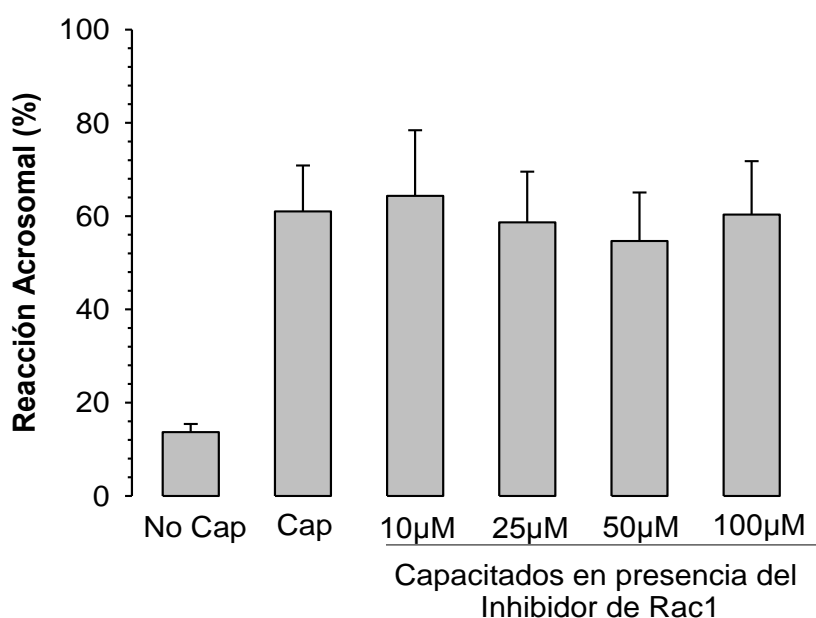


Figura 15. Efecto del NSC23766 en la capacitación y reacción acrosomal. Los espermatozoides del cobayo se capacitaron en medio MCM-PL en presencia de NSC23766, un inhibidor específico de Rac1. Los espermatozoides no capacitados se mantuvieron en solución NaCl a 0.154M. La imagen es el promedio de al menos de 3 experimentos independientes cada uno por duplicado (Promedio \pm S.E.M, $n=3$).

La inhibición de Rac1 altera la morfología y movilidad espermática.

Por otro lado, aunque NSC23766 no tuvo efecto ni sobre la capacitación ni en la reacción acrosomal, si lo tuvo sobre la morfología y la movilidad de flagelo del espermatozoide del cobayo. Mediante video de microscopia se observó que los espermatozoides no capacitados presentan una movilidad rápida y uniforme, mientras que los espermatozoides capacitados presentan una movilidad hiperactivada (Fig. 16A y B, respectivamente). Los espermatozoides tratados con 10 μM de NSC23766 (Fig. 16C), presentaron características similares a los capacitados, mientras que a partir de 25 μM (Fig. 16D), el flagelo comienza a curvarse y su movilidad a disminuir; en 50 μM (Fig. 16E), este efecto se vuelve más notorio, con los flagelos curvados y con una movilidad lenta; y a 100 μM (Fig. 16F), se observa una curvatura total del flagelo y una movilidad casi nula. Las imágenes de la Fig. 16 son representativas de los videos de microscopia.

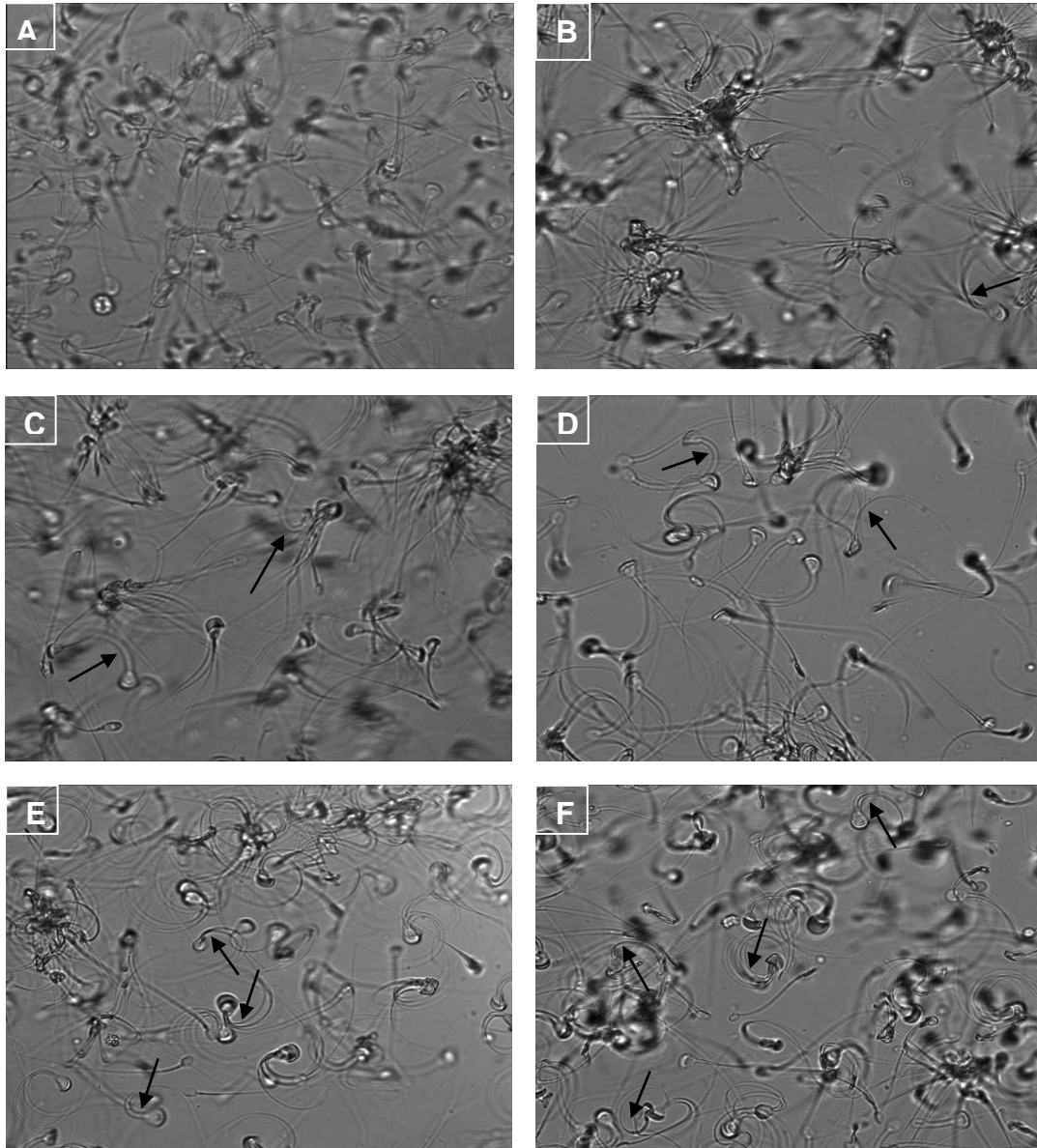


Figura 16. Efecto del inhibidor específico de Rac1 NSC23766, sobre la morfología y movilidad del flagelo del cobayo. Testigos: **A)** No capacitados y **B)** Capacitados a 60 min. NSC 23766 en concentraciones: **C)** 10 μ M; **D)** 25 μ M; **E)** 50 μ M y **F)** 100 μ M. Las flechas muestran espermatozoides curvados.

Efecto del inhibidor de Rac1 en la polimerización de actina. Para determinar si los efectos del inhibidor de Rac1 se deben a alteraciones en la polimerización de actina, se valoró la cantidad de actina-F en los espermatozoides no capacitados y capacitados en presencia del inhibidor. El análisis se realizó mediante el uso de la sonda faloidina-TRITC que se une a la actina-F. El análisis mostró los patrones de localización de actina-F. En los testigos no capacitados se observó una distribución de fluorescencia en todo el acrosoma, el segmento ecuatorial y a lo largo del flagelo, mientras que en los testigos capacitados sin NSC23766 (control de capacitación), se observó una fluorescencia distribuida en la zona apical del acrosoma así como en el segmento ecuatorial y a lo largo de todo el flagelo. En los capacitados en presencia del inhibidor NSC23766 se observaron los mismos patrones de distribución de fluorescencia en la zona apical del acrosoma que en los testigos, mientras que en el flagelo se observó una disminución de la fluorescencia Fig. 17 (A). Por lo que se procedió a cuantificar la actina-F presente a lo largo del flagelo en espermatozoides no capacitados (control 1) y capacitados por 60 min (control 2) y capacitados con el inhibidor de Rac1 100 μ M, esta última concentración se tomó por que es donde fue observado el máximo efecto del inhibidor sobre la morfología y movilidad del flagelo. En la gráfica de la Fig. 17 (B), se observó que en los espermatozoides tratados con NSC23766 tienden a una disminución en la fluorescencia, aunque esta no es significativa.

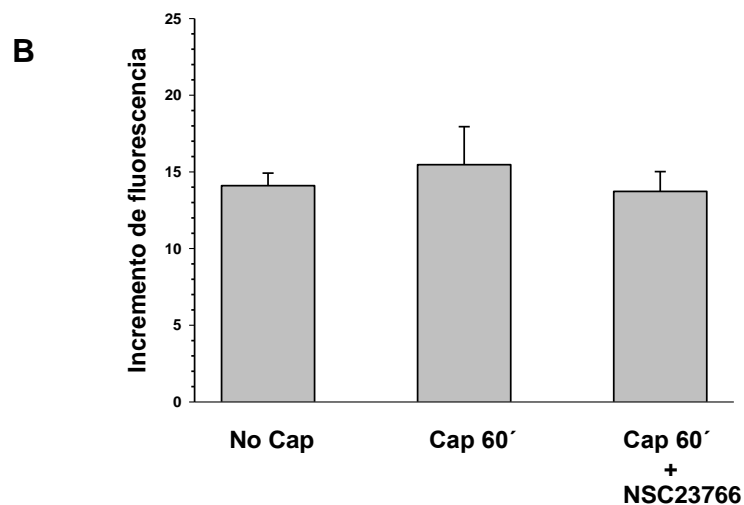
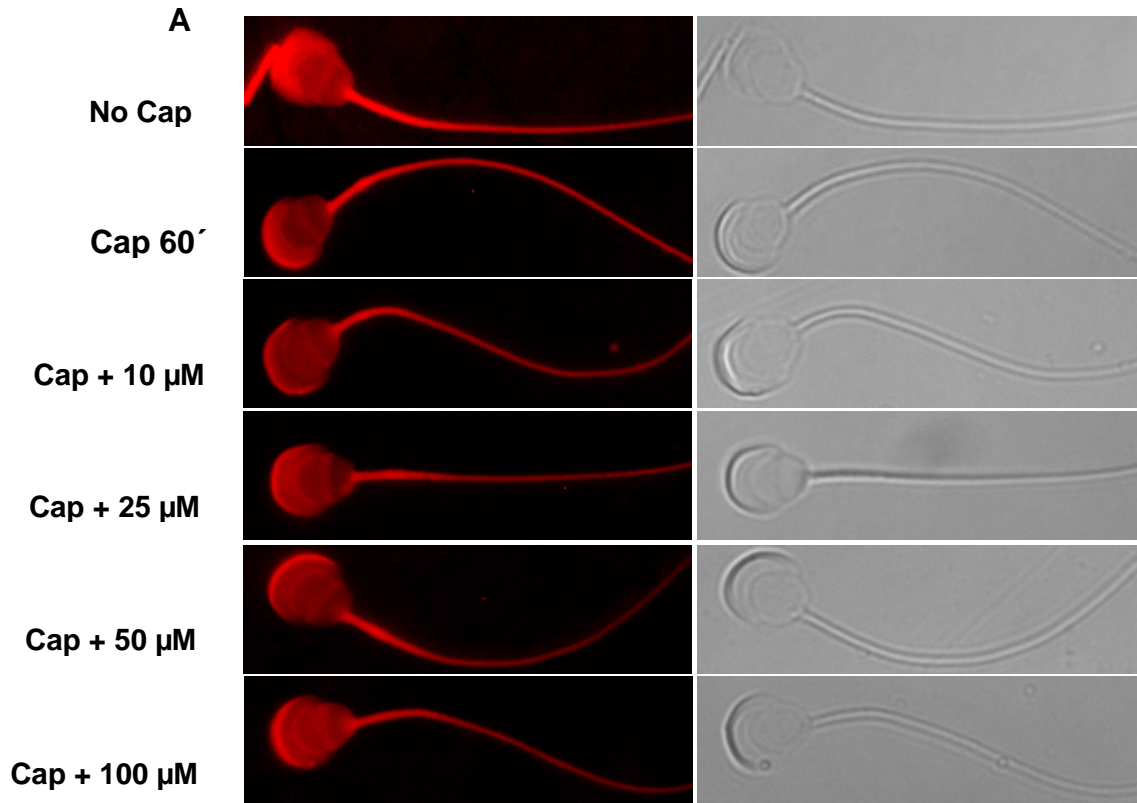


Fig. 17 Efecto del inhibidor de Rac1 en la polimerización de actina en espermática. A) Muestra una imagen representativa de cada tratamiento: No cap= no capacitados, Cap= capacitados 60 min y capacitados con diferentes concentraciones del NSC23766. **B)** Se muestra patrón de fluorescencia en no capacitados, capacitados 60 min y tratados con NSC23766 a 100 μ M. Imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes. No Cap= no capacitados, Cap = capacitados.

Discusión

La capacitación se define como las modificaciones funcionales que le otorgan al espermatozoide la habilidad para fecundar, habilidad que abarca la capacidad de los espermatozoides para unirse a la zona pelúcida y, posteriormente, producir: movilidad hiperactivada, la reacción acrosómica y la aptitud para unirse y fusionarse con la MP del óvulo (Bailey 2010). Se ha reportado que la polimerización de actina es esencial para el proceso de fecundación (Castellani-Ceresa *et al.* 1993).

La Actina se polimeriza durante la capacitación en las regiones ecuatorial y post-acrosomal, así como en el flagelo de espermatozoides de los mamíferos (Castellani-Ceresa *et al.* 1992; Moreno-Fierros *et al.* 1992; Castellani-Ceresa *et al.* 1993; Brener *et al.* 2003).

Este proceso es de suma importancia para la fecundación y, específicamente, para los procesos de fusión de las membranas espermática con la del óvulo, así como de la descondensación del núcleo espermático, ya que dichos procesos son inhibidos si la polimerización de actina es impedida durante la capacitación (Rogers *et al.* 1989; Sanchez-Gutierrez *et al.* 2002; Brener *et al.* 2003; Kumakiri *et al.* 2003) alterando drásticamente a la fertilidad. Sin embargo, es poco conocida cómo la polimerización de actina es regulada durante la capacitación.

Adicionalmente, la presencia en los espermatozoides de los mamíferos de proteínas que regulan la polimerización de actina en células somáticas, como son: proteínas de la familia Rho (RhoA, RhoB, Cdc42 y Rac1), Arp2/3, n-WASP y profilina (Delgado-Buenrostro *et al.* 2005; Ducummon & Berger 2006) o proteínas como ROCK, LIM y

cofilina (Fielder *et al.*, 2008), sugiere fuertemente la participación de las proteínas Rho en la capacitación, movilidad y reacción acrosomal de los espermatozoides, a través de la polimerización de actina. Por tanto, el propósito principal de este trabajo fue determinar el papel de una de estas proteínas Rho, Rac1, en los procesos espermáticos que lo habilitan para fecundar.

Los datos del presente trabajo muestran que Rac1 está localizada en la región acrosomal y el flagelo (Fig. 11), lo que sugiere que Rac1 podría estar relacionada con la capacitación, con la reacción acrosomal o con la movilidad espermática, especialmente por el hecho de que Rac1 durante la capacitación sufre un cambio de localización; de estar disperso por todo el acrosoma de los espermatozoides no capacitados, se relocaliza en la región apical del acrosoma en los espermatozoides capacitados (Fig. 12), lo que sugiere la posibilidad de que Rac1 se asocie con la MP durante la capacitación, pues, como sabemos, la interacción de Rac1 con la MP está relacionada con su activación (Cherfils & Zeghouf 2013).

Sin embargo, cuando los espermatozoides se capacitaron en presencia del inhibidor de Rac1 (NSC23766), la valoración de la reacción acrosomal después de 60 minutos de capacitación no fue diferente significativamente entre los espermatozoides no tratados y los tratados con el inhibidor (Fig. 15). Estos resultados anteriores sugieren que Rac1 no tiene una función central en la RA y, por consiguiente, en la capacitación, ya que la reacción acrosomal es dependiente de que la capacitación sea exitosa (Yanagimachi 1994); por lo que, si la capacitación hubiera sido inhibida por NSC23766, la reacción acrosomal también lo hubiera sido. Adicionalmente, la remodelación del citoesqueleto de actina que se produce durante la capacitación

tampoco se alteró por el inhibidor NSC23766, lo que indica que, posiblemente, la remodelación del citoesqueleto de actina en la región acrosomal es regulada por otra proteína Rho diferente a Rac1.

Datos recientes de nuestro laboratorio muestran que dicha remodelación pudiera ser regulada por Cdc42 (Angeles *et al.*, 2013; Baltierrez-Hoyos *et al.*, 2013). Otra posibilidad es que, en la región acrosomal de los espermatozoides no capacitados, Rac1 ya se encuentre activo o asociado con su GEF, lo que imposibilitaría al inhibidor NSC23766 para actuar, ya que es un compuesto de pirimidina que inhibe específica e irreversiblemente la actividad del intercambio de GDP/GTP, interfiriendo con la interacción entre Rac1 y sus GEFs específicos (Menna *et al.* 2010). Aunque se requiere de más estudios para verificar esta hipótesis y, de ser así, responder las siguientes preguntas: ¿Cuál es la razón por la que Rac1 está localizada en el acrosoma y qué función realizaría en esta región? y ¿Por qué Rac1 se relocaliza durante la capacitación?

Si bien los efectos observados sobre la inhibición de Rac1 con respecto a su posible no participación en la capacitación están relacionados con la región acrosomal, esta posibilidad no puede ser aplicada al flagelo, ya que los resultados muestran un claro efecto dependiente de la concentración de NSC23766 sobre la morfología y la movilidad espermática. El inhibidor de Rac1 produjo una clara curvatura del flagelo, así como su inmovilización, posiblemente esto se deba a una alteración de la estructura flagelar, y aunque se sugirió que esto podría deberse a cambios en la cantidad de actina-F, esto solo se ha mostrado como una tendencia que requiere ser comprobada.

Existen evidencia de una comunicación cruzada entre actina y microtúbulos vía GTPasas Rho, por ejemplo IQGAP1, un efector de Rac1 y Cdc42, interactúa con CLIP-170, una proteína de unión en los extremos crecientes de los microtúbulos, la perturbación de la interacción altera la estructura de los microtúbulos (Fukata *et al.* 2002). PAK, otro efector de Rac1 y Cdc42, quien fosforila a stathmina, que, en este estado, se une a los microtúbulos y los desestabiliza (Daub *et al.* 2001; Wittmann *et al.* 2004). Estos datos indican que varios efectores de Rac1 y Cdc42, juegan un papel en la regulación de la comunicación cruzada entre actina y microtúbulos (Montenegro-Venegas *et al.* 2010).

Con base en lo reportado en la literatura y en nuestros resultados sobre la curvatura observada en el flagelo, proponemos que Rac1 podría estar regulando la morfología y la movilidad a través de los microtúbulos presentes en el axonema del flagelo. Sería muy interesante investigar si las proteínas de esta vía de señalización se presentan en los espermatozoides, si se encuentran asociadas y si la inhibición de RAC1 altera la interacción con ellas y, por consiguiente, altera la estructura del axonema.

Por otro lado, la inhibición de Rac1 también disminuyó la movilidad de los espermatozoides de manera dependiente de concentración, este efecto puede ser debido directamente a la alteración de la morfología flagelar. Sin embargo, datos de nuestro laboratorio muestran que, en espermatozoides de ratón cuando son capacitados en presencia de NSC23766, la morfología del flagelo no se altera, pero si se inhibe la movilidad (datos no mostrados).

Lo anterior sugiere que, aunque Rac1 podría participar tanto en la capacitación como en la movilidad, las vías de regulación podrían ser diferentes, razón por lo que el inhibidor de Rac1 solo tenga efecto sobre la movilidad, como ya hemos discutido anteriormente.

En la remodelación del citoesqueleto de actina, se sabe que las proteínas WAVES regulan este proceso río-debajo de las GTPasas Rho. Especialmente, se ha demostrado que la GTPasa Rac actúa río-arriba de las proteínas WAVE promoviendo su actividad de polimerización (Aspenstrom *et al.* 1996; Rohatgi *et al.* 1999; Rohatgi *et al.* 2000; Miki & Takenawa 2003; Stradal *et al.* 2004).

Debido a que Rac1 activa WAVE1 en células somáticas durante la reorganización de actina (Miki *et al.* 1998), sugerimos que, en el espermatozoide de cobayo, la remodelación de actina espermática es regulada por el mismo mecanismo. En este trabajo se demostró la presencia de la isoforma WAVE3 (Fig. 12) y su localización fue, principalmente, a lo largo del flagelo (Fig.13). Posteriormente, se observó la co-localización de Rac1 con WAVE3 a lo largo del flagelo en espermatozoides no capacitados y capacitados (Fig.14).

Estos resultados nos proponen que se presenta interacción entre ambas proteínas y su participación probable en la polimerización de actina en el flagelo. Hasta ahora, solo el estudio por Rawe *et al.* 2004, en espermatozoides maduros de cuatro especies diferentes, ha reportado que WAVE1 se localiza únicamente en la vaina mitocondrial y Rac1 en el segmento ecuatorial, la región post-acrosomal y la vaina mitocondrial; en esta última Rac1 y WAVE1 co-localizan, sugiriendo la posibilidad de

una unidad de señalización funcional establecida por WAVE1 y sus proteínas asociadas en la pieza media del espermatozoide maduro (Rawe *et al.* 2004).

La movilidad espermática es necesaria para el transporte del DNA masculino al óvulo (Inaba 2011). Se sabe que la mayoría de los espermatozoides en los mamíferos realizan dos fases de movilidad: la fase de movilidad activa, que se observa al ser eyaculados y la fase de hiperactivación, la que es resultado de la capacitación (Suarez & Osman 1987).

El batido del flagelo en la fase activa es simétrico, de poca amplitud y permite el desplazamiento relativamente recto del espermatozoide (Vernon & Woolley 2004). A diferencia de la fase de hiperactivación, en la cual el movimiento del flagelo se caracteriza por ser vigoroso, asimétrico, de gran amplitud, alta velocidad y baja progresión (Ishijima *et al.* 2002).

La capacitación del espermatozoide involucra la polimerización de actina y el desarrollo de una movilidad hiperactivada. En estudios previos muestran que la actina F está involucrada en la movilidad espermática (Brener *et al.* 2003; Cohen *et al.* 2004; Itach *et al.* 2011). Adicionalmente, se ha reportado que hay una conexión entre la polimerización de actina y la movilidad celular en otros tipos celulares (Carlier *et al.* 2003; Bernheim-Groswasser *et al.* 2005). En este trabajo se muestran que en los espermatozoides capacitados hay una distribución de actina en la zona apical del acrosoma y segmento ecuatorial y un incremento de actina F a lo largo del flagelo en comparación con los espermatozoides no capacitados, mientras que los tratados con el NSC23766, presentan las mismas características en la zona apical, pero una disminución de actina-F a lo largo del flagelo (Fig.17 A). Sugiriendo que el

complejo Rac1/WAVE3 podría estar participando en la movilidad espermática a través de la polimerización de actina.

Para corroborar estos resultados, cuantificamos la cantidad de actina-F presente en espermatozoides no capacitados y capacitados en ausencia o presencia de NSC23766 (Fig. 17B). Los resultados muestran que NSC23766 inhibió la tendencia a incrementar la polimerización de actina F durante la capacitación (Fig. 17B). Aunque solo como una tendencia, estos resultados sugieren que Rac1 podría regular la movilidad flagelar a través de la polimerización de actina, sin embargo se requiere profundizar la investigación para definir claramente si esta hipótesis es verdadera.

Por otro lado, se ha sugerido que Rac1 es esencial para la actividad de los canales de Na⁺ epiteliales (ENaC) en células somáticas y los regula vía proteínas WAVE (Karpushev *et al.* 2011). Rac1 tiene una función fundamental en la activación de la familia Nox de las NADPH oxidasas (Miyano & Sumimoto ; Griendling *et al.* 2000), que juegan un papel integral en la regulación de los ENaC (Goodson *et al.* 2012), que se ha localizado en el acrosoma y pieza media de los espermatozoides de ratón (Hernandez-Gonzalez *et al.* 2006). Este último hallazgo nos ha llevado a postular la hipótesis de que Rac1 participa en la movilidad espermática a través de esta vía. Sin embargo, el papel funcional exacto de estas proteínas en el espermatozoide sigue abierto a investigación.

Conclusiones

- ✓ La proteína Rac1, a pesar de encontrarse presente en el acrosoma, parece no tener una participación directa en la regulación de la capacitación ni de la reacción acrosomal en espermatozoides de cobayo.
- ✓ Rac1 está relacionada con la regulación de la movilidad y la estabilidad morfológica del flagelo, posiblemente a través de la polimerización de actina.
- ✓ WAVE3 se sugiere que está involucrado en el mecanismo por el cual Rac1 regular la movilidad y la morfología del flagelo.

Perspectivas

1. Caracterizar los cambios morfológicos producidos por la inhibición de Rac1 a nivel ultraestructural, con el fin de determinar si se producen cambios en las estructuras citoesqueléticas del flagelo.
2. Determinar cuál es la función de Rac1 en la región acrosomal.
3. Determinar si Rac1 participa en la regulación del axonema flagelar a través de la interacción con proteínas efectoras que asociadas con los microtúbulos y así como verificar la presencia de estas proteínas en el espermatozoide del cobayo.
4. Determinar si Rac1 regula la actividad de los ENac a través de su interacción con WAVE3 en pieza media y si esta vía participa en la movilidad del flagelo en espermatozoides del cobayo.

Bibliografía

- Abou-Haila A , Tulsiani DR (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys.* **379**, 173-182.
- Aspenstrom P, Fransson A , Saras J (2004). Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* **377**, 327-337.
- Aspenstrom P, Lindberg U , Hall A (1996). Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Biol.* **6**, 70-75.
- Bailey JL (2010). Factors regulating sperm capacitation. *Syst Biol Reprod Med.* **56**, 334-348.
- Baltz JM, Williams PO , Cone RA (1990). Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol Reprod.* **43**, 485-491.
- Bement WM, Miller AL , von Dassow G (2006). Rho GTPase activity zones and transient contractile arrays. *Bioessays.* **28**, 983-993.
- Bernheim-Groswasser A, Prost J , Sykes C (2005). Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram. *Biophys J.* **89**, 1411-1419.
- Bishop AL , Hall A (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* **348 Pt 2**, 241-255.
- Bleil JD , Wassarman PM (1983). Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol.* **95**, 317-324.
- Breitbart H, Cohen G , Rubinstein S (2005). Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Reproduction.* **129**, 263-268.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J , Breitbart H (2003). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod.* **68**, 837-845.
- Brown JL, Stowers L, Baer M, Trejo J, Coughlin S , Chant J (1996). Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr Biol.* **6**, 598-605.
- Buccione R, Schroeder AC , Eppig JJ (1990). Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod.* **43**, 543-547.
- Carlier MF, Le Clainche C, Wiesner S , Pantaloni D (2003). Actin-based motility: from molecules to movement. *Bioessays.* **25**, 336-345.
- Castellani-Ceresa L, Brivio MF , Radaelli G (1992). F-actin in acrosome-reacted boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* **33**, 99-107.
- Castellani-Ceresa L, Mattioli M, Radaelli G, Barboni B , Brivio MF (1993). Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. *Mol Reprod Dev.* **36**, 203-211.
- Castellano LE, Martinez-Cadena G, Lopez-Godinez J, Obregon A , Garcia-Soto J (1997). Subcellular localization of the GTP-binding protein Rho in the sea urchin sperm. *Eur J Cell Biol.* **74**, 329-335.
- Cohen G, Rubinstein S, Gur Y , Breitbart H (2004). Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Dev Biol.* **267**, 230-241.

- Coleman ML, Marshall CJ , Olson MF (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**, 355-366.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW , Hanson FW (1988). Induction of acrosome reactions by the human zona pellucida. *Biol Reprod.* **38**, 235-244.
- Cherfils J , Zeghouf M (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev.* **93**, 269-309.
- Chiu TT, Jensen TE, Sylow L, Richter EA , Klip A (2011). Rac1 signalling towards GLUT4/glucose uptake in skeletal muscle. *Cell Signal.* **23**, 1546-1554.
- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Trevino CL, Felix R , Beltran C (2005). Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol.* **243**, 79-172.
- Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A , Hall A (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem.* **276**, 1677-1680.
- Delgado-Buenrostro NL, Hernandez-Gonzalez EO, Segura-Nieto M , Mujica A (2005). Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol Reprod Dev.* **70**, 198-210.
- Ducummon CC , Berger T (2006). Localization of the Rho GTPases and some Rho effector proteins in the sperm of several mammalian species. *Zygote.* **14**, 249-257.
- Eddy EM, Toshimori K , O'Brien DA (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* **61**, 103-115.
- Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M , Kirschner MW (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature.* **418**, 790-793.
- Ehrenwald E, Foote RH , Parks JE (1990). Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol Reprod Dev.* **25**, 195-204.
- Ellenbroek SI , Collard JG (2007). Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis.* **24**, 657-672.
- Escalier D , Albert M (2006). New fibrous sheath anomaly in spermatozoa of men with consanguinity. *Fertil Steril.* **86**, 219 e211-219.
- Etienne-Manneville S , Hall A (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature.* **420**, 629-635.
- Fawcett DW (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol.* **44**, 394-436.
- Franken DR, Bastiaan HS , Oehninger SC (2000). Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genet.* **17**, 374-378.
- Frost JA, Xu S, Hutchison MR, Marcus S , Cobb MH (1996). Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol Cell Biol.* **16**, 3707-3713.
- Fukata M, Watanabe T, Noritake J, Nakagawa M, Yamaga M, Kuroda S, Matsuura Y, Iwamatsu A, Perez F , Kaibuchi K (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell.* **109**, 873-885.
- Goodson P, Kumar A, Jain L, Kundu K, Murthy N, Koval M , Helms MN (2012). NADPH oxidase regulates alveolar epithelial sodium channel activity and lung fluid balance in vivo via O₂⁻(2) signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **302**, L410-419.

- Griendling KK, Sorescu D , Ushio-Fukai M (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* **86**, 494-501.
- Gu J, Sumida Y, Sanzen N , Sekiguchi K (2001). Laminin-10/11 and fibronectin differentially regulate integrin-dependent Rho and Rac activation via p130(Cas)-CrkII-DOCK180 pathway. *J Biol Chem.* **276**, 27090-27097.
- Gupta SK , Bhandari B Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J Androl.* **13**, 97-105.
- Hall A (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* **279**, 509-514.
- Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A , Stossel TP (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell.* **82**, 643-653.
- Hernandez-Gonzalez EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, Lopez-Gonzalez I, Demarco I, Wertheimer E, Darszon A , Visconti PE (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem.* **281**, 5623-5633.
- Hinsch E, Boehm JG, Groeger S, Mueller-Schloesser F , Hinsch KD (2003). Identification of cytokeratins in bovine sperm outer dense fibre fractions. *Reprod Domest Anim.* **38**, 155-160.
- Honda A, Siruntawineti J , Baba T (2002). Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update.* **8**, 405-412.
- Inaba K (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci.* **20**, 1043-1056.
- Inaba K (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *Mol Hum Reprod.* **17**, 524-538.
- Inoue N, Satouh Y, Ikawa M, Okabe M , Yanagimachi R (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 20008-20011.
- Ishijima S, Baba SA, Mohri H , Suarez SS (2002). Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* **61**, 376-384.
- Itach SB, Finklestein M, Etkovitz N , Breitbart H (2011). Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by phospholipase D-dependent actin polymerization. *Dev Biol.* **362**, 154-161.
- Karpushev AV, Levchenko V, Ilatovskaya DV, Pavlov TS , Staruschenko A (2011). Novel role of Rac1/WAVE signaling mechanism in regulation of the epithelial Na⁺ channel. *Hypertension.* **57**, 996-1002.
- Kiyokawa E, Hashimoto Y, Kobayashi S, Sugimura H, Kurata T , Matsuda M (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev.* **12**, 3331-3336.
- Kjoller L , Hall A (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res.* **253**, 166-179.
- Kumakiri J, Oda S, Kinoshita K , Miyazaki S (2003). Involvement of Rho family G protein in the cell signaling for sperm incorporation during fertilization of mouse eggs: inhibition by Clostridium difficile toxin B. *Dev Biol.* **260**, 522-535.
- Llanos MN, Morales P , Rizzo MS (1993). Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J Exp Zool.* **267**, 209-216.

- Machesky LM , Insall RH (1999). Signaling to actin dynamics. *J Cell Biol.* **146**, 267-272.
- Menna P, Cardama GA, Comin MJ, Alonso DF , Gomez DE (2010). [Rho GTPases as therapeutic targets in cancer and other human diseases]. *Medicina (B Aires).* **70**, 555-564.
- Mertens AE, Roovers RC , Collard JG (2003). Regulation of Tiam1-Rac signalling. *FEBS Lett.* **546**, 11-16.
- Miki H, Suetsugu S , Takenawa T (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* **17**, 6932-6941.
- Miki H , Takenawa T (2003). Regulation of actin dynamics by WASP family proteins. *J Biochem.* **134**, 309-313.
- Miyano K , Sumimoto H Assessment of the role for Rho family GTPases in NADPH oxidase activation. *Methods Mol Biol.* **827**, 195-212.
- Montenegro-Venegas C, Tortosa E, Rosso S, Peretti D, Bollati F, Bisbal M, Jausoro I, Avila J, Caceres A , Gonzalez-Billault C (2010). MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Mol Biol Cell.* **21**, 3518-3528.
- Moreno-Fierros L, Hernandez EO, Salgado ZO , Mujica A (1992). F-actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Mol Reprod Dev.* **33**, 172-181.
- Nagata K, Puls A, Futter C, Aspenstrom P, Schaefer E, Nakata T, Hirokawa N , Hall A (1998). The MAP kinase kinase kinase MLK2 co-localizes with activated JNK along microtubules and associates with kinesin superfamily motor KIF3. *EMBO J.* **17**, 149-158.
- Narumiya S (1996). The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem.* **120**, 215-228.
- Norman JC, Price LS, Ridley AJ , Koffer A (1996). The small GTP-binding proteins, Rac and Rho, regulate cytoskeletal organization and exocytosis in mast cells by parallel pathways. *Mol Biol Cell.* **7**, 1429-1442.
- Ortiz-Sanchez JM, Nichols SE, Sayyah J, Brown JH, McCammon JA , Grant BJ (2012). Identification of potential small molecule binding pockets on Rho family GTPases. *PLoS One.* **7**, e40809.
- Phillips DM (1977). Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J Ultrastruct Res*, 144-154.
- Rawe VY, Ramalho-Santos J, Payne C, Chemes HE , Schatten G (2004). WAVE1, an A-kinase anchoring protein, during mammalian spermatogenesis. *Hum Reprod.* **19**, 2594-2604.
- Ridley AJ, Comoglio PM , Hall A (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol.* **15**, 1110-1122.
- Rodriguez-Martinez H (2007). Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology.* **68 Suppl 1**, S138-146.
- Rogers BJ, Bastias C, Coulson RL , Russell LD (1989). Cytochalasin D inhibits penetration of hamster eggs by guinea pig and human spermatozoa. *J Androl.* **10**, 275-282.
- Rohatgi R, Ho HY , Kirschner MW (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol.* **150**, 1299-1310.

- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T , Kirschner MW (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*. **97**, 221-231.
- Sahai E , Marshall CJ (2002). RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer*. **2**, 133-142.
- Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J , Visconti PE (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl*. **65**, 245-259.
- Sanchez-Gutierrez M, Contreras RG , Mujica A (2002). Cytochalasin-D retards sperm incorporation deep into the egg cytoplasm but not membrane fusion with the egg plasma membrane. *Mol Reprod Dev*. **63**, 518-528.
- Schmandke A , Strittmatter SM (2007). ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. **13**, 454-469.
- Schmitz AA, Govek EE, Bottner B , Van Aelst L (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*. **261**, 1-12.
- Si Y , Okuno M (1993). The sliding of the fibrous sheath through the axoneme proximally together with microtubule extrusion. *Exp Cell Res*. **208**, 170-174.
- Siesser PM , Hanks SK (2006). The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clin Cancer Res*. **12**, 3233-3237.
- Sprang SR (1997). G proteins, effectors and GAPs: structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol*. **7**, 849-856.
- Stradal TE, Rottner K, Disanza A, Confalonieri S, Innocenti M , Scita G (2004). Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol*. **14**, 303-311.
- Suarez SS , Osman RA (1987). Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod*. **36**, 1191-1198.
- Suarez SS , Pacey AA (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update*. **12**, 23-37.
- Sun F, Bahat A, Gakamsky A, Girsh E, Katz N, Giojalas LC, Tur-Kaspa I , Eisenbach M (2005). Human sperm chemotaxis: both the oocyte and its surrounding cumulus cells secrete sperm chemoattractants. *Hum Reprod*. **20**, 761-767.
- Takai Y, Sasaki T , Matozaki T (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. **81**, 153-208.
- Teramoto H, Coso OA, Miyata H, Igishi T, Miki T , Gutkind JS (1996). Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem*. **271**, 27225-27228.
- Travis AJ , Kopf GS (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin Invest*. **110**, 731-736.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A, Loeser CR , Pereira BM (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res*. **240**, 151-164.
- Vadnais ML, Galantino-Homer HL , Althouse GC (2007). Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl*. **53**, 109-123.

- Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A , Sander C (1991). The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry*. **30**, 4637-4648.
- Van Aelst L , D'Souza-Schorey C (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. **11**, 2295-2322.
- Vernon GG , Woolley DM (2004). Basal sliding and the mechanics of oscillation in a mammalian sperm flagellum. *Biophys J*. **87**, 3934-3944.
- Vetter IR , Wittinghofer A (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. **294**, 1299-1304.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P , Kopf GS (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. **121**, 1129-1137.
- Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P , Kopf GS (1995b). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development*. **121**, 1139-1150.
- Wennerberg K , Der CJ (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*. **117**, 1301-1312.
- Wittmann T, Bokoch GM , Waterman-Storer CM (2004). Regulation of microtubule destabilizing activity of Op18/stathmin downstream of Rac1. *J Biol Chem*. **279**, 6196-6203.
- Yanagimachi R (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. **2**, 371-372.
- Yin L, Chung CM, Huo R, Liu H, Zhou C, Xu W, Zhu H, Zhang J, Shi Q, Wong HY, Chen J, Lu Y, Bi Y, Zhao C, Du Y, Ma M, Cai Y, Chen WY, Fok KL, Tsang LL, Li K, Ni Y, Chung YW, Zhou Z, Sha J , Chan HC (2009). A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cell Mol Life Sci*. **66**, 900-908.

Anexo

a) Solución isotónica (NaCl a 0.154M)

Diluir 4.5g de NaCl en 500 ml de agua destilada

b) PBS 10X

Para preparar el PBS a 10x pH7.4 (para un litro)

a. Se pesan los siguientes reactivos:

Cloruro de Sodio (NaCl)= 80g

Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4)= 2g

Fosfato de Sodio Dibásico 7•hidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)= 21.7g

Cloruro de Potasio (KCl)= 2g

b. Los reactivos se disuelven en 950mL de agua desionizada con ayuda de un agitador magnético.

c. Se ajusta el pH a 7.4

d. Se afora a 1000mL con agua desionizada. Se pasa el PBS a un recipiente para almacenarlo.

c) PBS-Tritón X100 al 0.1%

Tomar 99ml de PBS 1x y 1ml de tritón X-100 y homogenizar.

d) Medio MCM-PL (medio capacitante)

Se realizaron stocks 10X de los cuales se pesaron:

- 3.0705g de NaCl
- 0.1257g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 1.05305g 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 0.00138g de piruvato de sodio, se mide el pH para ajustar a 7.8 y posteriormente se aforó a 50ml. Se realizan alícuotas para posteriormente guardar a -20°C

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

e) Amortiguador de lisis para proteínas

Para preparar 2ml,

A 527 μl de los componentes del amortiguador de lisis, poner lo que lo que resta de PBS (1473 μl)

Componentes	Cantidad	Stocks	[] deseada
NP 40	20µl		
Iodeacetamida	20µl	1mg/ml	10mg/ml
Inhibidor de Tripsina	2µl	1mg/ml	1mg/ml
Benzamidina	100µl	1mg/ml	50mg/ml
Pepstatina	5µl	2mg/ml	2mg/ml
Leupeptina	5µl	2mg/ml	2mg/ml
Aprotinina	5µl	2mg/ml	4mg/ml
PMSF 10X	50µl	10X (DMSO)	1nM
Complete	50µl	1 tableta /1ml de H ₂ O	
Suma	267µl		

f) **Gel separador**

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

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

- 0.1mL de 10% APS
- 0.004mL de TEMED

g) Gel Concentrador

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

2.7mL de agua

0.67mL de 30% de acrilamida mix

0.5mL de 1M tris (pH 6.8)

0.04mL de 10% SDS

0.04mL de 10% APS

0.004mL de TEMED

- **Solución de monómeros o 30% de Acrilamida mix**

1. En un recipiente se adiciona:

- ✓ 30g de Acrilamida
- ✓ 0.8g de Bis acrilamida
- ✓ Agua desionizada cbp 100 mL

2. Se filtra y se guarda en la oscuridad

- **Lauril sulfato de sodio (SDS) al 10%**

1. Se pesa 10g de lauril sulfato de sodio en un recipiente
2. Se afora a 100mL con agua desionizada

- **Persulfato de amonio (APS) al 10%**

1. Se pesó 0.1g de Persulfato de Amonio en un tubo eppendorf
2. Adicionar 1mL de agua desionizada.

- **Tris 1.5M pH 8.8**

1. Se pesó 91g de Tris y se diluyen en 300 ml de agua desionizada
2. Se ajusta el pH a 8.8
3. Se afora a 500mly se filtra.

- **Tris 1M pH 6.8**

4. Se pesó 24.22g de Tris y se diluyen en 100 ml de agua desionizada
5. Se ajusta el pH a 6.8
6. Se afora a 200mly se filtra

h) **Amortiguador de Tricina 10X**

En un recipiente se diluyen con agua destilada:

- ✓ 121.1g de Tris base al 0.1M
- ✓ 179.2g de Tricina 0.1M
- ✓ 10g de SDS al 1%

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

i) Buffer de Laemli 3X

Para 10 ml de buffer se disuelven:

- 1.5 ml Tris 0.125M pH=6.8
- 3ml de glicerol al 50%
- 5ml de SDS al 10%
- 0.5ml de 2 – mercaptoetanol al 10%
- 1mg de azul de bromofenol al 0.005%

j) Buffer de Corrida: (tris 0.025M – Glicina 0.192 M – SDS 0.1%) 10X

1. En un recipiente se diluyeron con agua desionizada:

- ✓ 30g de Tris base
- ✓ 144g de Glicina
- ✓ 10g de SDS

Se afora a 1L de agua desionizada

k) Amortiguador de Transferencia (para un litro)

Se diluyen en 200 ml de agua hélix

- 200ml de Metanol
- 100ml de Glicina 10X mas Tris

l) Solución de bloqueo para WB

Para 100ml de solución se pesan 5g de leche en polvo descremada

Se diluyen en 100ml de PBS–Tritón

m) Solución fijadora: Formaldehído al 4% y Glutaraldehído al 0.2%

- Del Glutaraldehído al 25% se tomaran 800µl para obtener una concentración de 0.2%
- Del Formaldehido al 36% se tomaran 8.3ml para obtener una concentración al 4%
- Se afora a 100ml con PBS 1X

n) Cloruro de amonio (NH₄Cl) 50mM

- Se pesan 0.1337g de NH₄Cl
- Se diluirán en 50ml de PBS 1X

o) Solución Bloqueadora:

- BSA al 1% diluida en PBS



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00116

Matrícula: 2113801417

PARTICIPACION DE LA GTPasa
Racl EN LA CAPACITACION Y
REACCION ACROSOMAL

En México, D.F., se presentaron a las 11:30 horas del día 29 del mes de octubre del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ
DRA. EDITH ARENAS RIOS
DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES



DANELIA RAMIREZ RAMIREZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: DANELIA RAMIREZ RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III 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.

REVISO

LIC. JULIO CESAR DE LARA SASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

DR. EDMUNDO BONILLA GONZALEZ

VOCAL

DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

SECRETARIA

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES