



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS CONJUGADAS A  
UBIQUITINA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS CAPACITADOS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA DE  
LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**PRESENTA:**

**BIÓL EXP. CINTHYA CASAS ORTEGA**

**COMITÉ TUTORAL:**

**CODIRECTORES:**

**DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN**

**DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ**

**ASESOR**

**M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA**

**CIUDAD DE MÉXICO. MAYO, 2022**

## COMITÉ TUTORAL

### **Directora principal**

**Dra. Mayel del Valle Chirinos Espín**

Investigadora en Ciencias Médicas

Departamento de Biología de la Reproducción

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

[mayel.chirinose@incmnsz.mx](mailto:mayel.chirinose@incmnsz.mx)

### **Director**

**Dr. Edmundo Bonilla González**

Profesor investigador titular "C" T.C.

Departamento en Ciencias de la salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

[mundo@xanum.uam.mx](mailto:mundo@xanum.uam.mx)

### **Asesor**

**M. en C. Pedro Cuapio Padilla**

Laboratorio de Andrología, Banco de Semen, Calidad e Investigación de

HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español

[cuapiopp@yahoo.com.mx](mailto:cuapiopp@yahoo.com.mx)

## MIEMBROS DEL JURADO

### **Dra. Gabriela Hernández Silva**

Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

[gabyhs\\_1612@hotmail.com](mailto:gabyhs_1612@hotmail.com)

### **M. en C. Pedro Cuapio Padilla**

Laboratorio de Andrología, Banco de Semen, Calidad e Investigación de HISPAREP, Clínica de Reproducción Asistida, Hospital Español

[cuapiopp@yahoo.com.mx](mailto:cuapiopp@yahoo.com.mx)

### **Dr. Iván Uriel Bahena Ocampo**

Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I

[ibahena@xanum.uam.mx](mailto:ibahena@xanum.uam.mx)

### **Dr. Eduardo Casas Hernández**

Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, UAM-I

[dino@xanum.uam.mx](mailto:dino@xanum.uam.mx)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana perteneciente al programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con número de registro: 003797.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el estímulo económico otorgado para realizar este trabajo de investigación con número de registro CVU: 1014045.



**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL de la alumna CINTHYA CASAS ORTEGA, matrícula 2192802138, quien cumplió con los 192 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veinte de mayo del 2022 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

**CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS CONJUGADAS A UBIQUITINA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS CAPACITADOS**

Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 232 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBAR

**JURADO**

Presidente

  
DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

Secretario

  
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

Vocal

  
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA

Vocal

  
DRA. GABRIELA HERNANDEZ SILVA



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

Fecha : 20/05/2022  
Página : 1/1

#### CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO de MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL de la alumna CINTHYA CASAS ORTEGA, matrícula 2192802138, quien cumplió con los 192 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio. Con fecha veinte de mayo del 2022 presentó la DEFENSA de su EXAMEN DE GRADO cuya denominación es:

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS CONJUGADAS A UBIQUITINA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS CAPACITADOS

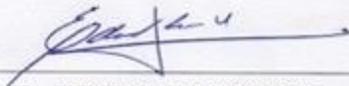
Cabe mencionar que la aprobación tiene un valor de 40 créditos y el programa consta de 232 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBAR

#### JURADO

Presidente

  
DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

Secretario

  
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO

Vocal

  
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA

Vocal

  
DRA. GABRIELA HERNANDEZ SILVA

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

A mis padres Ignacio y Bertha, por darme la vida, por su amor, por todo el esfuerzo que hicieron y hacen día a día, por confiar en mí, enseñarme a ser una persona de bien y apoyarme incondicionalmente en mis decisiones de vida.

A mi esposo Omar, al que amo con todo mi corazón y que es un gran ejemplo de perseverancia, paciencia y amor incondicional. Gracias por estar en los peores y mejores momentos de mi vida, por no dejarme caer y confiar siempre en mí.

A mis sobrinas Emily y Sofia, que son la alegría de mi corazón.

A mis hermanas Maricela e Ivonne, con las que he compartido tantos momentos que me han enseñado tanto.

A la Dra. Mayel Chirinos, por enseñarme tanto en mi formación como investigadora, por abrirme las puertas de su laboratorio, confiar en mi trabajo y tenerme mucha paciencia. Gracias por ser un gran ser humano y enseñarme que aunque las cosas no salen perfectas siempre se aprende algo bueno con trabajo y dedicación.

Al Mtro. Pedro Cuapio, por siempre tener la disposición de apoyarme y enseñarme la pasión que se debe tener al trabajo, a lo que uno ama hacer y las ganas de siempre dar lo mejor por los pacientes.

Al Dr. Edmundo Bonilla por su apoyo durante el posgrado y por ser una gran persona.

A mis compañeros de maestría y de laboratorio, por animarnos siempre entre nosotr@s, pasar buenos momentos y muchos otros de incertidumbre con cada muestra procesada y cada experimento realizado.

## **Dedicatoria**

**A mis padres**

**A mi esposo**

**A mis hermanas**

**A mis sobrinas**

**A mi familia**

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABLAS .....	12
ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN .....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	17
1.1 FECUNDACIÓN.....	17
1.2 ESPERMATOGÉNESIS.....	18
1.3 FASES DE LA ESPERMATOGÉNESIS.....	19
1.4 REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESPERMATOGÉNESIS.....	23
1.5 EL ESPERMATOZOIDE .....	24
1.6 MADURACIÓN POST-TESTICULAR DEL ESPERMATOZOIDE .....	26
1.7 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....	27
1.8 REACCIÓN ACROSOMAL .....	29
1.9 SISTEMA UBIQUITINA PROTEOSOMA .....	31
2. ANTECEDENTES.....	34
3. JUSTIFICACIÓN.....	37
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	37
5. HIPÓTESIS.....	37
6. OBJETIVO GENERAL .....	37
6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
7.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	38
7.2 SELECCIÓN DE DONADORES .....	38
7.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SEMEN HUMANO .....	39
7.4 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....	39
7.5 MOVILIDAD ESPERMÁTICA .....	40
7.6 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS .....	40
7.6.1 <i>Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</i> .....	40
7.6.2 <i>Electroforesis bidimensional (2DE)</i> .....	41
7.7 WESTERN BLOT.....	41
7.8 PURIFICACIÓN POR INMUNOAFINIDAD .....	42
7.9 ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	43
8. RESULTADOS.....	44
8.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE SEMEN UTILIZADAS .....	44
8.2 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS DE ESPERMATOZOIDES .....	45

<b>8.3 EFECTO DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA A DIFERENTES TIEMPOS SOBRE LA UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>46</b>
<b>8.4 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS DE ESPERMATOZOIDEOS MEDIANTE 2DE .....</b>	<b>48</b>
<b>8.5 USO DEL INHIBIDOR DEL PROTEOSOMA 26S .....</b>	<b>49</b>
<b>8.6 EFECTO DEL INHIBIDOR DEL PROTEOSOMA 26S EN LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....</b>	<b>50</b>
<b>8.7 EFECTO DEL INHIBIDOR DEL PROTEOSOMA SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA .....</b>	<b>51</b>
<b>8.8 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS MEDIANTE INMUNOPRECIPITACIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>10. CONCLUSIONES .....</b>	<b>58</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO 11.1 COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS UTILIZADOS .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO 11.2 ANTICUERPOS UTILIZADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO 11.3 PROTOCOLO ELÉCTRICO DEL IEF PARA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE 2DE .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO 11.4 RESULTADOS COMPLEMENTARIOS .....</b>	<b>62</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>65</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Espermatogénesis.....	19
Fig. 2. Fases de la espermatogénesis.....	21
Fig. 3. Etapas de la espermiogénesis.....	22
Fig. 4. Eje de regulación hormonal implicado en la espermatogénesis.....	24
Fig. 5. Estructura del espermatozoide humano.....	26
Fig. 6. Cambios del espermatozoide durante la capacitación y la reacción acrosomal.....	30
Fig. 7. Componentes estructurales del proteosoma 26S.....	32
Fig. 8. Sistema de degradación ubiquitina proteosoma.....	33
Fig. 9. Diagrama de la estrategia experimental.....	38
Fig. 10. Morfología espermática.....	45
Fig. 11. Efecto de la capacitación espermática en la ubiquitinación de proteínas.....	46
Fig. 12. Capacitación de espermatozoides humanos a diferentes tiempos de 4 diferentes donadores.....	47
Fig. 13. Capacitación de espermatozoides humanos a diferentes tiempos.....	47
Fig. 14. Proteínas ubiquitinadas en espermatozoides humanos no capacitados (NC) y capacitados (CAP) separadas mediante geles bidimensionales y analizadas mediante Western blot.....	48
Fig. 15. Curva de concentración del inhibidor del proteosoma MG132 sobre la ubiquitinación en proteínas de espermatozoides capacitados.....	50
Fig. 16. Ubiquitinación y fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas durante la capacitación.....	51
Fig. 17. Movilidad de espermatozoides capacitados en presencia de MG132.....	52
Fig. 18. Inmunoprecipitación de proteínas ubiquitinadas en espermatozoides no capacitados.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de referencia para examinar semen humano publicado por la Organización Mundial de la Salud, 2010.....	39
Tabla 2. Parámetros evaluados en las muestras en fresco.....	44
Tabla 3. Abundancia relativa de grupos de proteínas separadas mediante geles bidimensionales .....	49

## ABREVIATURAS

2DE	Electroforesis bidimensional
ABCC4	Miembro 4 de la subfamilia C de casete de unión a ATP
ABP	Proteína de unión a andrógenos
ACRBP	Proteína de unión a acrosina
ADAM5	Metaloproteinasa 5
AKAP3	Proteína de anclaje A-quinasa 3
APP	Aminopeptidasas
AQN1	Espermadesina
ARNs	Ácidos ribonucleicos
ATP	Adenosín trifosfato
AWN1	Espermadesina
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CAP	Espermatozoides capacitados
DMSO	Dimetilsulfóxido
DUB	Desubiquitina
E1	Enzima activadora de ubiquitina
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima ubiquitina ligasa
EE	Error estándar
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HSA	Albúmina sérica humana
HTF	Fluido tubárico humano

IEF	Isoelectroenfoque
K	Lisina
LH	Hormona luteinizante
MFGE-8	Lactadherina
MRP4	Proteína de resistencia a múltiples fármacos
NC	Espermatozoides no capacitados
O.M.S.	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
pI	Punto isoeléctrico
PKA	Proteína cinasa A
PM	Peso molecular
PTK	Tirosinas cinasas no receptoras
RTK	Tirosinas cinasas receptoras
SACY	Adenil ciclasa soluble
SDS-PAGE	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes
SPINK2	Inhibidor de acrosina
SUP	Sistema ubiquitina proteosoma
T	Testosterona
Tub	Anti $\beta$ -tubulina
TKs	Tirosinas cinasas
UBA1	Enzima activadora de ubiquitina tipo E1

## RESUMEN

La capacitación es el conjunto de cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren en los espermatozoides durante su tránsito por el tracto reproductor femenino y que son necesarios para convertirse en células capaces de fecundar al gameto femenino. Si bien se han estudiado algunos de los mecanismos relacionados con la capacitación, como es el aumento de la fosforilación en tirosinas, aún existen otros en los cuales el conocimiento es limitado. Uno de los mecanismos involucrados en la capacitación que han sido poco estudiados es el sistema ubiquitina proteosoma. El objetivo de este proyecto fue caracterizar las proteínas conjugadas a ubiquitina en espermatozoides humanos durante la capacitación *in vitro*. Para ello, se estudiaron los cambios en proteínas ubiquitinadas a partir de espermatozoides humanos no capacitados y capacitados mediante Western blot, a partir de la separación de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y electroforesis bidimensional (2DE). Adicionalmente, las proteínas conjugadas a ubiquitina fueron aisladas mediante inmunoprecipitación. Los resultados obtenidos indican que la conjugación de proteínas a ubiquitina aumenta durante la capacitación, simultáneo al aumento en la fosforilación en tirosinas. El análisis de los conjugados de ubiquitina permitió identificar 6 grupos de proteínas diferencialmente ubiquitinadas. Al inhibir la actividad del proteosoma, se observó una acumulación en los conjugados de ubiquitina, mientras que la fosforilación en tirosinas se mantuvo estable. La inmunoprecipitación permitió el aislamiento de los conjugados de ubiquitina, aunque el rendimiento fue muy bajo. Los resultados obtenidos apoyan que las proteínas del espermatozoide conjugadas a ubiquitina y su degradación por el proteosoma participan durante la capacitación, por lo que su estudio e identificación podría contribuir al mejor conocimiento de las vías de señalización requeridas para que el espermatozoide pueda fecundar.

## ABSTRACT

Capacitation is a set of biochemical and physiological changes that occur in spermatozoa during their transit along the female reproductive tract that are necessary to become cells able to fertilize the female gamete. Although several mechanisms related to capacitation have been studied, such as the increase of tyrosine phosphorylation, there are still some others unknown. One of the mechanisms involved in capacitation that is poorly studied is the ubiquitin-proteasome system. The aim of this project was to characterize the proteins conjugated to ubiquitin in human sperm during the *in vitro* capacitation. To that purpose, we studied the changes in ubiquitinated proteins of non-capacitated and capacitated human spermatozoa by Western blot, after protein separation by denaturing electrophoresis (SDS-PAGE) and two-dimensional electrophoresis (2DE). Moreover, the proteins conjugated to ubiquitin were isolated by immunoprecipitation. The results show the increase of protein ubiquitin conjugation during capacitation, simultaneous to the increase of tyrosine phosphorylation. Further analysis of the ubiquitin conjugates allowed the identification of 6 protein groups differentially ubiquitinated. When the proteasome activity was inhibited, we found the accumulation of ubiquitin conjugates, while the tyrosine phosphorylation remained steady. The immunoprecipitation allowed the isolation of ubiquitin conjugates, but the recovery was very low. The results support that the sperm proteins conjugated to ubiquitin and their degradation by the proteasome participate during capacitation, so their study and identification may contribute to the better knowledge of the signaling pathways necessary for sperm to fertilize.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Fecundación

La fecundación es un proceso coordinado entre el gameto masculino (espermatozoide) y el femenino (ovocito) en el cual interactúan, se reconocen y culmina en la fusión de ambas células para dar inicio a la formación de un nuevo organismo. Para que dicho proceso se lleve a cabo, es necesario que los gametos se encuentren maduros. En el caso del ovocito, se considera maduro o con capacidad fecundante cuando alcanza un tamaño de 120  $\mu\text{m}$  de diámetro y se encuentra detenido en la profase de la meiosis II, mientras que los espermatozoides adquieren su capacidad fecundante de manera progresiva al recorrer el epidídimo (maduración post-testicular) y concluye durante su tránsito por el tracto reproductor femenino mediante el proceso llamado capacitación (Georgadaki et al., 2016).

Durante el coito, el hombre deposita millones de espermatozoides en la vagina de la mujer, de los cuales gran cantidad muere debido al ambiente ácido propio de la vagina y otro tanto sobrevive gracias a los elementos protectores que se encuentran en el plasma seminal. Aquellos espermatozoides que logran superar esa primera barrera nadan a través del moco cervical al útero, sitio en el cual tienen contacto con células inmunológicas, tales como los leucocitos polimorfonucleares, los cuales posiblemente están involucrados en la eliminación de espermatozoides defectuosos mediante fagocitosis. Una vez ahí, mediante contracciones musculares, el útero facilita el recorrido de los espermatozoides hacia el tercio superior del oviducto, donde se ubica el ámpula que es donde ocurre la fecundación. El oviducto presenta un ambiente mayormente favorable para la vitalidad espermática, con menor cantidad de células inmunológicas y secreciones epiteliales que promueven la interacción de los gametos. Sin embargo, este mismo epitelio oviductal parece seleccionar de manera más rigurosa a espermatozoides con características particularmente óptimas, como la correcta condensación de cromatina, morfología adecuada y buena movilidad (García-Vázquez et al., 2016; Georgadaki et al., 2016).

## 1.2 Espermatogénesis

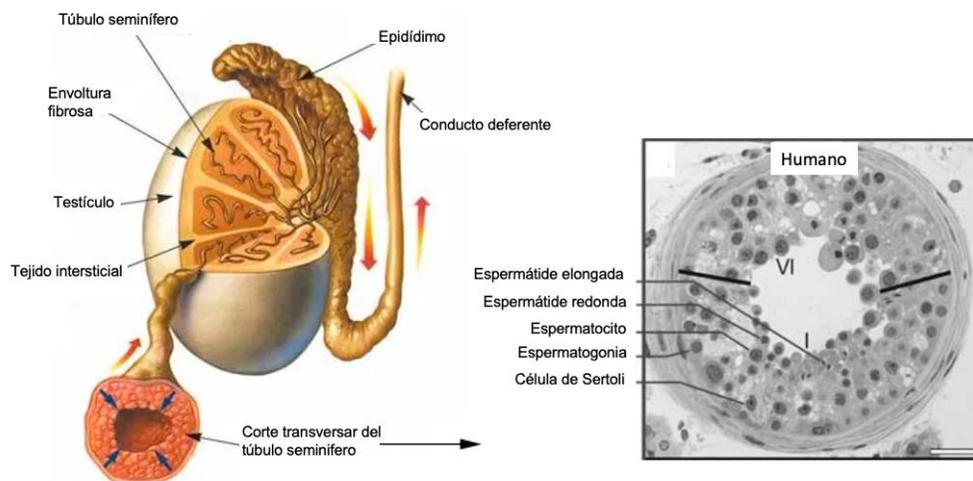
La espermatogénesis es un proceso altamente complejo mediante el cual las células germinales primordiales masculinas (diploides) son diferenciadas a espermatozoides (haploides) mediante 3 fases principales que involucran: 1) divisiones mitóticas para generar proliferación celular; 2) divisiones meióticas para reducir el número de cromosomas; y 3) el proceso de espermiogénesis, mediante el cual células redondas adquieren la morfología propia del espermatozoide (de Kretser et al., 1998).

El proceso de la espermatogénesis se lleva a cabo en los túbulos seminíferos del testículo (Cannarella et al., 2020; de Kretser et al., 1998). Los testículos son estructuras ovoides en par de aproximadamente 4.5-5 cm de largo y 2.5-4 cm de ancho en el humano. Dentro de éstos podemos identificar dos compartimentos: 1) el compartimento tubular, que comprende la región de túbulos seminíferos; y 2) el compartimento intertubular, que rodea a todos estos túbulos seminíferos compuesto de tejido intersticial (tejido conectivo laxo), células de Leydig, vasos sanguíneos y macrófagos. Las células de Leydig cumplen una importante función debido a que son la principal fuente de testosterona (T) en los hombres y se localizan de manera estratégica entre los vasos sanguíneos y los túbulos seminíferos. Por otra parte, los testículos también son responsables de sintetizar y secretar andrógenos (T), los cuales juegan un papel importante para la producción espermática y la reproducción masculina, un hombre pospuberal secretan entre 3 y 10 mg/día de T, lo que representa más del 95 % del total de T circulante, la cual puede almacenarse en el compartimento intratesticular o liberarse a la circulación sistémica. (Durairajanayagam et al., 2015; Neto et al., 2016).

Los túbulos seminíferos ocupan alrededor de dos tercios del volumen total de los testículos. Están constituidos por una membrana basal, células germinales en los diferentes estadios de diferenciación y las células de Sertoli, cuya función es aportar un ambiente hormonal y de soporte adecuado para la continua diferenciación germinal. Si partimos de la región basal del túbulo hacia el lumen, podemos

identificar por orden de maduración a espermatogonias tipo A, espermatogonias tipo B, espermatocitos primarios y secundarios, espermátides redondas, espermátides elongadas y espermatozoides (Hess y Renato de Franca, 2008; Neto et al., 2016). Estos túbulos seminíferos se rodean de tejido peritubular que permite la contractilidad e incluso pueden modificar la actividad de las hormonas y de los factores de crecimiento sobre el epitelio seminífero. Se componen de seis capas celulares de miofibroblastos internos y fibroblastos externos (Kerr, 1992).

El proceso de diferenciación espermática requiere de aproximadamente 74 días en el hombre. Sin embargo, se producen de manera continua debido a que a lo largo del túbulo las células germinales se encuentran en diferentes fases de diferenciación (Fig. 1) (Cannarella et al., 2020; de Kretser et al., 1998).



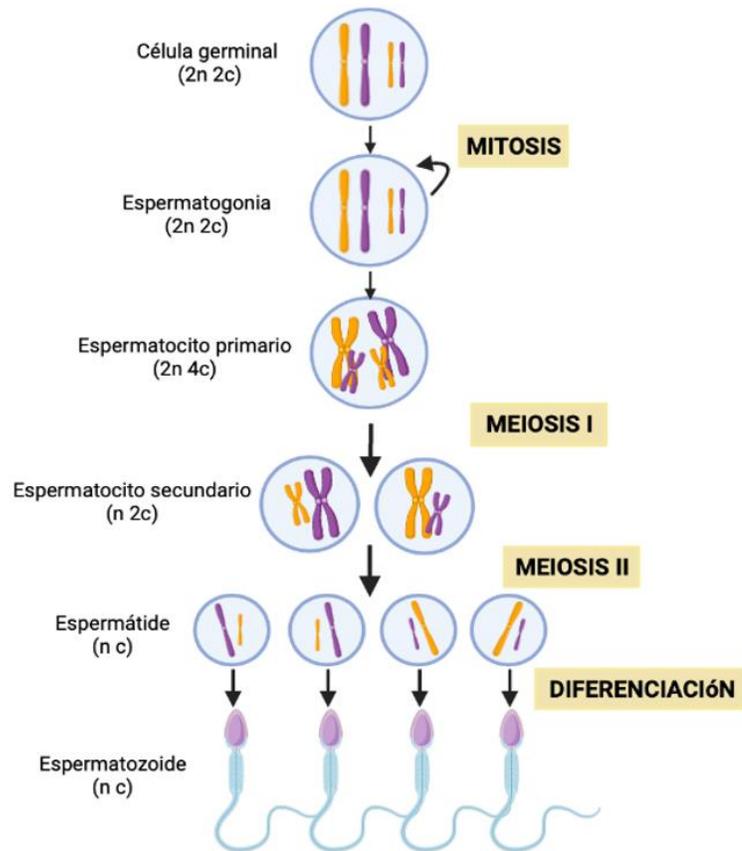
**Fig. 1. Espermatogénesis.** Dentro del testículo se localizan los túbulos seminíferos, donde se encuentran los diferentes estadios de diferenciación espermática. A la izquierda se observa la disposición de los túbulos seminíferos dentro del testículo. A la derecha se muestra un corte transversal del túbulo con la disposición celular de espermatogonias a espermátides elongadas. (Modificado de Hess and Renato de Franca, 2008 y <https://www.mens-app.es/estructura-y-funcion-de-los-testiculos/>).

### 1.3 Fases de la Espermatogénesis

La primera fase de la espermatogénesis es considerada proliferativa. Aquí las espermatogonias, que son células diploides localizadas en la membrana basal del

túbulo seminífero, comienzan a dividirse mediante mitosis de manera continua. Las células madre espermatogoniales se pueden clasificar en dos tipos: el tipo A y el tipo B, siendo la espermatogonia B la que comienza a dividirse por mitosis, conformando dos espermatocitos en la fase de preleptoteno, que representan el inicio de la siguiente fase de la espermatogénesis: la fase meiótica. Mientras que las espermatogonias tipo A se mantienen en la zona basal del túbulo seminífero como células progenitoras (Hess y Renato de Franca, 2008).

La segunda fase consta de divisiones celulares de tipo meiótico. La división meiótica consta de tres etapas: (A) meiosis I, con la división de células con 2 juegos de cromosomas y 4 cromátidas hermanas ( $2n$   $4c$ ); (B) formación de espermatocitos secundarios ( $n$   $2c$ ) y (C) meiosis II, que es la división de espermatocitos secundarios con la finalidad de formar espermátides redondas haploides ( $n$   $c$ ) (Fig. 2) (Hess y Renato de Franca, 2008).



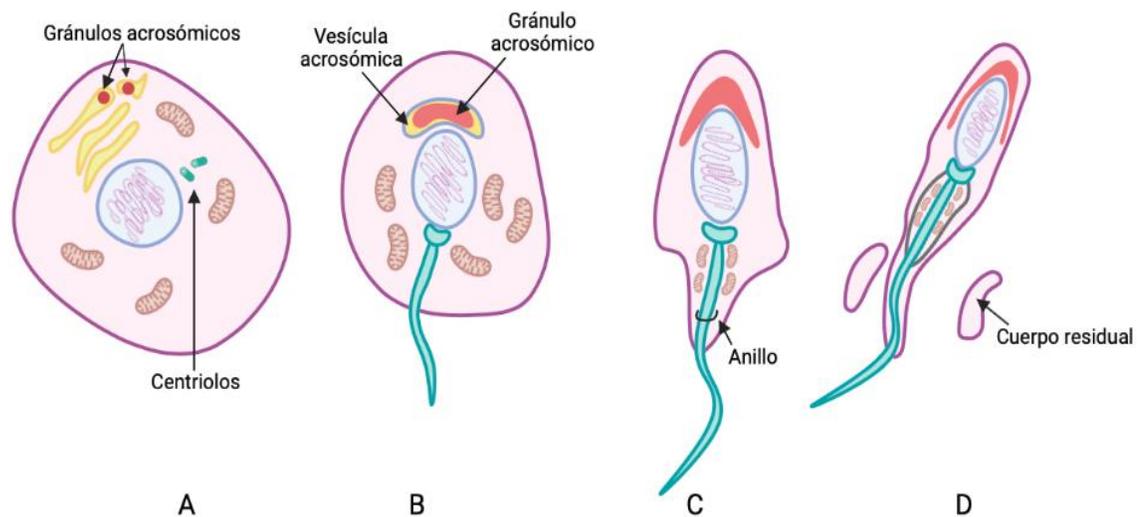
Created in BioRender.com

**Fig. 2. Fases de la espermatogénesis.** Durante la espermatogénesis, las células germinales experimentan divisiones mitóticas y meióticas para adquirir una carga génica haploide. Por otra parte, también existe una remodelación morfológica para adquirir la estructura propia del espermatozoide. (Realizado en BioRender.com)

La última fase ya no implica ningún tipo de división, ahora cada espermátide inicia con la remodelación de sus organelos mediante el proceso denominado espermiogénesis para culminar con la morfología propia de un espermatozoide. El proceso de espermiogénesis se desarrolla a través de 4 etapas:

1. Etapa de Golgi: Este organelo se diferencia para dar origen a una vesícula denominada acrosoma, la cual contendrá enzimas indispensables para procesos posteriores que permiten la fecundación.

2. Etapa de casquete: En este momento de la espermatogénesis, la vesícula acrosomal toca la envoltura nuclear y comienza a aplanarse hasta cubrir aproximadamente un tercio de la superficie nuclear. Por otra parte, el núcleo comienza a presentar cambios en su morfología.
3. Etapa acrosomal: Implica la migración del acrosoma sobre el núcleo y es típicamente observada en espermátides redondas. En esta etapa también se incluye la condensación de cromatina.
4. Etapa de maduración: Aquí, el exceso de citoplasma celular es eliminado mediante la formación de lóbulos citoplasmáticos y cuerpos residuales que contienen componentes celulares no requeridos para su función, como son mitocondrias, ribosomas, lípidos, y vesículas entre otros. Además, en esta fase los cambios en el núcleo y la migración del acrosoma continúan desarrollándose, pero en menor proporción (Fig. 3) (Hess y Renato de Franca, 2008).

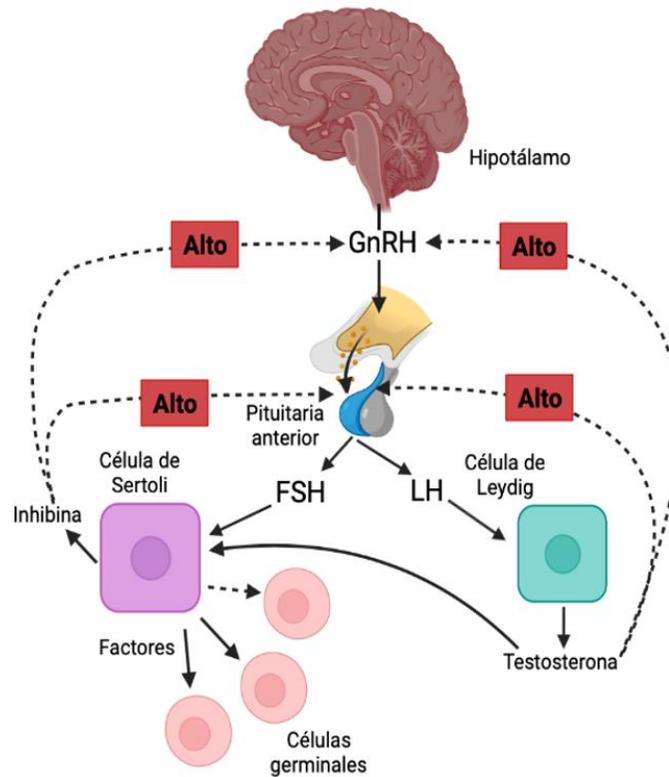


Created in BioRender.com bio

**Fig. 3. Etapas de la espermiogénesis.** Transformación morfológica experimentada por espermátides redondas haploides a espermatozoides alargados maduros para ser liberados al lumen del túbulo seminífero. (A) Etapa de Golgi, (B) etapa de casquete, (C) etapa de acrosoma y (D) etapa de maduración. (Realizado en BioRender.com)

## **1.4 Regulación hormonal de la espermatogénesis**

La regulación hormonal en la espermatogénesis es orquestada mediante el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El control de este eje inicia con señales enviadas por el hipotálamo, al secretar la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) mediante pulsaciones. A su vez, la GnRH genera un efecto sobre la hipófisis estimulando la producción de gonadotropinas, tales como la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), para su posterior liberación. La LH es liberada de manera similar a la GnRH mediante pulsos, mientras que la liberación de FSH es influenciada por otra hormona, la inhibina. Tanto la LH como la FSH actúan a nivel testicular para producir testosterona e inhibina. La FSH actúa sobre las células de Sertoli estimulando la secreción de inhibina y proteína de unión a andrógenos (ABP), pero una vez que aumenta la concentración de inhibina, inicia una retroalimentación negativa en la hipófisis que culmina por suprimir la liberación de FSH y así, regular los niveles de inhibina. Por su parte, la LH actúa sobre las células de Leydig, localizadas en el compartimento intertubular del testículo, estimulando la producción de testosterona mediante la conversión de colesterol. Al presentarse altos niveles de testosterona, tal como ocurre con la inhibina y la FSH, se genera una retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis suprimiendo la liberación de LH y, a nivel del hipotálamo, suprimiendo la producción de GnRH, lo que genera la regulación a dos niveles (Fig. 4). Tanto FSH como LH son indispensables para llevar a cabo el proceso de espermatogénesis, la primera para iniciarlo y la segunda para mantenerlo (de Kretser et al., 1998).



Created in BioRender.com 

**Fig. 4. Eje de regulación hormonal implicado en la espermatogénesis.** El proceso de espermatogénesis se encuentra regulado a nivel de hipotálamo-hipófisis-testículo. El hipotálamo libera hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), lo que estimula a la hipófisis o pituitaria anterior a liberar hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). Posteriormente, estas dos hormonas llegan a sus respectivas células blanco para estimular la síntesis y secreción de hormonas esteroideas que, a su vez, tienen efectos regulatorios a diferentes niveles del eje. (Realizado en BioRender.com)

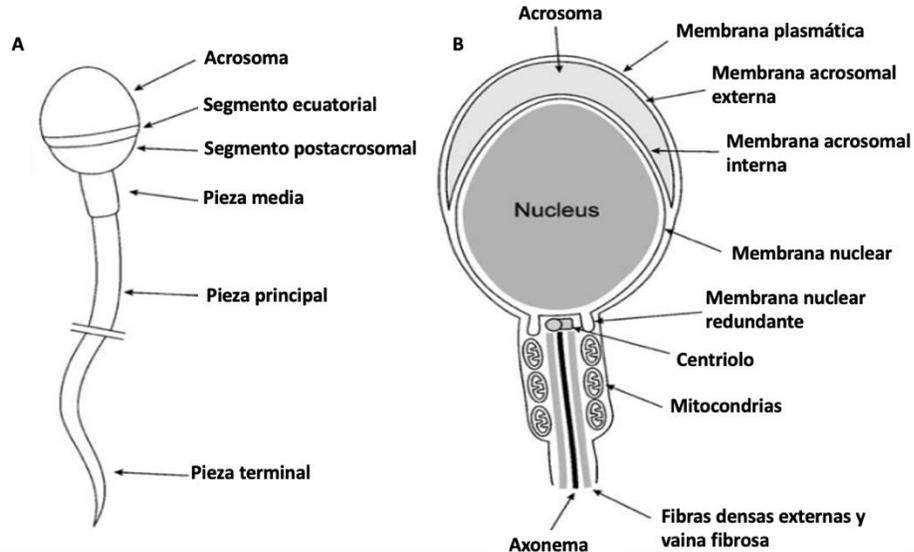
## 1.5 El espermatozoide

Los espermatozoides son células masculinas altamente diferenciadas cuyo propósito es transferir la información genética y epigenética a generaciones subsiguientes (Neto et al., 2016).

El espermatozoide humano consta de una cabeza y un flagelo unidos por una pieza conectora y mide entre 45 y 50  $\mu\text{m}$  de longitud. Siguiendo los criterios estrictos respecto a la morfología normal, la cabeza debe ser lisa y simétrica en forma ovalada con base ancha y región apical adelgazada, midiendo de 4 a 5.5  $\mu\text{m}$  de

largo y 2.5 a 3.5  $\mu\text{m}$  de ancho (World Health Organization, 2010). Esta región es muy importante, ya que ahí se localiza el material genético. El núcleo celular constituye aproximadamente el 65% de la cabeza del espermatozoide. En la cabeza también se presenta una región en forma de capuchón denominada acrosoma que ocupa dos tercios de su parte anterior. El acrosoma es una vesícula derivada del aparato de Golgi que contiene enzimas hidrolíticas como acrosina y hialuronidasa. Cuando el espermatozoide se encuentra cerca del complejo cúmulo-ovocito, se promueve una exocitosis del acrosoma que permite la liberación de su contenido enzimático, el cual es indispensable para la fertilización (Durairajanayagam et al., 2015).

El flagelo mide entre 40 y 50  $\mu\text{m}$  de largo y proporciona la movilidad a la célula. Se puede dividir en tres regiones: pieza media, pieza principal y pieza terminal. La pieza media sostiene la cabeza con el flagelo manteniéndolo en una posición central y es más ancha que el resto del flagelo. Ahí se localizan mitocondrias altamente compactadas en forma de hélice que aportan energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) indispensable para el movimiento. La pieza principal es la región más larga del flagelo y donde se localiza el axonema, que es la maquinaria de propulsión constituida por dos microtúbulos centrales y 9 pares periféricos. Finalmente, se encuentra la pieza terminal (Fig. 5). Si bien se mencionaba que la cabeza era la región más importante por contener el ADN, el flagelo también juega un papel muy importante, ya que permite al espermatozoide transportarse por el tracto reproductor femenino (Durairajanayagam et al., 2015).



**Fig. 5. Estructura del espermatozoide humano.** (A) Representación morfológica del espermatozoide humano, (B) amplificación de la cabeza con subdominios y pieza media. (Modificado de Darszon et al., 2005).

## 1.6 Maduración post-testicular del espermatozoide

Dentro del testículo, los espermatozoides adquieren una diferenciación morfológica y reducen su carga genética, pero aún son funcionalmente inmaduros. Para que los espermatozoides sean capaces de llevar a cabo la fecundación requieren de un proceso de maduración que se obtiene al recorrer el epidídimo. El epidídimo, es un sistema de conductos contorneados altamente especializado y de gran longitud (más de 6 metros de longitud en hombre) que forma parte del sistema reproductor masculino. De manera anatómica, se regionaliza en cuatro segmentos: el segmento inicial, la cabeza, el cuerpo y la cola (Sullivan y Mieusset, 2016).

En el epidídimo ocurre la concentración, la inmunoprotección y almacenamiento del gameto masculino. También es en este conducto donde los espermatozoides adquieren un movimiento flagelar progresivo y moléculas de superficie requeridas para el reconocimiento de la zona pelúcida del ovocito, una capa formada de glicoproteínas que se encuentran rodeando al ovocito (Sullivan y Mieusset, 2016).

Para que los espermatozoides lleguen a una maduración funcional es muy importante la interacción con el microambiente del epidídimo. La regionalización es muy marcada respecto a la función del epitelio epididimario. Por ejemplo, en el segmento inicial se absorbe la mayor parte del líquido secretado por el testículo, generando una concentración elevada de espermatozoides en la región. El epitelio de la cabeza es más activo, sintetiza y secreta mayor cantidad de proteínas, y es aquí donde los espermatozoides comienzan a nadar de manera progresiva. En el cuerpo, las características anteriores continúan afinándose hasta llegar a la cola del epidídimo, la cual presenta un gran lumen que permite el almacenamiento de los espermatozoides y presenta tanto actividad secretora como absorbente. El microambiente cambiante del epidídimo permite el aumento progresivo de la maduración funcional espermática (Zhou et al., 2018).

Los fluidos encontrados en el lumen del epidídimo son variados. Hoy en día se han podido identificar iones inorgánicos, proteínas y ARNs no codificantes. Sin embargo, es muy complejo conocer todos los componentes en su totalidad, ya que es cambiante de región a región. Dentro de estos fluidos existen vesículas denominadas epididimosomas, los cuales han llamado la atención en los últimos años debido a la capacidad que tienen para transferir de manera eficiente proteínas y ARNs no codificantes a los espermatozoides (Zhou et al., 2018).

Uno de los cambios que se genera en el epidídimo es la reducción de los centriolos. Un estudio realizado en ratones demostró que en la parte superior del epidídimo es posible localizar un par de centriolos en el espermatozoide, los cuales conforme avanzan por el epidídimo son degradados y transformados en cuerpos vestigiales una vez que el espermatozoide ha fecundado al ovocito (Simerly et al., 2016).

## **1.7 Capacitación espermática**

La capacitación espermática es el siguiente proceso requerido por los espermatozoides para convertirse en células completamente aptas para fecundar al

gameto femenino (Georgadaki et al., 2016). En el tracto reproductor femenino se depositan diferentes subpoblaciones de espermatozoides con diferentes grados de movilidad, fragmentación de ADN, morfología y sensibilidad a moléculas de señalización, por lo cual los espermatozoides de mejor calidad son seleccionados de manera rigurosa, y una gran cantidad de ellos son retenidos y no continúan hacia el encuentro con el ovocito (García-Vázquez et al., 2016) (Okabe, 2013).

Durante la capacitación se produce un aumento en la fluidez de la membrana plasmática como consecuencia del eflujo de colesterol, lo cual aumenta la afluencia iónica, la hiperpolarización de membrana, los cambios en la concentración de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y el aumento de la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas. Estos cambios permiten que el espermatozoide adquiera una movilidad hiperactivada y pueda llevar a cabo la reacción acrosomal, los cuales son cruciales para la penetración de la zona pelúcida y la posterior fusión con la membrana plasmática del ovocito (De Jonge, 2017). Uno de los eventos tempranos para llevar a cabo la capacitación espermática es la remoción de factores descapacitantes. Dicha remoción de la superficie de la membrana plasmática permite el inicio de eventos en cascada como es la pérdida de colesterol (aumentando la fluidez de membrana), el ingreso de iones como bicarbonato y calcio, los cuales aumentan el pH intracelular y activan la adenil ciclasa soluble (SACY), incrementándose con ello el cAMP y, posteriormente, la activación de la proteína cinasa A (PKA). En bovinos y en el ratón, el cAMP puede ser regulado a la baja mediante el transportador de nucleótidos MRP4 o ABCC4 y se piensa que este cAMP puede regular de manera autocrina al espermatozoide, ya que la adición externa de éste puede revertir los efectos de la inhibición de MRP4 en el proceso de hiperactivación, la fosforilación de tirosinas y la reacción acrosomal (Darszon et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, el aumento en la fosforilación de proteínas es indispensable para la capacitación. El aumento de la fosforilación en tirosinas es

generado mediante la activación de un grupo de enzimas denominadas tirosinas cinasas (TKs), las cuales son activadas de manera directa o indirecta por la PKA. Existen varias TK de la familia Src, como SRC, FYN, LYN y YES1, que se ha demostrado tienen una participación en la capacitación en varias especies. Sin embargo, SRC es la TK mayormente estudiada debido a que se ubica en el flagelo de espermatozoides humanos y se activa por la fosforilación del residuo Y416 durante la capacitación (Signorelli et al., 2012).

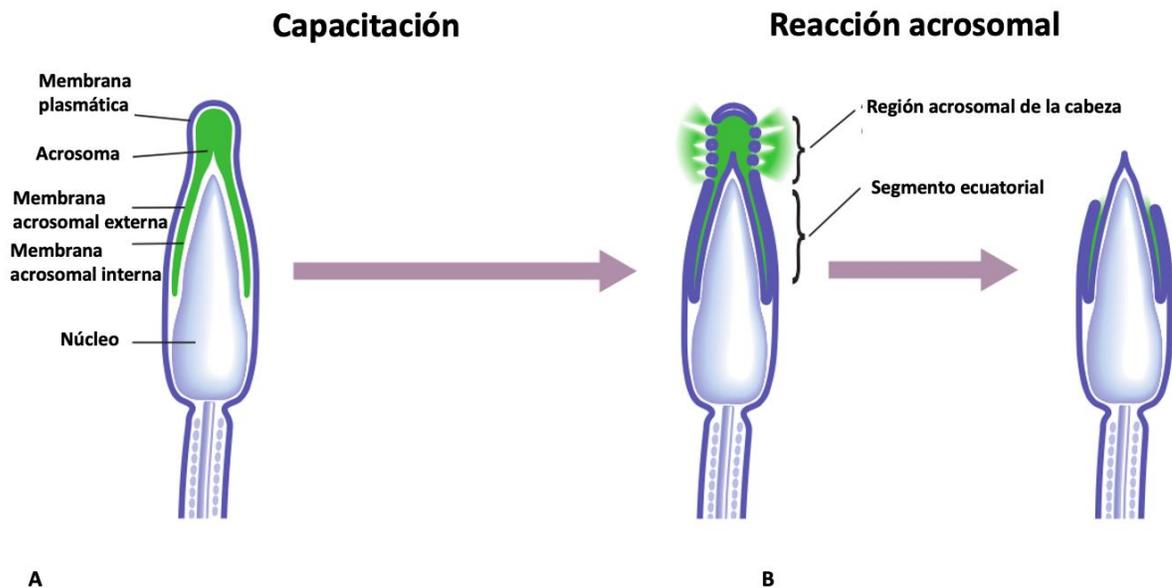
Otro componente importante para los espermatozoides post-eyaculados es la obtención de energía necesaria para llevar a cabo el largo recorrido del lugar donde son depositados al sitio donde ocurre la fecundación. Por lo tanto, los espermatozoides llevan a cabo los procesos bioquímicos de glucólisis y fosforilación oxidativa para obtener la energía requerida en forma de adenosín trifosfato (ATP). En mamíferos, las enzimas implicadas en la glucólisis se encuentran unidas a la vaina fibrosa de la pieza principal del flagelo, mientras que la fosforilación oxidativa se realiza en las mitocondrias localizadas en la pieza media (Darszon et al., 2020).

Por otra parte, en las últimas décadas se ha dado gran importancia a la función de los canales de calcio en el proceso de capacitación debido a la relación que existe entre el calcio extracelular y los cambios de movilidad (Darszon et al., 2005). Principalmente, se habla del canal CatSper, que regula las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular de manera dependiente e independiente de voltaje. De igual forma, se ha visto que CatSper puede funcionar como un canal de sodio independiente de voltaje. Además, parece ser que este canal es activado por progesterona proveniente de las células del cúmulo ovocitario en espermatozoides de humano (Okabe, 2013) (Torres-Flores et al., 2011).

## **1.8 Reacción acrosomal**

El último evento requerido para la fecundación es la reacción acrosomal. La reacción acrosomal consiste en la liberación exocítica del contenido enzimático del

acrosoma, lo cual ayuda a penetrar las capas celulares del cúmulo y la zona pelúcida del ovocito. Para que ocurra esta liberación, la membrana plasmática del espermatozoide se fusiona con la membrana externa del acrosoma, dejando expuesta la membrana acrosomal interna donde se localizan receptores que son necesarios para la fusión con el gameto femenino (Fig. 6). Algunas moléculas implicadas en esta actividad son los receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (SNARE). Se sabe que las proteínas de unión a zona pelúcida de mamíferos como GalTasa, Sp56, zonadhesina, Crisp, acrosina, entre otras, se encuentran implicadas en la generación de esta reacción al interactuar con las glicoproteínas de la zona pelúcida (Okabe, 2013) y otras señales químicas como es la progesterona, componente del líquido folicular. En modelos de estudio como el bovino y el ratón, se ha visto que la exposición por tiempos cortos y altas concentraciones de progesterona generan un aumento de espermatozoides que llevan a cabo la reacción acrosomal (Ryu et al., 2014)



**Fig. 6. Cambios del espermatozoide durante la capacitación y la reacción acrosomal.** (A). Los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino sufren cambios fisiológicos implicados en la capacitación. (B) Posterior a la capacitación, los espermatozoides son capaces de liberar el contenido enzimático del acrosoma al fusionar la membrana del espermatozoide con la membrana externa del acrosoma, logrando exponer moléculas que les permiten reconocer al ovocito. (Modificado de Okabe, 2013).

## 1.9 Sistema ubiquitina proteosoma

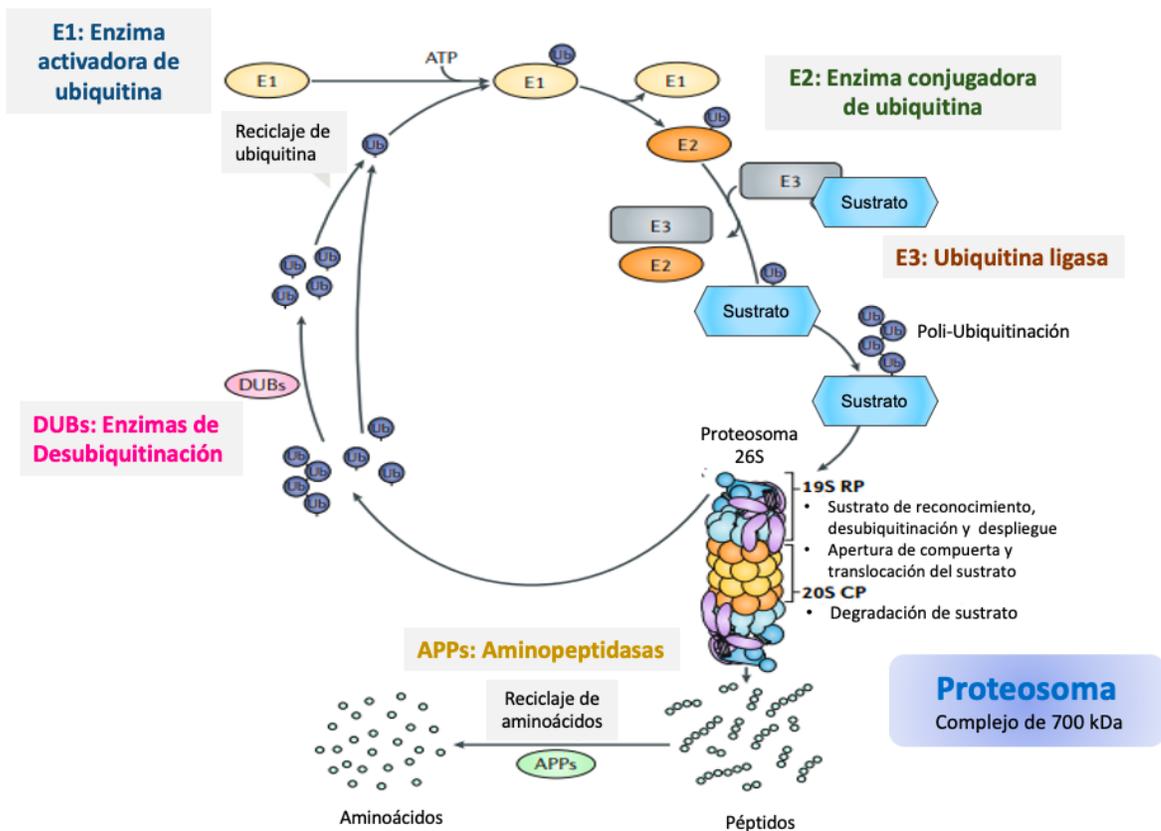
El sistema ubiquitina proteosoma (SUP) es un mecanismo de degradación de proteínas estrictamente regulado que controla diferentes procesos celulares, tales como la transcripción, el ciclo celular, la señalización, el tráfico y el control de calidad de las proteínas. Es de suma importancia su adecuado funcionamiento, de lo contrario, al presentar deficiencias pueden surgir diversas enfermedades neurodegenerativas e incluso el cáncer (Rousseau y Bertolotti, 2018) (Collins y Goldberg, 2017) .

Todas las funciones celulares requieren de un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de proteínas. En el caso de la degradación, existen dos mecanismos: la vía vesicular mediada por lisosomas y la vía citosólica mediante el SUP. Mientras que el primero se encarga de degradar componentes celulares al envolverlos en vesículas de doble membrana y posteriormente fusionándolas con lisosomas, el SUP degrada de manera selectiva proteínas al marcarlas con una pequeña proteína chaperona denominada ubiquitina (Wang y Robbins, 2014). La ubiquitina se compone de 76 residuos de aminoácidos con un peso de 8.5 kDa. La manera en la que dirige una proteína al sistema de degradación es formando enlaces isopeptídicos con las proteínas blanco. Esta proteína se encuentra altamente conservada, particularmente en los residuos de lisina K6, K11, K27, K29, K33, K48 y K63, a los cuales pueden añadirse otras moléculas de ubiquitinas formando múltiples cadenas. Sin embargo, el residuo K48 es comúnmente donde se observa la formación de tetra o poliubiquitinación, señal reconocida por el proteosoma 26S (Sutovsky, 2011).

El proteosoma 26S es una proteasa constituida por múltiples subunidades y presenta afinidad específica por proteínas marcadas con ubiquitina. Específicamente, el proteosoma 26S se compone por un núcleo 20S compuesto por cuatro anillos concéntricos que a su vez presentan siete subunidades que forman una estructura de barril hueco con actividad proteolítica. El núcleo 20S se cubre en ambos o sólo uno de los extremos por partículas reguladoras 19S (Fig. 7). Esta



ciclos sucesivos de conjugación. Sin embargo, en ocasiones, la presencia de monoubiquitinación puede ser suficiente para direccionar el sustrato al proteosoma 26S para su posterior degradación. Una vez reconocido el sustrato, la subunidad 19S del proteosoma retira las moléculas de ubiquitina mediante su actividad de desubiquitina (DUB) o por enzimas desubiquitinantes extrínsecas que se asocian a esta subunidad. Ahora, el sustrato es fragmentado en péptidos cortos que posteriormente son separados en aminoácidos mediante aminopeptidasas (APP) y las ubiquitinas libres son recicladas para marcar nuevas proteínas sustrato (Fig. 8) (Rousseau y Bertolotti, 2018).



**Fig. 8. Sistema de degradación ubiquitina proteosoma.** Para llevar a cabo la degradación de proteínas mediante el sistema, se requiere de la proteína ubiquitina, la enzima activadora de ubiquitina (E1), la enzima conjugadora (E2), la enzima ubiquitina ligasa (E3), APPs y enzimas de desubiquitinación (DUBs). La ubiquitina forma un enlace isopeptídico con la proteína sustrato y se dirige al proteosoma 26S, donde es reconocida y fragmentada en pequeñas secuencias de aminoácidos, los cuales son separados en unidades mediante la acción de APPs. (Modificado de Rousseau and Bertolotti, 2018).

## 2. ANTECEDENTES

El proteosoma fue detectado en espermatozoides humanos y de ratón mediante centrifugación diferencial de proteínas espermáticas en gradientes de glicerol, donde se observó que había una fracción con una proporción de sedimentación similar al proteosoma de las células somáticas (Rosales et al., 2011). Por otra parte, el proteosoma se ha localizado en la membrana acrosomal externa e interna y en la matriz acrosomal (Morales et al., 2003) y extracelularmente en el espermatozoide humano (Morales et al., 2004). Esta localización extracelular podría estar asociada con su posible participación en los mecanismos de penetración de la zona pelúcida (Saldivar-Hernandez et al., 2015). Prueba de ello, es la afinidad que presentan estos complejos multiproteicos por zonas homólogas de la zona pelúcida de humanos (Redgrove et al., 2011). Otros estudios también han identificado el proteosoma en la región del cuello, donde se ubican los centriolos, y alrededor del núcleo (Wojcik et al., 2000).

Un estudio expuso que el SUP presentaba relativamente una mayor actividad en espermatozoides con una maduración mayor, comparada con la actividad registrada en los que presentaban menos grado de madurez, lo que sugiere que el proteosoma es necesario en la fisiología normal de los espermatozoides previo a las penetración del ovocito (Tipler et al., 1997).

En 2009, Kong y colaboradores estudiaron el papel del proteosoma durante la capacitación del espermatozoide humano, relacionando su actividad con la fosforilación de proteínas durante este proceso. Ellos encontraron que al incubar espermatozoides humanos en presencia de inhibidores específicos del proteosoma hubo una disminución significativa de espermatozoides capacitados y se modificó el patrón de fosforilación de proteínas, observándose disminución en residuos de serina, aumento en residuos de treonina, pero sin efecto sobre las tirosinas (Kong et al., 2009).

Sabemos que el semen humano se encuentra compuesto por una población heterogénea de espermatozoides con diversos grados de diferenciación estructural

y funcional, por lo que es posible observar subpoblaciones de diferente calidad (Saez-Espinosa et al., 2020). Para poder diferenciar dichas subpoblaciones, la técnica más utilizada es la separación por centrifugación utilizando gradientes discontinuos de Percoll. Mediante la utilización de esta técnica, se ha mostrado que espermatozoides aislados de la interfase de 64/45% de un gradiente de Percoll presentaban reducción en la actividad del proteosoma junto con una disminución en el porcentaje de células móviles y con morfología normal. En cambio, los espermatozoides obtenidos del gradiente de 90% tenían mayor actividad del proteosoma al mismo tiempo que mejor calidad (Rosales et al., 2011).

También se ha visto que la enzima activadora de ubiquitina tipo E1 (UBA1), responsable de activación de la ubiquitina, se encuentra presente en el espermatozoide porcino y es necesaria para la capacitación e interacción espermatozoide-zona pelúcida durante la fecundación *in vitro*. Por otra parte, al capacitar los espermatozoides en presencia de un inhibidor específico de UBA1, PYR-41, observaron alteraciones en la remodelación de la membrana acrosómica externa y una capacidad fertilizante reducida (Yi et al., 2012).

Estudios recientes sobre el papel del proteosoma en la capacitación espermática en modelo porcino han permitido identificar algunas proteínas destinadas a degradarse, ya que se encontraron acumuladas al inhibir la función del SUP durante la capacitación *in vitro*. De las proteínas que pudieron identificarse resaltan la espermadhesina y la proteína DQH, que son blancos importantes de degradación para promover el desprendimiento de los espermatozoides retenidos en el reservorio oviductal. Otras de las proteínas identificadas son la lactadherina (MFGE-8), desintegrina A, metaloproteinasa 5 (ADAM5), espermadhesina (AWN1), proteína de unión a acrosina (ACRBP), el inhibidor de acrosina (SPINK2), entre otras. En este mismo estudio también observaron que la reorganización que presenta la membrana plasmática en el momento de la capacitación tomaba más tiempo en espermatozoides expuestos a inhibidores del proteosoma (Zigo et al., 2019b).

Se ha visto que el proteosoma degrada a la proteína que regula parcialmente la liberación de proteína cinasa A (PKA) denominada AKAP3 y otras proteínas como el inhibidor de acrosina (SPINK2) y la espermadhesina (AQN1) implicadas en la remodelación de la región acrosomal que presentan los espermatozoides ya capacitados (Kerns et al., 2016).

Todas estas investigaciones sugieren que el mecanismo del SUP juega un papel fundamental en la capacitación espermática y, por tanto, para que el espermatozoide adquiera la capacidad de cumplir su función.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El SUP está presente en el espermatozoide de humano y desempeña un papel esencial en la capacitación espermática. Sin embargo, se desconocen las proteínas que son degradadas por el SUP durante la capacitación y las posibles alteraciones funcionales que podría generar una deficiente actividad proteolítica por parte del SUP.

### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son las proteínas que se conjugan a ubiquitina en espermatozoides humanos durante la capacitación?

### **5. HIPÓTESIS**

La degradación selectiva de proteínas del espermatozoide mediante el SUP aumentará durante la capacitación espermática.

### **6. OBJETIVO GENERAL**

Caracterizar las proteínas conjugadas a ubiquitina en espermatozoides humanos durante la capacitación.

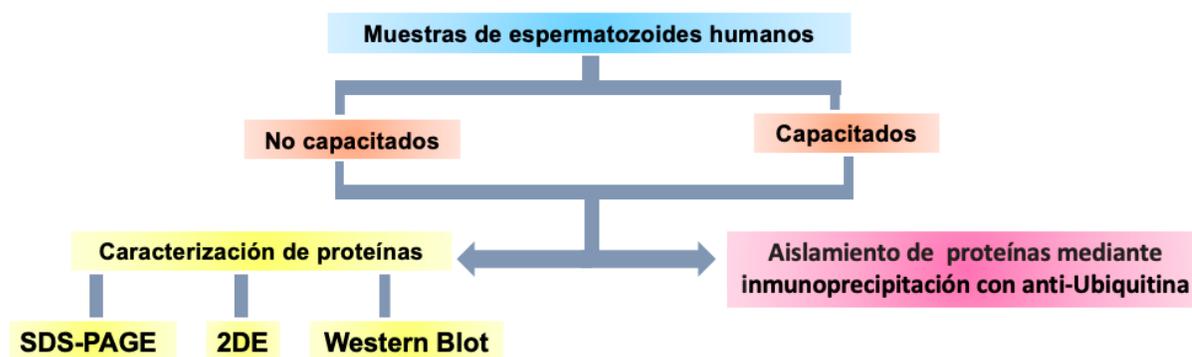
#### **6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar proteínas conjugadas a ubiquitina en espermatozoides no capacitados y capacitados mediante el uso de anticuerpos específicos.
- Aislar proteínas conjugadas a ubiquitina a partir de espermatozoides humanos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de esta investigación fue aprobado por el Comité Científico y de Ética en Investigación Humana del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

### 7.1 Estrategia experimental



Se incluirán grupos de espermatozoides capacitados en presencia de MG132 (Inhibidor del proteosoma) o su vehículo (DMSO)

**Fig. 9. Diagrama de la estrategia experimental.** Se mencionan los tratamientos aplicados y las técnicas a realizar para cumplir con los objetivos propuestos.

### 7.2 Selección de donadores

Se incluyeron en el estudio como donadores de muestras de semen a hombres entre 18 y 35 años a los cuales se les realizó un cuestionario para recolectar información básica sobre su historial médico y hábitos de estilo de vida. Se descartaron de la investigación a hombres con enfermedades crónicas de cualquier tipo, que ingirieran algún tipo de medicamento, fumaran, tuvieran problemas de alcoholismo o drogadicción.

### 7.3 Obtención de muestras de semen humano

Las muestras de semen se obtuvieron mediante masturbación después de una abstinencia sexual de 3 a 5 días. Posteriormente, los eyaculados se incubaron durante 30 minutos a 37°C para permitir la licuefacción y se evaluaron de acuerdo a las especificaciones y valores de referencias del Manual de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2010). Sólo se consideraron en el estudio aquellas muestras clasificadas como normozoospermicas (ver tabla 1).

**Tabla 1. Valores de referencia para examinar semen humano publicado por la Organización Mundial de la Salud, 2010.**

Parámetro	Valores límite de referencia
pH	$\geq 7.2$
Volumen	$\geq 1.5$ ml
Concentración espermática	$\geq 15 \times 10^6$ / ml
Concentración total	$\geq 39 \times 10^6$
Movilidad progresiva	$\geq 32\%$
Viabilidad	$\geq 58\%$
Morfología	$\geq 4\%$
Leucocitos	$\leq 1 \times 10^6$ /ml

### 7.4 Procesamiento de muestras y capacitación espermática

Los espermatozoides se separaron del plasma seminal mediante la técnica de centrifugación a través de gradientes con densidades discontinuas de Percoll (Isolate™ Irvine Scientific, Santa Ana CA, EE. UU). Para ello, se colocó en un tubo cónico muestra seminal sobre dos fases de diferentes densidades (50% y 90%).

Posteriormente, se centrifugó a 2,100 rpm por 20 min y se obtuvo el botón celular, el cual se lavó con medio Fluido Tubárico Humano (HTF) (ver anexo 11.1) mediante una centrifugación a 10,000 rpm por 10 min, y nuevamente se evaluó la movilidad y la densidad. Los espermatozoides recuperados se llevaron a una concentración de  $15 \times 10^6$  células/ml en medio HTF suplementado con 0.3% albúmina sérica humana (HSA) y 0.33 mM piruvato de sodio para los diferentes grupos experimentales: no capacitados, capacitados, capacitados más inhibidor proteosomal y capacitados más el vehículo del inhibidor. Las fracciones que fueron capacitadas se incubaron durante 2 o 4 h en HTF suplementado a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% de humedad (Hernandez-Silva et al., 2019). Los espermatozoides capacitados a los cuales se les inhibió la actividad proteosomal fueron incubados con el inhibidor Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132): C2211; (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo, EE.UU.) 50 μM, utilizando como vehículo dimetilsulfóxido (DMSO). Al final de las incubaciones, los espermatozoides se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS), suplementada con 1 mM ortovanadato de sodio y 0.02 mM genisteína.

## **7.5 Movilidad espermática**

La movilidad espermática se evaluó mediante la observación de 10 μl de la muestra en un microscopio de contraste de fases, donde se contaron al menos 100 células. La movilidad se clasificó como progresiva, no progresiva e inmóvil. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de células de cada categoría.

## **7.6 Caracterización de proteínas ubiquitinadas**

### **7.6.1 Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)**

La caracterización mediante SDS-PAGE se realizó resuspendiendo el botón celular obtenido de  $1 \times 10^6$  espermatozoides en solución de muestra de Laemmli (ver anexo 11.1) para la obtención de proteínas solubles, las cuales se separaron en geles de poliacrilamida al 12%. Al terminar la separación electroforética, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o utilizados para análisis mediante Western blot.

### **7.6.2 Electroforesis bidimensional (2DE)**

Alícuotas de  $10 \times 10^6$  de espermatozoides se resuspendieron en Buffer de rehidratación (ver Anexo 11.1) para su análisis mediante 2DE. La primera dimensión separó las proteínas según su punto isoeléctrico mediante isoelectroenfoque (IEF) en tiras de 7 cm de largo con un rango de pH de 3-10 (ReadyStrip IPG; Bio-Rad; Hercules CA, EE. UU). Los IEFs se realizaron en el equipo PROTEAN IEF Cell de Bio-Rad, siguiendo un protocolo eléctrico conforme lo recomendado en su manual (ver anexo 11.3). Posteriormente, las tiras se incubaron sucesivamente en buffer de equilibrio I y buffer de equilibrio II (Ver anexo 11.1) durante 10 min cada uno. Para la segunda dimensión, las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en geles de gradiente de poliacrilamida (4-20%). Los geles obtenidos se tiñeron con el colorante azul de Coomassie al 0.2% durante 30 min o se procesaron para Western blot.

### **7.7 Western Blot**

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE y 2DE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa para su análisis mediante la detección de proteínas con anticuerpos específicos. Después de la transferencia, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (ver anexo 11.1) durante una hora y, posteriormente, se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-ubiquitina, diluidos 1:3,000 en 0.1% TBS-Tween 20. Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron 3 veces con buffer 0.1% TBS-Tween 20. Consecutivamente, se incubaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplados a peroxidasa de rábano diluido 1:2,000 en 0.1% TBS-Tween 20 (ver anexo 11.2). Por otra parte, para analizar la abundancia de fosforilación en tirosinas, las membranas procesaron de manera similar, pero como anticuerpo primario se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina (clon 4G10) diluidos 1:5,000 y para corroborar la carga homogénea de proteínas presentes en la membrana, se re-incubaron con anticuerpos monoclonales anti- $\beta$ -tubulina diluidos 1: 30,000.

El revelado de la unión de anticuerpos específicos se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando como sustrato de la peroxidasa el Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, EE.UU.). La detección se llevó a cabo utilizando un fotodocumentador Chemidoc XRS+ Imager (Bio-Rad). El análisis densitométrico para cada condición experimental se realizó mediante el programa ImageLab™ (Bio-Rad), normalizando las intensidades de ubiquitinación y fosforilación con la señal obtenida de anti-β-tubulina en cada carril, y el valor de abundancia relativa obtenido de espermatozoides no capacitados se consideró como 1 para la normalización de los demás valores. Para el análisis de los mapas bidimensionales se utilizó el software PD Quest (Bio-Rad) (Hernandez-Silva et al., 2019).

## **7.8 Purificación por inmunoafinidad**

La solubilización de proteínas se realizó agregando 50µl de buffer RIPA (ver anexo 11.1) con inhibidores de proteasas a  $10 \times 10^6$  espermatozoides. Luego, las células se calentaron durante 5 min en agua hirviendo, se homogenizaron y centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min, recuperándose el sobrenadante para obtener la fracción de proteínas solubles.

Para la inmunoprecipitación de conjugados de ubiquitina, los extractos proteicos se incubaron con perlas de agarosa-proteína G acopladas con anticuerpos anti-ubiquitina, siguiendo los procedimientos ya descritos (Schwertman et al., 2013).

Brevemente, anticuerpos anti-mono/poli-ubiquitinación diluidos en PBS se acoplaron a 100 µl de perlas de agarosa-proteína G, incubándose durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación constante. Luego, se centrifugó y lavó con 500 µl PBS. Terminados los lavados, se realizó el entrecruzamiento del anticuerpo con la proteína A utilizando sustrato de disuccinimidil (DSS). Finalmente, se lavaron las perlas con 500 µl de buffer de elución (ver anexo 11.1) y PBS, sucesivamente.

Una vez preparadas las perlas, se incubaron con 45  $\mu$ l de la fracción soluble de proteínas, más 150  $\mu$ l de PBS y 10  $\mu$ l de BSA 2%. Se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Posteriormente, las perlas se centrifugaron y lavaron con 500  $\mu$ l de Triton-X100 al 1% en PBS. Finalmente, las proteínas asociadas a las perlas se eluyeron 2 veces consecutivas agregando 50  $\mu$ l buffer de elución. Las eluciones recuperadas de varios donadores se mezclaron y concentraron en columnas de Amicon Ultra-15 (Amicon® Ultra, Billerica, EE. UU.). Posteriormente, se cuantificaron por medio del método de ácido bicinconínico (BCA; Pierce, Rockford IL, EE. UU.). Para verificar la obtención de las proteínas de interés, se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción de plata utilizando el protocolo rápido del Kit Silver stain kit (Biorad; Hercules, CA, EE. UU.) y Western blot con anticuerpos anti-ubiquitina.

## **7.9 Análisis de resultados**

Los resultados obtenidos se presentan como la media  $\pm$  error estándar (EE). Adicionalmente, se utilizó el programa de análisis estadístico GraphPad Prisma (GraphPad Software Inc., versión 5.01), aplicando la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples y t pareada para la comparación de dos grupos. Se consideraron diferencias significativas los valores de  $P < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Características de las muestras de semen utilizadas

Las muestras de diferentes donadores fueron evaluadas conforme lo establece la O.M.S. (World Health Organization, 2010) para el análisis de muestras seminales. En la tabla 2 se presentan los valores obtenidos para un total de 40 muestras obtenidas de 11 donadores diferentes. Cada una de las muestras individuales cumplieron con los valores límites de referencia para ser consideradas como normozoospermicas.

Tabla 2. Parámetros evaluados en las muestras en fresco

	Valores obtenidos de muestras seminales en fresco (Promedio $\pm$ D.E.), n=40	Valores obtenidos de las muestras post-gradientes (Promedio $\pm$ D. E.), n= 40
<b>Abstinencia (Días)</b>	3.5 $\pm$ 0.8	-
<b>Volumen (ml)</b>	3.3 $\pm$ 0.99	0.67 $\pm$ 0.4
<b>pH</b>	8.2	-
<b>Concentración (x10<sup>6</sup>/ml)</b>	75.0 $\pm$ 30.6	57.7 $\pm$ 32.4
<b>Total de células(x10<sup>6</sup>)</b>	248.7 $\pm$ 122.3	36.8 $\pm$ 26.6
<b>Movilidad progresiva (%)</b>	73.1 $\pm$ 8.1	-
<b>Movilidad total (%)</b>	80.8 $\pm$ 6.4	72.6 $\pm$ 11.1
<b>Morfología (%) *</b>	5.25 $\pm$ 0.5	-

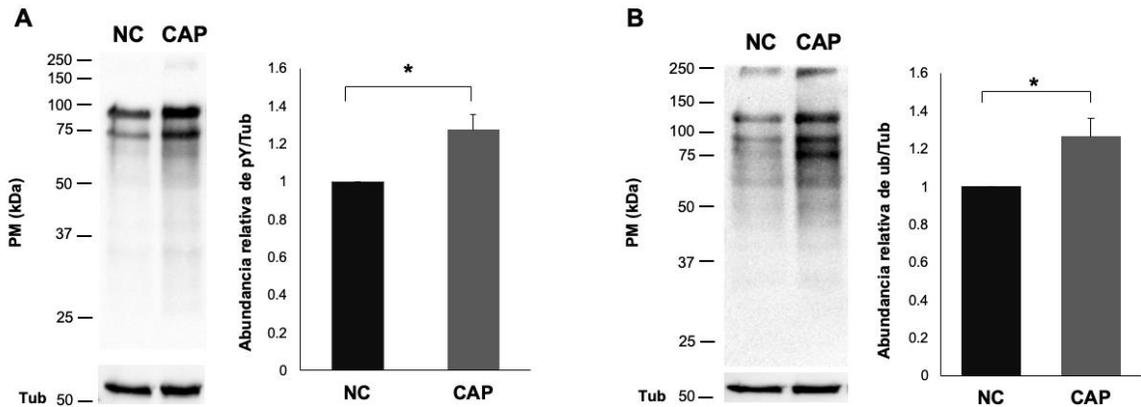
\* La evaluación morfológica se realizó con una n=4



**Fig. 10. Morfología espermática:** 1. Espermatozoide con alteración en cabeza, 2. Espermatozoides con alteración en pieza media, 3. Espermatozoide con alteración en flagelo, 4. Espermatozoide con gota citoplasmática, 5. Espermatozoide normal. Imagen tomada en microscopio óptico, Aumento: 1000X, tinción Spermac stain.

## 8.2 Caracterización de proteínas ubiquitinadas de espermatozoides

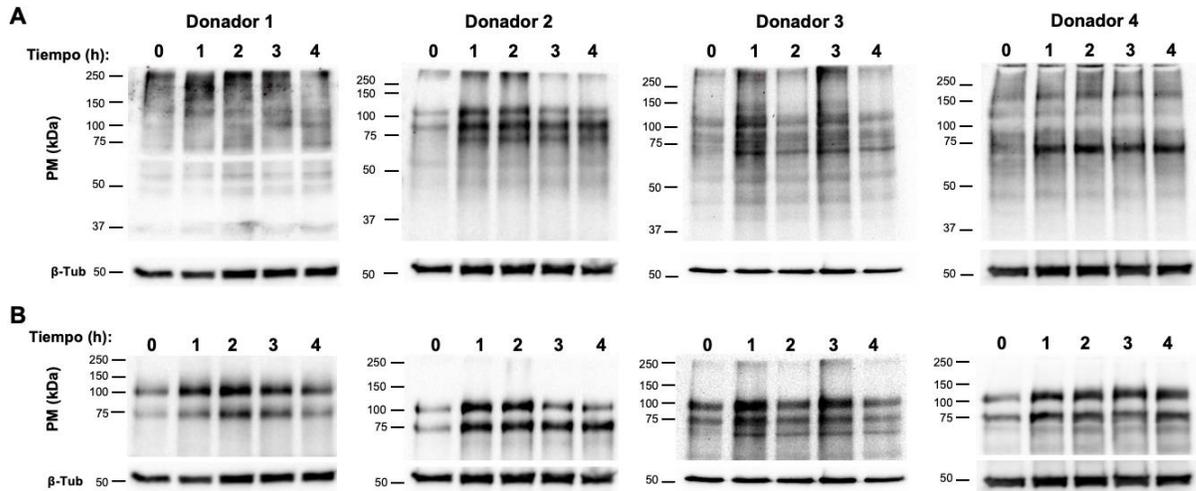
Para caracterizar las proteínas ubiquitinadas de espermatozoides durante la capacitación, se corroboró la eficiencia del protocolo de capacitación *in vitro* mediante el estudio de los cambios de fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas. En la Fig.11.A se observa que los espermatozoides capacitados (CAP) presentaron un aumento de fosforilación en tirosinas de dos proteínas de aproximadamente 82 y 97 kDa en comparación con los no capacitados (NC). Paralelamente, la misma muestra se utilizó para la detección de proteínas ubiquitinadas en espermatozoides no capacitados y capacitados, observándose en espermatozoides CAP un aumento de proteínas ubiquitinadas con alto rango de peso molecular comprendido entre 45 y 250 kDa aproximadamente (Fig. 11.B). Para confirmar que la cantidad de proteína cargada fuera homogénea se consideró como control de carga la presencia de  $\beta$ -tubulina.



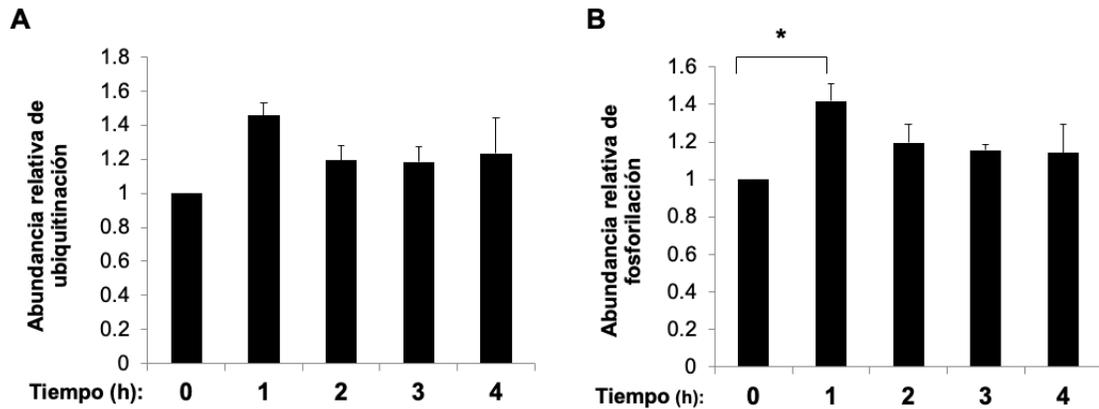
**Fig. 11. Efecto de la capacitación espermática en la ubiquitinación de proteínas.** (A) Fosforilación en tirosinas y análisis densitométrico de espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (CAP) durante 4 h; (B) Ubiquitinación de proteínas y análisis densitométrico de espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (CAP) durante 4 h. Las mismas membranas fueron re-incubadas con anti- $\beta$ -tubulina como control de carga.  $n=7$ , se muestran las medias  $\pm$  EE. (\*)  $P < 0.05$ . Tub: Anti  $\beta$ -tubulina.

### 8.3 Efecto de la capacitación espermática a diferentes tiempos sobre la ubiquitinación de proteínas

Como el proceso de ubiquitinación de proteínas y su degradación por el SUP es dinámico, se realizaron curvas de tiempo de capacitación para estandarizar los tiempos óptimos que nos permitieran obtener la mayor cantidad de proteínas ubiquitinadas en experimentos posteriores. En la Fig. 12 se observa que los patrones de ubiquitinación en función del tiempo son variables para 4 donadores diferentes. Al analizar la abundancia relativa de estos 4 experimentos, detectamos que el mejor tiempo de capacitación fue a 1 h, en el que hay el mayor aumento de proteínas ubiquitinadas (Fig. 13.A) y un aumento de fosforilación en tirosinas (Fig. 13.B).



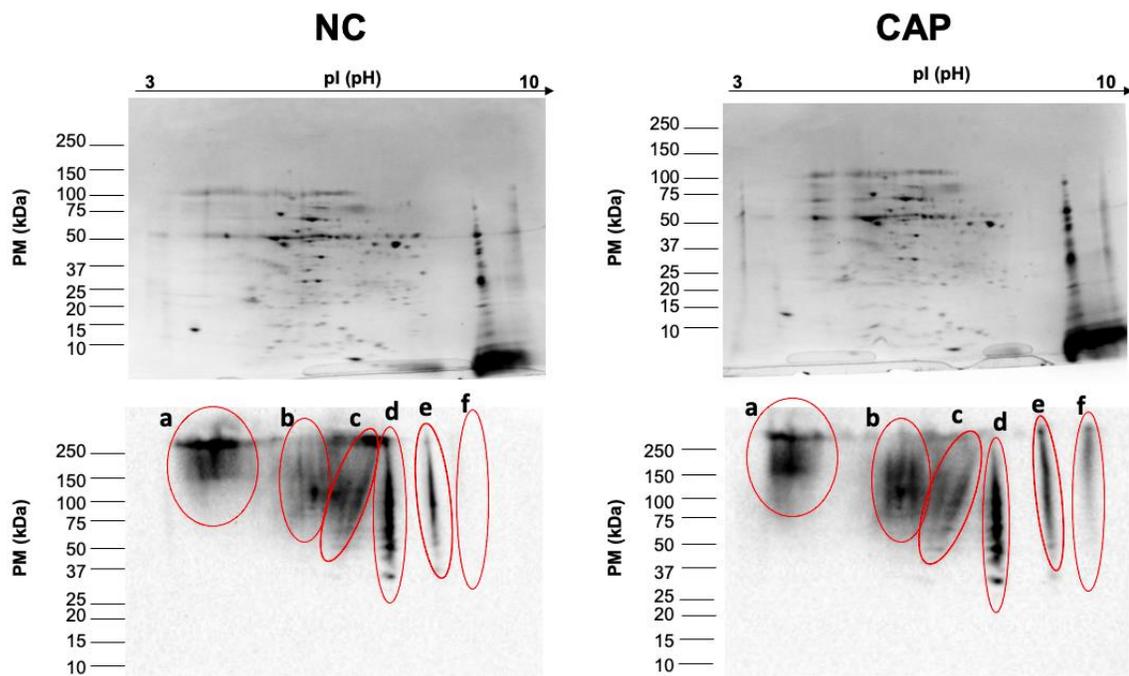
**Fig. 12. Capacitación de espermatozoides humanos a diferentes tiempos de 4 diferentes donadores.** (A) Ubiquitinación de proteínas en espermatozoides capacitados durante 0, 1, 2, 3 y 4 h. (B) Fosforilación en tirosinas de espermatozoides capacitados durante 0, 1, 2, 3 y 4 h. Se consideraron espermatozoides no capacitados (0 h) como control. n=4. Tub: Anti  $\beta$ -tubulina.



**Fig. 13. Capacitación de espermatozoides humanos a diferentes tiempos.** (A) Abundancia relativa de la ubiquitinación de proteínas; (B) Abundancia relativa de la fosforilación en tirosinas de espermatozoides. Se consideraron espermatozoides no capacitados (0 h) como control. Se muestran las medias  $\pm$  EE. n= 4 (\*)  $P < 0.05$ . Tub: Anti  $\beta$ -tubulina.

## 8.4 Caracterización de proteínas ubiquitinadas de espermatozoides mediante 2DE

Al analizar las proteínas ubiquitinadas detectadas mediante 2DE seguido de Western blot de un donador se pudieron identificar 6 grupos de proteínas (Fig. 14). Este análisis se realizó con muestras de 4 donadores diferentes y los valores de punto isoeléctrico y peso molecular aparente de cada grupo proteico se muestran en la Tabla 3. Adicionalmente, se comparó la abundancia relativa de cada grupo de proteínas ubiquitinadas presentes en el WB de espermatozoides no capacitados *versus* capacitados, lo que permitió conocer el efecto en la ubiquitinación de cada uno de estos grupos. Considerando dichos valores de abundancia relativa, los grupos de proteínas b, d, e y f presentaron un aumento, mientras que los grupos a y c disminuyeron.



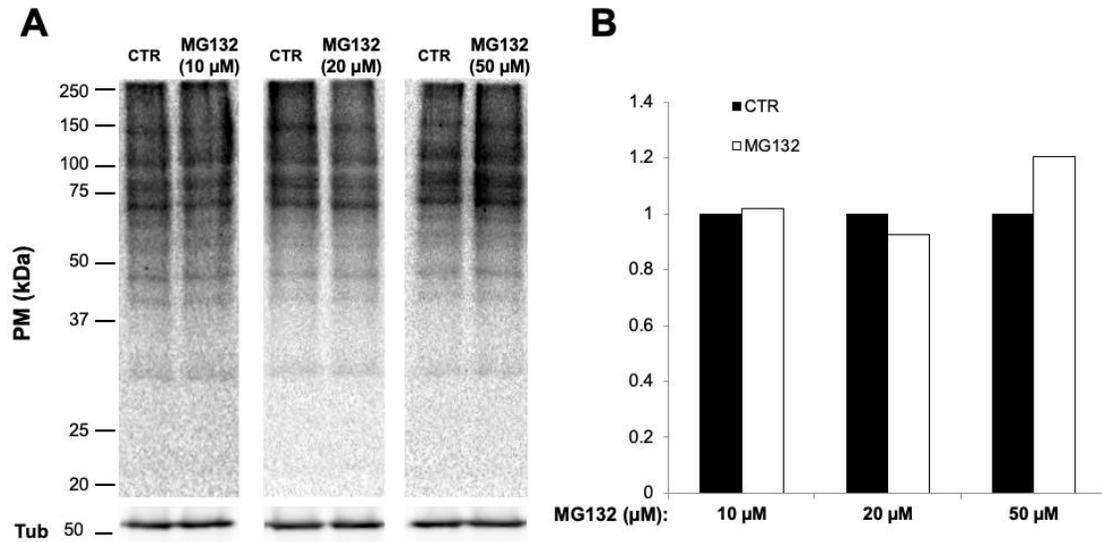
**Fig. 14. Proteínas ubiquitinadas en espermatozoides humanos no capacitados (NC) y capacitados (CAP) separadas mediante geles bidimensionales y analizadas mediante Western blot.** Paneles superiores: Geles teñidos con azul de Coomassie. Paneles inferiores: Western blots con anti-Ub. Se muestra un experimento representativo. Los grupos de proteínas indicados en el Western blot se analizaron mediante densitometría para analizar su abundancia relativa (ver Tabla 3).

**Tabla 3. Abundancia relativa de grupos de proteínas separadas mediante geles bidimensionales. n= 4.**

Banda	PM (kDa)	pI Aproximado	CAP/NC	Efecto en la ubiquitinación
<b>a</b>	150 - >250	3.5 - 4.5	0.80	↓
<b>b</b>	80 - 150	5.7 - 6.2	1.14	↑
<b>c</b>	100 - 150	6.6 - 7.4	0.90	↓
<b>d</b>	28 - 200	7.5 - 7.8	1.11	↑
<b>e</b>	37 - 150	8.3 - 8.9	1.15	↑
<b>f</b>	75 - 250	9.1 - 9.3	1.08	↑

### 8.5 Uso del inhibidor del proteosoma 26S

Dado que la degradación de proteínas en las células es una actividad muy dinámica que podría dificultar la detección de los conjugados de ubiquitina, se optó por la utilización del inhibidor del proteosoma 26S, MG132, durante la capacitación espermática con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de proteínas de interés. Para ello se realizaron ensayos con el fin de determinar la concentración óptima del inhibidor MG132. En la Fig. 15.A se compararon las concentraciones 10, 20 y 50  $\mu\text{M}$  del inhibidor, donde aparentemente la concentración de 50  $\mu\text{M}$  permitió un ligero aumento de acumulación de proteínas ubiquitinadas. En la Fig.15.B se muestra el análisis densitométrico de la abundancia relativa de proteína ubiquitinadas, confirmando que el inhibidor MG132 a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  es la óptima para el objetivo del proyecto.

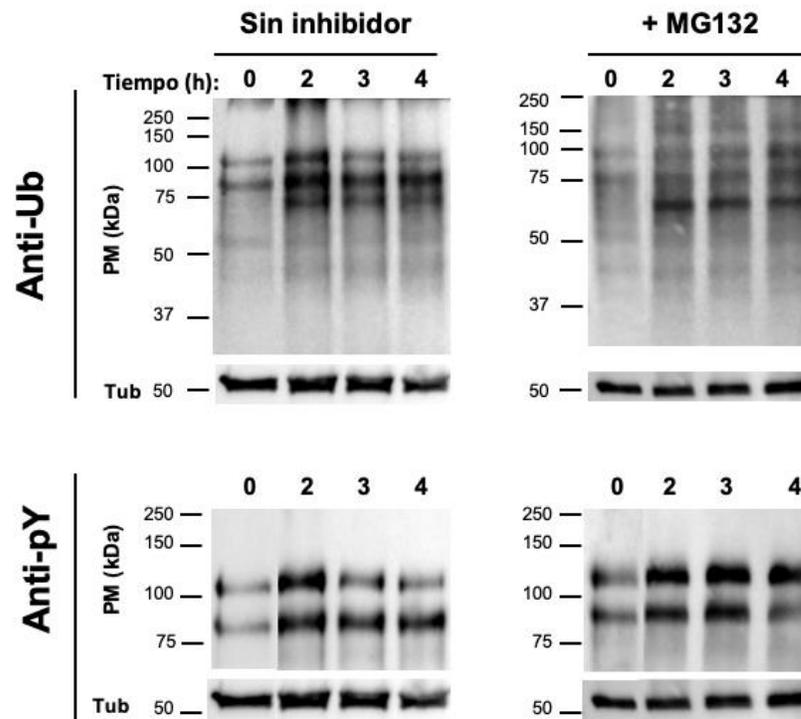


**Fig. 15. Curva de concentración del inhibidor del proteosoma MG132 sobre la ubiquitinación en proteínas de espermatozoides capacitados.** (A) Western blot con anti-Ub de espermatozoides capacitados durante 2 h en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de MG132. (B) Densitometría correspondiente al Western blot de proteínas ubiquitinadas en presencia de MG132. Las muestras control en ausencia de MG132 se incubaron en presencia de la cantidad equivalente de DMSO empleada como vehículo en cada caso. CTR: Control; Tub: Anti β-tubulina.

### 8.6 Efecto del inhibidor del proteosoma 26S en la capacitación espermática

Considerando que el uso del inhibidor MG132 sería una herramienta favorable para mantener la presencia de proteínas ubiquitinadas al momento de realizar una purificación de estas proteínas, se consideró prudente conocer ¿Qué pasaría con la progresión de la capacitación espermática a través del tiempo si fuese utilizado el inhibidor MG132? En la Fig. 16 se puede observar que al comparar la presencia de proteínas conjugadas con ubiquitina en ausencia y en presencia del inhibidor, el patrón de proteínas es diferente, es decir, cuando no se utiliza el inhibidor las proteínas se localizan en un rango de peso molecular entre 40-125 kDa aproximadamente, mientras que en presencia del inhibidor se obtuvieron proteínas con un mayor rango de peso molecular. Por otro lado, al capacitar los espermatozoides a diferentes tiempos en ausencia de inhibidor observamos que las proteínas ubiquitinadas tuvieron una abundancia máxima a las 2 h conjuntamente con el momento de mayor fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas,

mientras que en presencia del inhibidor tanto los conjugados a ubiquitina como la fosforilación en tirosinas se mantuvo constante a en todos los tiempos estudiados.

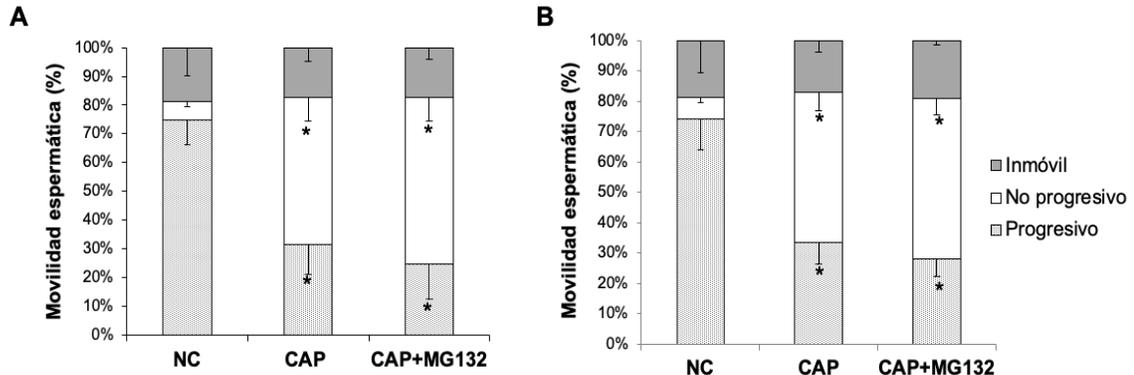


**Fig. 16. Ubiquitinación y fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas durante la capacitación.** Los espermatozoides fueron incubados a diferentes tiempos en ausencia o presencia del inhibidor MG132 (50  $\mu$ M). Se consideraron espermatozoides a tiempo 0 h como control. Tub: Anti  $\beta$ -tubulina.

### 8.7 Efecto del inhibidor del proteosoma sobre la movilidad espermática

Al evaluar la movilidad espermática para conocer el efecto que podría tener el inhibidor MG132 durante la capacitación, se consideraron dos tiempos diferentes de capacitación, 2 h y 4 h. En la Fig. 17.A se observa que en los espermatozoides capacitados en ausencia de MG132 (CAP) durante 2 h presentaron una disminución en la movilidad progresiva y un aumento en el porcentaje de espermatozoides con movilidad no progresiva en comparación con el control de no capacitados (NC), mientras que la movilidad de espermatozoides capacitados en presencia del inhibidor (CAP+MG132) muestra un patrón similar al de los espermatozoides CAP.

Por otro lado, en la Fig. 17.B se observa que la dinámica de la movilidad en espermatozoides capacitados durante 4 h es similar a la presente en espermatozoides capacitados durante 2 h.



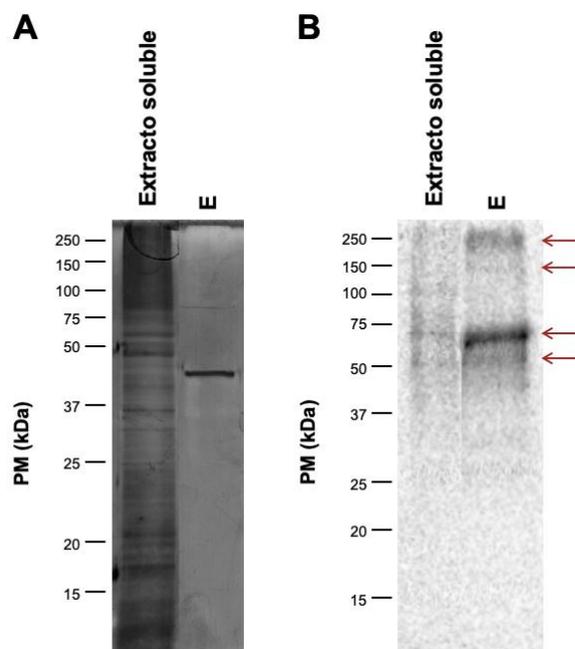
**Fig. 17. A. Movilidad de espermatozoides capacitados en presencia de MG132.** (A) Espermatozoides capacitados en presencia de MG132 (50 µM) durante 2 h; (B) Espermatozoides capacitados en presencia de MG132 (50 µM) durante 4 h. Se consideraron espermatozoides no capacitados como control. Se muestran las medias ± EE. n ≥ 5. (\*) P < 0.05 vs NC. NC: No capacitado; CAP: Capacitado.

## 8.8 Obtención de proteínas ubiquitinadas mediante inmunoprecipitación

Para el aislamiento de los conjugados de ubiquitina de espermatozoides, las proteínas se inmunoprecipitaron a partir de un extracto de proteínas solubilizadas de  $35.7 \times 10^6$  de espermatozoides, siendo este un pool de 4 diferentes donadores, lo cual permitió una recuperación de 10.9 µg de proteínas purificadas.

Al caracterizar estas proteínas mediante SDS-PAGE (Fig. 18.A) podemos observar que hay abundantes proteínas en el lisado celular, mientras que de proteínas purificadas (E) la cantidad de proteína total ubiquitinada es muy escasa. Al realizar el WB con anti-ubiquitina de estas muestras (Fig. 18.B), la presencia de proteínas conjugadas con ubiquitinas en el lisado total disminuye drásticamente y en la elución de las proteínas purificadas podemos detectar 4 bandas de proteínas ubiquitinadas de aproximadamente 250, 143, 64.5, y 53 kDa. Debido al bajo rendimiento obtenido mediante la inmunoprecipitación, es indispensable el procesamiento de un mayor número de células con el fin de obtener proteína suficiente para mejorar la

sensibilidad de la detección mediante WB y para abrir la posibilidad de una posterior secuenciación mediante espectrometría de masas que permitiría su identificación.



**Fig. 18. Inmunoprecipitación de proteínas ubiquitinadas en espermatozoides no capacitados.** (A) SDS-PAGE de proteínas de espermatozoides no capacitados teñidos con plata; (B) Western blot con anti-Ub de proteínas inmunoprecipitadas de espermatozoides no capacitados. Las flechas resaltan las 4 proteínas ubiquitinadas que se detectaron. E: Elución.

## 9. DISCUSIÓN

La capacitación es un conjunto de cambios bioquímicos y fisiológicos que deben ocurrir en el espermatozoide para que pueda fecundar, y cuyo mecanismo de acción y regulación no se conoce completamente. Trabajos previos sugieren que el SUP podría participar en la regulación del progreso de la capacitación (Kerns et al., 2016; Kong et al., 2009; Sutovsky, 2011), por lo que el objetivo de este proyecto fue estudiar el papel que juega la degradación de proteínas mediada por el SUP durante la capacitación espermática en los cambios que debe presentar el espermatozoide humano para adquirir su total funcionalidad.

Para validar el sistema de capacitación *in vitro* utilizado, se estudiaron los cambios en la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas mediante WB, lo cual es un indicador en la progresión de capacitación, ya que al incubar espermatozoides en un medio capacitante se observa un incremento de fosforilaciones dependientes del tiempo, principalmente localizadas en la pieza principal del flagelo, donde se encuentra la vaina fibrosa del citoesqueleto (Carrera et al., 1996). Los resultados obtenidos de espermatozoides incubados en medio capacitante sugieren que se llevó a cabo la capacitación. A lo largo del análisis de las muestras de diferentes donadores fue consistente la fosforilación en tirosinas de dos proteínas de aproximadamente 82 y 97 kDa, lo cual concuerda con lo descrito por otros autores (Carrera et al., 1996; Lopez-Torres et al., 2017; Turner et al., 1999). Paralelamente, observamos un aumento de la ubiquitinación de proteínas en aquellos espermatozoides que fueron incubados en medio capacitante. Sin embargo, al realizar varios ensayos con diferentes donadores para detectar proteínas ubiquitinadas los resultados fueron muy variables, por lo que se consideró importante conocer la dinámica de ubiquitinación respecto al tiempo de capacitación. Los resultados obtenidos mostraron que a 1 h de incubación en medio capacitante, los espermatozoides ya presentaban un aumento significativo de conjugados de ubiquitina, al igual que incrementaba la fosforilación en tirosinas. Estudios previos indican que los espermatozoides pueden capacitarse *in vitro*

durante un lapso muy amplio de tiempo entre 3 y 24 h, dependiendo de la heterogeneidad de la muestra lo que resulta en subpoblaciones de espermatozoides con diversos grados de funcionalidad (Saez-Espinosa et al., 2020). Otro estudio analizó la hiperactivación y la fosforilación de proteínas durante diferentes tiempos de incubación en medio capacitante (0, 2, 4 y 6 h) concluyendo que desde las 2 primeras horas se detectan diferencias significativas para ambas variables (Hernandez-Silva et al., 2021).

Una observación interesante del presente estudio es que en todos los experimentos observamos que entre mayores eran los niveles de fosforilación, mayor era la abundancia de proteínas ubiquitinadas, lo que sugiere que el marcaje de proteínas con ubiquitina es un mecanismo relacionado con la capacitación y la posterior capacidad fecundante del espermatozoide. Cabe mencionar que no identificamos ubiquitina libre en los espermatozoides, lo cual indica que la ubiquitina presente en el espermatozoide se encuentra principalmente conjugada a otras proteínas.

Nuestros resultados obtenidos a partir de los SDS-PAGE mostraron que los conjugados de ubiquitina tienen mayormente un alto peso molecular debido a que una misma proteína podría estar poliubiquitinada. Si bien los análisis realizados mediante SDS-PAGE arrojaron información relevante para conocer la dinámica de ubiquitinación de proteínas en espermatozoides humanos durante la capacitación, la separación de proteínas mediante 2DE permitió analizar gran cantidad de proteínas en un solo gel, con una mejor resolución que permite caracterizar isoformas y variantes de una proteína con diferentes modificaciones post-traduccionales (Robotti et al., 2021). El uso de la técnica de 2DE nos permitió estimar el punto isoeléctrico y peso molecular de las proteínas ubiquitinadas presentes en el lisado de espermatozoides y con esto comparar el perfil de ubiquitinación entre espermatozoides CAP y NC, identificándose 6 grupos de proteínas diferencialmente ubiquitinadas (aumentó en 4 grupos de proteínas y disminuyó en 2), indicando que la capacitación espermática produce una dinámica de ubiquitinación y degradación de proteínas que es específica para cada proteína.

Los resultados de ubiquitinación analizados mediante SDS-PAGE y 2DE indican que la ubiquitinación de proteínas en espermatozoides ocurre en pocas proteínas en comparación con las células somáticas (Granese et al., 2013). Sin embargo, la degradación por el proteosoma de estas pocas proteínas podría ser relevante para el progreso de la capacitación espermática.

Con el fin de preservar los conjugados de ubiquitina en las proteínas espermáticas posterior a la capacitación para su caracterización, se capacitó en presencia de MG132, el cual es un inhibidor reversible del sitio tipo quimiotripsina del proteosoma 26S de rápido ingreso a la célula (Kisselev y Goldberg, 2001). Trabajos previos señalan que la concentración efectiva del MG132 es muy variada y va de 1 a 100  $\mu$ M (Tipler et al., 1997; Yi et al., 2012; Zigo et al., 2019a), por lo que fue necesario evaluar diferentes concentraciones en medio capacitante para posteriormente utilizar la más conveniente en nuestro estudio. Al capacitar espermatozoides en presencia del MG132, se observó un ligero aumento en la abundancia de conjugados de ubiquitina en función del tiempo acompañado de un cambio en el patrón, debido a que el peso molecular de las proteínas aumenta en función de la cantidad de ubiquitinas conjugadas a ella. Esta observación podría ser inherente a la dinámica de ubiquitinación en espermatozoides. Sin embargo, también es posible que los resultados obtenidos fueran generados por la actividad del inhibidor, ya que si bien el MG132 ingresa rápidamente a las células, su unión es lenta y su disociación es rápida, además de que se oxida en ácidos inactivos que son transportados rápidamente fuera de la célula (Kisselev y Goldberg, 2001). Para evaluar si el MG132 afecta la capacitación espermática, se evaluó de forma paralela la fosforilación en tirosinas, observándose que hay aumento de esta variable en presencia del inhibidor durante la capacitación y dicho aumento se mantiene estable a los tiempos estudiados.

Para aislar las proteínas ubiquitinadas en los espermatozoides, se inmunoprecipitó a partir del lisado de las células utilizando anticuerpos anti-ubiquitina. El rendimiento de las proteínas purificadas fue muy bajo, razón por la cual no fue posible

secuenciarlas para su identificación. Es importante conocer la identidad de las proteínas conjugadas a ubiquitina durante la capacitación espermática para conocer mejor los mecanismos en los que el SUP contribuye al progreso de la capacitación, por lo que en el futuro sería importante continuar dichos experimentos. Aunque en el presente trabajo no pudimos identificar las proteínas que son degradadas por el SUP durante la capacitación espermática en humanos, estudios realizados en otras especies han descrito algunas proteínas degradadas por el proteosoma que están involucradas en la capacitación. Una de estas proteínas es AKAP3, la cual sirve como andamio de la PKA y que disminuye en espermatozoides de bovino al incubarlos en medio capacitante (Hillman et al., 2013). Adicionalmente, en este trabajo describen una gran variabilidad entre las muestras de semen de diferentes toros, en concordancia con nuestras observaciones en espermatozoides de humano donde la ubiquitinación de proteínas espermáticas fue variable entre donadores. Por otra parte, estudios proteómicos realizados con espermatozoides de cerdo permitieron identificar algunas de las proteínas que son degradadas por el SUP, tales como lactadherina, ACRBP, ADAM5 y SPINK2 (Zigo et al., 2019b).

La participación del SUP en los mecanismos que permiten al espermatozoide humano fecundar al ovocito han sido estudiados previamente, demostrándose que es necesario tanto para la penetración de la zona pelúcida (Saldivar-Hernandez et al., 2015) como para la reacción acrosomal (Chakravarty et al., 2008). Asimismo, se ha investigado su papel en la capacitación de espermatozoides humanos, demostrándose que la actividad del proteosoma se incrementa al inicio de la capacitación espermática por medio de la activación de la vía de la SACY/PKA, y que este aumento es necesario para que la capacitación progrese (Kong et al., 2009; Zapata-Carmona et al., 2019). Todos estos resultados sugieren que el SUP es fundamental para que el espermatozoide pueda capacitarse y fecundar.

## 10. CONCLUSIONES

- Durante la capacitación en espermatozoides humanos se produce un aumento de la conjugación de proteínas a ubiquitina, y esto ocurre paralelamente al aumento en la fosforilación en tirosinas.
- Se identificaron 6 grupos de proteínas espermáticas que presentan cambios en la ubiquitinación durante la capacitación.
- Los patrones de ubiquitinación de proteínas espermáticas varían en función del tiempo y del donador de las muestras de semen.
- La inhibición del proteosoma produjo una acumulación de conjugados de ubiquitina, mientras que la fosforilación en tirosinas se mantuvo estable.
- La inmunoprecipitación permitió el aislamiento de conjugados de ubiquitina, si bien el rendimiento fue muy bajo.
- Las proteínas del espermatozoide marcadas con ubiquitina y su posterior degradación por el proteosoma forman parte de los mecanismos que permiten a los espermatozoides capacitarse, por lo que su estudio e identificación podría contribuir al mejor conocimiento de las vías de señalización requeridas para que el espermatozoide pueda fecundar.

## 11. ANEXOS

### ANEXO 11.1 Composición de soluciones y medios utilizados

- **Medio Fluido Tubárico Humano (HTF):** KCl 4.69 mM, NaCl 97.8 mM, D-Glucosa 2.78 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.04 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.37 mM, lactato de sodio 21.4 mM, piruvato de sodio 0.33 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.0 mM, HEPES 21.0 mM, gentamicina 10 µg/ml, penicilina/estreptomicina 0.25%, pH 7.3.
- **Solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS):** NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, pH 7.4
- **Solución Laemmli:** Tris-HCl 0.6 M, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol 2%, pH 6.8.
- **Buffer de rehidratación:** Urea 8 M, CHAPS 2%, DTT 50 mM, Bio-Lyte 0.2%, azul de bromofenol.
- **Buffer de equilibrio I:** Urea 6 M, SDS 2%, glicerol 20%, DTT 2%, Tris-HCl 0.05 M, pH 8.8.
- **Buffer de equilibrio II:** Urea 6 M, SDS 2%, glicerol 20%, iodoacetamida 2.5%, Tris-HCl 0.05 M, pH 8.8.
- **Solución de bloqueo TBS-Tween 20:** Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.4) + 0.3% de BSA.
- **Solución de lavado TBS-Tween 20 0.1%:** Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%
- **Buffer RIPA:** Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, Desoxicolato de sodio 1%, SDS 0.1%, Ortovanadato de sodio 1 mM, Fluoruro de sodio 10 mM, suplementado con inhibidor de proteasas.
- **Buffer de elución:** Glycina-HCl 50 mM, pH 2.8.

## **ANEXO 11.2 Anticuerpos utilizados**

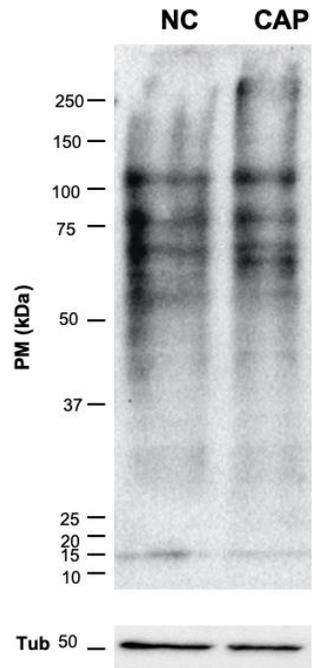
- Anti-mono/poli-ubiquitinación, monoclonal preparado en ratón, clon FK2: BML-PW8810; Enzo Life Sciences, NY, EE. UU.
- Anti-Ubiquitina, policlonal preparado en conejo: U5379; Sigma-Aldrich, St. Louis Mo, EE.UU.
- Anti- $\beta$ -tubulina, monoclonal preparado en ratón: T0198; Sigma-Aldrich, St. Louis Mo, EE.UU.
- Anti-fosfotirosina, monoclonal preparado en ratón, clon 4G10: 05-321; Millipore, Bedford, EE.UU.

**ANEXO 11.3 Protocolo eléctrico del IEF para separación de proteínas mediante 2DE**

	<b>Voltaje</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Volt/h</b>	<b>Rampa</b>
<b>Paso 1</b>	250	20 min	–	Lineal
<b>Paso 2</b>	4,000	2 h	–	Lineal
<b>Paso 3</b>	4,000	–	10,000	Rápida
<b>Total</b>		5 h	14,000	

## ANEXO 11.4 Resultados complementarios

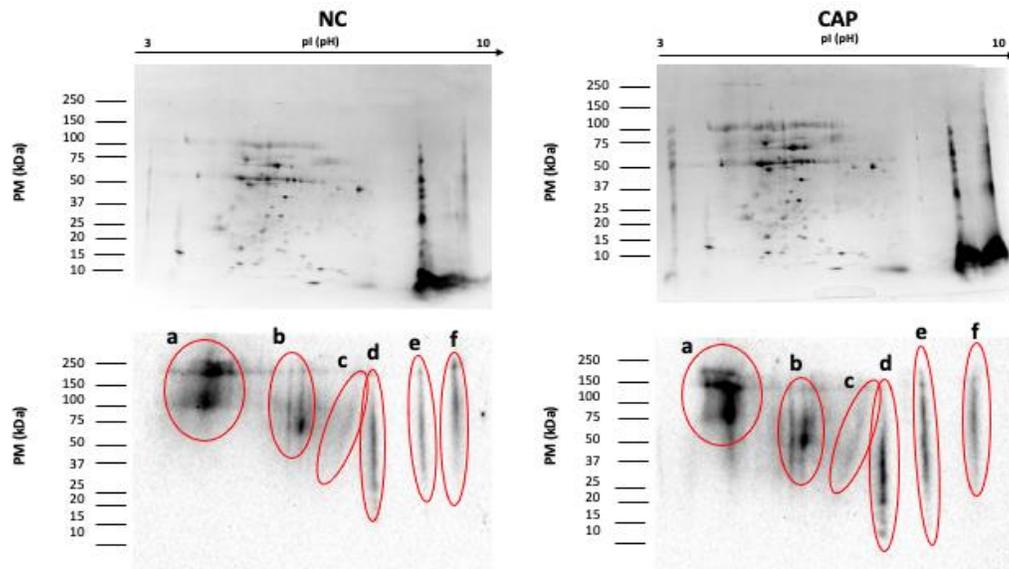
### 1) Western blot mostrando ausencia de ubiquitina libre en espermatozoides NC y CAP:



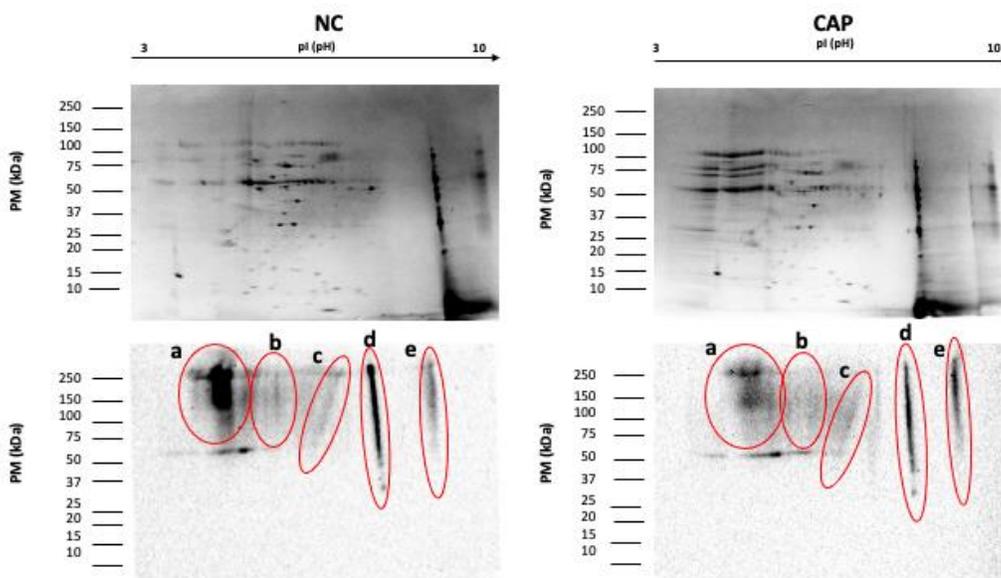
**Ausencia de ubiquitina libre en espermatozoides.** Ubiquitinación de proteínas de espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (CAP) durante 4 h. No se detecta la presencia de la proteína ubiquitina de 8.5 kDa. La misma membrana fué re-incubadas con anti- $\beta$ -tubulina como control de carga. Tub: Anti  $\beta$ -tubulina.

## 2) 2DE de varios donadores:

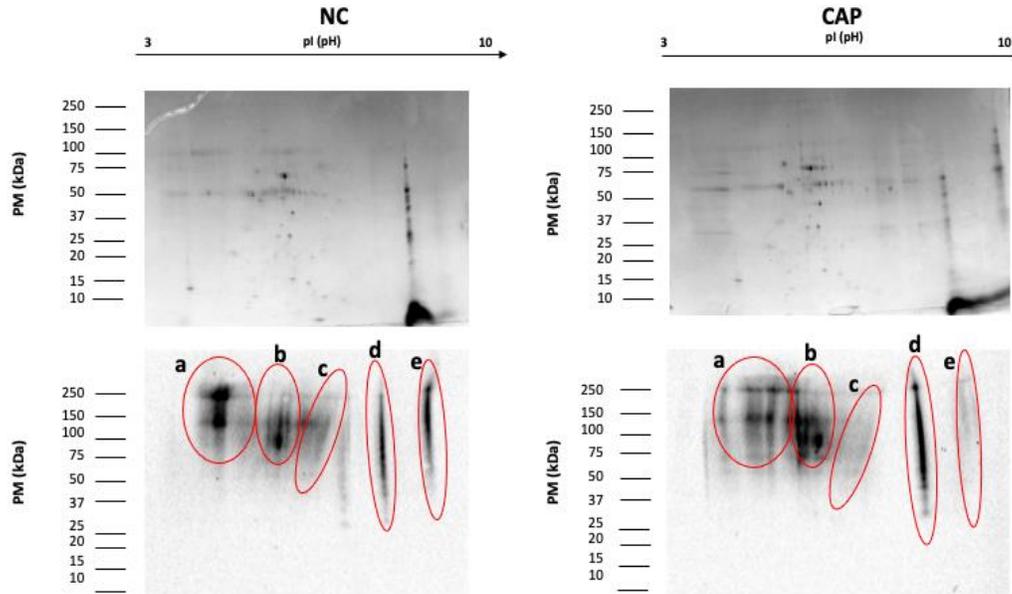
### Donador 1



### Donador 2



### Donador 3



**Proteínas ubiquitinadas en espermatozoides humanos no capacitados (NC) y capacitados (CAP) separadas mediante geles bidimensionales y analizadas mediante Western blot.** Paneles superiores: Geles teñidos con azul de Coomassie. Paneles inferiores: Western blots con anti-Ub.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Cannarella R, Condorelli RA, Mongioi LM, La Vignera S & Calogero AE. (2020) Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *Int J Mol Sci* 21.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS & Moss SB. (1996) Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* 180:284-296.
- Collins GA & Goldberg AL. (2017) The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 169:792-806.
- Chakravarty S, Bansal P, Sutovsky P & Gupta SK. (2008) Role of proteasomal activity in the induction of acrosomal exocytosis in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 16:391-400.
- Darszon A, Nishigaki T, Lopez-Gonzalez I, Visconti PE & Trevino CL. (2020) Differences and Similarities: The Richness of Comparative Sperm Physiology. *Physiology (Bethesda)* 35:196-208.
- Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Trevino CL, Felix R & Beltran C. (2005) Calcium channels and Ca<sup>2+</sup> fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* 243:79-172.
- De Jonge C. (2017) Biological basis for human capacitation-revisited. *Hum Reprod Update* 23:289-299.
- de Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D & Wreford N. (1998) Spermatogenesis. *Hum Reprod* 13 Suppl 1:1-8.
- Durairajanayagam D, Rengan AK, Sharma RK & Agarwal A. 2015. Sperm biology from production to ejaculation. In: Glenn L. Schattman SCE, Ashok Agarwal, editor. Unexplained Infertility. Switzerland: Springer Nature. p 29-42.
- Garcia-Vazquez FA, Gadea J, Matas C & Holt WV. (2016) Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian J Androl* 18:844-850.

- Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA & Zoumpourlis V. (2016) The molecular basis of fertilization (Review). *Int J Mol Med* 38:979-986.
- Granese B, Scala I, Spatuzza C, Valentino A, Coletta M, Vacca RA, De Luca P & Andria G. (2013) Validation of microarray data in human lymphoblasts shows a role of the ubiquitin-proteasome system and NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of Down syndrome. *BMC Med Genomics* 6:24.
- Hernandez-Silva G, Fabian Lopez-Araiza JE, Lopez-Torres AS, Larrea F, Torres-Flores V & Chirinos M. (2019) Proteomic characterization of human sperm plasma membrane-associated proteins and their role in capacitation. *Andrology* (en prensa).
- Hernandez-Silva G, Lopez-Torres AS, Maldonado-Rosas I, Mata-Martinez E, Larrea F, Torres-Flores V, Trevino CL & Chirinos M. (2021) Effects of Semen Processing on Sperm Function: Differences between Swim-Up and Density Gradient Centrifugation. *World J Mens Health* 39:740-749.
- Hess RA & Renato de Franca L. (2008) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol* 636:1-15.
- Hillman P, Ickowicz D, Vigel R & Breitbart H. (2013) Dissociation between AKAP3 and PKARII promotes AKAP3 degradation in sperm capacitation. *PLoS One* 8:e68873.
- Kerns K, Morales P & Sutovsky P. (2016) Regulation of Sperm Capacitation by the 26S Proteasome: An Emerging New Paradigm in Spermatology. *Biol Reprod* 94:117.
- Kerr JB. (1992) Functional cytology of the human testis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 6:235-250.
- Kisselev AF & Goldberg AL. (2001) Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 8:739-758.
- Kong M, Diaz ES & Morales P. (2009) Participation of the human sperm proteasome in the capacitation process and its regulation by protein kinase A and tyrosine kinase. *Biol Reprod* 80:1026-1035.
- Leestemaker Y & Ovaa H. (2017) Tools to investigate the ubiquitin proteasome system. *Drug Discov Today Technol* 26:25-31.

- Lopez-Torres AS, Gonzalez-Gonzalez ME, Mata-Martinez E, Larrea F, Trevino CL & Chirinos M. (2017) Luteinizing hormone modulates intracellular calcium, protein tyrosine phosphorylation and motility during human sperm capacitation. *Biochem Biophys Res Commun* 483:834-839.
- Morales P, Kong M, Pizarro E & Pasten C. (2003) Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Hum Reprod* 18:1010-1017.
- Morales P, Pizarro E, Kong M & Jara M. (2004) Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Mol Reprod Dev* 68:115-124.
- Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS & Goldstein M. (2016) Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 59:10-26.
- Okabe M. (2013) The cell biology of mammalian fertilization. *Development* 140:4471-4479.
- Redgrove KA, Anderson AL, Dun MD, McLaughlin EA, O'Bryan MK, Aitken RJ & Nixon B. (2011) Involvement of multimeric protein complexes in mediating the capacitation-dependent binding of human spermatozoa to homologous zonae pellucidae. *Dev Biol* 356:460-474.
- Robotti E, Cala E & Marengo E. (2021) Two-Dimensional Gel Electrophoresis Image Analysis. *Methods Mol Biol* 2361:3-13.
- Rosales O, Opazo C, Diaz ES, Villegas JV, Sanchez R & Morales P. (2011) Proteasome activity and proteasome subunit transcripts in human spermatozoa separated by a discontinuous Percoll gradient. *Andrologia* 43:106-113.
- Rousseau A & Bertolotti A. (2018) Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:697-712.
- Ryu DY, Kim YJ, Lee JS, Rahman MS, Kwon WS, Yoon SJ & Pang MG. (2014) Capacitation and acrosome reaction differences of bovine, mouse and porcine spermatozoa in responsiveness to estrogenic compounds. *J Anim Sci Technol* 56:26.
- Saez-Espinosa P, Huerta-Retamal N, Robles-Gomez L, Aviles M, Aizpurua J, Velasco I, Romero A & Gomez-Torres MJ. (2020) Influence of in vitro

- capacitation time on structural and functional human sperm parameters. *Asian J Androl* 22:447-453.
- Saldivar-Hernandez A, Gonzalez-Gonzalez ME, Sanchez-Tusie A, Maldonado-Rosas I, Lopez P, Trevino CL, Larrea F & Chirinos M. (2015) Human sperm degradation of zona pellucida proteins contributes to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol* 13:99.
- Schwertman P, Bezstarosti K, Laffeber C, Vermeulen W, Demmers JA & Marteiijn JA. (2013) An immunoaffinity purification method for the proteomic analysis of ubiquitinated protein complexes. *Anal Biochem* 440:227-236.
- Signorelli J, Diaz ES & Morales P. (2012) Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res* 349:765-782.
- Simerly C, Castro C, Hartnett C, Lin CC, Sukhwani M, Orwig K & Schatten G. (2016) Post-Testicular Sperm Maturation: Centriole Pairs, Found in Upper Epididymis, are Destroyed Prior to Sperm's Release at Ejaculation. *Sci Rep* 6:31816.
- Sullivan R & Mieusset R. (2016) The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update* 22:574-587.
- Sutovsky P. (2011) Sperm proteasome and fertilization. *Reproduction* 142:1-14.
- Tipler CP, Hutchon SP, Hendil K, Tanaka K, Fishel S & Mayer RJ. (1997) Purification and characterization of 26S proteasomes from human and mouse spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 3:1053-1060.
- Torres-Flores V, Picazo-Juarez G, Hernandez-Rueda Y, Darszon A & Gonzalez-Martinez MT. (2011) Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod* 26:2626-2635.
- Turner RM, Eriksson RL, Gerton GL & Moss SB. (1999) Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Mol Hum Reprod* 5:816-824.
- Wang X & Robbins J. (2014) Proteasomal and lysosomal protein degradation and heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 71:16-24.

- Wojcik C, Benchaib M, Lornage J, Czyba JC & Guerin JF. (2000) Proteasomes in human spermatozoa. *Int J Androl* 23:169-177.
- World Health Organization. (2010) *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Geneva, Switzerland: WHO Press.
- Yi YJ, Zimmerman SW, Manandhar G, Odhiambo JF, Kennedy C, Jonakova V, Manaskova-Postlerova P, Sutovsky M, Park CS & Sutovsky P. (2012) Ubiquitin-activating enzyme (UBA1) is required for sperm capacitation, acrosomal exocytosis and sperm-egg coat penetration during porcine fertilization. *Int J Androl* 35:196-210.
- Zapata-Carmona H, Baron L, Zuniga LM, Diaz ES, Kong M, Drobnis EZ, Sutovsky P & Morales P. (2019) The activation of the chymotrypsin-like activity of the proteasome is regulated by soluble adenylyl cyclase/cAMP/protein kinase A pathway and required for human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 25:587-600.
- Zhou W, De Iuliis GN, Dun MD & Nixon B. (2018) Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:59.
- Zigo M, Jonakova V, Manaskova-Postlerova P, Kerns K & Sutovsky P. (2019a) Ubiquitin-proteasome system participates in the de-aggregation of spermadhesins and DQH protein during boar sperm capacitation. *Reproduction* 157:283-295.
- Zigo M, Manaskova-Postlerova P, Jonakova V, Kerns K & Sutovsky P. (2019b) Compartmentalization of the proteasome-interacting proteins during sperm capacitation. *Sci Rep* 9:12583.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00103

Matrícula: 2192802138

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS  
CONJUGADAS A UBIQUITINA EN  
ESPERMATOZOIDES HUMANOS  
CAPACITADOS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 20 del mes de mayo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ  
M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA  
DRA. GABRIELA HERNANDEZ SILVA  
DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO



CINTHYA CASAS ORTEGA  
ALUMNA

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

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: CINTHYA CASAS ORTEGA

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.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. EDUARDO CASAS HERNANDEZ

VOCAL

M. EN C. PEDRO CUAPIO PADILLA

VOCAL

DRA. GABRIELA HERNANDEZ SILVA

SECRETARIO

DR. IVAN URIEL BAHENA OCAMPO