



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA



**POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

***“Identificación de residuos de carbohidratos de proteínas asociadas a balsas lipídicas (rafts) de espermatozoides de cerdo”***

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**PRESENTA**

**José Benito López Salguero**

**Directora: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**

**Asesora: Dra. Irma Jiménez Morales**

**Asesor: Dr. Humberto González Márquez**

**Asesor: Dr. José Antonio Herrera Barragán**

**México, D. F. a 14 de Diciembre de 2011.**

# COMITÉ TUTORIAL

## DIRECTORA

**Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana**

**Depto. de Ciencias de la Salud, D.C.B.S. U.A.M.-I.**

**[reyna@xanum.uam.mx](mailto:reyna@xanum.uam.mx)**

## ASESORA

**Dra. Irma Jiménez Morales**

**Depto. de Ciencias de la Salud, D.C.B.S. U.A.M.-I.**

**[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.mx)**

## ASESOR

**Dr. Humberto González Márquez**

**Depto. de Ciencias de la Salud, D.C.B.S. U.A.M.-I.**

**[hgm@xanum.uam.mx](mailto:hgm@xanum.uam.mx)**

## ASESOR

**Dr. José Antonio Herrera Barragán**

**Unidad de Manejo y Aprovechamiento Sustentable de Vida Silvestre.**

**DGVS-CR.IN-917-MEX/06**

**Depto. de Producción Agrícola y Animal, D.C.B.S. U.A.M.-X**

**[mvzjoseherrera@yahoo.com.mx](mailto:mvzjoseherrera@yahoo.com.mx)**

# **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Andrología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana.

CON APOYO FINANCIERO DE:

CONACYT PROYECTO 0105961/I01110/194/09.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.

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

El trabajo que aquí se plasma es la suma de esfuerzos compartidos del comité tutorial, compañeros de laboratorio, familiares y amigos.

Agradezco a mi Directora de tesis la Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana, por todo el apoyo que me ha brindado, por sus consejos y la instrucción profesional que ha contribuido de manera importante en mi formación académica.

A la Dra. Irma Jiménez Morales por su aportación de conocimientos, consejos y apoyo dentro del laboratorio.

Al Dr. Humberto González Márquez por todo el conocimiento que me transmitió, sus correcciones, creatividad que ha dejado una huella en mi vida.

Al Dr. José Antonio Herrera Barragán por sus aportaciones, consejos y sugerencias.

A todos los profesores y profesoras de la UAM-I que me han impartido clases.

A todos los miembros del jurado.

A todos mis compañeros y amigos.

A mi querida mamá Luisa Salguero Lachino quien siempre me animó a estudiar.

Gracias a Dios porque he podido concluir una etapa muy importante en mi formación profesional.

## **MIEMBROS DEL JURADO**

**Dra. Irma Jiménez Morales**

**Depto. de Ciencias de la Salud, D.C.B.S. U.A.M.-I.**

**[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.mx)**

**Dr. Humberto González Márquez**

**Depto. de Ciencias de la Salud, D.C.B.S. U.A.M.-I.**

**[hqm@xanum.uam.mx](mailto:hqm@xanum.uam.mx)**

**Dr. José Antonio Herrera Barragán**

**Unidad de Manejo y Aprovechamiento Sustentable de Vida Silvestre.**

**DGVS-CR.IN-917-MEX/06**

**Depto. De Producción Agrícola y Animal, D.C.B.S. U.A.M.-X**

**[mvzjoseherrera@yahoo.com.mx](mailto:mvzjoseherrera@yahoo.com.mx)**

**Dr. José Luis Contreras Montiel**

**Depto. de Biología de la Reproducción, D.C.B.S. U.A.M.-I.**

**[jlcm@xanum.uam.mx](mailto:jlcm@xanum.uam.mx)**

## JURADO DE EXAMEN

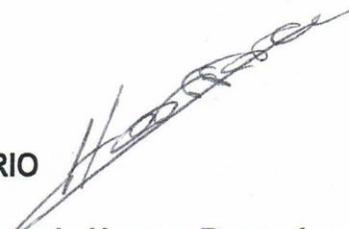
Los miembros del jurado fueron designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana. Los abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Identificación de residuos de carbohidratos de proteínas asociadas a balsas lipídicas (rafts) de espermatozoides de cerdo", con fecha 14 de diciembre de 2011.

**PRESIDENTE**



**Dr. José Luis Contreras Montiel**

**SECRETARIO**



**Dr. José Antonio Herrera Barragán**

**VOCAL**



**Dra. Irma Jiménez Morales**

**VOCAL**



**Dr. Humberto González Márquez**

# *Dedicatoria*

*A mi Madre:*

*Luisa Salguero Lachino*

*Este logro también es tuyo. Gracias por tu apoyo, tu esfuerzo y  
dedicación.*

## RESUMEN

Los espermatozoides de mamífero son móviles después de ser eyaculados, pero no pueden fertilizar al óvulo. Esta habilidad la adquieren durante su paso por el tracto reproductivo de la hembra y se le llama capacitación espermática, en la cual la activación de una adenilciclase dependiente de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y de la proteína cinasa A (PKA) permiten la fosforilación de tirosinas de un grupo de proteínas, y esto se asocia con cambios en la movilidad espermática y la capacidad de respuesta del acrosoma. La membrana plasmática se modifica durante la capacitación, en especial las balsas lipídicas (rafts), compuestas de proteínas específicas, glicoesfingolípidos, gangliósidos y colesterol en la cara exoplásmica, conectada a fosfolípidos y colesterol en la cara citoplásmica de la membrana. Las proteínas de señalización de los rafts son específicas del tipo de célula y de su estado e incluyen, proteínas receptoras y no receptoras con actividad de tirosina cinasa, proteínas G, fosfolípidos de inositol, proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), óxido nítrico sintasa y otras. El objetivo de este trabajo fue Identificar residuos de carbohidratos de proteínas asociadas a los rafts de espermatozoides de cerdo frescos y capacitados. Se analizaron 7 muestras de semen de sementales sanos. Se indujo la capacitación *in vitro* incubando en medio TALP-Hepes 4 horas a 39°C. Se obtuvo la fracción de rafts por ultracentrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa, observándose una región opalescente en la interface del gradiente de 5-35% en ambas condiciones. Se realizaron electroforesis con geles de poliacrilamida al 12.5%, con 20 µg de proteína por carril. En la fracción correspondiente a las balsas lipídicas de espermatozoides

frescos se observaron 16 bandas con  $M_r$  de 11 a 134 kDa y en los capacitados desde 11 hasta 141 kDa. La identificación de residuos de carbohidratos se realizó por Western Blot, usando las lectinas DSA y SNA, específicas para N-acetilglucosamina y ácido siálico respectivamente. DSA se unió a 8 bandas de proteínas de los rafts de espermatozoides frescos y a 11 de capacitados. SNA se unió a 4 bandas de espermatozoides frescos y a 7 de capacitados. Nuestros resultados muestran que las proteínas asociadas a balsas lipídicas de espermatozoides capacitados se encuentran glicosiladas con residuos de N-acetilglucosamina y de ácido siálico y se incrementa el número de proteínas glicosiladas asociadas a balsas lipídicas después de la capacitación.

## ABSTRACT

Mammalian sperm are motile after ejaculation, but cannot fertilize the egg. This ability is acquired during passage through the female reproductive tract and it is called sperm capacitation. In this process the activation of both, a bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) dependent adenylate cyclase and a protein kinase A (PKA) allow tyrosine phosphorylation of a group of proteins, and this is associated with changes in sperm motility and acrosome reaction. The plasma membrane is modified during the capacitation, especially lipid rafts, small platforms within the plasma membrane, composed of specific proteins, glycosphingolipids, gangliosides and cholesterol in the exoplasmic face, connected to phospholipids and cholesterol on the cytoplasmic face. The signaling proteins of the lipid rafts are specific of the cell type and physiological state, and include non-receptor and receptor proteins with tyrosine kinase activity, G proteins, inositol phospholipids, glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, nitric oxide synthase and others. The aim of this work was to identify carbohydrate residues of proteins associated with lipid rafts of fresh and capacitated boar spermatozoa. Seven semen samples of healthy boars were analyzed. Capacitation was induced in vitro by incubating in TALP-Hepes medium during 4 hours at 39 °C. Lipid rafts were obtained by ultracentrifugation in discontinuous sucrose gradient, specifically in the 5-35% interphase, in both conditions. Electrophoresis was performed with 12.5 % polyacrylamide gels, with 20  $\mu$ g of protein per lane. The fraction corresponding to lipid rafts of fresh sperm showed 16 bands with  $M_r$  of 11 to 134 kDa and in capacitated sperm, from 11 to 141 kDa. Carbohydrate residues

identification was performed by Western blot, using DSA and SNA lectins, specific for N-acetylglucosamine and sialic acid, respectively. DSA lectin joined to 8 bands of proteins in rafts of fresh sperm and 11 of capacitated sperm. SNA joined 4 bands in fresh sperm and 7 in the capacitated. Our results show that the proteins associated with lipid rafts of capacitated spermatozoa are glycosylated with residues of N-acetylglucosamine and sialic acid, and the number of glycosylated proteins associated with lipid rafts increases after capacitation.

# ÍNDICE

COMITÉ TUTORIAL .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
MIEMBROS DEL JURADO .....	iv
JURADO DE EXAMEN .....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÍNDICE .....	xi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Espermatozoide de Mamífero.....	1
1.2. Maduración Espermática .....	6
1.3. Capacitación Espermática .....	6
1.4. Reacción Acrosomal.....	8
1.5. Membrana Plasmática .....	8
1.6. Balsas lipídicas (rafts) .....	9
2. ANTECEDENTES .....	10
3. JUSTIFICACIÓN .....	12
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	14
5. HIPÓTESIS.....	14
6. OBJETIVO GENERAL .....	15
6.1. Objetivos Particulares.....	15
7. MÉTODOS.....	16
7.1. Obtención y análisis de la muestra .....	16
7.2. Preparación de la muestra.....	16
7.3. Capacitación in vitro .....	17
7.4. Aislamiento de los Rafts de espermatozoides de cerdo.....	17
7.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y medio reductor .....	18
7.6. Dot blot y Western Blot.....	18
8. RESULTADOS.....	21
8.1. Evaluación seminal.....	21

8.2. Capacitación.....	21
8.3. Aislamiento de Balsas Lipídicas .....	21
8.4. SDS-PAGE.....	23
8.5. Dot blot.....	23
8.6. Western blot .....	24
9. DISCUSIÓN.....	36
10. CONCLUSIONES .....	38
11. LITERATURA CITADA.....	39

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Espermatozoide de Mamífero*

La espermatogénesis sucede en los túbulos seminíferos de los testículos, los cuales contienen una serie compleja de células germinales en desarrollo que constituirán los gametos masculinos. Los espermatozoides maduros de mamífero son células alargadas que consisten en una cabeza que contiene al núcleo, y una cola donde se encuentra el aparato necesario para su desplazamiento (Fig. I). El espermatozoide entero está cubierto por la membrana plasmática, y por debajo de ella, en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, se encuentra una estructura llamada acrosoma; además se distingue un cuello que une la cabeza del espermatozoide con su cola (flagelo), que a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Fig. II) (Hafez, 2002).

La célula espermática tiene una morfología característica y su superficie está altamente diferenciada en diferentes dominios de membrana (Fig. III), cuyos lípidos y proteínas experimentan cambios cuando el espermatozoide se capacita. Cada una de las regiones de la superficie de la cabeza del espermatozoide tiene un papel específico en la fertilización del ovocito: una región específica está dedicada a la unión con la zona pelúcida, una gran área de la superficie de la cabeza del espermatozoide está involucrada en la reacción acrosomal, y otras regiones están implicadas en la unión y fusión con la membrana plasmática del óvulo. Estos eventos ocurren en el área de la cabeza del espermatozoide (Gadella y col., 2008).

Recientemente, usando microscopía de fuerza atómica se descubrió una nueva región, el subsegmento ecuatorial dentro del segmento o región ecuatorial de bovino, porcino y ovino (Fig. IV) (Jones y col., 2007).

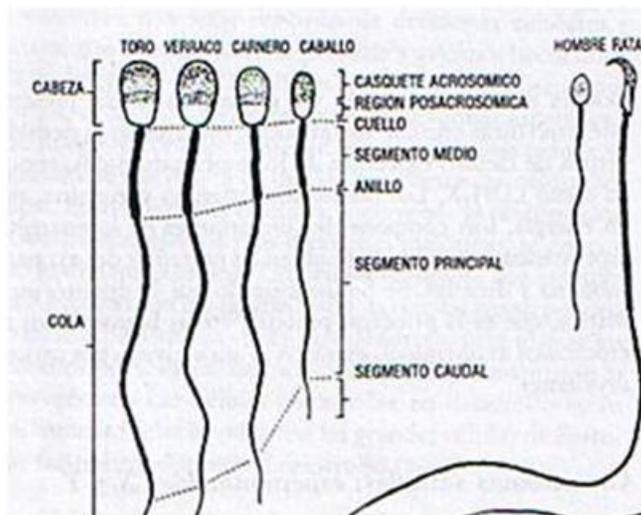


Figura I. Comparación de espermatozoides de animales domésticos y otros vertebrados. Se proporcionan las principales características estructurales (Hafez, 2002).

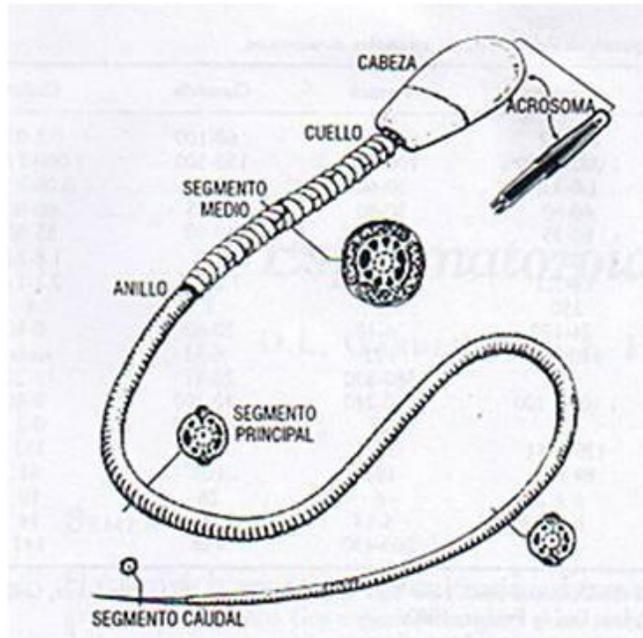


Figura II. Características de un espermatozoide de bovino. Se observa la cabeza, con su casquete acrosomal y la cola, con sus divisiones anatómicas (Hafez, 2002).

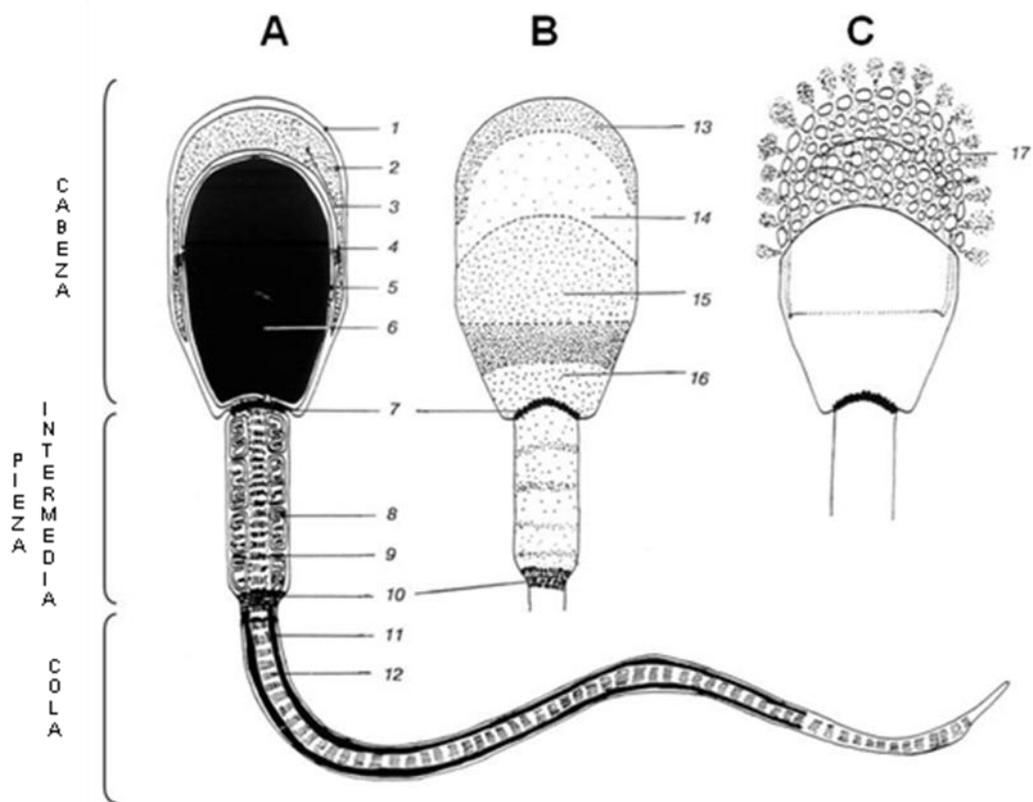


Figura III. Representación esquemática de la célula espermática de cerdo. A) Una vista seccional del espermatozoide. Todas las líneas sólidas representan membranas, 1, membrana plasmática; 2, membrana acrosomal externa; 3, matriz de enzimas acrosomales; 4, membrana acrosomal interna; 5, envoltura nuclear; 6, núcleo; 7, anillo posterior y cuello; 8, mitocondrias; 9, porción proximal del flagelo; 10, anillo; 11, vaina fibrosa; 12, axonema + fibras densas externas. B) Vista superficial de la cabeza del espermatozoide y pieza intermedia con subdominios, 13, cresta apical; 14, región pre-ecuatorial; 15, región ecuatorial; 16, región post-ecuatorial; C) Reacción acrosomal 17, se forman vesículas mixtas, a través de múltiples fusiones entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Gadella y col. , 2008).

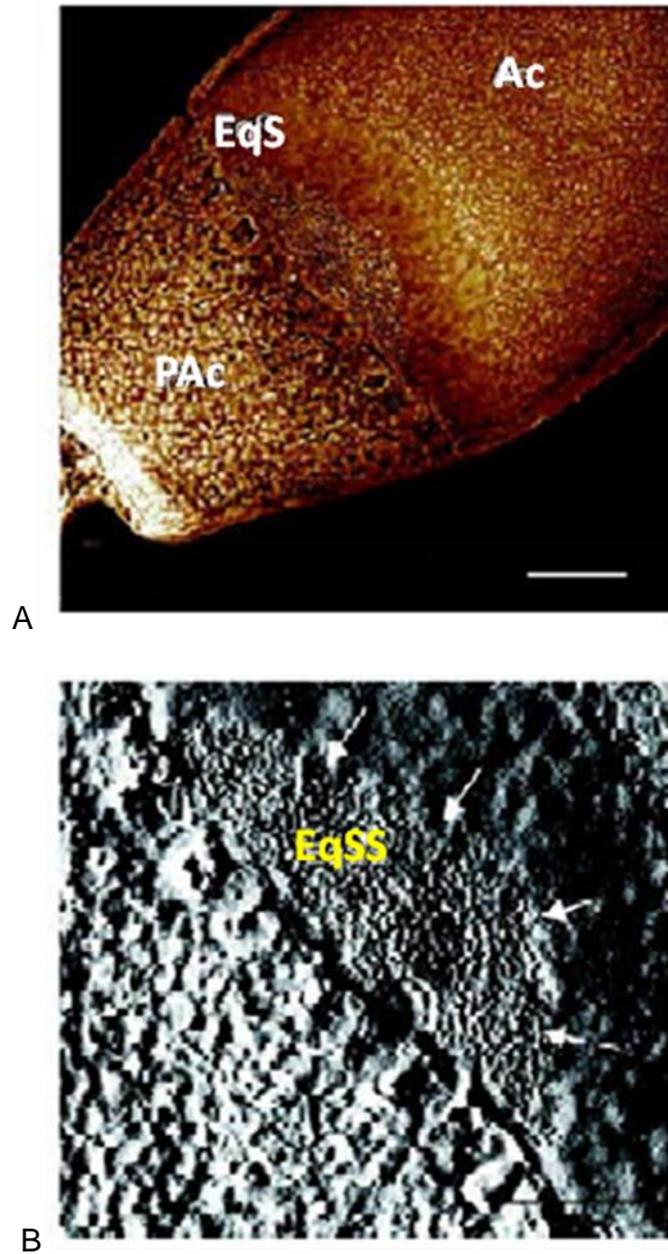


Figura IV. Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AMF) de un espermatozoide de ovino. A) Imagen de baja resolución que ilustra la diferencia en la topografía de los segmentos postacrosomal (PAC), ecuatorial (EqS) y acrosomal (Ac). B) Mayor resolución del subsegmento ecuatorial (EqSS), indicado por flechas. Barra = 1  $\mu$ m. (Jones y col. , 2007).

## **1.2. Maduración Espermática**

Los espermatozoides experimentan cambios durante su paso por el epidídimo en un proceso conocido como maduración espermática, el cual tarda en general, de 10 a 15 días, en mamíferos. Estos cambios dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de transporte (Hafez, 2002).

## **1.3. Capacitación Espermática**

Los espermatozoides de mamífero son móviles después de ser eyaculados, sin embargo, todavía no pueden fertilizar al óvulo. Esta habilidad la adquieren durante su paso por el tracto reproductivo de la hembra en un proceso llamado capacitación espermática (Yanagimachi, 1994; Visconti y Kopf, 1998). Es necesario que los espermatozoides residan en el aparato reproductor de la hembra antes de estar en condiciones de unirse al óvulo y penetrar en él, la capacitación ocurre en el útero, en la región ístmica del oviducto (Hafez, 2002).

La capacitación es un proceso con múltiples pasos durante los que la activación de una adenilciclase dependiente de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) y de la proteína cinasa A (PKA) permiten la fosforilación de tirosinas de un grupo de proteínas (flagelares y de otros sitios de la membrana espermática), que correlaciona con cambios en la movilidad espermática y con la capacidad de respuesta del acrosoma (Visconti y col., 1995a; Visconti y col., 1995b)..

La capacitación *in vitro* se correlaciona con un incremento en la fosforilación de tirosina dependiente de AMP cíclico (cAMP), como evento terminal, y está asociado con cambios tanto en la cabeza como en la cola que preparan al espermatozoide

para llevar a cabo la reacción acrosomal y para adquirir hipermovilidad (Suarez, 1996). Tanto los espermatozoides de la cola del epidídimo como los eyaculados pueden capacitarse *in vitro*, incubándolos en medios definidos que simulan la composición de electrolitos del fluido del tracto reproductor de la hembra (Yanagimachi, 1994).

Además, para que la capacitación sea completa, se requieren otros eventos en la membrana plasmática del espermatozoide, entre los que se cuentan la pérdida de colesterol (Arnoult y col., 1999; Visconti y col., 1999a; Visconti y col., 1999b), la pérdida de la asimetría de los lípidos (Flesch y col., 2001), la hiperpolarización (Zeng y col., 1995), la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (Florman y col., 1998), y la pérdida y redistribución de glicoproteínas de la membrana plasmática (Tulsiani y col., 1997; Frits y col., 2000; Jiménez y col., 2006). Para inducir *in vitro* la pérdida de colesterol, es esencial agregar albúmina sérica bovina (BSA) al medio de capacitación, pues funciona como aceptor de colesterol, removiéndolo de la membrana plasmática del espermatozoide (Davis y col., 1979; Davis y col., 1980; Davis, 1981; Go y Wolf, 1985; Suzuki y Yanagimachi, 1989; Cross, 1996). Se ha demostrado que el flujo de colesterol y otros esteroides fuera de la membrana plasmática precede la cascada de fosforilación de tirosinas regulada por cAMP (Visconti y col., 1995a; Visconti y col., 1995b; Visconti y col., 1999b). Hasta el momento, no se ha logrado explicar cómo esta pérdida de colesterol se acopla con la regulación de la transducción de señales intrínseca de la capacitación.

#### **1.4. Reacción Acrosomal**

La reacción acrosomal consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, seguida por una vesiculación extensa sobre el segmento anterior del acrosoma, lo que da lugar a la liberación de enzimas hidrolíticas, por ejemplo hialuronidasa y acrosina, las cuales participan en la penetración del espermatozoide en el óvulo (Hafez, 2002). Entre los componentes que hacen posible que la reacción acrosomal se lleve a cabo se encuentran el aumento de pH intracelular, la despolarización de la membrana plasmática, el aumento de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  que activan a la fosfolipasa C y a la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , los cuales activan a la proteína cinasa C mediante la formación de diacilglicerol, ácidos grasos libres y lisofosfatidilcolina (Flesch y Gadella, 2000). Todos estos cambios estructurales y bioquímicos se realizan en la membrana plasmática.

#### **1.5. Membrana Plasmática**

La membrana plasmática es una estructura que protege a la célula de su entorno y sirve de armazón para la organización de sus componentes internos. Constituye una barrera con permeabilidad selectiva para el intercambio de sustancias, presenta sistemas de transporte físico de transporte de moléculas de un lado a otro de ella; contiene receptores que se unen a ligandos específicos en el espacio externo y transmite información de los compartimientos en el interior de la célula; interviene en interacciones con otras células, además de ser un sitio transductor de señales y energía (Karp, 2006). El modelo de la estructura de la membrana más aceptado actualmente es el de Mosaico Fluido (Singer y Nicolson,

1972; Somerharju y col., 2009); sin embargo, este modelo ha comenzado a transformarse con nuevos hallazgos.

### **1.6. *Balsas lipídicas (rafts)***

Se han descrito, dentro de las membranas celulares, microdominios estructurales, llamados rafts o balsas lipídicas, que miden de 10 a 200 nm, y son altamente dinámicos (Selvaraj y col., 2006; Pinaud y col., 2009). Los rafts son pequeñas plataformas dentro de la membrana, compuestas de glicoesfingolípidos, gangliósidos y colesterol en la cara exoplásmica, conectada a fosfolípidos y colesterol en la cara citoplásmica de la bicapa lipídica (Simons y Ehehalt, 2002). Una propiedad de los rafts es su habilidad para reclutar proteínas específicas, tanto transmembranales como unidas a la membrana, ancladas a glicofosfolípidos o proteínas modificadas con cadenas acil-lipídicas o combinaciones de las anteriores (Anderson, 1998). Además, pueden contener proteínas específicas que se mantienen unidas al microdominio y tienen menos fluidez que las que están en el resto de la membrana celular. Su contenido de lípidos contribuye a su naturaleza hidrofóbica y a dos propiedades bioquímicas características: insolubilidad a 4°C en el detergente Tritón X-100 y densidad de flotación baja por lo que pueden aislarse al centrifugarlos en un gradiente de sacarosa. Estas propiedades pueden utilizarse para aislar y purificar membrana resistente al detergente como una correlación bioquímica de los rafts, las membranas resistentes a detergentes (DRM) (Brown y London, 1998b).

Se ha demostrado que la pérdida de colesterol estabiliza la estructura de los rafts provocando cambios en su tamaño, distribución y contenido de glicoproteínas (Kabouridis y col., 2000).

Las proteínas de señalización de los rafts son específicas del tipo de célula y del estado fisiológico celular e incluyen, proteínas receptoras y no receptoras con actividad de tirosina cinasa, proteínas G, fosfolípidos de inositol, proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), óxido nítrico sintasa y otras (Brown y London, 1998a; Roy y col., 1999; Kabouridis y col. , 2000).

## **2. ANTECEDENTES**

Se han realizado estudios que involucran a los residuos de carbohidratos del espermatozoide en la interacción con la zona pelúcida (ZP), por ejemplo, Lay, et al. (2011a) reportan que los residuos de N-acetilglucosamina en las glicoproteínas ZP3 de porcino, juegan un papel crítico en las interacciones ZP-espermatozoide y que en bovino y porcino, los residuos de ácido siálico participan en la acidificación de glicoproteínas de la zona pelúcida durante la maduración de los ovocitos, lo que le permite la capacidad de aceptar al espermatozoide (Lay y col., 2011b).

Se han identificado varias proteínas en las balsas lipídicas como hexocinasa 1 (HK1), serinproteasa de testículo 1 y 2, TEX101, hialuronidasa, transportador de glucosa 3 (SLC2A3), entre otras (Sleight y col., 2005), en espermatozoides de ratón; así como fertilina beta, precursor de sp32, superóxido dismutasa, espermadhesina AQN-3 y otras más (van Gestel y col., 2005), en espermatozoides de cerdo; incluso

se ha estudiado su distribución (Miranda y col., 2009), pero aún se desconoce si son glicoproteínas.

En el laboratorio de Biología Celular de la Unidad Iztapalapa de la UAM, se han realizado, desde hace más de 10 años, estudios sobre la membrana del espermatozoide de mamíferos. Estos estudios se basaron, principalmente, en el reconocimiento de los residuos de carbohidratos de las glicoproteínas de la membrana del espermatozoide mediante lectinas. Se reportó la participación de los residuos de manosa en la unión del espermatozoide a la ZP en donde se detectó que, en espermatozoides de humano, aumentan los residuos de manosa al inducir la reacción acrosomal, lo que sugiere que la expresión de éstos, se relacionan con su potencial fertilizante (Fierro y col., 1996; Fierro y col., 1998).

En espermatozoides de cerdo se demostró la presencia de residuos de manosa, N-acetilglucosamina (NAc-Glu) y/o ácido siálico (AcSial) en la membrana de los espermatozoides y que la distribución de estas moléculas cambia durante la capacitación y la reacción acrosomal; en espermatozoides recién eyaculados los residuos de NAc-Glu y/o AcSial se encontraron en todo el espermatozoide, en los capacitados sólo en la cabeza y en los reaccionados desaparecen. Los residuos de manosa se localizan en la cabeza y pieza intermediaria de espermatozoides recién eyaculados, en los capacitados en todo el acrosoma y en los reaccionados solamente en el borde de la cabeza (Jiménez y col., 2003).

Otro hallazgo importante fue que en espermatozoides de cerdos subfértiles los residuos de NAc-Glu y/o AcSial así como los de manosa se pierden después de la capacitación y la reacción acrosomal (Jiménez y col., 2002).

Por medio de cromatografía de afinidad, utilizando como ligando las lectinas Con-A y WGA, se demostró que la membrana plasmática de espermatozoides de cerdo presenta un gran número de proteínas unidas a residuos de manosa, NAc-Glu y/o AcSial; así mismo, se observó que después de la capacitación disminuye el número de glicoproteínas; como dato original se encontró que la proteína arilsulfatasa está presente en los espermatozoides capacitados y que tiene residuos de manosa y de NAc-Glu y/o AcSial como parte de su glicosilación (Jiménez y col. , 2006).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El estudio de la capacitación espermática es de gran interés pues es un paso decisivo en la fertilización, pero aún quedan muchas incógnitas en su señalización. Los rafts, parecen ser la base de la fisiología membranal al integrar arreglos de lípidos con proteínas y favorecer el ensamblaje de nuevas organizaciones lipoproteínicas.

Actualmente las técnicas globales de estudio se están imponiendo para el análisis de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Entre estos análisis, la glicómica es de gran utilidad pues permite el estudio global de los carbohidratos que se han modificado o expresado realmente en un momento fisiológico dado. Mediante estas técnicas, se propone estudiar de manera integral a las glicoproteínas asociadas a rafts, que estén presentes en el espermatozoide maduro recién eyaculado de cerdo, y seguir su proceso de pérdida y modificación durante la capacitación.

A pesar de que existen estudios de caracterización de microdominios membranales en varias especies y células diferenciadas, en espermatozoides de cerdo todavía falta por caracterizar completamente la composición y el funcionamiento de los rafts, esto podría colaborar a dilucidar el por qué los espermatozoides de cerdo no se comportan como los de otras especies.

## **4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Hay diferencias en los tipos de balsas lipídicas (rafts) que existen en la membrana de los espermatozoides frescos y capacitados?

¿Cuáles son los cambios en los residuos de carbohidratos asociados a las proteínas presentes en las balsas lipídicas (rafts) de espermatozoides de cerdo frescos y capacitados?

## **5. HIPÓTESIS.**

Si las balsas lipídicas (rafts) son la unidad básica de la fisiología membranal celular, después de la capacitación de los espermatozoides de cerdo, se observarán rearreglos de las glicoproteínas presentes en ellas.

Al aislar las proteínas de las balsas lipídicas (rafts) se podrán identificar los carbohidratos asociados a ellas.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Identificar residuos de carbohidratos de proteínas asociadas a balsas lipídicas (Rafts) de espermatozoides frescos y capacitados de cerdo.

### ***6.1. Objetivos Particulares***

1. Determinar la capacitación de los espermatozoides mediante la técnica de la clorotetraciclina.
2. Aislar balsas lipídicas de espermatozoides frescos y capacitados, mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, seguido de un análisis de proteínas por SDS-PAGE y western blot.
3. Caracterizar residuos de carbohidratos asociados a proteínas presentes en balsas lipídicas mediante DIG Glycan Differentiation Kit.

## **7. MÉTODOS**

### ***7.1. Obtención y análisis de la muestra***

Las muestras de semen se obtuvieron por eyaculación de sementales sanos híbridos (York-Landrace) de una granja comercial. En el laboratorio se analizó la calidad de las muestras, se determinó la concentración de espermatozoides, movilidad y número de formas anormales con el fin de utilizar solamente muestras normales de acuerdo a criterios ya establecidos (Garner y Hafez, 1993). La movilidad se determinó por observación directa al microscopio óptico a 400X y se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles. La concentración se determinó haciendo una dilución 1:100 del semen, colocando una alícuota (20 µl en ambos lados) en una cámara de Neubauer. La viabilidad se determinó por medio de la técnica de Eosina/Nigrosina. Se consideraron como espermatozoides vivos aquéllos que no presentaron tinción y muertos los teñidos en color rojo. Con los mismos frotis se determinó el porcentaje total de espermatozoides con anomalías morfológicas. Se analizaron 100 espermatozoides.

### ***7.2. Preparación de la muestra***

La muestra se lavó con medio DPBS (solución salina de fosfatos de Dulbecco) previamente suplementado con albúmina sérica de bovino (BSA) fracción V (Sigma) al 0.1%, a pH 7.4. Se tomó el volumen necesario de la muestra de semen para tener una concentración de  $1 \times 10^9$  espermatozoides y se le añadió un volumen igual de

medio, se centrifugó a 600 x g durante 10 minutos, se repitió 3 veces hasta dejar el sobrenadante transparente.

### **7.3. Capacitación *in vitro***

Se depositaron  $1 \times 10^9$  espermatozoides en una caja de cultivo (Nunc Denmark) con medio TALP (Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato) (114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 5 mM glucosa, 10 mM lactato de sodio, 0.1 mM piruvato de sodio)-HEPES suplementado con 6mg/mL BSA fracción V y 1 mM Piruvato de Sodio, pH de 7.4 (Bavister y col., 1983) y se incubaron durante cuatro horas a 39 °C, en una atmósfera húmeda, con 5 % de CO<sub>2</sub> (Jiménez y col. , 2002).

La capacitación se evaluó por medio de la tinción con clorotetraciclina (CTC) (Fraser y Herold, 1990), y se procedió a purificar los rafts.

### **7.4. Aislamiento de los Rafts de espermatozoides de cerdo**

La fracción de baja densidad insoluble al Tritón-X100 se preparó según técnica descrita para linfocitos (Guo y col., 2000), modificada duplicando la concentración de inhibidor de proteasas en todos los pasos de purificación. Los espermatozoides (frescos y capacitados) de cerdo se normalizaron a  $\sim 10^9$  células/ml en TALP, mezclados con un volumen igual de MBS (50 mM MES (pH 6.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 4 mM AEBSF), se incubaron por 20 minutos a 4°C, a partir de este momento la muestra se mantuvo rigurosamente a esta temperatura. Posteriormente se centrifugó a baja velocidad (900 x g por 10 minutos a 4°C). El

sobrenadante (2 ml) que contiene el material insoluble al Tritón X-100, se mezcló con un volumen igual de sacarosa al 85% (p/V) en mMBS (25 mM MES [pH 6.5], 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 2 mM AEBSF), de esta manera la sacarosa quedó al 42.5 %. Sobre esta mezcla se colocaron cuidadosamente 6 ml de sacarosa al 35% seguidos por 3 ml de sacarosa al 5% en mMBS y se centrifugó a 35 000 x g por 18 h a 4°C en un rotor Beckman SW50.1. Se colectaron 12 fracciones de 1 ml desde la parte superior del gradiente, las cuales se mantuvieron en congelación hasta su uso.

### **7.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y medio reductor**

Las proteínas de las muestras se mantuvieron por 4 minutos a 100 °C en el amortiguador de muestra de Laemmli (1970), seguido de centrifugación a 9000 x g por 10 minutos. Las proteínas reducidas se separaron en una dimensión en un gel al 12.5% de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) y se visualizaron por coloración con plata, otros geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por electrotransferencia y visualizados con rojo Ponceau (Morrissey, 1981).

### **7.6. Dot blot y Western Blot**

Se realizó dot blot de las proteínas de las fracciones de baja densidad de flotación utilizando anticuerpos anti-PLC $\delta$ 4 y la subunidad  $\beta$  de la toxina de cólera asociada HRP de acuerdo a Nixon, *et al.* (Nixon y col., 2010), para confirmar que efectivamente se aislaron balsas lipídicas.

Con el fin de detectar PLC $\delta$ 4, se agregaron 2  $\mu$ l de proteína a membranas de nitrocelulosa, se bloqueó con TBST-BSA (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, Tris 25 mM, a pH 7.4, Tween 20 al 0.05 %, BSA al 3 %), se incubó durante 1 hora con anti-PLC $\delta$ 4 (Santa Cruz Biotechnology, E.U.A.) a una dilución 1:1000. Se hicieron 3 lavados con TBST (NaCl 150 mM, KCl 3 mM, Tris 25 mM, a pH 7.4, Tween 20 al 0.05 %) por 10 minutos, se incubó con el anticuerpo secundario anti-cabra acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) producido en conejo (Sigma Aldrich, Inc. St. Louis, MO, E.U.A.) a una dilución 1:5000 en TBST durante 1 hora. Se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBST y se procedió a revelar usando el sustrato quimioluminiscente HRP (Immobilon <sup>TM</sup> Western, Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A.). Posteriormente se digitalizó la imagen en un fotodocumentador KODAK Gel Logic 1500 Imaging System, E. U. A.

Asimismo, para detectar al gangliósido GM1 se utilizó la subunidad  $\beta$  de la toxina de cólera (Sigma Aldrich, Inc. St. Louis, MO, E.U.A.). Se agregaron 3  $\mu$ l de proteína, se bloqueó con leche en polvo al 5 % en TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, a pH 7.5, Tween 20 al 0.1 %). Se incubó durante 1 hora con la toxina de cólera conjugada a HRP suplementada con leche en polvo al 0.5 % a una dilución 1:1000. Se hicieron 5 lavados con TBS-T y se reveló con Immobilon <sup>TM</sup> Western usando el mismo fotodocumentador.

Para determinar los residuos de carbohidratos asociados a proteínas de balsas lipídicas, se hizo Western blot empleando un kit diferencial de lectinas (DIG GlycanDifferentiationKit, Roche<sup>TM</sup>, Mannheim, Germany).

Se solubilizaron 20 µg de proteína con buffer de Laemmli y se separaron mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se bloqueó durante 6 horas con PVP (polivinil pirrolidona) al 2% (p/v) en buffer salino-Tris (TBS: Tris 25 mM, KCl 3 mM y NaCl 150 mM) con Tween 20 al 0.05% (v/v) (TBS-T) y se incubó toda la noche a 4 °C con las lectinas SNA (*Sambucus nigra* agglutinin), y DSA (*Datura stramonium* agglutinin) que reconocen respectivamente residuos de ácido siálico y N-acetilglucosamina, a una dilución 1:1000 en PVP. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y se incubó con Anti-Digoxigenina-POD-HRP (Roche<sup>TM</sup>, Mannheim, Germany) durante dos horas a una dilución 1:5000 en TBST. Posteriormente se lavaron 5 veces las membranas con TBST y se procedió a revelar usando el sustrato quimioluminiscente HRP (Immobilon<sup>TM</sup> Western, Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A.). Finalmente se digitalizó la imagen en un fotodocumentador (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System, E. U. A).

## **8. RESULTADOS**

### **8.1. Evaluación seminal**

Se obtuvieron eyaculados de cerdos sementales York-Landrace sanos que, en promedio, presentaron las siguientes características espermáticas: Concentración de  $134 \times 10^6 \pm 44 \times 10^6$  espermatozoides/ml, viabilidad del  $91 \pm 5.5$  %, movilidad del  $83 \pm 3.9$  %, y menos del 10 % de anomalías morfológicas (n=7).

### **8.2. Capacitación**

La capacitación espermática determinada con clorotetraciclina mostró, al tiempo cero (T0), que  $16 \pm 1.5$  % estaban capacitados,  $84 \pm 1.02$  % no lo estaban y no hubo espermatozoides reaccionados; después de 4 hrs de incubación se capacitaron el  $90 \pm 0.7$  %, solo  $8 \pm 0.9$  % de los espermatozoides no se capacitó y  $2 \pm 1.6$  % presentó reacción acrosomal.

### **8.3. Aislamiento de Balsas Lipídicas**

Después de la ultracentrifugación colectamos 12 fracciones de cada tubo, observamos una banda blanquecina en la interface entre 35 % y 5 % del gradiente de sacarosa (fracciones insolubles a Tritón X-100 a 4° C y de baja densidad de flotación) que corresponde a balsas lipídicas y se colectó principalmente en las fracciones 4 y 5. Las proteínas de cada fracción se cuantificaron por el método de Lowry.

Después de varias repeticiones se fue haciendo más eficiente la extracción de las balsas lipídicas, lo cual se reflejó en la obtención de una mayor cantidad de proteínas en las fracciones correspondientes (fracciones 4 y 5). Así mismo, al colectar las fracciones con más cuidado logramos concentrar las proteínas presentes en rafts en una sola fracción (Gráfica 1).

En cuanto a las muestras de espermatozoides frescos, en las fracciones 1-3 no se encontró proteína, en la fracción 4 se obtuvieron 278  $\mu\text{g/ml}$ , en las fracciones de la 5 a la 9 tiende a disminuir la concentración, y en las fracciones 10, 11 y 12 se vuelve a incrementar, obteniendo 886, 1244 y 1436  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

Se observó que hay una mayor cantidad de proteínas de rafts después de la capacitación (152  $\mu\text{g/ml}$  en frescos contra 256  $\mu\text{g/ml}$  en capacitados), siendo que, en la proteína total, había una cantidad superior en los espermatozoides frescos (1878  $\mu\text{g/ml}$ ) comparada con los capacitados 1358  $\mu\text{g/ml}$ . Las proteínas de rafts se colectaron casi siempre en las fracciones 4 ó 5, y corresponden a la banda opalescente que se observó en el gradiente de sacarosa después de la ultracentrifugación; además todas las fracciones mostraron la misma tendencia, en las primeras fracciones no hay proteínas, en las siguientes fracciones aparecen las proteínas correspondientes a los rafts (fracciones 4 y/o 5), en las siguientes disminuye drásticamente la concentración de proteína, y finalmente aumenta de manera considerable en las últimas fracciones (Gráfica 1).

#### **8.4. SDS-PAGE**

Al separar las proteínas de todas las fracciones por medio de SDS-PAGE se observó que, en diferentes geles de muestras de extracciones de rafts de fechas distintas, las proteínas presentes en rafts se encuentran en las fracciones 4, 5 e incluso en la 3, (Fig. 2 y 3); las proteínas que se encontraron en la región más densa del gradiente de sacarosa (proteínas que no son de rafts) se observan a partir de la fracción 8 hasta la 12 y muestran el mismo patrón de bandeo (Fig. 1 y 2). Nos enfocamos a las proteínas asociadas a rafts tanto de espermatozoides frescos como capacitados, cuyos electroferogramas de muestras de diferentes extracciones muestran el mismo patrón (Fig. 3). Por otro lado, tanto en espermatozoides frescos como capacitados encontramos 16 bandas de proteínas (Fig. 4) pero con diferencias en cantidad de proteína y masa molecular relativa (*Mr*). En los espermatozoides frescos las proteínas van desde 11 hasta 134 kDa, y en los capacitados desde 11 hasta 141 kDa.

#### **8.5. Dot blot**

Para verificar que efectivamente se obtuvieron balsas lipídicas, realizamos un dot blot para detectar PLC  $\delta 4$ , que es una proteína marcadora de rafts (Fig. 5), pero la reacción fue algo débil, por tal motivo decidimos realizar un dot blot para el gangliósido GM1, el cual se sabe está presente en rafts de espermatozoides de cerdo, y ahí observamos que hubo reacción débil en la fracción 3 y con mayor intensidad en la 4, lo que concuerda con la región opalescente colectada en esas fracciones (Fig. 6).

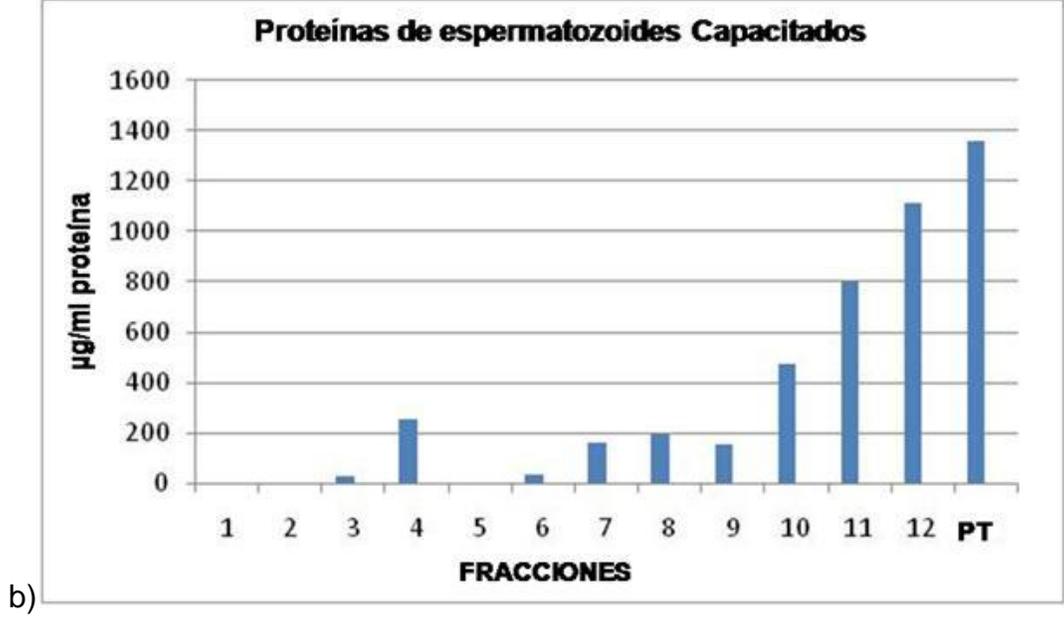
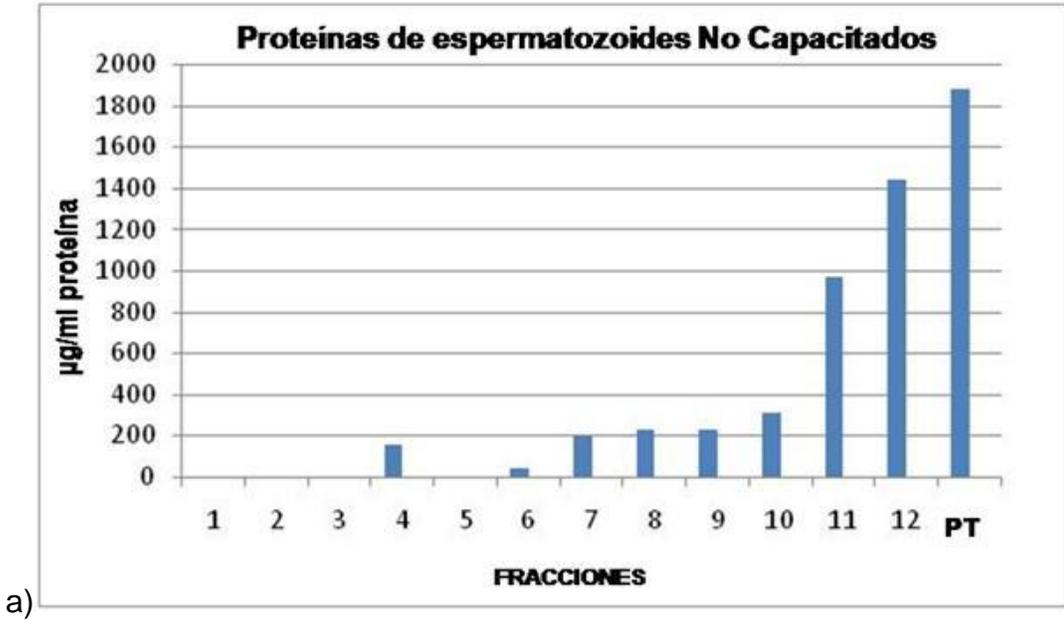
## **8.6. Western blot**

Se realizó Western blot con lectinas para determinar la presencia de residuos de carbohidratos. Se logró encontrar las condiciones adecuadas para la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Fig. 7).

Al realizar el Western blot con la lectina DSA, específica para N-acetilglucosamina, se observan 8 bandas en la fracción de rafts de espermatozoides frescos y 11 en la fracción de rafts de espermatozoides capacitados. Se encontró una banda con *Mr* de 25.36 kDa que solo se observa en los rafts de espermatozoides frescos, también una con *Mr* de 96.92 kDa exclusiva de rafts de espermatozoides capacitados, otra banda con *Mr* de 106.94 kDa que se encuentra en tanto en las proteínas totales como en los rafts de espermatozoides frescos y capacitados. También se observan dos bandas con *Mr* de 42.16 kDa y 32.76 kDa que se encuentran en los rafts de espermatozoides frescos, así como en los rafts y proteína total de espermatozoides capacitados. Además se obtuvo una banda de bajo peso molecular con *Mr* de 16.64 kDa que solo se observó en los espermatozoides capacitados (proteína total y rafts) (Fig. 8). Se realizaron 4 repeticiones y se obtuvo el mismo patrón.

El Western blot con la lectina SNA, que es específica para ácido siálico, mostró que hay 4 bandas de proteínas en la fracción de rafts de espermatozoides frescos y 7 en la de rafts de espermatozoides capacitados. Hay tres bandas con *Mr* de 145.37 kDa, 78.89 kDa y 35.75 kDa que solo se encuentran en los rafts de espermatozoides capacitados, una banda con *Mr* de 97.91 kDa que se encuentra en los rafts de

espermatozoides frescos y que también está presente en los espermatozoides capacitados, tanto en la proteína total como en los rafts; también se observa una banda con *Mr* de 111.29 kDa que solo se encuentra en los espermatozoides capacitados, tanto en la proteína total como en los rafts; así como una banda con *Mr* de 44.95 kDa que se encuentra en la proteína total y también en los rafts, tanto en espermatozoides frescos como en los capacitados; además de una de 17.61 kDa que sólo está en la proteína total de espermatozoides frescos (Fig. 9) (se hicieron 4 repeticiones obteniendo el mismo patrón).



Gráfica 1. Concentración de proteína presente en las fracciones de rafts y no rafts. a) Hay mayor cantidad de proteína total (PT) en los espermatozoides frescos (1878 µg/ml contra 1358 µg/ml), b) pero mayor cantidad de proteína de rafts (fracción 4) en los capacitados (256 µg/ml contra 152 µg/ml). Se logró concentrar la mayor cantidad de proteína de rafts en una sola fracción (4).

<b>Mr de Proteínas de Rafts de Espermatozoides No Capacitados (kDa)</b>	<b>Mr de Proteínas de Rafts de Espermatozoides Capacitados (kDa)</b>
134	141
127	132
119	124
89	96
73	83
64	77
54	67
51	58
46	52
37	40
30	37
27	28
16	17
14	15
13	13
11	11

Tabla 1. Masas moleculares relativas (Mr) de proteínas de rafts de espermatozoides frescos (no capacitados) y capacitados. En las dos condiciones se encontraron 16 bandas de proteínas pero con diferente Mr, en los frescos van desde 134 kDa hasta 11 kDa y en los capacitados desde 141 kDa hasta 11 kDa.

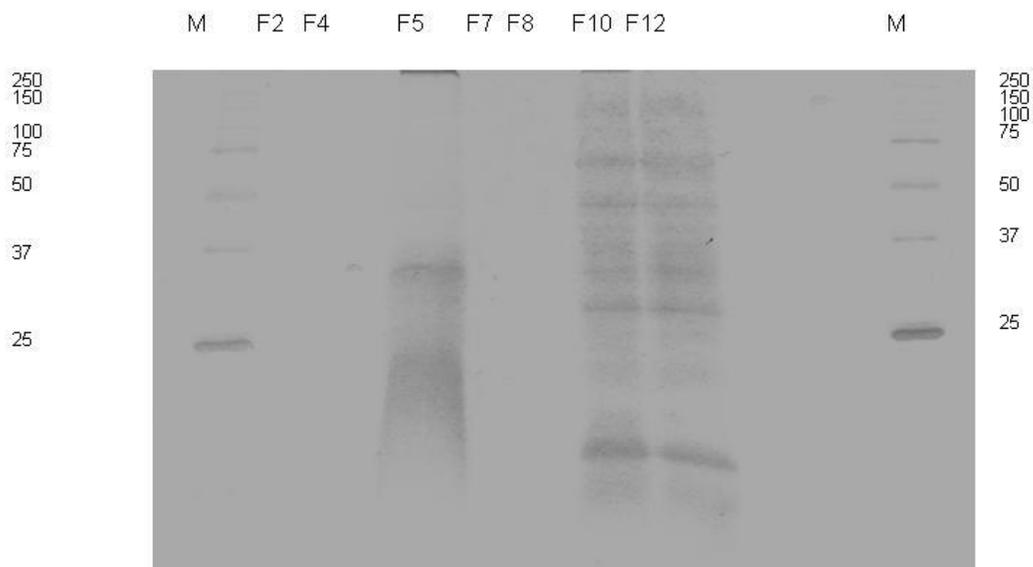


Figura 1. Proteínas de rafts y no rafts. En un inicio la separación de las proteínas no fue la adecuada, sin embargo se puede apreciar que en F5 hay algunas bandas que corresponden a las que se colectaron de la interfase del 35% y 5% y que corresponden a balsas lipídicas (rafts), en F10 y F12 se encuentran las proteínas de mayor densidad y son las que no se encuentran asociadas a rafts (muestran el mismo patrón de bandeo). M = Marcadores de peso molecular, F2 a F12 = Fracciones de proteínas de espermatozoides frescos (no capacitados).

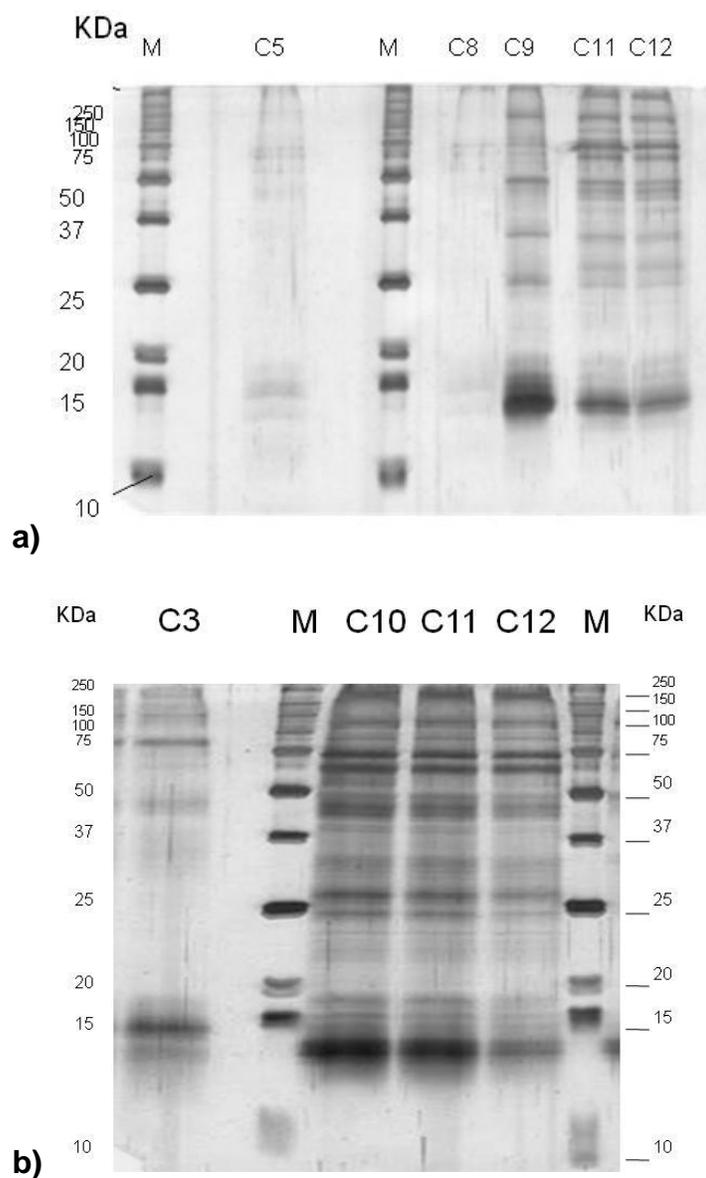


Figura 2. Electroferograma de proteínas de espermatozoides capacitados. En a, las proteínas presentes en rafts se encuentran en la fracción 5, en b, se encuentran en la fracción 3. Las proteínas de mayor densidad y que no son de rafts, se observan a partir de la fracción 8 y hasta la fracción 12. Muestran el mismo patrón de bandeado M = Marcador de peso molecular, C5 – C12 = Fracción 5 a la 12 de espermatozoides capacitados.

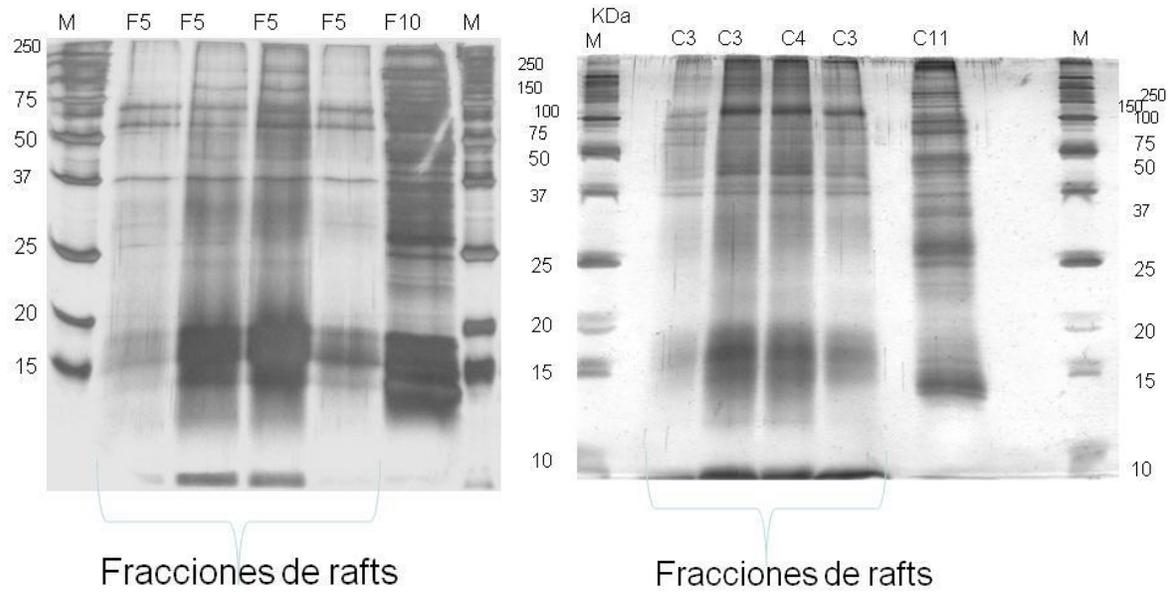


Figura 3. Electroferograma de proteínas de espermatozoides frescos y capacitados. M = Marcador de peso molecular, F5 = Fracción de rafts de espermatozoides frescos, F10 = Fracción de no rafts de espermatozoides frescos, C3 y C4 = Fracción de rafts de espermatozoides capacitados, C11 = Fracción de no rafts de espermatozoides capacitados.

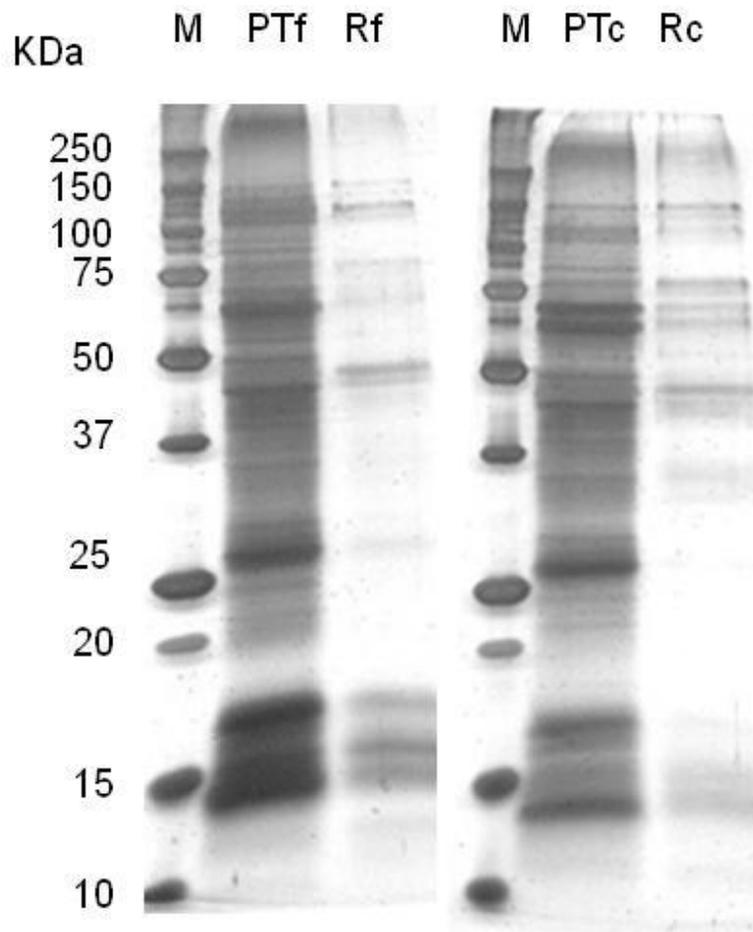


Figura 4. Proteínas de rafts de espermatozoides frescos y capacitados. En ambos casos se observan 16 bandas de proteínas. M = Marcador de peso molecular, PTf = Proteína total de espermatozoides frescos, Rf = Proteína de rafts de espermatozoides frescos, PTc = Proteína total de espermatozoides capacitados, Rc = Proteína de rafts de espermatozoides capacitados.

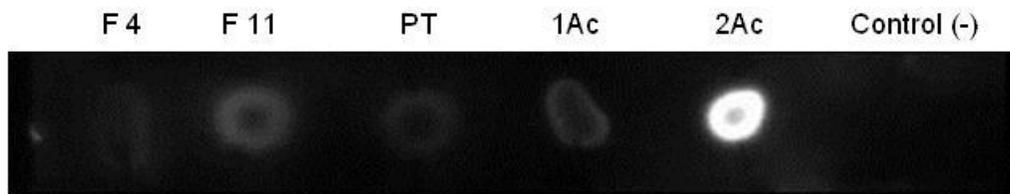


Figura 5. Dot blot para PLC  $\delta$ 4. Se observa ligeramente que hubo reacción en la fracción 4 que corresponde a proteínas de rafts. F4= Fracción 4, F11= Fracción 11, PT= Proteína Total, Control (-)=  $\beta$ -lactoglobulina A.

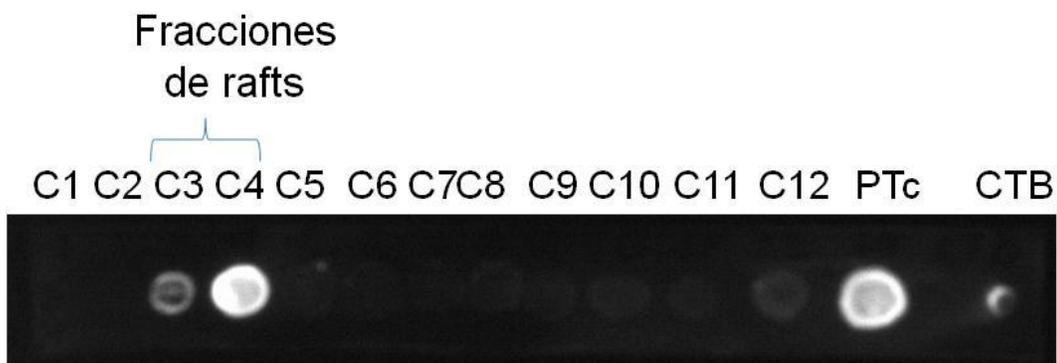


Figura 6. Dot blot para GM1. Las fracciones 3 y 4 están enriquecidas con el gangliósido GM1, lo que confirma que corresponden a rafts. C1 a C12 = Fracciones de espermatozoides capacitados, PTc = Proteína total de espermatozoides capacitados, CTB = Subunidad  $\beta$  de la toxina de cólera (se utilizó como control positivo).

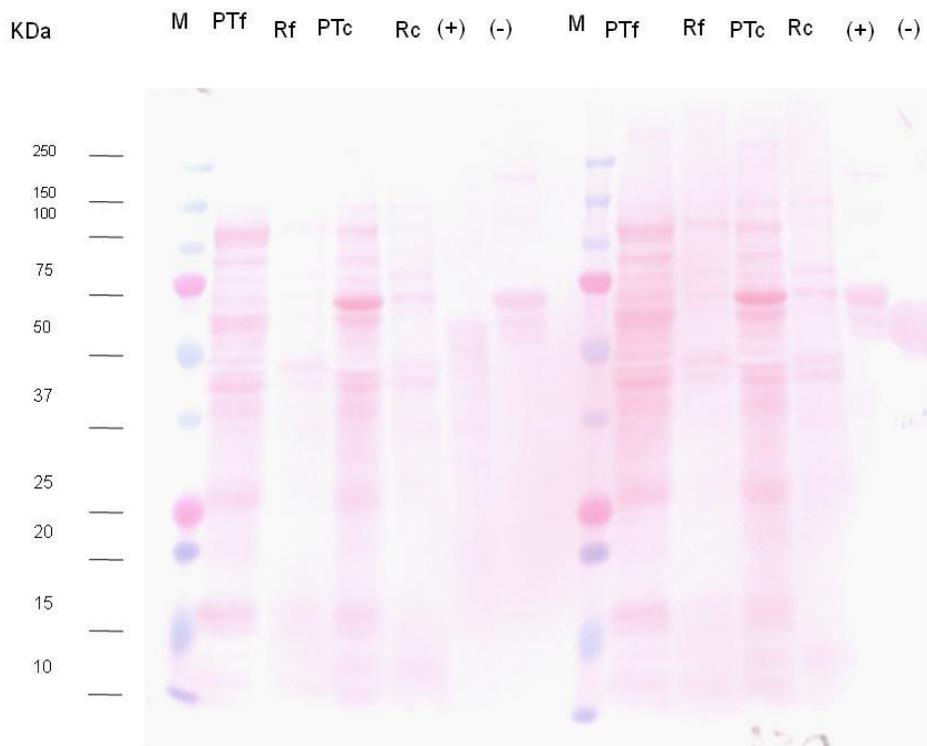


Figura 7. Transferencia a membranas de nitrocelulosa. M = Marcadores de peso molecular, PTf = Proteína total de espermatozoides frescos, Rf = proteínas de Rafts de espermatozoides frescos, PTc = Proteína total de espermatozoides capacitados, Rc = Rafts de espermatozoides capacitados, (+) = control positivo, (-) = control negativo.

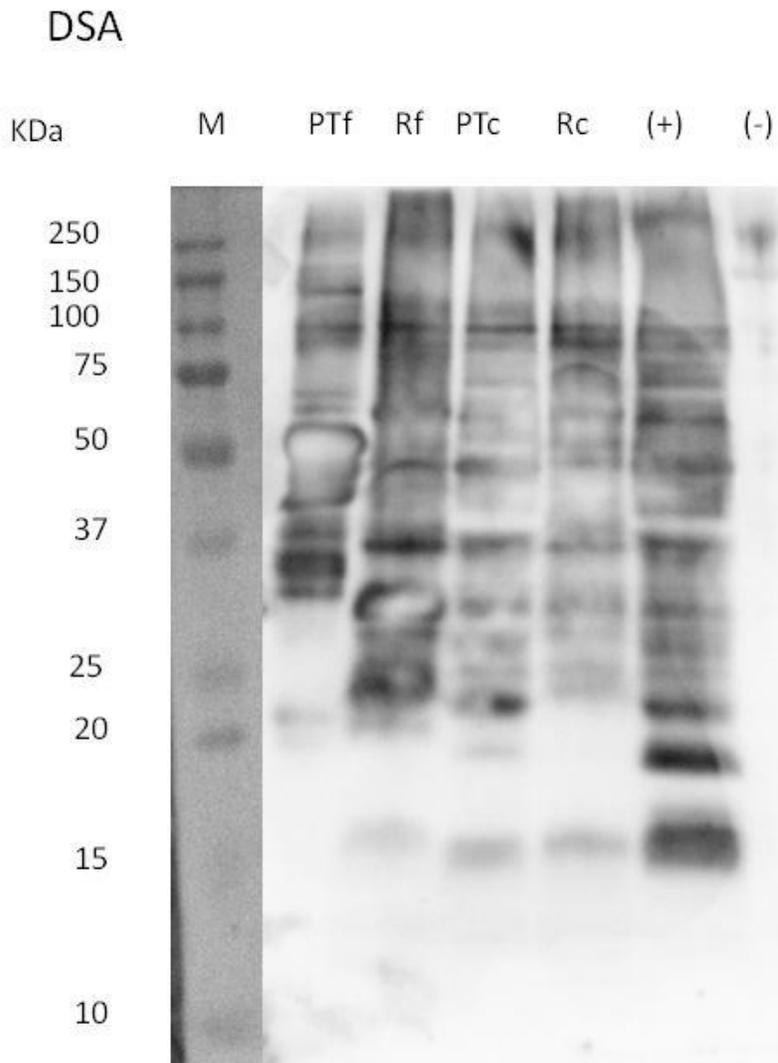


Figura 8. Western blot con DSA (específica para N-acetilglucosamina). Carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular (M), carril 6 corresponde al Control positivo (+) Fetuina y el carril 7 al Control negativo (-) CarboxipeptidasaY. PTf = Proteína total de espermatozoides frescos, Rf = Proteína de rafts de espermatozoides frescos, PTc = Proteína total de espermatozoides capacitados, Rc = Proteína de rafts de espermatozoides capacitados.

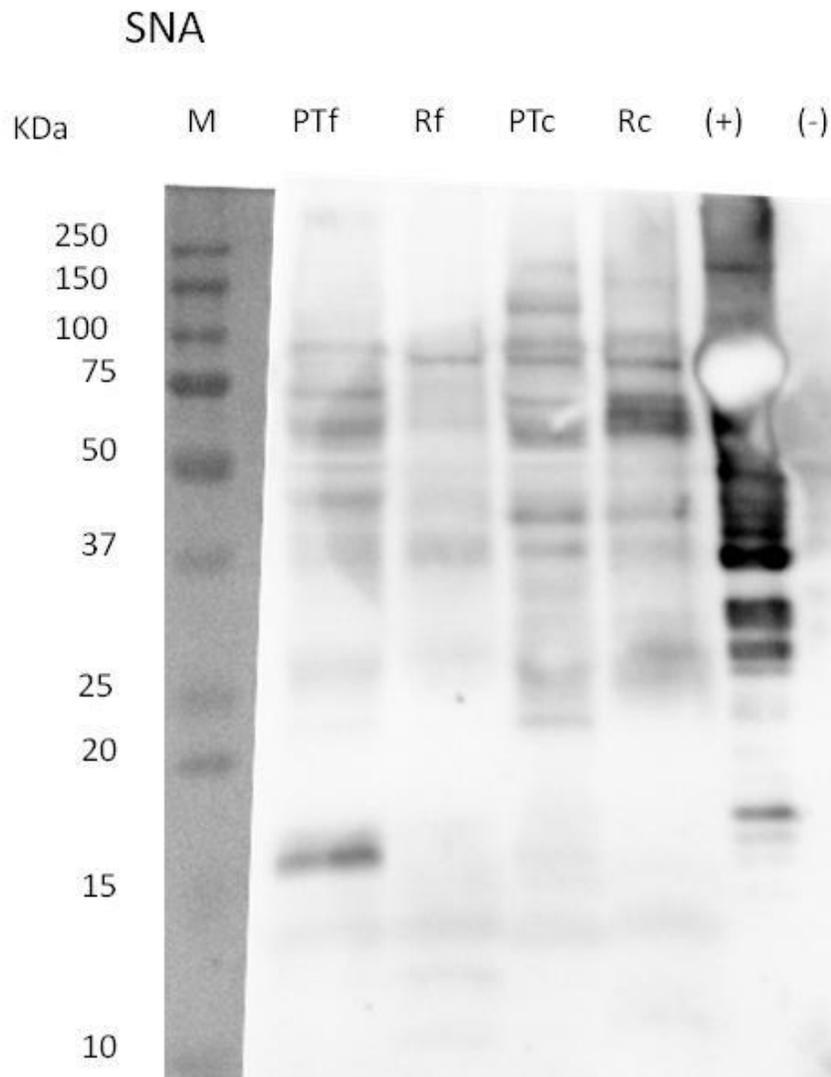


Figura 9. Western blot con la lectina SNA que es específica para ácido siálico. Carril 1 corresponde a marcadores de peso molecular (M), carril 6 Control positivo (+) Fetuina y el carril 7 al Control negativo (-) CarboxipeptidasaY. PTf = Proteína total de espermatozoides frescos, Rf = Proteína de rafts de espermatozoides frescos, PTc = Proteína total de espermatozoides capacitados, Rc = Proteína de rafts de espermatozoides capacitados.

## 9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se logró replicar la extracción de las balsas lipídicas ya que, al igual que otros autores, encontramos que las fracciones que corresponden a balsas lipídicas (4 y 5) aparecen en el gradiente de sacarosa como una región opaca, blanquecina, opalescente en la interface entre 5 y 35% de sacarosa; otros autores usan tubos de centrifuga de 2 ml y colectan 9 fracciones en lugar de 12; las proteínas de rafts se colectaron casi siempre en las fracciones 4 ó 5 y corresponden con la nube opalescente que se observó en el gradiente de sacarosa después de la ultracentrifugación, lo cual corresponde con lo reportado previamente en la literatura (Shadan y col., 2004; Sleight y col. , 2005). A parte de esto, lo confirmamos mediante dot blot para PLC  $\delta 4$ , la cual es una proteína marcadora de rafts y para el gangliósido GM1, el cual se ha reportado que se encuentra enriquecido en los rafts (Cross, 2004; Nixon y col. , 2010; Kawano y col., 2011).

Nuestros resultados mostraron cambios tanto en los residuos de N-acetilglucosamina como en los de ácido siálico, en las glicoproteínas de rafts de espermatozoides frescos y capacitados en cuanto a concentración, cantidad de bandas y Mr. Los residuos de ácido siálico se encuentran en mayor cantidad en las glicoproteínas de rafts de espermatozoides capacitados, solo hay 4 bandas de proteínas en la fracción de rafts de espermatozoides frescos y 7 en la de rafts de espermatozoides capacitados, además hay tres bandas con Mr de 145.37, 78.89 y 35.75 kDa que solo se encuentran en los rafts de espermatozoides capacitados. Hay una banda de 97.91 y otra de 44.95 kDa que se concentran en la fracción de rafts.

En cuanto a los residuos de N-acetilglucosamina, el aumento en el número de bandas después de la capacitación también es importante, dado que solo se observan 8 bandas en la fracción de rafts de espermatozoides frescos y 11 en la fracción de rafts de espermatozoides capacitados, por otro lado, se encontró una banda con  $M_r$  de 96.92 kDa exclusiva de rafts de espermatozoides capacitados. Hay tres bandas con  $M_r$  de 106.94, 42.16 y 32.76 kDa que se concentran en la fracción de rafts. El hecho de que se hayan encontrado bandas de glicoproteínas asociadas a rafts después de haber ocurrido la capacitación, tiene sentido, pues como hemos visto durante la capacitación espermática tienen lugar una serie de eventos en la membrana plasmática, donde participan varias proteínas, las cuales son susceptibles de modificaciones postraduccionales.

Los cambios encontrados pueden estar involucrados en el reconocimiento entre el espermatozoide y la ZP, ya que este fenómeno se lleva a cabo a través de carbohidratos; y/o a la adhesión del espermatozoide al epitelio oviductal (reserva de espermatozoides), pues también involucra la participación de carbohidratos (Topfer-Petersen y col., 2008).

Encontramos una banda con  $M_r$  de 42.16 kDa con residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico que podría corresponder a proacrosina (unión a ZP) y/o fertilina  $\beta$ , las cuales ya han sido reportadas en rafts (van Gestel y col. , 2005). También hay una banda con residuos de N-acetilglucosamina en los rafts de espermatozoides capacitados con  $M_r$  de 16.64 kDa que posiblemente corresponda a espermadhesina AQN-3 (proteína de unión a ZP) (Topfer-Petersen y col. , 2008), también ya reportada en rafts (van Gestel y col. , 2005).

Como se mencionó anteriormente, la diferencia en  $M_r$  en las glicoproteínas puede deberse a modificaciones postraduccionales debido a la capacitación. Por otro lado, la mayor cantidad de glicoproteínas con residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico encontradas en los rafts de espermatozoides capacitados, pueden estar implicadas en las vías de señalización que se activan en el proceso de capacitación del espermatozoide en donde podrían estar participando de manera importante.

## **10. CONCLUSIONES**

Las proteínas asociadas a balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo se encuentran glicosiladas con residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico.

Algunas glicoproteínas con residuos de ácido siálico así como las de N-acetilglucosamina se concentran en la fracción de rafts, específicamente las de 97.91, 44.95 y 106.94, 42.16, 32.76 kDa respectivamente.

Las bandas de glicoproteínas con  $M_r$  de 35.75, 78.89 y 145.37 kDa con residuos de ácido siálico que solo se encuentran en los rafts de espermatozoides de cerdo cuando ha ocurrido la capacitación.

Hay una banda de 96.92 kDa, con residuos de N-acetilglucosamina exclusiva de rafts de espermatozoides capacitados.

## 11. LITERATURA CITADA

- Anderson, R. G., (1998) The caveolae membrane system, *Annu Rev Biochem*, **67**: 199-225.
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M. y Florman, H. M., (1999) Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**: 6757-6762.
- Bavister, B., Leibfried, M. y Lieberman, G., (1983) Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium, *Biol Reprod*, **28**: 235-247.
- Brown, D. y London, E., (1998a) Function of lipid rafts in biological membrane, *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**: 111-136.
- Brown, D. A. y London, E., (1998b) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes, *J Membr Biol*, **164**: 103-114.
- Cross, N., (2004) Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm., *Biol Reprod*, **71**: 1367-1373.
- Cross, N. L., (1996) Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness, *Mol Reprod Dev*, **45**: 212-217.
- Davis, B. K., (1981) Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**: 7560-7564.

- Davis, B. K., Byrne, R. y Bedigian, K., (1980) Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**: 1546-1550.
- Davis, B. K., Byrne, R. y Hungund, B., (1979) Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro, *Biochim Biophys Acta*, **558**: 257-266.
- Fierro, R., Bene, M. C., Foliguet, B., Faure, G. C. y Grignon, G., (1998) Evaluation of human sperm acrosome reaction and viability by flow cytometry, *Ital J Anat Embryol*, **103**: 75-84.
- Fierro, R., Foliguet, B., Grignon, G., Daniel, M., Bene, M. C., Faure, G. C. y Barbarino-Monnier, P., (1996) Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry, *Arch Androl*, **36**: 187-196.
- Flesch, F. M., Brouwers, J. F., Nievelstein, P. F., Verkleij, A. J., van Golde, L. M., Colenbrander, B. y Gadella, B. M., (2001) Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane, *J Cell Sci*, **114**: 3543-3555.
- Flesch, F. M. y Gadella, B. M., (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization, *Biochim Biophys Acta*, **1469**: 197-235.

- Florman, H. M., Arnoult, C., Kazam, I. G., Li, C. y O'Toole, C. M., (1998) A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels, *Biol Reprod*, **59**: 12-16.
- Fraser, L. y Herold, E., (1990) Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate, *Mol Reprod Dev*, **40**: 233-241.
- Frits, M., Flesch, F. M. y Gadella, B. M., (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization, *Biochim Biophys Acta*, **1469**: 197-235.
- Gadella, B. M., Tsai, P. S., Boerke, A. y Brewis, I. A., (2008) Sperm head membrane reorganisation during capacitation, *Int J Dev Biol*, **52**: 473-480.
- Garner, D. L. y Hafez, E., S .E. (1993). Spermatozoa and seminal plasma. en *Reproduction in Farm Animals*. E. S. E. Hafez. Philadelphia, Lea & Febiger: pp. 165-187.
- Go, K. J. y Wolf, D. P., (1985) Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation, *Biol Reprod*, **32**: 145-153.
- Guo, B., Kato, R. M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M. I. y Rawlings, D. J., (2000) Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex, *Immunity*, **13**: 243-253.
- Hafez, E. S. E. y H., B. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. México, D. F. , McGraw-Hill Interamericana.
- Jiménez, I., Fierro, R., González-Márquez, H., Mendoza-Hernández, G., Romo, S. y M, B., (2006) Carbohydrate affinity chromatography indicates that

- Arylsulfatase-A from capacitated boar sperm has mannose and N-acetylglucosamine/sialic acid residues, *Archives of Andrology*, **52**: 455-462.
- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Betancourt, M., Herrera, J. y Fierro, R., (2002) Expression of lectin receptors en the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boar by flow cytometry, *Arch Androl*, **48**: 159-166.
- Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J. A., García, A., Betancourt, M. y Fierro, R., (2003) Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa, *Theriogenology*, **59**: 1171-1180.
- Jones, R., James, P. S., Howes, L., Bruckbauer, A. y Klenerman, D., (2007) Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation, *Asian J Androl*, **9**: 438-444.
- Kabouridis, P. S., Janzen, J., Magee, A. L. y Ley, S. C., (2000) Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes, *Eur J Immunol*, **30**: 954-963.
- Karp, G. (2006). Biología celular y molecular. en. México, Mc. Graw-Hill: pp. 118-133.
- Kawano, N., Yoshida, K., Miyado, K. y Yoshida, M., (2011) Lipid rafts: keys to sperm maturation, fertilization, and early embryogenesis, *J Lipids*, **2011**: 264706.
- Laemmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**: 680-685.
- Lay, K. M., Ashizawa, K., Nakada, T. y Tatemoto, H., (2011a) N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation is involved in sperm-zona pellucida interactions of porcine oocytes, *Theriogenology*, **75**: 1146-1152.

- Lay, K. M., Oshiro, R., Arasaki, C., Ashizawa, K. y Tatemoto, H., (2011b) Role of Acidification Elicited by Sialylation and Sulfation of Zona Glycoproteins During Oocyte Maturation in Porcine Sperm-zona Pellucida Interactions, *J Reprod Dev.*
- Miranda, P. V., Allaire, A., Sosnik, J. y Visconti, P. E., (2009) Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm, *Biol Reprod*, **80**: 897-904.
- Morrissey, J. H., (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity, *Anal Biochem*, **117**: 307-310.
- Nixon, B., Mitchell, L. A., Anderson, A., McLaughlin, E. A., O'Bryan, M. K. y Aitken, R. J., (2010) Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes, *J Cell Physiol*: 2651-2665.
- Pinaud, F., Michalet, X., Iyer, G., Margeat, E., Moore, H. P. y Weiss, S., (2009) Dynamic partitioning of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-rich microdomains imaged by single-quantum dot tracking, *Traffic*, **10**: 691-712.
- Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F. y Parton, R. G., (1999) Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains, *Nat Cell Biol*, **1**: 98-105.
- Selvaraj, V., Asano, A., Buttke, D. E., McElwee, J. L., Nelson, J. L., Wolff, C. A., Merdushev, T., Fornes, M. W., Cohen, A. W., Lisanti, M. P., Rothblat, G. H.,

- Kopf, G. S. y Travis, A. J., (2006) Segregation of micron-scale membrane subdomains in live murine sperm, *J Cell Physiol*, **206**: 636-646.
- Shadan, S., James, P. S., Howes, E. A. y Jones, R., (2004) Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa, *Biol Reprod*, **71**: 253-265.
- Simons, K. y Ehehalt, R., (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease, *J Clin Invest*, **110**: 597-603.
- Singer, S. y Nicolson, G., (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science*, **175**: 720-731.
- Sleight, S. B., Miranda, P. V., Plaskett, N. W., Maier, B., Lysiak, J., Scoble, H., Herr, J. C. y Visconti, P. E., (2005) Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation, *Biol Reprod*, **73**: 721-729.
- Somerharju, P., Virtanen, J. A., Cheng, K. H. y Hermansson, M., (2009) The superlattice model of lateral organization of membranes and its implications on membrane lipid homeostasis, *Biochim Biophys Acta*, **1788**: 12-23.
- Suarez, S. S., (1996) Hyperactivated motility in sperm, *J Androl*, **17**: 331-335.
- Suzuki, F. y Yanagimachi, R., (1989) Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa, *Gamete Res*, **23**: 335-347.
- Topfer-Petersen, E., Ekhlasi-Hundrieser, M. y Tsoлова, M., (2008) Glycobiology of fertilization in the pig, *Int J Dev Biol*, **52**: 717-736.

- Tulsiani, D. R., Komiya, Y. H. y Araki, Y., (1997) Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event, *Biol Reprod*, **57**: 487-494.
- van Gestel, R. A., Brewis, I. A., Ashton, P. R., Helms, J. B., Brouwers, J. F. y Gadella, B. M., (2005) Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells, *Mol Hum Reprod*, **11**: 583-590.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. y Kopf, G. S., (1995a) Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation, *Development*, **121**: 1129-1137.
- Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Ning, X., Moore, G. D., Valenzuela, J. P., Jorgez, C. J., Alvarez, J. G. y Kopf, G. S., (1999a) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation, *J Biol Chem*, **274**: 3235-3242.
- Visconti, P. E. y Kopf, G. S., (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation, *Biol Reprod*, **59**: 1-6.
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P. y Kopf, G. S., (1995b) Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway, *Development*, **121**: 1139-1150.
- Visconti, P. E., Ning, X., Fornes, M. W., Alvarez, J. G., Stein, P., Connors, S. A. y Kopf, G. S., (1999b) Cholesterol efflux-mediated signal transduction in

mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation, *Dev Biol*, **214**: 429-443.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. en *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. D. Neill. New York, Raven Press. **I**: pp. 189-317.

Zeng, Y., Clark, E. N. y Florman, H. M., (1995) Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion, *Dev Biol*, **171**: 554-563.