



Casa Abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Caracterización de glicoproteínas y colesterol de los microdominios de la membrana de espermatozoides de cerdo durante la capacitación y criopreservación”.

TESIS
QUE PRESENTA
JOSÉ BENITO LÓPEZ SALGUERO MATRÍCULA 2121800666
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DIRECTORA: DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

JURADOS:

Presidenta: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana _____

Secretario: Dr. Humberto González Márquez _____

Vocal: Dra. Irma Jiménez Morales _____

Vocal: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor _____

Vocal: Dr. Julio César Chávez Zamora _____

Iztapalapa, Ciudad de México, enero 2022.

PNPC

El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana es un posgrado multisede, Consolidado, orientado a investigación y pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Conacyt con registro 001480

Jurado

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM (Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa, Lerma y Xochimilco) aprobó la Tesis que presenta

José Benito López Salguero

El día 18 de octubre de 2021

Sinodales

Presidenta: Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana _____

Secretario: Dr. Humberto González Márquez _____

Vocal: Dra. Irma Jiménez Morales _____

Vocal: Dra. Rosa María Viguera Villaseñor _____

Vocal: Dr. Julio César Chávez Zamora _____

Comité Tutorial

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dra. Irma Jiménez Morales

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dr. Humberto González Márquez

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Realización

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Andrología y de Expresión Génica de la UAM-Iztapalapa, y en el de la Unidad de Glicobiología Estructural y Funcional de la Universidad de Lille, Francia.

Trabajo financiado por:

CONACYT, México, proyecto número 105961-M

Beca CONACYT, México a J. Benito López Salguero número 233535

CONACYT-ANUIES-ECOS proyecto bilateral México-Francia, número M10-A02

Fondos de la Comunidad Europea, del CNRS, de la Universidad de Lille, Francia y de Universidad Autónoma Metropolitana, México.

Dedicatorias

Con amor a mi madre, Luisa Salguero Lachino, por todo el esfuerzo y esmero con el que me educó, por darme todo lo necesario, así como animarme a seguir estudiando cuando ya no quería, gracias mamá.

A mi amada esposa, Daniela Aguilar Sánchez, por todo su apoyo y comprensión para poder finalizar esta hermosa etapa de mi vida.

A mi hermosa hija, Diana Quetzalli López Aguilar, por ser un estímulo para convertirme en una mejor persona.

A toda mi familia, mis hermanas, Chuy, gracias por ser como una segunda mamá para mí, hermana Lilia, algún día te volveré a ver en el cielo, a mis hermanos Juan y Ángel, gracias por formar parte de mi vida, mis amados sobrinos y sobrinas, Lya, Khalil, Isaac, Mitzy, a mis suegros, Susana y Jorge, así como mis cuñados, Jorge, Azucena y su esposo, por ser unas grandes personas.

A Dios por ser tan bueno conmigo.

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Dra. Reyna Fierro pastrana por todo su apoyo que me brindó desde la Licenciatura y en especial para poder concluir este proyecto.

Al Dr. Humberto González Márquez por sus consejos, darme dirección y por su paciencia durante mi formación en la Licenciatura, Maestría y en esta última etapa.

A la Dra. Irma Jiménez Morales por compartirme sus conocimientos desde que llegué al Laboratorio de Andrología para realizar mi PDI y Servicio Social.

A todos los integrantes de los laboratorios de Andrología y Expresión Génica por permitirme formar parte de este gran equipo.

A todo el personal de la Unidad de Glicobiología Estructural y Funcional de Lille, Francia. A la Dra. Anne-Sophie VERCOUTTER-EDOUART por instruirme en la Glicobiología y contribuir para la realización de este trabajo. Al Dr. Dr. Tony LEFEBVRE por recibirme con mucha fraternidad en su equipo durante mi estancia en Lille.

A todo el personal de la coordinación del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. Al Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez por su apoyo para poder concluir el Doctorado. Al Lic. Vicente Cuauhtonal Gallegos Meza, por su apoyo y amable atención para realizar todos los trámites. A la Lic. Patricia Cruz Martínez, por su gentil orientación para realizar los trámites.

A CONACYT por la beca otorgada, 233535.

A Cooperación Bilateral México-Francia CONACYT-ANUIES-ECOS (M10-A02).

A European Community (FEDER), “Région Nord-Pas de Calais”, IBISA network, CNRS, l’Université de Lille-Faculté des Sciences et Technologies.

A toda la Universidad Autónoma Metropolitana por recibirme y permitirme formar parte de ella.

A mi amigo Oscar Mondragón, por su apoyo durante los experimentos.

A todo el equipo de “ExNefrored” por su apoyo y amistad, Leslie, Paola, Iván.

Índice

PNPC	i
Jurado	ii
Comité Tutoral.....	iii
Realización.....	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos.....	vi
Índice.....	viii
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas	xv
Resumen.....	i
Abstract	iii
Introducción.....	1
Estructura del espermatozoide de mamífero	2
Capacitación espermática.....	4
Reacción acrosomal	6
Membrana Plasmática	6
Microdominios.....	8
Antecedentes	12
Estudios de balsas lipídicas en espermatozoides.....	12

Interacción espermatozoide-óvulo	15
Criopreservación de espermatozoides	17
Justificación.....	20
Preguntas de Investigación	21
Hipótesis.....	21
Objetivo General	22
Objetivos Específicos	22
Métodos	23
Reactivos	23
Obtención y análisis de la muestra	23
Eliminación del líquido seminal.....	24
Capacitación <i>in vitro</i>	24
Criopreservación de espermatozoides	25
Aislamiento de balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo	26
Marcadores de balsas lipídicas.....	27
Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y medio reductor (SDS-PAGE).....	28
Identificación de los residuos de carbohidratos	29
Determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas obtenidas mediante espectrometría de masas en tándem	30

Distribución de balsas lipídicas de la membrana plasmática de los espermatozoides	31
Cuantificación de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides	32
Análisis estadístico	33
Resultados	34
Muestras de semen y capacitación.....	34
Criopreservación de espermatozoides	34
Balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo	39
Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
Identificación de los residuos de carbohidratos	43
Determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas obtenidas mediante espectrometría de masas en tándem	50
Determinación de la distribución de balsas lipídicas de la membrana plasmática de los espermatozoides	59
Cuantificación de colesterol	62
Discusión.....	64
Conclusiones.....	75
Literatura Citada.....	76
Productos derivados de este trabajo de tesis.....	99

Lista de figuras

- Figura 1. Estructura del espermatozoide de mamífero. Se observa la cabeza, con su acrosoma y la cola, con sus divisiones anatómicas (segmento medio, principal y caudal o terminal) (Hafez y B. Hafez 2017) 3
- Figura 2. Representación esquemática del espermatozoide de cerdo. A) Una vista seccional del espermatozoide. 1. Membrana plasmática, 2. Membrana acrosomal externa, 3. Matriz de enzimas acrosomales, 4. Membrana acrosomal interna, 5. Envoltura nuclear, 6. Núcleo, 7. Anillo posterior y cuello, 8. Mitocondrias, 9. Porción proximal del flagelo, 10. Anillo, 11. Vaina fibrosa, 12. Axonema y fibras densas externas. B) Vista superficial de la cabeza del espermatozoide y pieza intermedia con subdominios. 13. Cresta apical, 14. Región pre-ecuatorial, 15. Región ecuatorial, 16. Región post-ecuatorial. C) Reacción acrosomal. 17. Formación de vesículas mixtas a través de múltiples fusiones entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Gadella et al. 2008) 4
- Figura 3. Modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson (Singer y Nicolson 1972) 7
- Figura 4. Modelo de organización de balsas lipídicas en la membrana plasmática. Las balsas lipídicas (rojo-verde) se segregan de otras regiones (azules) de la bicapa en las que la fosfatidilcolina insaturada predomina en la cara exoplásmica, y tiene una organización diferente de colesterol intercalado de la que hay en los rafts. **a.** Las balsas lipídicas contienen proteínas pegadas a la cara exoplásmica de la bicapa gracias a GPI, proteínas unidas a la cara citoplásmica por colas de acilo (se muestra la proteína Yes de la familia de cinasas Src), o proteínas asociadas a través de su dominio transmembranal como las proteínas virales neuraminidasa y hemaglutinina (asociadas con DIG, (Detergent-Insoluble Glycolipids) en las membranas virales). **b.** La bicapa lipídica en los rafts es asimétrica con esfingomielina (rojo) y glicoesfingolípidos (rojo) enriquecidos en la cara exoplásmica y glicerolípidos (fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina) en la cara citoplásmica (verde). El colesterol (gris), se presenta en ambas caras y llena el espacio bajo los grupos de la cabeza

de los esfingolípidos o entre la cadena de ácidos grasos en la zona cercana. **c.** Las caveolas están formadas por moléculas de caveolina ensambladas que hacen una invaginación en forma de horquilla en la membrana. Las interacciones con las balsas lipídicas pueden estar mediadas por la unión de colesterol y la acilación de las cisteínas del extremo C-terminal (Simons y Ikonen 1997)..... 11

Figura 5. Espermatozoides de cerdo teñidos con eosina-nigrosina. Los espermatozoides vivos no presentan tinción, por el contrario, los que están muertos se encuentran teñidos de color rojo. 1000 aumentos, microscopio óptico Carl Zeiss 34

Figura 6. SDS-PAGE de proteínas de espermatozoides de cerdo teñidas con plata. El cambio es más evidente con PRC, ya que se aprecia un aumento de intensidad para las bandas 64, 45, 36, 34 y 26 kDa, señaladas por flechas y una pérdida de las bandas de 64 y 45 kDa en PRCr. PTNC = proteína total de espermatozoides no capacitados, PTC= proteína total de espermatozoides capacitados, PTCr = proteína total de espermatozoides criopreservados, PRNC = proteínas de balsas de espermatozoides no capacitados, PRC = proteínas de balsas de espermatozoides capacitados, PRCr = proteínas de balsas de espermatozoides criopreservados. Los pesos moleculares se indican en kDa. Cada SDS-PAGE se replicó al menos tres veces con distintas muestras de eyaculado..... 35

Figura 7. Ensayos con lectinas en glicoproteínas de espermatozoides de cerdo. A) PNA, se observó una disminución en la señal en la banda de 145 kDa en RPNC y RPCr. B) SNA, se observaron 3 bandas, 79, 59 y 24 kDa, con mayor intensidad, en RPC y una disminución en RPCr en la banda de 79 kDa, para las bandas de 59 y 24 kDa la señal fue menor en RPNC y RPCr. C) GNA, la banda de 45 kDa en PRC, mostró mayor señal comparada con PRNC y PRCr. D) DSA, en PRCr disminuyó la señal en las bandas de 145, 120 kD, 45, 36 y 34 kDa. PTNC = proteína total de espermatozoides no capacitados, PTC= proteína total de espermatozoides capacitados, PTCr = proteína total de espermatozoides criopreservados, PRNC = proteínas de balsas de espermatozoides no capacitados, PRC = proteínas de balsas de espermatozoides capacitados, PRCr = proteínas de balsas de espermatozoides criopreservados. Se utilizaron como controles positivos o negativos: asialofetuína

(Aft), fetuina (Ft), transferrina (Tf) y carboxipeptidasa Y (CPY) de acuerdo con la lectina y a las indicaciones del fabricante (5 µg)	37
Figura 8. Gradiente de sacarosa. Entre la interfase del gradiente del 5 y 35 % se distingue una región blanquecina, la cual se colectó en las fracciones 4 y 5, que corresponden a balsas lipídicas.....	39
Figura 9. A. Dot-blot para GM1. Se detectó GM1 en el extracto total de espermatozoides capacitados (PTC), extracto total de no capacitados (PTNC), y en las fracciones 3 y/o 4. (-) Albúmina de suero bovino (control negativo); (+) homogeneizado de células de cerebro de rata (control positivo). Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes; cada uno se realizó en espermatozoides capacitados (C) y no capacitados (NC). B. Detección por transferencia de Western de Caveolina-1 (Cav 1) y flotilina-1 (Flot-1), que se encuentran en las proteínas de balsas lipídicas de los espermatozoides NC (PRNC) y C (PRC), colectadas en las fracciones 3 y/o 4, la proteína total de NC (PTNC) y C espermatozoides (PTC). Los marcadores de masa molecular se indican en kDa.	41
Figura 10. SDS-PAGE y análisis densitométrico de proteínas de espermatozoides de cerdo teñidas con plata correspondiente a proteínas totales (PT) de espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (C) (panel izquierdo) y proteínas de rafts (PR) de espermatozoides C y NC (panel derecho). Cada SDS-PAGE se replicó al menos tres veces con distintas muestras de eyaculado. En las extracciones de PR, la capacitación indujo un aumento de intensidad para las bandas ~ 80, 70, 65, 48, 40, 36-34 kDa (flechas con líneas de punteadas) y una disminución de la intensidad para las bandas ~ 74, 23 y 15 kDa (flechas con línea continua, gruesa y corta)	43
Figura 11. Se realizó la tinción con rojo Ponceau de membranas de nitrocelulosa antes de realizar los ensayos de transferencia de lectina y se confirmó que la carga de proteína fue igual en todos los carriles. Utilizamos las lectinas PNA y SNA para identificar a los carbohidratos O-glicanos, y GNA y DSA para los N-glicanos.....	46
Figura 12. Detección de glicoproteínas de balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo mediante western blot con lectina. PNA (A), SNA (B), GNA (C) o DSA (D). Todos los cambios significativos ($p < 0.05$) observados después de la capacitación	

se indican con flechas. Se utilizaron asialofetuína (Aft), fetuina (Ft), transferrina (Tf) y carboxipeptidasa Y (CPY) como controles positivos o negativos según la lectina y según las indicaciones del fabricante (5 µg). RPNC = proteínas en balsa de espermatozoides no capacitados, RPC = proteínas en balsa de espermatozoides capacitados. Los pesos moleculares se indican en kDa. Se muestran fotografías representativas de cinco experimentos independientes. La densidad óptica (DO) se determinó y se normalizó frente a la DO de la migración de las proteínas totales de RPC o RCNP teñidas con la tinción de rojo Ponceau (Romero-Calvo et al. 2010) 47

Figura 13. Patrones de fluorescencia de CTX-FITC para GM1 en la membrana de espermatozoides de cerdo. Las preparaciones se observaron a 100 x. A, fluorescencia en flagelo y cabeza. B, fluorescencia intensa en la cabeza y débil en el flagelo. B1, fluorescencia en la región apical y post acrosomal y débil en el flagelo (en criopreservados). C, fluorescencia sólo en la cabeza. D, fluorescencia en la región post acrosomal y pieza media (en criopreservados). Lado izquierdo de cada fotografía, observación en fluorescencia. Lado derecho, observación en campo claro. Se muestran los porcentajes de cada patrón..... 60

Figura 14. Patrones de distribución de fluorescencia en espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados. A: Flagelo y cabeza, B: Intensa en la cabeza, pero débil en el flagelo, B1: Región apical y post acrosomal, débil en el flagelo, C: sólo en la cabeza y D: en la región post-acrosomal y pieza intermedia. * diferencias significativas $p < 0.05$ 61

Figura 15. Concentración de colesterol (µg/ml) en espermatozoides de cerdo. Se observa una pérdida importante en los espermatozoides capacitados, ya que la concentración de colesterol en el medio de capacitación fue mayor que en los espermatozoides (349.5 y 147.6 µg/ml respectivamente); por otra parte, la pérdida de colesterol en los criopreservados fue dramática, pues prácticamente todo el colesterol se determinó únicamente en el medio de criopreservación (487.9 µg/ml). Spz (espermatozoides), P.S (plasma seminal), M.CAP (medio de capacitación) y M.CON (medio de criopreservación). * diferencias significativas ($p < 0.05$) 63

Lista de tablas

Tabla 1. Cambios en glicoproteínas de balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo mediante lectin blot.....	38
Tabla 2. Cambios en la glicosilación de proteínas en balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo, basados en análisis de blot con lectinas.....	49
Tabla 3. Identificación de proteínas de balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo no capacitados, capacitados y criopreservados.	53
Tabla 4. Porcentaje de espermatozoides de cerdo de acuerdo con los patrones de fluorescencia con CTX-FITC.....	61
Tabla 5. Porcentaje de Concentración de colesterol en espermatozoides de cerdo y sobrenadante.....	62

Resumen

La superficie de los espermatozoides está recubierta de glicoproteínas cuya redistribución durante la capacitación *in vitro* juega un papel clave en el proceso de fertilización. Las balsas lipídicas o rafts son microdominios de membrana involucrados en la transducción de señales a través de receptores e incluyen o reclutan tipos específicos de proteínas y glicoproteínas. Pocos estudios se han centrado en identificar glicoproteínas residentes en las balsas lipídicas de los espermatozoides. Las proteínas asociadas con las balsas lipídicas modifican su localización durante la capacitación. El objetivo de este estudio fue identificar las glicoproteínas asociadas con las balsas lipídicas de los espermatozoides de cerdo capacitados, mediante técnicas de electroforesis, Western blot, lectinas y espectrometría de masas. A partir de los perfiles proteómicos generados por las extracciones de proteínas de balsas lipídicas, observamos que después de la capacitación, la intensidad de algunas bandas aumentó mientras que la de otras disminuyó. Para determinar si las proteínas obtenidas de las balsas lipídicas están glicosiladas, se realizaron ensayos de Western blot con lectinas. Se analizaron por espectrometría de masas bandas de proteínas con buena resolución y que mostraban modificaciones significativas de glicosilación después de la capacitación. Las bandas de interés tuvieron un peso molecular aparente de 64, 45, 36, 34, 24, 18 y 15 kDa. Se secuenciaron las 7 bandas y se identificaron 20 glicoproteínas conocidas o potenciales. Diez de estas proteínas se describen en este estudio por primera vez como proteínas asociadas con balsas lipídicas de espermatozoides (ADAM5, SPMI, SPACA1, proteína plasmática seminal pB1, PSP-I, MFGE8, tACE, PGK2, SUCLA2, MDH1). Además, LYDP4, SPAM-1,

HSP60, ZPBP1, AK1 se reportaron previamente en balsas lipídicas de espermatozoides de ratón y humanos, pero no en espermatozoides de cerdo. También encontramos y confirmamos la presencia de ACR, ACRBP, AWN, AQN3 y PRDX5 en balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo. Se describió el patrón de glicosilación en balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo antes y después de la capacitación. Se necesitan más análisis glicómicos para determinar el tipo y la variación de las cadenas de glicanos de las glicoproteínas de las balsas lipídicas en la superficie de los espermatozoides durante la capacitación y la reacción acrosomal. Se encontraron 5 patrones de distribución del colesterol de balsas lipídicas, en espermatozoides no capacitados predominó el patrón A con fluorescencia en la región del flagelo y cabeza, en los capacitados fue el patrón C con fluorescencia en la cabeza, en los criopreservados se observaron dos patrones más siendo los mayoritarios los patrones A y C. Respecto a la concentración de colesterol, se encontró que en los espermatozoide criopreservados hubo pérdida considerable del colesterol el cual se detectó en el medio de congelación por lo que se postula que el proceso de congelación afectó considerablemente la membrana de los espermatozoides.

Palabras clave: espermatozoides de cerdo, capacitación, glicoproteína, balsas lipídicas, lectinas.

Abstract

The surface of the spermatozoa is coated with glycoproteins, the redistribution of which during in vitro capacitation plays a vital role in the subsequent fertilization process. Lipid rafts are membrane microdomains involved in signal transduction through receptors and include or recruit specific types of proteins and glycoproteins. Few studies have focused on identifying glycoproteins resident in the lipid rafts of spermatozoa. Proteins associated with lipid rafts modify their localization during capacitation. The study's objective was to identify the glycoproteins associated with lipid rafts of capacitated boar spermatozoa through a lectin-binding assay coupled to a mass spectrometry approach. From the proteomic profiles generated by the raft proteins extractions, we observed that some bands' intensity increased after capacitation while others' decreased. To determine whether the proteins obtained from lipid rafts are glycosylated, lectin blot assays were performed, the protein bands with good resolution and significant glycosylation modifications after capacitation were analyzed by mass spectrometry. The bands of interest had an apparent molecular weight of 64, 45, 36, 34, 24, 18, and 15 kDa. We sequenced the seven bands, and 20 known or potential glycoproteins were identified. In our knowledge, this is the first time that the following proteins and their association with sperm lipid rafts are described: ADAM5, SPMI, SPACA1, Seminal plasma protein pB1, PSP-I, MFGE8, tACE, PGK2, SUCLA2, and MDH1. Moreover, LYDP4, SPAM-1, HSP60, ZBP1, and AK1 were previously reported in mouse and human spermatozoa lipid rafts but not in boar spermatozoa. We also found and confirmed the presence of ACR, ACRBP, AWN, AQN3, and PRDX5 in lipid rafts of boar spermatozoa. This paper provides an overview of the glycosylation pattern in lipid rafts

of boar spermatozoa before and after capacitation. The further glycomic analysis is needed to determine the type and the variation of glycan chains of the lipid rafts glycoproteins on the surface of spermatozoa during capacitation and acrosome reaction. Five patterns of cholesterol distribution of the rafts were found in non-capacitated sperm: Pattern A with fluorescence in the flagellum and head region predominated; after capacitation, it was pattern C with fluorescence in the head, in cryopreserved two patterns were observed more being the majority patterns A and C. Regarding the concentration of cholesterol, it was found that in cryopreserved sperm there was considerable loss of cholesterol which was detected in the freezing medium, so it is postulated that the freezing process affected the sperm membrane considerably.

Keywords: Boar spermatozoa, capacitation, glycoprotein, lipid rafts, lectins.

Introducción

El proceso de fertilización involucra una serie de eventos entre el ovocito y el espermatozoide que conducen a la formación del cigoto y finaliza con la formación de un nuevo individuo (Naz y Rajesh 2004). El espermatozoide debe someterse a una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, llamado Capacitación, que permite que el espermatozoide pueda migrar hacia el ovocito, se una a la zona pelúcida (ZP) y realice la reacción acrosomal (RA) (Cross 2004, Gadella *et al.* 2008). Resultado de la pérdida de colesterol, durante la capacitación se reordenan los lípidos y las proteínas de la membrana, cambia la regulación de la permeabilidad de iones y se incrementa la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, así como también se reorganizan las balsas lipídicas (Boerke *et al.* 2008, Visconti *et al.* 2011).

La integridad de la membrana plasmática es de vital importancia. Se ha constatado que la criopreservación de espermatozoides puede dañar la membrana plasmática y la acrosomal. El 50% de los espermatozoides criopreservados que sobreviven al proceso de congelación-descongelación, presentan el fenómeno de criocapacitación, teniendo una vida más corta y poca eficiencia reproductiva (Hernandez *et al.* 2007, Bailey *et al.* 2008), especialmente los espermatozoides de cerdo cuya criopreservación todavía constituye un reto, posiblemente por alguna característica particular de su membrana plasmática.

Los espermatozoides se producen en el testículo, específicamente en los túbulos seminíferos, de ahí pasan a la cabeza del epidídimo y, durante su paso hacia la cola del epidídimo, maduran (Hafez y B. Hafez 2017).

Estructura del espermatozoide de mamífero

Los espermatozoides maduros de mamífero son células alargadas que tienen una cabeza que contiene al núcleo y una cola en donde se encuentra el aparato necesario para su desplazamiento. El espermatozoide entero está cubierto por la membrana plasmática y, por debajo de ella, en la porción anterior de la cabeza, se encuentra una gran vesícula llamada acrosoma; además, se distingue el cuello que une la cabeza del espermatozoide con su cola (flagelo), que, a su vez, se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Fig. 1) (Hafez y B. Hafez 2017).

La célula espermática tiene una morfología característica y su superficie está muy diferenciada en varios dominios (Fig. 2), cuyos lípidos y proteínas experimentan cambios cuando el espermatozoide se capacita. Cada una de las regiones de la superficie de la cabeza del espermatozoide tiene un papel específico en la fertilización del ovocito: una región está dedicada a la unión con la ZP, una gran área de la superficie de la cabeza del espermatozoide está involucrada en la RA, y otras regiones están implicadas en la unión y fusión con la membrana plasmática del óvulo. Estos eventos ocurren en el área de la cabeza del espermatozoide (Gadella *et al.* 2008).



Figura 1. Estructura del espermatozoide de mamífero. Se observa la cabeza, con su acrosoma y la cola, con sus divisiones anatómicas (segmento medio, principal y caudal o terminal) (Hafez y B. Hafez 2017).

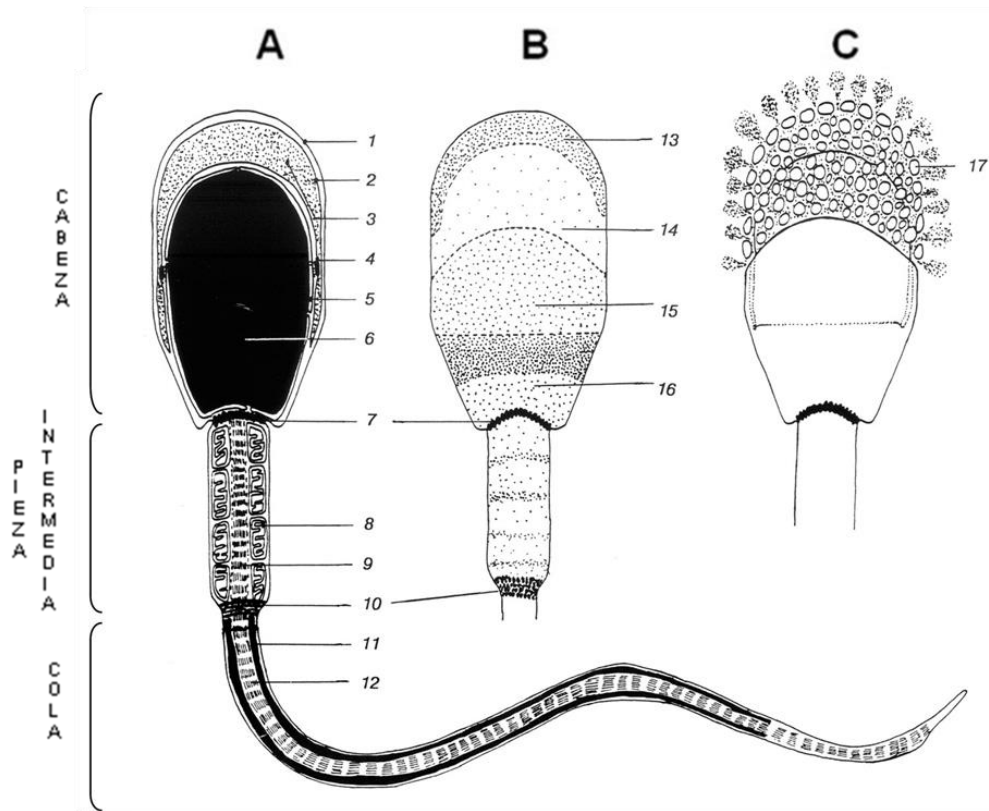


Figura 1 Representación esquemática del espermatozoide de cerdo. A) Una vista seccional del espermatozoide. 1. Membrana plasmática, 2. Membrana acrosomal externa, 3. Matriz de enzimas acrosomales, 4. Membrana acrosomal interna, 5. Envoltura nuclear, 6. Núcleo, 7. Anillo posterior y cuello, 8. Mitocondrias, 9. Porción proximal del flagelo, 10. Anillo, 11. Vaina fibrosa, 12. Axonema y fibras densas externas. B) Vista superficial de la cabeza del espermatozoide y pieza intermedia con subdominios. 13. Cresta apical, 14. Región pre-ecuatorial, 15. Región ecuatorial, 16. Región post-ecuatorial. C) Reacción acrosomal. 17. Formación de vesículas mixtas a través de múltiples fusiones entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa (Gadella et al. 2008).

Capacitación espermática

Los espermatozoides de mamífero, después de ser eyaculados, son móviles, sin embargo, todavía no pueden fertilizar al óvulo. Esta habilidad la adquieren durante su paso por el tracto reproductivo de la hembra durante el cual sucede un proceso llamado

capacitación espermática (Yanagimachi 1994, Visconti y Kopf 1998). Es necesario que los espermatozoides residan en el aparato reproductor de la hembra antes de estar en condiciones de unirse al óvulo, la capacitación ocurre en el útero, en el istmo del oviducto (Hafez y B. Hafez 2017). Los cambios en la membrana plasmática del espermatozoide son la pérdida del colesterol, seguido del reacomodo y movimiento de las balsas lipídicas. Después de la pérdida de colesterol, entra bicarbonato, que desencadena eventos bioquímicos, como la activación de la adenilciclase dependiente de bicarbonato (HCO_3^-) y de la proteína cinasa A (PKA), que activan la fosforilación de tirosinas de un grupo de proteínas, tanto flagelares como de otros sitios del espermatozoide, lo que correlaciona con cambios en la movilidad y con la capacidad para realizar la RA (Visconti *et al.* 1995a, Visconti *et al.* 1995b). El incremento de la fosforilación de tirosinas dependiente de AMP cíclico está asociado con cambios tanto en la cabeza como en el flagelo que preparan al espermatozoide para llevar a cabo la RA y para adquirir movilidad hiperactiva (Suarez 1996). Además de la pérdida de colesterol (Arnoult *et al.* 1999, Visconti *et al.* 1999a, Visconti *et al.* 1999b), se pierde la asimetría de los lípidos (Flesch *et al.* 2001), la membrana se hiperpolariza (Zeng *et al.* 1995), se abren los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Florman *et al.* 1998), y hay pérdida y redistribución de glicoproteínas de la membrana plasmática (Tulsiani *et al.* 1997, Jiménez *et al.* 2006). Para inducir *in vitro* la pérdida de colesterol, es esencial agregar albúmina sérica bovina (BSA) al medio de capacitación, pues funciona como aceptor de colesterol, secuestrándolo del medio y favoreciendo el flujo hacia el exterior del espermatozoide (Davis *et al.* 1979, Davis *et al.* 1980, Davis 1981, Go y Wolf 1985, Suzuki y Yanagimachi 1989, Cross 1996). Se ha demostrado que el flujo de colesterol y otros esteroides fuera de la membrana plasmática precede la cascada de fosforilación

de tirosinas regulada por AMP cíclico (Visconti *et al.* 1995a, Visconti *et al.* 1995b, Visconti *et al.* 1999c). Tanto los espermatozoides de la cola del epidídimo como los eyaculados pueden capacitarse *in vitro*, incubándolos en medios definidos que simulan la composición de electrolitos del fluido del tracto reproductor de la hembra (Yanagimachi 1994). De esta manera, podemos definir a la capacitación espermática como una cascada de cambios biofísicos, bioquímicos y estructurales, que ocurren durante el paso del espermatozoide por el tracto reproductor de la hembra, en el istmo del oviducto, donde adquieren la habilidad para fertilizar al óvulo (Yanagimachi 1994, Topfer-Petersen *et al.* 2008).

Reacción acrosomal

La RA consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa, seguida por una vesiculación sobre el segmento anterior del acrosoma, lo que da lugar a la liberación de enzimas hidrolíticas, como hialuronidasa y acrosina, que permiten al espermatozoide atravesar la ZP del óvulo (Hafez y B. Hafez 2017). Entre los componentes que hacen posible que la RA se lleve a cabo se encuentran el aumento de pH intracelular, la despolarización de la membrana plasmática, el aumento de iones de Ca^{2+} que activan a la fosfolipasa C y a la fosfolipasa A2, que activan a la proteína cinasa C mediante la formación de diacilglicerol, ácidos grasos libres y lisofosfatidilcolina (Flesch y Gadella 2000). Así como también la polimerización de la actina en actina F.

Membrana Plasmática

La membrana plasmática es una estructura que protege a la célula de su entorno y sirve de estructura o armazón para la organización de sus componentes internos.

Constituye una barrera con permeabilidad selectiva para el intercambio de sustancias, presenta sistemas de transporte físico de moléculas de un lado a otro de ella; contiene receptores que se unen a ligandos específicos en el espacio externo y transmite información de los compartimientos en el interior de la célula; interviene en interacciones con otras células, además de ser un sitio transductor de señales y energía (Karp 2006). El modelo de la estructura de la membrana plasmática más aceptado actualmente es el de Mosaico Fluido (Fig. 3) (Singer y Nicolson 1972, Somerharju *et al.* 2009), sin embargo, este modelo se ha modificado, postulando islas con rigidez distinta al resto de la membrana, a estas regiones se les conoce como microdominios de la membrana, también llamados balsas lipídicas, o dominios resistentes a detergentes, los cuales abordaremos en el apartado siguiente.

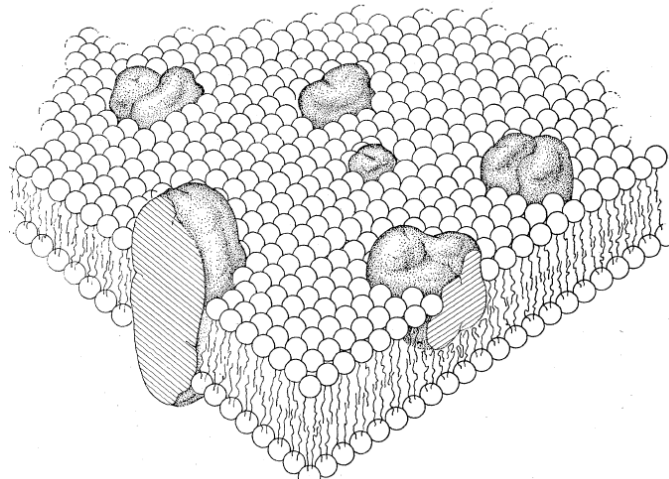


Figura 3. Modelo de mosaico fluido propuesto por Singer y Nicolson (Singer y Nicolson 1972).

Microdominios

En las membranas celulares se han postulado microdominios llamados **Rafts** o **Balsas Lipídicas**, estructuras que miden de 10 a 200 nm y son muy dinámicos (Selvaraj *et al.* 2006, Pinaud *et al.* 2009). Son plataformas pequeñas dentro de la membrana, compuestas de glicoesfingolípidos, gangliósidos y colesterol en la cara exoplásmica, asociados con fosfolípidos y colesterol en la cara citoplásmica de la bicapa lipídica (Fig.4) (Simons y Ehehalt 2002, Gylfason *et al.* 2010). Además, pueden contener proteínas específicas que se mantienen unidas al microdominio, lo que les confiere menos fluidez que las que están en el resto de la membrana celular. Los lípidos que las constituyen contribuyen les confieren dos propiedades bioquímicas características: insolubilidad a 4°C en el detergente Tritón X-100 y una densidad de flotación baja después de centrifugarlos en un gradiente de sacarosa; estas propiedades pueden utilizarse para aislarlos y purificarlos (Sleight *et al.* 2005).

Actualmente, existe el interés de investigar los cambios del flujo de colesterol en la membrana plasmática. Esto se debe a que en varios tipos celulares el colesterol está asociado con el movimiento de los dominios específicos de la membrana. Los cambios en el contenido de colesterol están relacionados con los cambios entre las interacciones proteína-proteína de las proteínas integrales de la membrana. El contenido de colesterol es el factor principal que influye en la formación de los microdominios membranales o balsas lipídicas (Hoessli *et al.* 2000). Se ha demostrado que la pérdida de colesterol estabiliza la estructura de las balsas lipídicas provocando cambios en su tamaño, distribución y contenido de glicoproteínas (Kabouridis *et al.* 2000, Baron *et al.* 2010, Domingues *et al.* 2010). Otra propiedad de las balsas lipídicas

es su habilidad para reclutar proteínas específicas, tanto transmembranales como unidas a la membrana, ancladas a glicofosfolípidos o proteínas modificadas con cadenas acil-lipídicas (Anderson 1998) o combinaciones de las anteriores. Hay evidencias de que, en células somáticas, las balsas lipídicas sirven como centros de tráfico de colesterol y para las rutas de transducción de señales basadas en la membrana plasmática (Pike 2003, Gibson *et al.* 2009). Las proteínas de señalización de las balsas lipídicas son específicas del tipo de célula y del estado fisiológico celular e incluyen proteínas receptoras y no receptoras con actividad de tirosina cinasa, proteínas G, fosfolípidos de inositol, proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), óxido nítrico sintasa y otras (Brown y London 1998a, Kabouridis *et al.* 2000, Pinaud *et al.* 2009).

Se han descrito dos tipos de balsas lipídicas:

Balsas planas: Alineadas en el plano de la membrana y su caracterización ha sido muy difícil debido a su tamaño pequeño (10-200 nm) (Pike 2006).

Caveolas: Se forma por polimerización de caveolinas (Fig.4c) o de proteínas integrales de membrana relacionadas con las caveolinas (ej.flotilina), que se unen fuertemente al colesterol (Murata *et al.* 1995, Vassilieva *et al.* 2009). La caveolina forma homo y hetero-oligómeros de alto peso molecular entre 22 y 600 kDa (Monier *et al.* 1995, Sargiacomo *et al.* 1995, Scheiffele *et al.* 1998). Aunque las funciones generales de las caveolas todavía no se definen completamente, se cree que están implicadas en el transporte de colesterol (Roy *et al.* 1999, Simons y Ikonen 2000, Jaureguiberry *et al.* 2010), el tráfico de moléculas en la membrana (Nelson y Rodriguez-Boulan 2004, Schroeder *et al.* 2010), y la transducción de señales (Ostrom *et al.* 2004). Las caveolinas son una familia de proteínas integrales de membrana de

20-24 kDa (Stan 2005). Funcionan como una molécula que ordena complejos proteicos de señalización en la membrana (Simons y Ikonen 1997, Sonnino *et al.* 2008) y son la principal proteína que conforma a las caveolas. Existen 3 isoformas, de las cuales caveolina-1 y 2 se expresan en la mayoría de los tipos celulares. La caveolina-1 es esencial para la formación de caveolas y se caracterizó como el primer marcador molecular de estos dominios (Stan 2005, Sonnino *et al.* 2008).

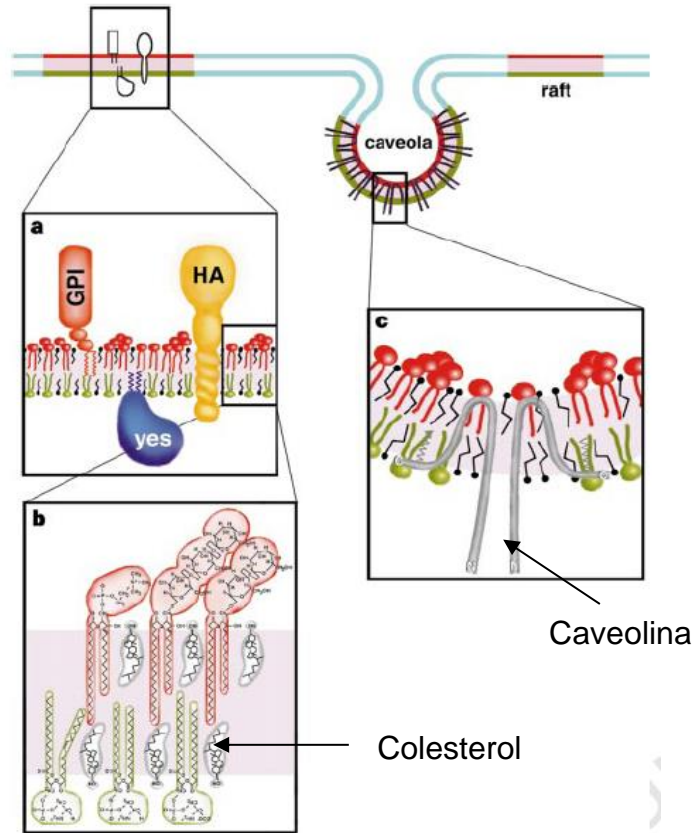


Figura 4. Modelo de organización de balsas lipídicas en la membrana plasmática. Las balsas lipídicas (rojo-verde) se segregan de otras regiones (azules) de la bicapa en las que la fosfatidilcolina insaturada predomina en la cara exoplásmica, y tiene una organización diferente de colesterol intercalado de la que hay en los rafts. **a.** Las balsas lipídicas contienen proteínas pegadas a la cara exoplásmica de la bicapa gracias a GPI, proteínas unidas a la cara citoplásmica por colas de acilo (se muestra la proteína Yes de la familia de cinasas Src), o proteínas asociadas a través de su dominio transmembranal como las proteínas virales neuraminidasa y hemaglutinina (asociadas con DIG, (Detergent-Insoluble Glycolipids) en las membranas virales). **b.** La bicapa lipídica en los rafts es asimétrica con esfingomielina (rojo) y glicoesfingolípidos (rojo) enriquecidos en la cara exoplásmica y glicerolípidos (fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina) en la cara citoplásmica (verde). El colesterol (gris), se presenta en ambas caras y llena el espacio bajo los grupos de la cabeza de los esfingolípidos o entre la cadena de ácidos grasos en la zona cercana. **c.** Las caveolas están formadas por moléculas de caveolina ensambladas que hacen una invaginación en forma de

horquilla en la membrana. Las interacciones con las balsas lipídicas pueden estar mediadas por la unión de colesterol y la acilación de las cisteínas del extremo C-terminal (Simons y Ikonen 1997).

Antecedentes

Las balsas lipídicas reciben varias denominaciones debido a sus características particulares. Se les llama DRM (Brown y London 1998b, Schuck *et al.* 2003, Nixon y Aitken 2009), membranas enriquecidas en colesterol (CEM: cholesterol-enriched membranes), membranas enriquecidas en glicosfingolípidos (GEM: glycosphingolipid enriched membranes) (Rodgers y Rose 1996); membranas enriquecidas en glicosfingolípidos insolubles en detergente (DIG: detergent-insoluble, glycosphingolipid-enriched membranes) (Schroeder *et al.* 1998), y plataformas enriquecidas en gangliósidos como el gangliósido M1 (GM1) (Selvaraj *et al.* 2006).

Se ha visto que la membrana del espermatozoide tiene microdominios formados por esteroides, esfingolípidos, glicolípidos y proteínas ancladas a GPI, es decir, se han identificado rafts o balsas lipídicas (Harder *et al.* 1998).

Estudios de balsas lipídicas en espermatozoides

Existen enfoques opuestos en relación con el comportamiento de las balsas lipídicas durante la capacitación en espermatozoides de mamífero. En concordancia con la afirmación de que el colesterol, un componente integral de los rafts, se libera tempranamente desde la membrana del espermatozoide durante la capacitación, hay estudios que apuntan a que las balsas lipídicas se disocian como siguiente paso después de la capacitación en espermatozoides de ratón (Sleight *et al.* 2005), mientras que otras investigaciones sugieren un incremento de balsas lipídicas después de este

evento; estos microdominios lipídicos al agruparse podrían proporcionar un mecanismo para que los complejos de señalización puedan dar inicio, tales como la fusión de membranas y exocitosis de vesículas acrosomales, además de que se encuentran enriquecidos en proteínas que participan en la unión primaria de la ZP y en la RA (Shadan *et al.* 2004, Boerke *et al.* 2008, Nixon y Aitken 2009).

Experimentos con marcadores de fluidez de membrana como la merocianina y análogos fluorescentes de lípidos, demostraron que, durante la capacitación, la superficie del espermatozoide sufre un desordenamiento de las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos con un aumento en la fluidez lateral y distorsión de la asimetría fosfolipídica (Gadella y Harrison 2000, Cross 2003). Se propuso entonces la hipótesis de una "translocación" parcial de los aminofosfolípidos en la zona apical de la membrana en la cabeza del espermatozoide (de Vries *et al.* 2003). Cuando se generó un ratón nulo para la translocasa de fosfolípidos específica de los espermatozoides, se observó que, aunque las células tenían una movilidad y morfología semejante a las del tipo silvestre, no se podían unir ni atravesar la ZP, es decir, no podían realizar la RA (Wang *et al.* 2004); esto demostró la importancia del reacomodo de los aminofosfolípidos durante la capacitación y puso en evidencia la existencia de un transportador específico expresado en el espermatozoide.

Otro aspecto importante es que, aunque el colesterol interactúa con proteínas típicas de las balsas lipídicas, como la caveolina y la flotilina, la remoción del colesterol membranal durante la capacitación corresponde a una fracción no asociada a los microdominios de membrana (van Gestel *et al.* 2005). La remoción del colesterol contribuye a aumentar la fluidez de la membrana y permite la agregación de las balsas

lipídicas en la zona apical, que participa posteriormente en el reconocimiento de la ZP (van Gestel *et al.* 2005).

Se ha demostrado que niveles sustanciales de colesterol (50%) permanecen en el espermatozoide después de la capacitación ya que es liberado durante la capacitación desde los dominios fluidos no asociados a balsas lipídicas (Boerke *et al.* 2008). Una hipótesis muy interesante es que esta pérdida de colesterol y recomposición de la estructura de las balsas lipídicas también lleva a un cambio en la composición o en la distribución de las proteínas asociadas a ellos y que éste es el inicio de la ruta de señalización que lleva a la capacitación (Sleight *et al.* 2005).

Las syntaxinas son proteínas de balsas lipídicas que participan en la capacitación y su patrón de distribución lateral es similar al de las flotilinas. Antes de la capacitación y de la RA, las syntaxinas se encuentran dispersas en la región apical de la membrana (APM). Después de la capacitación *in vitro*, las syntaxinas se concentran en la cresta de la APM y se recuperan en la fracción DRM colocalizadas junto con las SNAREs y las caveolinas (Sousa *et al.* 2006).

Además de las SNAREs y de proteínas de membrana asociadas a vesículas (VAMPS), es necesario un grupo de proteínas de andamiaje asociadas a las balsas lipídicas, conocidas como MUPP1, para que se pueda llevar a cabo la fusión de membranas en la RA (Ackermann *et al.* 2008).

Un análisis realizado en espermatozoides de ratón permitió determinar que el flujo de colesterol durante la capacitación modifica la localización de proteínas residentes de balsas lipídicas y sugirieron que podrían desempeñar un papel en la regularización de la señalización (Sleight *et al.* 2005). Estudios realizados con técnicas de inmunolocalización *in situ*, inmunohistoquímica y Western blot, permitieron determinar

que proteínas de balsas lipídicas, algunas asociadas con GM1 y con el gangliósido M3 (GM3) tales como IZUMO, caveolina 2 y flotilina 2, inicialmente localizadas en la porción anterior de la cabeza del espermatozoide, cambian su posición después de la RA (Miranda *et al.* 2009). La caveolina 2 no pudo detectarse después de la RA, por lo que se piensa que se localiza en la membrana que cubre al acrosoma y en consecuencia se pierde durante la exocitosis, ya que múltiples puntos de fusión de la membrana acrosomal externa y de la plasmática se fenestran y los componentes localizados originalmente en la porción apical del espermatozoide se pierden (Miranda *et al.* 2009).

Interacción espermatozoide-óvulo

Una de las etapas decisivas en la fertilización es el reconocimiento y la interacción entre moléculas complementarias presentes en el espermatozoide y la ZP (Wassarman 1992). La unión inicial entre los gametos implica el reconocimiento de proteínas glicosiladas presentes tanto en la ZP como en la superficie del espermatozoide. La especificidad de especie podría estar relacionada con la modificación de los carbohidratos en la ZP del ovocito y de la unión primaria (con ZP3) y secundaria (con ZP2), además de que la porción de glicanos de esas glicoproteínas es el ligando para enzimas de unión a carbohidratos sobre la membrana espermática (Miller y Ax 1990, Tulsiani *et al.* 1997).

En algunas especies de mamíferos diversas glicoproteínas de la superficie del espermatozoide actúan como moléculas receptoras. Estudios en ratón han permitido la identificación de diversos receptores en el gameto masculino (Loeser y Tulsiani 1999).

Los residuos de N-acetilglucosamina en la glicoproteína ZP3 de porcino juegan un papel crítico en las interacciones ZP-espermatozoide; en bovino y porcino, los residuos de ácido siálico participan en la acidificación de glicoproteínas de la ZP durante la maduración de los ovocitos, lo cual facilita su unión con el espermatozoide (Lay *et al.* 2011a, Lay *et al.* 2011b).

Investigadores del laboratorio de Andrología de la UAM-I, han realizado estudios sobre la membrana del espermatozoide de mamíferos. Algunos de ellos se refieren al reconocimiento de residuos de carbohidratos de las glicoproteínas de la membrana del espermatozoide mediante el uso de lectinas. Se reportó la participación de los residuos de manosa en la unión del espermatozoide a la ZP en donde se detectó que, en espermatozoides de humano, aumentan los residuos de manosa al inducir la RA, lo que sugiere que su expresión se relaciona con la capacidad fertilizante del espermatozoide (Fierro *et al.* 1996, Fierro *et al.* 1998).

En espermatozoides de cerdo se demostró la presencia de residuos de manosa, N-acetilglucosamina (NAc-Glu) y/o ácido siálico (AcSial) en la membrana de los espermatozoides y que la distribución de estas moléculas cambia durante la capacitación y la RA; en espermatozoides recién eyaculados los residuos de NAc-Glu y/o AcSial se encontraron en todo el espermatozoide, en los capacitados sólo en la cabeza y en los reaccionados desaparecen. Los residuos de manosa se localizaron en la cabeza y pieza intermediaria de espermatozoides recién eyaculados, en los capacitados en todo el acrosoma y en los reaccionados solamente en el borde de la cabeza (Jiménez *et al.* 2003). Otro hallazgo importante fue que en cerdos subfértiles los residuos de GlcNac y/o AcSial así como los de manosa se pierden después de la capacitación y la RA (Jiménez *et al.* 2003).

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

Se hicieron estudios proteómicos para identificar los residuos de carbohidratos unidos a las proteínas presentes en los microdominios lipídicos en la membrana de espermatozoides de cerdo sin capacitar y después de la capacitación. Se encontró que algunas proteínas asociadas a microdominios lipídicos están glicosiladas con residuos de NAc-Glu y/o AcSial (López-Salguero *et al.* 2020), los cuales se han relacionado con la movilidad espermática y protección del reconocimiento inmune durante la capacitación (Lassalle y Testart 1994).

Criopreservación de espermatozoides

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

La criopreservación provoca estrés osmótico, químico y mecánico, daño directo por cristales de hielo y daño secundario causado por el incremento progresivo en la

concentración de solutos (Pesch y Bergmann 2006). Se sabe que el proceso de criopreservación y descongelación de espermatozoides induce una reducción de su viabilidad (Martin *et al.* 2007) y aumenta la fragmentación del ADN (Yildiz *et al.* 2007, Yildiz *et al.* 2008). Después de la criopreservación de espermatozoides, se produce un cambio de los fosfolípidos en la membrana plasmática que resulta en la externalización de fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (Watson 2000), lo cual se relaciona con la pérdida de la asimetría de la membrana, tal como ocurre durante la capacitación (Gadella *et al.* 2008).

La respuesta al proceso de congelación y descongelación varía entre las especies debido a las diferencias en la estructura y fisiología espermática (Waterhouse *et al.* 2006). Las variantes en cuanto a las características bioquímicas de la membrana del espermatozoide, específicamente del contenido relativo y la proporción de los fosfolípidos y del colesterol de membrana, se han considerado como los factores principales que explican las diferencias inter-específicas en la sensibilidad al daño por congelación (Darin-Bennett y White 1977, Waterhouse *et al.* 2006, Yamauchi *et al.* 2009).

Uno de los factores principales que ha dificultado el uso comercial de la inseminación artificial con semen congelado-descongelado en la industria porcina, es la existencia de grandes variaciones interindividuales, principalmente en la composición de lípidos de la membrana plasmática, por ejemplo la cantidad relativa de colesterol y ácidos grasos poliinsaturados, que se correlaciona con la susceptibilidad al daño por congelación (Holt *et al.* 2005). El almacenamiento de los espermatozoides de cerdo a bajas temperaturas está asociado a la reducción de la movilidad y la fertilidad, y puede deberse a una desorganización de los lípidos de la membrana (Guthrie y Welch 2005),

los cuales son particularmente vulnerables a las especies reactivas de oxígeno promotoras de estrés oxidante (Wathes *et al.* 2007) y a otros factores como el óxido nítrico, el cual es necesario para la movilidad (Lewis *et al.* 1996, Donnelly *et al.* 1997). Este daño podría estar reflejado también en la composición, estructura y/o funcionalidad de las balsas lipídicas en espermatozoides de cerdo ya que podrían presentar características diferentes con otros microdominios membranales de otras especies en las que dichas células no se afectan con la criopreservación. Las balsas lipídicas son importantes en la fisiología del espermatozoide, pues se ha visto que están relacionadas con los cambios que ocurren durante la capacitación (Shadan *et al.* 2004, Boerke *et al.* 2008, Nixon y Aitken 2009). El espermatozoide de cerdo se escogió porque se considera un modelo adecuado de estudio para enfermedades en humanos, además de su accesibilidad y fácil manejo (Petters 1994).

La congelación de semen de cerdo debiera ser el método ideal de almacenamiento, porque permitiría mantener por un tiempo ilimitado un banco de esperma en comparación con los extensores, usados a una temperatura de 15-18°C, que sólo son capaces de mantenerlo en buen estado por algunos días (Conejo-Nava *et al.* 2003).

Justificación

La capacitación es un proceso complejo, ocurre en el tracto reproductor de la hembra, se inicia con la pérdida de colesterol que vuelve a la membrana más fluida. La activación de la entrada de bicarbonato y calcio activan a la adenilato ciclasa soluble, que a su vez activa a la proteína cinasa A, que fosforila proteínas en residuos de tirosina, lo que permite que la membrana se hiperpolarice y se hiperactive. También ocurre remodelación de la membrana y del citoesqueleto que se refleja en el movimiento de las balsas lipídicas, glicoproteínas y glicolípidos que preparan al espermatozoide para la RA y el reconocimiento espermatozoide-ovocito.

La mayoría de las proteínas del espermatozoide ya se conocen, pero no se sabe si están glicosiladas ni si están asociadas a balsas lipídicas, es por ello el interés en este tema.

Los espermatozoides de algunas especies se han logrado criopreservar con buenos resultados, pero en el cerdo no se han logrado buenos resultados en este proceso, ya sea para utilizar las muestras en reproducción asistida o en investigación. Nos interesa conocer si se dañan las balsas lipídicas durante este proceso, por ello se integró a este estudio.

Preguntas de Investigación

¿Cuáles son las glicoproteínas de balsas lipídicas de la membrana de espermatozoides de cerdo que experimentan cambios después de la capacitación y de la criopreservación?

¿Cómo se modifica el colesterol en la membrana de espermatozoides capacitados y criopreservados?

Hipótesis

Si las balsas lipídicas son la unidad básica de la fisiología membranar celular, se encontrará un incremento de las glicoproteínas asociadas a balsas lipídicas de la membrana plasmática de espermatozoides capacitados y una disminución, en los criopreservados.

El colesterol asociado a balsas lipídicas se encontrará mayoritariamente en los espermatozoides capacitados y disminuirá en los criopreservados.

Objetivo General

Determinar los cambios que presentan las glicoproteínas y el colesterol asociados a balsas lipídicas de la membrana de espermatozoides de cerdo capacitados y criopreservados.

Objetivos Específicos

1. Identificar las glicoproteínas asociadas a balsas lipídicas que se modifican durante la capacitación y criopreservación.
2. Determinar la distribución de las balsas lipídicas y concentración de colesterol en espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados.

Métodos

Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St Louis, Mo) a menos que se indique lo contrario.

Obtención y análisis de la muestra

Las muestras de semen de cerdo fueron obtenidas de la fracción rica de machos sanos, maduros, reproductores probados provenientes de una granja comercial, de las razas Landrace, Pietrain, Landrace-Pietrain y Duroc-Pietrain. Los eyaculados fueron resuspendidos en un diluyente comercial (Sancho *et al.* 2007) y transportados al laboratorio en un termo a la temperatura a la que se recibió para evitar choque térmico. En el laboratorio se analizó la calidad de las muestras, se determinó la concentración de espermatozoides, movilidad y número de formas anormales con el fin de utilizar solamente muestras normales de acuerdo con criterios ya establecidos (Garner y Hafez 1993). Por observación directa al microscopio óptico (ZEISS, Germany) a 400 aumentos, se estimó el porcentaje de espermatozoides móviles. La concentración se determinó haciendo una dilución del semen, colocando una alícuota en una cámara de Neubauer. Por medio de la tinción de Eosina/Nigrosina se evaluó la viabilidad; se consideraron como espermatozoides vivos aquéllos que no presentaron tinción y muertos los que capturaron la eosina dando una coloración de rosa a rojo. Con los mismos frotis se determinó el porcentaje total de espermatozoides con anomalías morfológicas. Se analizaron al menos 200 células al microscopio (Jiménez *et al.* 2002). Se procesaron solamente las muestras de semen clasificadas como normospermicas.

Eliminación del líquido seminal

A un mL de semen se le adicionó un mL de solución salina de fosfatos (PBS) pH 7.4, se centrifugó a 600 Xg durante 10 minutos. La muestra se lavó dos veces para eliminar el líquido seminal. Se procesó una muestra por experimento proveniente de un solo cerdo.

Capacitación *in vitro*

Una vez lavados los espermatozoides, se incubaron 5×10^6 espermatozoides/mL y se colocaron en un frasco de cultivo (Nunc, Roskilde Denmark) conteniendo 500 mL de medio de capacitación TALP-HEPES (Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato) (100mM de NaCl, 3.1mM KCl, 2.1mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25mM NaHCO_3 , 0.4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM HEPES, 21.6 mM lactato de sodio) suplementado con 6 mg/mL BSA fracción V y 1 mM piruvato de sodio, pH 7.4 (Bavister *et al.* 1983). Se incubaron por 4 horas a 39° C, en una atmósfera con humedad y 5% (v/v) de CO_2 (Jiménez *et al.* 2002, Jiménez *et al.* 2006).

Para determinar la eficiencia del proceso de capacitación, se tomó una alícuota y se evaluó por medio de la tinción de clorotetraciclina para lo cual se analizaron 200 células y se clasificaron de acuerdo con los patrones de tinción ya establecidos (Fraser y Herold 1990).

Espermatozoides no capacitados: con fluorescencia uniforme en la cabeza y el acrosoma intacto.

Espermatozoides capacitados: con fluorescencia concentrada en la región acrosomal, una banda sin fluorescencia en la región postacrosomal y presencia de acrosoma intacto.

Espermatozoides con RA: sin fluorescencia en la cabeza, excepto una banda fluorescente en la región ecuatorial.

Las muestras se analizaron con un microscopio de epifluorescencia, de 495 nm (ZEISS, Alemania) a un aumento de 400X. Sólo las muestras cuyo valor de espermatozoides capacitados era igual o mayor a 80% se usaron para purificar las balsas lipídicas.

Criopreservación de espermatozoides

Los espermatozoides de la fracción rica diluida se enfriaron lentamente a 17°C durante 240 minutos y después de una centrifugación a 2400 x g durante 5 minutos (Carvajal *et al.* 2004). Los espermatozoides se criopreservaron usando la técnica de pajillas previamente descrita (Westendorf *et al.* 1975) con algunas modificaciones. Los botones fueron resuspendidos en Vitasem LD (Magapor®, Zaragoza, España) compuesto de glucosa, bicarbonato de sodio, EDTA, estabilizadores de membrana y antibióticos; se utilizó DMSO al 7% como crioprotector, el cual ya se ha utilizado previamente en cerdo (Gilmore *et al.* 1998, Kim *et al.* 2008). La concentración fue de 1×10^9 células/mL. Se enfriaron utilizando un baño de agua con hielo hasta llegar a 5°C en 90 minutos (Breininger *et al.* 2010), se equilibraron a 5°C durante 10 minutos y se continuó el descenso de temperatura hasta 2°C equilibrando por 5 minutos. Los espermatozoides resuspendidos y enfriados se colocaron en pajillas de PVC de 0.5 mL (IMV® Francia). Se realizó el llenado y sellado de las pajillas y se congelaron por 10 minutos en vapores de nitrógeno líquido, pasado ese tiempo las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido, y se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido.

Las pajillas permanecieron en el tanque de nitrógeno líquido al menos 2 semanas antes de descongelar.

La descongelación se realizó en un baño maría a 37°C por 20 segundos (Hernandez *et al.* 2007). Los espermatozoides descongelados provenientes de las pajillas fueron resuspendidos en el mismo diluyente Vitasem LD (Magapor®, Zaragoza, España) 1:1 (v/v) a 37°C y se analizó la movilidad y viabilidad.

Aislamiento de balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo

Se tomó una alícuota de los espermatozoides de cerdo capacitados (C), no capacitados (NC) o criopreservados (C), y se ajustó a 2×10^9 células/mL en 1 mL de medio TALP, mezclado con un volumen igual de medio MBS (50 mM de MES, pH 6.5, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Tritón-X100, 2 mM Na_3VO_4), y 4 mM del inhibidor de serin proteasas AEBSF). Se incubaron por 20 minutos a 4°C. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a $900 \times g$ a 4 ° C. El sobrenadante (1.5 mL) se mezcló con un volumen igual de sacarosa al 85% (p/v) en MBS modificado (25 mM MES, pH 6,5, 150 mM NaCl, 1 mM Na_3VO_4 y 2 mM AEBSF). La mezcla se cubrió con 6 mL de sacarosa al 35% (p/v) seguido de 3 mL de sacarosa al 5% (p/v) en MBS modificado y se centrifugó a $200 \times 10^3 \times g$ durante 18 h (4 °C) en un Rotor SW41Ti (Beckman, Palo Alto CA, EE. UU.); se colectaron 12 fracciones de 1 mL de la parte superior del gradiente (Shadan *et al.* 2004).

El contenido de proteína de cada fracción se evaluó mediante el método micro Lowry modificado por Peterson (Peterson 1977).

Marcadores de balsas lipídicas

Se realizó el método de dot blot con el marcador de balsas lipídicas GM1. Se depositaron 2 μL de cada fracción en membranas de nitrocelulosa y se secaron al aire; las membranas se bloquearon con leche en polvo sin ácidos grasos al 5% (p/v) en solución salina amortiguadora Tris-Tween 20 (TBST) conteniendo 10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl y Tween 20 al 0.1% (p/v). Se bloquearon durante 1 hora y se incubaron con Subunidad B de enterotoxina del cólera (CTxB) conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 h (Nixon et al 2011). Para visualizar GM1, utilizamos un ensayo de quimioluminiscencia (Immobilon TM Western, Millipore Corporation, Billerica, MA 01821, EE. UU.) y detectamos la señal con un sistema de imágenes (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System, EE. UU.).

Con el fin de detectar los marcadores de balsas lipídicas caveolina y flotilina, se realizaron Western blots tomando cantidades iguales de proteína (20 μg). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y las proteínas se sometieron a electrotransferencia en una membrana de nitrocelulosa (Amersham Protran Supported 0.45 μm NC, GE Healthcare) durante 2 h a 200 mA y se tiñeron con rojo Ponceau para visualizar las bandas, el cual se retiró con TBST. Para la incubación con los anticuerpos, las membranas se saturaron primero durante 45 min con leche en polvo sin ácidos grasos al 5% (p/v) en solución salina amortiguadora TBST (15 mM Tris/HCl, pH 8, 140 mM NaCl y 0.05% (v/v) Tween 20). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: policlonal de conejo anti-flotilina-1 (sc-25,506, Santa Cruz Biotechnology, 1:2000) y monoclonal de ratón anticaveolina-1 (sc-70,516, Santa Cruz Biotechnology, 1:2000). Las membranas se incubaron con los anticuerpos

durante toda la noche a 4 °C, se lavaron 3 veces con TBST durante 10 min y se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado durante una hora (anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a HRP, o anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a HRP, GE Healthcare, 1: 10,000). Finalmente, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno y la detección se realizó por quimioluminiscencia (ECL Prime, GE Healthcare).

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y medio reductor (SDS-PAGE)

Las proteínas fueron cuantificadas utilizando *Micro-BCA Protein Assay kit* (Thermo Scientific), en el cual la absorbancia se leyó a 595 nm en un lector de microplacas. Para el análisis electroforético de proteínas se utilizaron veinte microgramos de muestra para cada condición (Laemmli 1970): proteína total de espermatozoides no capacitados (PTNC), proteína total de espermatozoides capacitados (PTC), proteínas de balsa (PR) de NC (PRNC), PR de C (PRC) y PR de criopreservados (PRCr).

Primeramente, se precipitó la proteína con ácido tricloroacético a una concentración final del 10% (a 4°C) y se lavó con acetona al 100% (a 4°C). Las proteínas se prepararon calentando las muestras por 4 min a 100°C (2 veces) en el amortiguador de muestra de Laemmli, seguido de centrifugación a 3000 x g por 30 segundos. Las proteínas reducidas se separaron en una dimensión, en geles al 12.5% de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS). Se corrieron dos geles en paralelo, uno fue visualizado con tinción de nitrato de plata o 0.1% de Azul de Coomassie R-250 (Morrissey 1981), y el otro fue transferido a membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia (Immobilon, Millipore, Bedford, MA) para el Western blot. Se

procesaron las muestras necesarias para obtener resultados repetitivos, con al menos cinco geles de buena calidad, de cada condición de estudio.

Identificación de los residuos de carbohidratos

Para determinar los residuos de carbohidratos asociados a proteínas de balsas lipídicas, se realizó Western blot empleando un kit diferencial de lectinas conjugadas con digoxigenina (DIG) (Glycan Differentiation Kit, Roche™, Mannheim, Germany) (Vercoutter-Edouart *et al.* 2008).

Las lectinas utilizadas fueron:

- a) Aglutinina de cacahuete (PNA, 100 µg/mL, dilución 1:100), que reconoce el disacárido Gal (β 1-3) N-acetilgalactosamina (GalNAc) del núcleo de O-glicanos.
- b) Aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA, 0.25 µg/mL, dilución 1:4,000) que reconoce ácido siálico (NeuAc) unido a galactosa (Gal) vía α 2-6, y NeuAc unido a GalNAc vía α 2-6, que son principalmente O-glicanos.
- c) Aglutinina *Galanthus nivalis* (GNA, 0.25 µg/mL, dilución 1:4,000) reconoce manosa (Man) terminal unido a Man vía α 1-3 o α 1-6, de N-glicanos.
- d) Aglutinina *Datura stramonium* (DSA, 0.25 µg/mL, dilución 1:4,000) reconoce Gal β 1-4 N-acetilglucosamina (GlcNAc), en N-glicanos de tipo complejo e híbrido.

Como controles positivos y negativos se usaron 5 µg de fetuina (Ft), asialofetuina (Aft), transferrina (Tf) y carboxypeptidasa Y (CPY), provenientes del mismo kit (Roche™, Mannheim, Germany).

Se bloqueó con polivinilpirrolidona (PVP) K30 al 2% (*p/v*) en TBST (15 mM Tris/KCl pH 8.0, 140 mM NaCl), 0.1% (*v/v*) Tween 20) y se incubó toda la noche a 4 °C con las lectinas. Las membranas se lavaron tres veces con TBST y se incubó con anticuerpo

policlonal anti-digoxigenina conjugado a HRP (30 mU/mL) (Roche Life Sciences) durante dos horas a una dilución 1:5,000 en TBST. Posteriormente se lavaron 5 veces las membranas con TBST y se procedió a revelar mediante quimioluminiscencia (Immobilon™ Western, Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 U.S.A.) en films fotográficos (Kodak Biomax Film) en un cuarto oscuro.

Las mediciones de densitometría se realizaron utilizando el software ImageJ (NCBI, EE.UU.) (Schneider et al, 2012). La densidad óptica (DO) se determinó y se normalizó frente a la DO de todo el carril de proteínas de PRC o PRNC teñidas con rojo de Ponceau (Romero-Calvo *et al.* 2010). Estos resultados son representativos de cinco réplicas independientes.

Determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas obtenidas mediante espectrometría de masas en tándem

Las PRNC y PRC se separaron mediante SDS-PAGE en geles al 12.5%; se utilizaron 150 µg de cada condición de muestra. Las bandas de proteína que dieron señal con las 4 lectinas se cortaron, destiñeron, redujeron y alquilaron antes de la digestión con tripsina. Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas de trampa de iones (LCQ Deca XP +, Thermo electron, San José, CA) equipado con una fuente de iones de nano electropulverización acoplada a un aparato de cromatografía líquida de alta presión de nanoflujo (LC Packings Dionex, Amsterdam, Países Bajos) (Gurcel *et al.* 2008).

La búsqueda en las bases de datos y la identificaron las proteínas se realizó para los espectros de masas en tándem (MS/MS) utilizando el software Mascot (<http://www.matrixscience.com>) y los siguientes parámetros: “otro mamífero” como

taxonomía, tolerancia de 60 ppm para la masa de iones parentales y 60 uma para los iones de fragmentación, se permitió una escisión perdida y carbamidometilación de cisteína y oxidación de metionina como posibles modificaciones. Solo se tomaron en consideración las proteínas candidatas con una puntuación Mascot significativa (umbral de significación para la candidata <0.05 utilizando el método de puntuación MudPIT). Estos experimentos se realizaron en el en el laboratorio de Glicómica y Proteómica Funcionales de la Universidad de Lille, Francia.

Distribución de balsas lipídicas de la membrana plasmática de los espermatozoides

Se realizó un análisis con fluorescencia para determinar la distribución de balsas lipídicas de espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados, mediante el uso de CTX-FITC, debido a que se une con una alta afinidad al gangliósido GM1, el cual es un marcador de balsas lipídicas. Las muestras se incubaron con CTX-FITC (70 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después, los espermatozoides se fijaron con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se realizaron 2 lavados con PBS. En un portaobjetos se mezclaron 10 μL de la muestra y 5 μL de DABCO (1,4-diaza,2,2,2-biciclo-octano) para atenuar el desvanecimiento de la fluorescencia.

Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia Axiostar plus, ZEISS®, a una longitud de onda de 495 nm excitación y 525 nm emisión, a 400 aumentos. Se contaron 200 espermatozoides de cada condición y se analizaron los diferentes patrones de fluorescencia (Colas 2013).

Cuantificación de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides

Se utilizó el reactivo Amplex® Red (10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxacina) para detectar la actividad de peroxidasa o de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este reactivo, en combinación con la peroxidasa de rábano (HRP), se usa para detectar el H_2O_2 liberado de las células o generado en reactivos acoplados con enzimas. Se puede utilizar como ensayo ultrasensible de la actividad peroxidasa cuando hay un exceso de H_2O_2 . En presencia de la peroxidasa, el reactivo Amplex® Red reacciona con H_2O_2 en una estequiometría 1:1 y se crea un producto de oxidación rojo fluorescente llamado resorufina, el cual tiene unos niveles de excitación y emisión de 571 nm y 585 nm, respectivamente. Dado que el coeficiente de extinción es alto ($58.000 \pm 5.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), se puede realizar el ensayo mediante fluorimetría o espectrofotometría. Esta reacción se ha utilizado para detectar un mínimo de 10 picomoles de H_2O_2 en un volumen de 100 μl o en 1×10^{-5} U/ml de HRP. La preparación de soluciones y metodología se realizaron de acuerdo con las especificaciones del fabricante, para lo cual se realizó una curva estándar de colesterol con concentraciones crecientes (0, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g/ml}$, $n=3$).

Las muestras se diluyeron con el amortiguador (0.5 M fosfato de potasio pH 7.4, 0.25M NaCl, 25 mM ácido clorhídrico, 0.5% Tritón X-100) manteniendo la concentración a 5×10^6 espermatozoides/mL. Se utilizó una dilución 1:100.

Se colocaron 50 μL de las muestras de espermatozoides (sobrenadante), en una microplaca de 96 pozos, se utilizó H_2O_2 10 μM como control positivo y amortiguador como negativo. La curva estándar se realizó por triplicado. En cada pozo se colocaron

50 μL de Amplex Red (2 U/mL HRP, 2 U/mL colesterol oxidasa, y 0.2 U/mL colesterol esterasa, diluido en amortiguador) 300 μM . Las muestras se incubaron por 1h a 37°C en oscuridad. La fluorescencia se determinó mediante un espectrofluorímetro DTX 880 multimodal, a una longitud de onda de 530-560 nm excitación y 590 nm de emisión. A partir de los valores de fluorescencia obtenida, se calculó la concentración de colesterol en $\mu\text{g/mL}$, a partir de la curva estándar.

Análisis estadístico

Medición de colesterol: se calcularon las medias y se obtuvo su desviación estándar. Para comparar las medias de los valores de cuantificación de colesterol, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Para los patrones de fluorescencia se utilizó la prueba "U" de Mann-Whitney, aplicada a dos muestras independientes.

Los datos obtenidos con las lectinas se analizaron con la prueba t de Student utilizando el software NCSS 2007, y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

Resultados

Muestras de semen y capacitación

En este trabajo se analizaron los espermatozoides de 10 cerdos clínicamente sanos. Se realizó la evaluación básica de las muestras y se trabajó con las que tuvieron una viabilidad mayor del 90%, movilidad mayor del 80%, concentración de al menos 100×10^6 , y porcentaje de anomalías morfológicas menor a 10 (Fig. 5). Se realizó la técnica de capacitación de espermatozoides y se obtuvo un porcentaje adecuado de capacitación, el cual fue del $84.5\% \pm 2.04$.

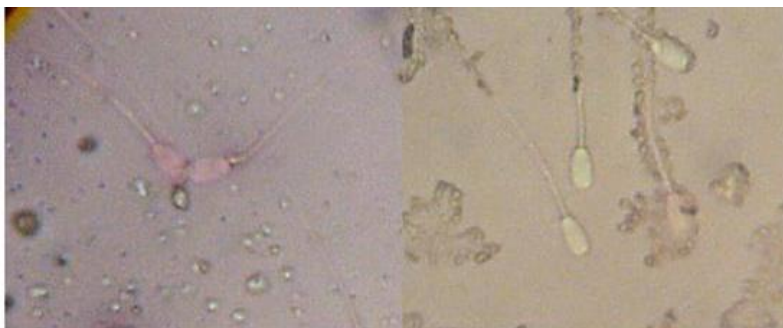


Figura 5. Espermatozoides de cerdo teñidos con eosina-nigrosina. Los espermatozoides vivos no presentan tinción, por el contrario, los que están muertos se encuentran teñidos de color rojo. 1000 aumentos, microscopio óptico Carl Zeiss.

Criopreservación de espermatozoides

Después de realizar el proceso de criopreservación, se procedió a descongelar las muestras de semen de cerdo, siguiendo el protocolo descrito en el presente trabajo. Se obtuvo después de la descongelación una viabilidad del 40% y movilidad del 20%.

Con respecto a los cambios que observamos en las glicoproteínas presentes en balsas lipídicas, tenemos lo siguiente.

En los ensayos de proteínas, cuando se evaluaron las tres condiciones, se pudo observar que el patrón electroforético de las bandas de proteínas totales se mantuvo sin cambios importantes. Sin embargo, en cuanto a las proteínas de balsas lipídicas, el cambio fue más evidente con PRC, ya que se aprecia un aumento de intensidad para las bandas de 64, 45, 36, 34 y 26 kDa, comparadas con las de PRNC y PRCr, en esta última condición se observó pérdida de algunas bandas, como es el caso de las de 64 y 45 kDa (Fig. 6).

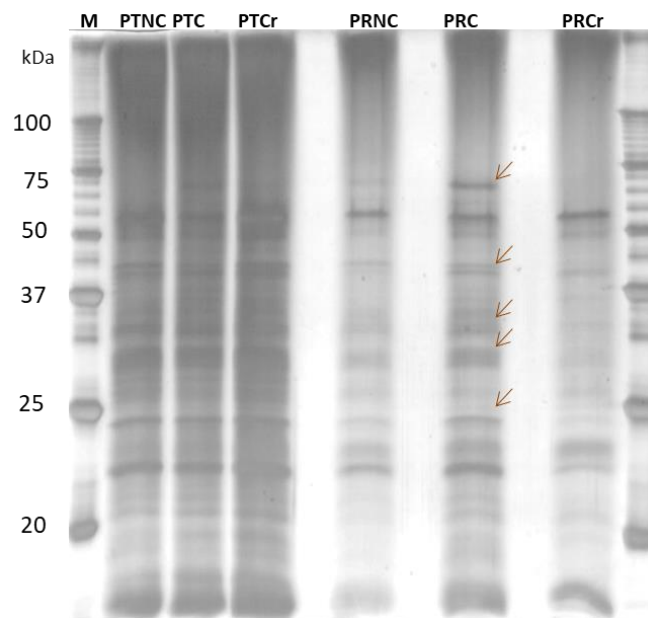


Figura 6. SDS-PAGE de proteínas de espermatozoides de cerdo teñidas con plata. El cambio es más evidente con PRC, ya que se aprecia un aumento de intensidad para las bandas 64, 45, 36, 34 y 26 kDa, señaladas por flechas y una pérdida de las bandas de 64 y 45 kDa en PRCr. PTNC = proteína total de espermatozoides no capacitados, PTC= proteína total de espermatozoides capacitados, PTCr = proteína total de espermatozoides criopreservados, PRNC = proteínas de balsas de espermatozoides no capacitados, PRC = proteínas de balsas de espermatozoides capacitados, PRCr =

proteínas de balsas de espermatozoides criopreservados. Los pesos moleculares se indican en kDa. Cada SDS-PAGE se replicó al menos tres veces con distintas muestras de eyaculado.

Al realizar el western blot con lectinas o lectin blot, observamos que hay pérdida de glicoproteínas después de la criopreservación. En el ensayo con la lectina PNA (Aglutinina de cacahuate, que reconoce al disacárido Gal (β 1-3) N-acetilgalactosamina (GalNAc) del núcleo de O-glicanos) se observó una disminución en la señal con esta lectina en la banda de 145 kDa tanto en PRNC y RPCr. Con SNA (Aglutinina de *Sambucus nigra*, que reconoce ácido siálico (NeuAc) unido a galactosa (Gal) vía α 2-6, y NeuAc unido a GalNAc vía α 2-6, principalmente en O-glicanos) se observaron 3 bandas, 79, 59 y 24 kDa, que mostraron mayor intensidad en la señal con esta lectina en PRC y una notable disminución en RPCr en la banda de 79 kDa; para las bandas de 59 y 24 kDa la señal fue menor tanto en PRNC como para RPCr.

En el caso de GNA (Aglutinina *Galanthus nivalis*, que reconoce manosa (Man) terminal unido a Man vía α 1-3 o α 1-6, en N-glicanos) hay una banda de 45 kDa en PRC que muestra mayor señal comparada con PRNC y PRCr. Finalmente, al utilizar la lectina DSA (Aglutinina *Datura stramonium*, que reconoce Gal β 1-4 N-acetilglucosamina (GlcNAc), en N-glicanos de tipo complejo e híbrido) hubo varias bandas en PRCr que disminuyeron la señal con esta lectina, comparadas con PRNC y PRC, se observaron dos de elevada masa molecular, 145 y 120 kDa, así como otras de menor masa, de 45, 36 y 34 kDa, que dieron muy poca señal (Fig. 7).

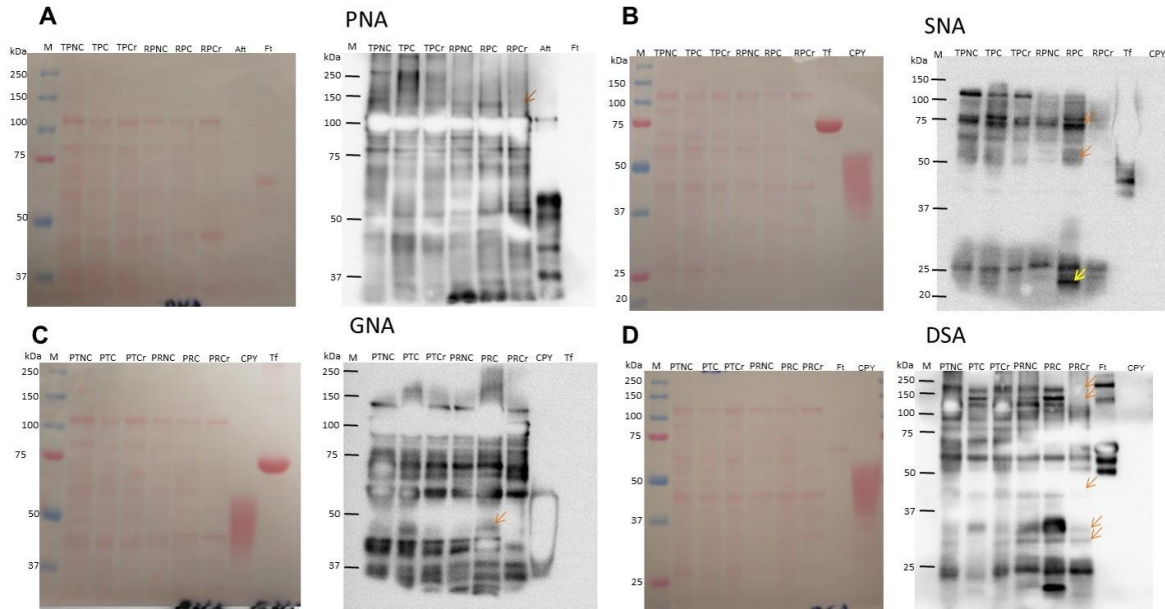


Figura 7. Ensayos con lectinas en glicoproteínas de espermatozoides de cerdo. A) PNA, se observó una disminución en la señal en la banda de 145 kDa en RPNC y RPCr. B) SNA, se observaron 3 bandas, 79, 59 y 24 kDa, con mayor intensidad, en RPC y una disminución en RPCr en la banda de 79 kDa, para las bandas de 59 y 24 kDa la señal fue menor en RPNC y RPCr. C) GNA, la banda de 45 kDa en PRC, mostró mayor señal comparada con PRNC y PRCr. D) DSA, en PRCr disminuyó la señal en las bandas de 145, 120 kD, 45, 36 y 34 kDa. PTNC = proteína total de espermatozoides no capacitados, PTC= proteína total de espermatozoides capacitados, PTCr = proteína total de espermatozoides criopreservados, PRNC = proteínas de balsas de espermatozoides no capacitados, PRC = proteínas de balsas de espermatozoides capacitados, PRCr = proteínas de balsas de espermatozoides criopreservados. Se utilizaron como controles positivos o negativos: asialofetúina (Aft), fetuina (Ft), transferrina (Tf) y carboxipeptidasa Y (CPY) de acuerdo con la lectina y a las indicaciones del fabricante (5 µg).

Se determinaron las densidades ópticas (DO) y encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$) en las bandas de 145, 120, 45, 36 y 34 kDa, evaluadas con DSA, al comparar PRNC y PRCr. En éstas mismas dos condiciones y con la lectina SNA, hubo diferencia

significativa para la banda de 79 kDa. Por otra parte, cuando se analizó la DO para comparar PRC y PRCr, hubo diferencias significativas en casi todas las bandas mencionadas: con DSA se aprecian en las bandas de 145, 120, 36 y 34 kDa; con PNA, en la banda de 145 kDa; con GNA en la banda de 45 kDa y con SNA en las bandas de 79, 59 y 24 kDa (Tabla 2).

Tabla 1. Cambios en glicoproteínas de balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo mediante lectin blot

<i>Mr</i> (kDa)	DO		DO		DO	
	PRNC	<i>p</i>	PRCr	<i>p</i>	PRC	
145kDa	0,021081368	0,008 **	0,010431689	0,001 ***	0,023863729	
120kDa	0,020745375	0,016 **	0,006439983	0,005 ***	0,025569446	
DSA 45kDa *	0,007880369	0,005 **	0,002325746	0,089	0,01313076	No diferencia entre RPCr y RPC
36 kDa	0,043535445	0,049 **	0,016730289	0,029 ***	0,052112922	
34kDa	0,022350185	0,049 **	0,00875866	0,011 ***	0,027752857	
PNA 145kDa	0,017516597	0,07	0,01489792	0,004 ***	0,021605969	
GNA 45kDa *	0,006013357	0,198	0,005398056	0,005 ***	0,025192492	
79kDa *	0,024754182	0,043 **	0,011749193	0,008 ***	0,035344274	
SNA 59kDa	0,004912651	0,096	0,004145614	0,001 ***	0,015056102	
24kDa *	0,013316966	0,29	0,014154733	0,009 ***	0,039540804	

La masa relativa (*Mr*) se determinó usando el software Quantity One 4.6.8, con marcadores de masa molecular y los valores de densidad óptica (DO) usando ImageJ (se muestran los valores promedio). Las diferencias significativas, entre parejas, se obtuvieron mediante una prueba de t ($p < 0.05$), * RPNC y RPC, ** RPNC y PRCr, *** PRCr y RPC. *Mr* = Masa molecular relativa. PRPNC = Proteínas de rafts de espermatozoides no capacitados. PRPC = Proteínas de rafts de espermatozoides capacitados. Estos resultados son representativos de cinco réplicas independientes de cada condición de muestra.

Balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo

Se realizó la extracción de proteína de espermatozoides y se procedió a la obtención de balsas lipídicas de espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados (Cr). Se observó en cada tubo de ultracentrífuga, una región blanquecina, opalescente en la región que se encuentra entre la densidad del 5 y 35 % del gradiente (fracciones 3-4) (Fig.8).

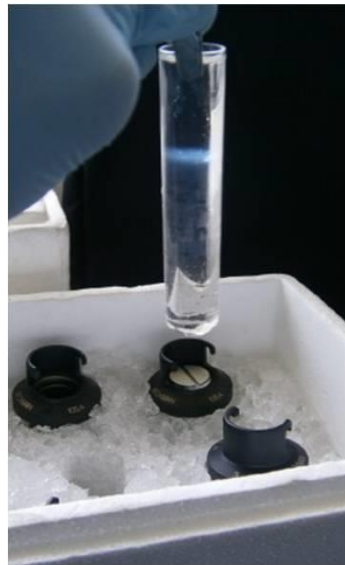


Figura 8. Gradiente de sacarosa. Entre la interfase del gradiente del 5 y 35 % se distingue una región blanquecina, la cual se colectó en las fracciones 4 y 5, que corresponden a balsas lipídicas.

La cantidad de proteína total obtenida tras la extracción fue de $1.72 \pm 0.23 \mu\text{g}/10^6$ de espermatozoides no capacitados (PTNC) y de $1.13 \pm 0.11 \mu\text{g}/10^6$ de espermatozoides capacitados (PTC). Después de la ultracentrifugación se obtuvieron satisfactoriamente 12 fracciones del gradiente de sacarosa (1 mL de cada una).

Con el fin de verificar la obtención de balsas lipídicas, se realizó un dot blot para determinar la presencia de GM1 (un marcador específico establecido para balsas lipídicas), se observó una señal en las fracciones 3 y 4 (Fig. 9A) en ambas condiciones, PTC y PTNC, correspondiente a la fracción DRM que apareció como una banda opalescente en la fracción de baja densidad del gradiente. Se observó asimismo una señal en PTNC y PTC en el homogeneizado de células de cerebro de rata (control positivo), pero ninguna señal para albumina de suero bovino (control negativo). Los resultados son representativos de tres réplicas independientes de cada condición de muestra de diferentes eyaculados.

Obtuvimos $0.27 \pm 0.1 \mu\text{g}/10^6$ espermatozoides de proteína de PRNC y $0.32 \pm 0.02 \mu\text{g}/10^6$ de PRC. Estas fracciones fueron analizadas para la inmunodetección de otros marcadores de DRM ya bien establecidos: caveolina-1 y flotilina-1. Estas dos proteínas se detectaron en las muestras de proteína enriquecida por balsas lipídicas (PRNC y PRC) y proteínas totales (PTNC y PTC) de los espermatozoides tanto no capacitados y capacitados (Fig. 9B). Las proteínas de las fracciones 5-12 no estuvieron asociadas con GM1, y no se detectó proteína alguna en las fracciones 1 y 2.

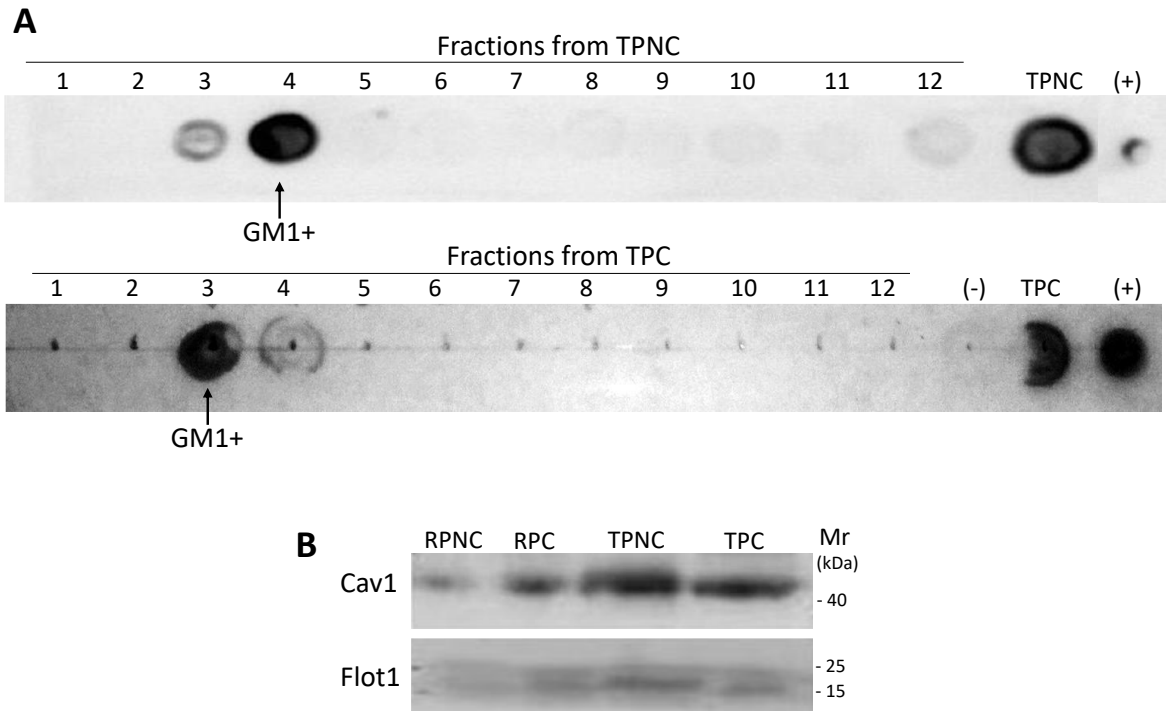


Figura 9. A. Dot-blot para GM1. Se detectó GM1 en el extracto total de espermatozoides capacitados (PTC), extracto total de no capacitados (PTNC), y en las fracciones 3 y/o 4. (-) Albúmina de suero bovino (control negativo); (+) homogeneizado de células de cerebro de rata (control positivo). Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes; cada uno se realizó en espermatozoides capacitados (C) y no capacitados (NC). B. Detección por transferencia de Western de Caveolina-1 (Cav 1) y flotilina-1 (Flot-1), que se encuentran en las proteínas de balsas lipídicas de los espermatozoides NC (PRNC) y C (PRC), colectadas en las fracciones 3 y/o 4, la proteína total de NC (PTNC) y C espermatozoides (PTC). Los marcadores de masa molecular se indican en kDa.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

De todas las fracciones de balsas lipídicas tanto de espermatozoides capacitados (PRC), no capacitados (PRNC) y criopreservados (PRCr), se realizaron electroforesis unidimensionales (SDS-PAGE) y el patrón de bandas fue constante. En los primeros ensayos se puede apreciar cierta diferencia en las bandas, pero es debida a la cantidad

de proteína que se cargó en cada fracción ya que no siempre las proteínas de balsas lipídicas se colectaron de la misma fracción (a veces fue en la fracción 3, 4, y/o 5). Después de varias repeticiones se logró que el patrón de bandeo fuera reproducible. Durante la estancia en el Laboratorio de Glicobiología Estructural y Funcional de la Universidad de Lille 1, Francia, se realizaron SDS-PAGE con geles grandes de gradiente de 7.5 a 12.5 % y 15 % con la finalidad de lograr una mejor separación de las bandas de proteínas, para después recortarlas, decolorarlas, realizar la digestión trípica, obtener los péptidos y mandarlos a analizar al espectro de masas.

Las proteínas de los espermatozoides fueron analizadas por SDS-PAGE y tinción de plata, encontrando las bandas con Mr en el rango de 250-15 kDa en todas las condiciones. Se realizó cada análisis SDS-PAGE al menos tres veces con distintas muestras de eyaculados. En las extracciones de PT observamos cambios mínimos después de la capacitación, indicando que este proceso no afecta el perfil global de las proteínas (Fig. 10, izquierda.). En contraste, en las extracciones de PR, notamos que después de la capacitación, se incrementó la intensidad de varias bandas (~80, 70, 65, 48, 40, 36-34 y 28 kDa, marcadas con flechas con líneas punteadas), mientras que la intensidad de otras bandas decreció (en las bandas de ~74, 23 y 15 kDa, marcadas con flechas con líneas continuas) (Fig. 10, derecha).

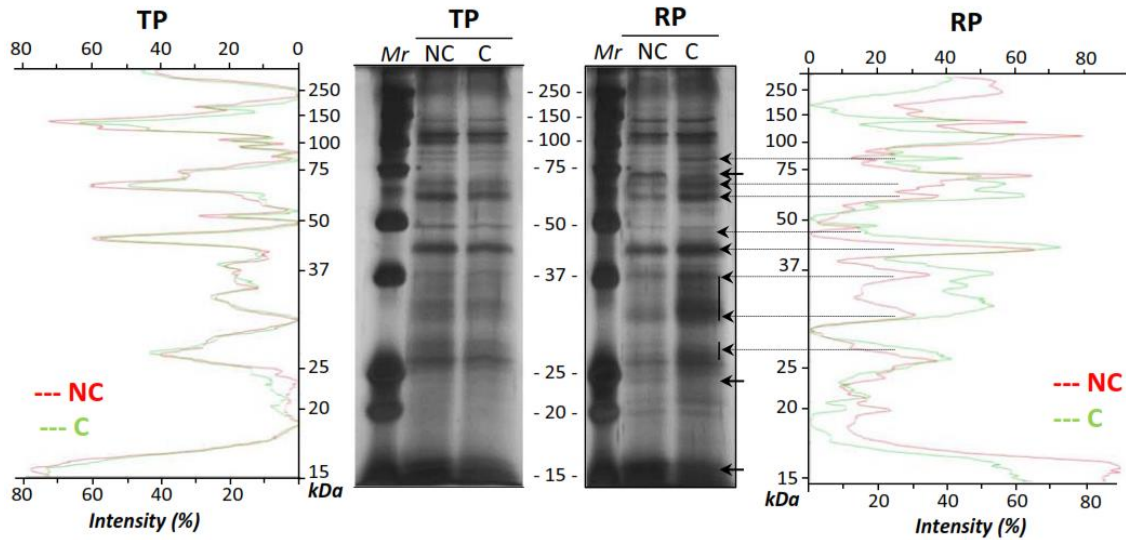


Figura 10. SDS-PAGE y análisis densitométrico de proteínas de espermatozoides de cerdo teñidas con plata correspondiente a proteínas totales (PT) de espermatozoides no capacitados (NC) y capacitados (C) (panel izquierdo) y proteínas de rafts (PR) de espermatozoides C y NC (panel derecho). Cada SDS-PAGE se replicó al menos tres veces con distintas muestras de eyaculado. En las extracciones de PR, la capacitación indujo un aumento de intensidad para las bandas ~ 80, 70, 65, 48, 40, 36-34 kDa (flechas con líneas de punteadas) y una disminución de la intensidad para las bandas ~ 74, 23 y 15 kDa (flechas con línea continua, gruesa y corta).

Identificación de los residuos de carbohidratos

Con el fin de determinar si las proteínas obtenidas de las balsas lipídicas están glicosiladas, se realizaron ensayos de western blot con lectina. Se realizó la tinción con rojo Ponceau de membranas de nitrocelulosa antes de realizar los ensayos de western blot con lectina y se confirmó que la carga de proteína fue igual en todos los carriles (Fig. 11). Utilizamos las lectinas PNA y SNA para identificar a los carbohidratos O-glicanos, y GNA y DSA para los N-glicanos (Fig. 12). Cada ensayo fue replicado al menos cinco veces con distintos eyaculados. Se muestran los datos representativos. Se usaron controles positivo y negativo con cada lectina para confirmar la especificidad

de la señal. Para cada ensayo medimos la densidad óptica de las bandas para determinar el cambio en la señal entre las dos condiciones (PRNC y PRC); se realizaron al menos cinco experimentos independientes ($P < 0.05$).

En la tabla 2 se muestra la cuantificación de los cambios de glicosilación detectados en las glicoproteínas de las balsas lipídicas de los espermatozoides porcinos después de la capacitación.

Observamos cambios mayores de glicosilación en una proteína de bajo peso molecular (15 kDa) que mostró una señal muy fuerte con todas las lectinas en la muestra de RPNC, pero que desapareció o disminuyó marcadamente (de 0 a -31 veces) después de la capacitación (PRC) (Fig. 12, Tabla 2). La detección del núcleo de O-glicano con PNA no mostró cambios significativos, salvo por una banda de 18 kDa que aumentó significativamente en casi 3.8 veces después de la capacitación. Esta banda sólo fue detectada con PNA, lo que sugiere que la(s) cadena(s) de O-glicanos de estas glicoproteínas quizá no estén sialiladas mediante unión vía $\alpha 2,6$ ya que no hubo reconocimiento con SNA (Fig. 12A-B, Tabla 2). En contraste, sí hubo una fuerte señal con SNA, específicamente en las bandas con pesos moleculares aparentes de 100, 79, 64 y 26-24 kDa en PRC, comparado con PRNC (un aumento de 2.6 a 20 veces), mientras que la banda en 36 kDa decreció significativamente (-2.3 veces) (Fig. 12B, Tabla 2).

La señal de otras glicoproteínas de balsas lipídicas que contienen residuos de oligomanosa, detectada con GNA, disminuyó significativamente después de la capacitación en las bandas de 45, 36 y 34 kDa (de -1.3 a -6.7 veces), aunque aumentó también significativamente (1.3 veces) en la banda de 64 kDa (Fig. 12C, Tabla 2).

Finalmente, con la lectina DSA que reconoce Gal β 1-4GlcNAc en *N*-glicanos de tipo complejo e híbrido, observamos que la mayoría de las bandas decrecieron después de la capacitación, mostrando una diferencia significativa en la banda de 30 kDa (-4.6 veces) (Fig. 12D, Tabla 2). Estos resultados indican que los patrones de la *N*-glicosilación y/o *O*-glicosilación son modificados fuertemente durante el proceso de capacitación.

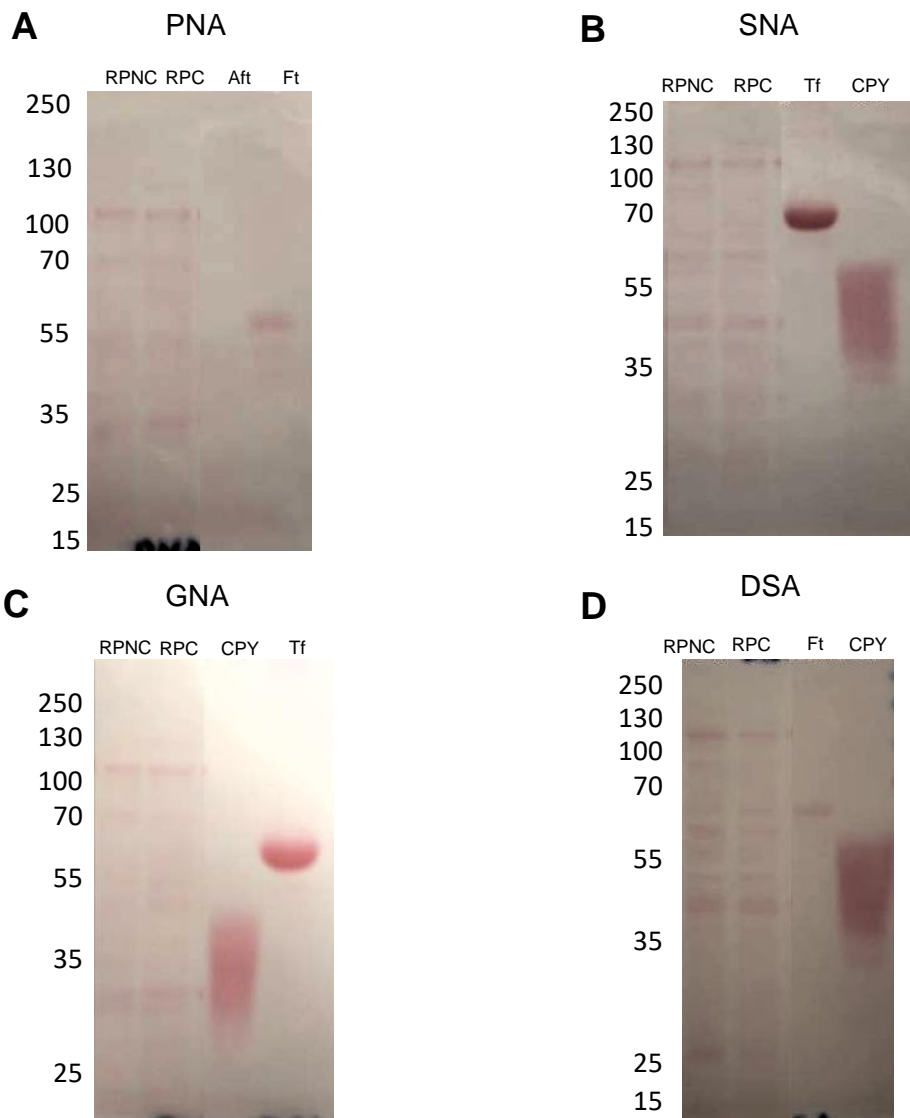


Figura 11. Se realizó la tinción con rojo Ponceau de membranas de nitrocelulosa antes de realizar los ensayos de transferencia de lectina y se confirmó que la carga de proteína fue igual en todos los carriles. Utilizamos las lectinas PNA y SNA para identificar a los carbohidratos O-glicanos, y GNA y DSA para los N-glicanos.

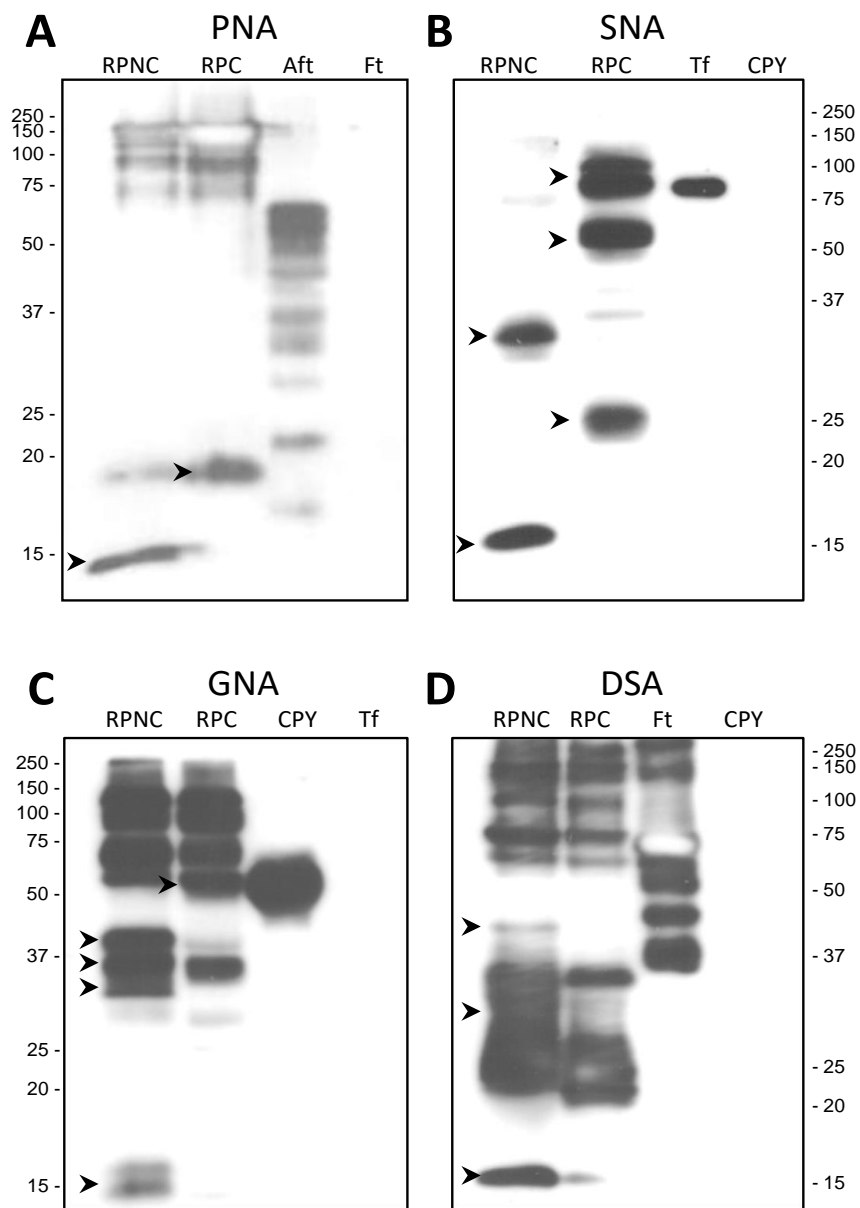


Figura 12. Detección de glicoproteínas de balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo mediante western blot con lectina. PNA (A), SNA (B), GNA (C) o DSA (D). Todos los cambios significativos ($p < 0.05$) observados después de la capacitación se indican con flechas. Se utilizaron asialofetuína (Aft), fetuína (Ft), transferrina (Tf) y carboxipeptidasa Y (CPY) como controles positivos o negativos según la lectina y

según las indicaciones del fabricante (5 µg). RPNC = proteínas en balsa de espermatozoides no capacitados, RPC = proteínas en balsa de espermatozoides capacitados. Los pesos moleculares se indican en kDa. Se muestran fotografías representativas de cinco experimentos independientes. La densidad óptica (DO) se determinó y se normalizó frente a la DO de la migración de las proteínas totales de RPC o RCNP teñidas con la tinción de rojo Ponceau (Romero-Calvo et al. 2010).

Tabla 2. Cambios en la glicosilación de proteínas en balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo, basados en análisis de blot con lectinas.

Mr (kDa)	OD											
	PNA (Gal)			SNA (NeuAc)			GNA (Man)			DSA (GlcNAc)		
	RPNC	RP C	FC	RPNC	RPC	FC	RPNC	RPC	FC	RPNC	RPC	FC
145							0.04	0.047				
							9		-1			
120	0.036	0.0					0.06	0.050		0.07	0.052	
		57	+1.6				1		-1.2	5		-1.4
110										0.06	0.048	
										2		-1.3
79	0.034	0.0		0.02	0.054		0.07	0.067				
		61	+1.8	1	*	+2.6	8		-1.2			
64				0.01	0.089		0.02	0.032		0.06	0.050	
				2	*	+7.4	5	*	+1.3	1		-1.2
59	0.023	0.0										
		42	+1.8									
45							0.20	0.094		0.07	0.054	
							5	*	-2.2	6	*	-1.4
36				0.04	0.019		0.05	0.043		0.12	0.108	
				3	*	-2.3	8	*	-1.3	0		-1.1
34							0.03	0.008				
							4	*	-4.2			

30									0.05	0.012		
									5	*		-4.6
26				0.01	0.039				0.08	0.110		+1.
				1	*	+3.5			8			2
24				0.00	0.020				0.08	0.17		+2
				1	*	+20			8	7		
18	0.013	0.0										
			+									
		50										
		*	3.8									
15	0.149	0*		0.03	0.001		0.05	0.008	0.06	0.016		
			0			-31						-4
				1	*		4	*	4	*		
											-6.7	

Se determinó la masa molecular (*Mr*) usando el software Quantity One 4.6.8 con marcadores de masa molecular y valores de densidad óptica (DO) determinados usando ImageJ (se muestran los valores promedio). Se obtuvieron diferencias significativas (*) entre PRNC y PRC utilizando una prueba t ($P < 0.05$). El cambio de veces (FC) se calculó en relación con los valores de PRNC. *Mr* = Masa molecular relativa. PRNC = Proteínas de rafts de espermatozoides no capacitados. PRC = Proteínas de rafts de espermatozoides capacitados. Estos resultados son representativos de cinco réplicas independientes de cada condición de muestra.

Determinación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas obtenidas mediante espectrometría de masas en tándem

Las bandas de proteínas de espermatozoides de cerdo NC o C, que presentaron buena resolución y que mostraron modificaciones significativas en su contenido de glicosilación después de la capacitación y criopreservación, fueron analizadas por espectrometría de masas. Las bandas de interés tuvieron una masa molecular

aparente de 64, 45, 36, 34, 24, 18 y 15 kDa. Estos resultados son representativos de cinco diferentes experimentos de cada condición de la muestra.

Se encontraron 7 bandas en las balsas lipídicas de espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados; éstas se secuenciaron y se identificaron 20 conocidas o potenciales glicoproteínas (Tabla 3). Entre ellas, 9 son potencialmente nuevas O- y/o N-glicoproteínas en espermatozoides de cerdo: Molécula de adhesión espermática-1 (SPAM-1), enzima convertidora de angiotensina testicular (tACE), proteína-5 conteniendo dominio desintegrina y metaloproteasa (ADAM5), proteína de unión a acrosina (ACRBP), precursor del inhibidor de la movilidad espermática del plasma seminal (SPMI), proteína-1 asociada a la membrana del acrosoma espermático (SPACA 1), proteína del plasma seminal pB1, espermadhesina AWN (AWN) y proteína-4 conteniendo dominio Ly6/PLAUR (LYPD4). Identificamos 5 proteínas cuyos sitios de glicosilación ya han sido reportados en cerdo: Lactadherina (MFGE8), acrosina (ACR), proteína-1 de unión a la zona pelúcida (ZPBP1), proteína de unión a carbohidratos AQN-3 (AQN-3) y glicoproteína principal del plasma seminal PSP-I (PSP-I). Todas ellas participan en el proceso de fertilización excepto LYPD4 quien tiene una función desconocida.

En el presente trabajo, también se encontraron seis proteínas que no pertenecen a la membrana plasmática: Proteína-60 de choque térmico (HSP60), peroxiredoxina-5 (PRDX5), fosfoglicerato cinasa-2 específica de testículo (PGK2), subunidad beta de succinil-CoA ligasa (SUCLA2), malato deshidrogenasa-1 (MDH1) y adenilato cinasa isoenzima-1 (AK1).

Entre las conocidas o potenciales glicoproteínas, para diez de ellas, ésta es la primera vez que se describe su asociación con balsas lipídicas de espermatozoides (ADAM5, SPMI, SPACA 1, proteína del plasma seminal pB1, PSP-I, MFGE8, tACE, PGK2, SUCLA2 y MDH1). Además, LYDP4, SPAM-1, HSP60, ZPBP1 y AK1 han sido reportadas en balsas lipídicas de espermatozoides de ratón y humano, pero no en espermatozoides de cerdo. Hemos encontrado y confirmado la presencia de ACR, AWN, ACRBP, AQN3 y PRDX5 en balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo.

Tabla 3. Identificación de proteínas de balsas lipídicas de espermatozoides de cerdo no capacitados, capacitados y criopreservados.

Banda	Gen	Proteína	MW (Da)	Número de acceso Banco de genes/Uniprot	Puntuación (péptidos secuenciados)	Función	N-glicosilación En espermatozoides de cerdo
p64	SPAM-1	Molécula de adhesión de espermatozoides 1	56004	NP_999176.1 /Q8MI02	421 (29)	Hialuronidasa (Primakoff <i>et al.</i> 1985, Day <i>et al.</i> 2002).	Desconocido
	* MFGE8	Lactadherina	47819	NP_001116456.1 /P79385	259 (21)	Remodelación de membrana y/o como proteína de unión a ZP (Ensslin <i>et al.</i> 1998).	Asn 41, Asn 372
	HSP60	Proteína de choque térmico de 60 kDa, mitocondrial	61002	NP_001241645.1 /G9F6X6	269 (17)	Chaperona (Zhu <i>et al.</i> 2009)	Desconocido
	* tACE	Enzima convertidora de angiotensina testicular	84746	NP_001028187 /Q4ACT8	190 (15)	Proteasa. Transporte dentro de los oviductos y en unión a ZP (Hagaman <i>et al.</i> 1998)	Desconocido

p45	MFGE8	Lactadherina	47819	NP_001116456 /P79385	776 (79)		
	ACR	Acrosina	45358	AAA31131 /P08001	343 (27)	Proteasa principal de Asn 19, Asn 208 espermatozoides. Propiedades de afinidad a carbohidratos y ZP (Topfer-Petersen y Henschen 1987)	
	* PGK2	Fosfoglicerato cinasa específica de testículo	44817	AAR89550.1 /Q6RI85	318 (31)	Vía metabólica de la glucólisis (Chen <i>et al.</i> 2004).	Desconocido
	*SUCLA2	Succinil-CoA ligasa subunidad beta, mitocondrial	50272	XP_003131022.1 /O97580	216 (14)	Vía metabólica del ciclo del ácido tricarboxílico (Johnson <i>et al.</i> 1998).	Desconocido
	* ADAM5	Proteína 5 que contiene dominios de desintegrina y metaloproteasa	45167	BAJ76671.1 /E7FM66	199 (15)	Participa en la actividad de unión a carbohidratos de los espermatozoides (Mori <i>et al.</i> 2011).	Desconocido
p36	MFGE8	Lactadherina	45695	NP_001116456.1/P79385	671 (41)		
	* MDH1	Malato deshidrogenasa citoplasmática	35573	1MLD_A /P11708	318 (12)	Participa en el componente citosólico de la lanzadera malato-	Desconocido

	ZPBP1	Proteína 1 de unión a ZP	39598	Q29108.1 /Q29108	311 (15)	aspartato (Chapman <i>et al.</i> 1999) Vinculado a la familia de 90 kDa de ZP (Mori <i>et al.</i> 1995)	Asn 113, Asn 186, Asn 339
	ACR	Acrosina	45332	AAA31131 /P08001	289 (16)		
p34	MFGE8	Lactadherina	47819	NP_001116456.1 /P79385	275 (30)		
	LYPD4	Proteína 4 que contiene el dominio Ly6/PLAUR	26613	NP_001182280.1 /D3K5J4	222 (18)	Componente de anclaje de la membrana. Función desconocida.	Desconocido
	ACRBP	Proteína de unión a acrosina	60501	Q29016.1 /Q29016	205 (13)	Se une a proacrosina. Puede estar implicado en el empaquetamiento y condensación del zimógeno de acrosina en la matriz acrosomal (Baba <i>et al.</i> 1994)	Desconocido
	* SPMI	Inhibidor de la movilidad espermática del plasma seminal	15025	NP_001026946.1 /Q28920	154 (15)	Pertenece a la familia de las espermadhesinas (Haase <i>et al.</i> 2005)	Sitio potencial de N-unión 36

	*SPACA1	Proteína asociada a la membrana del acrosoma espermático	1	32219	NP_001177176.1 /D5K8A9	138 (9)	Puede estar involucrado en la fusión espermatozoide-ovocito (Fujihara <i>et al.</i> 2012).	Desconocido
p24	MFGE8	Lactadherina		45695	NP_001116456.1 /P79385	470 (25)		
	ZPBP1	Proteína de unión a ZP	1	39598	Q29108.1 /Q29108	424 (17)		
	AK1	Adenilato cinasa isoenzima 1		21625	P00571.1 /P00571	365 (18)	Participa en la homeostasis de la energía celular y metabolismo de los nucleótidos de adenina (Fry <i>et al.</i> 1986)	Desconocido
p18	AQN3	Proteína de unión a carbohidratos AQN-3		12876	P24020.1 /P24020	283 (18)	Media la unión de los espermatozoides a los componentes de la ZP del óvulo mediante un mecanismo de unión a carbohidratos (Sanz <i>et al.</i> 1991)	Asn 50
	AK1	Adenilato cinasa isoenzima 1		21625	P00571.1 /P00571	264 (18)		

* --	Proteína del plasma seminal pB1	15362	P80964.2 /P80964	243 (10)	Puede formar un complejo con la espermadhesina AQN-1 (Plucienniczak <i>et al.</i> 1999).	Desconocido	
ZPBP1	Proteína 1 de unión a ZP	39598	Q29108.1 /Q29108	236 (12)			
* PSP-I	Principal glicoproteína del plasma seminal PSP-I	14491	NP_999002.1 /P35495	192 (5)	Pertenece a la familia de las espermadhesinas. Desencadena el reclutamiento de células inmunes después del apareamiento (Rodriguez-Martinez <i>et al.</i>)	Asn 71	
p15	PRDX5	Peroxiredoxina-5 mitocondrial	17313	NP_999309.1 /Q9GLW8	386 (15)	Actividad peroxidasa y antioxidante (Knoops <i>et al.</i> 1999)	Desconocido
	SPMI	Inhibidor de la movilidad espermática del plasma seminal	15025	NP_001026946.1 /I7HJH6	256 (24)	Bloquea la motilidad de los espermatozoides reactivados-desmembrados e intactos (Iwamoto <i>et al.</i> 1995)	Desconocido

PSP-I	Principal glicoproteína del plasma seminal PSP-I	14491	NP_999002.1 /P35495	211 (8)		
AWN	Espermadesina AWN	16891	CAI05910.1 /P26776	100 (8)	Pertenece a la familia de las espermadhesinas. Media la unión de los espermatozoides de cerdo a ZP por un mecanismo de unión a carbohidratos (Sanz <i>et al.</i> 1992)	Desconocido

Los péptidos fueron analizados por espectrometría de masas en tándem y la identificación se realizó usando el software MASCOT. La función biológica, estatus de glicosilación y posición de los residuos N-glicosilados conocidos (Asn, Asparagina) de las proteínas identificadas, están reportadas de acuerdo con la base de datos de UniProt (www.uniprot.org). Da: Dalton. ZP: Zona pelúcida. * Proteínas de balsas lipídicas reportadas por primera vez en espermatozoides de cerdo. Estas bandas se encontraron en las balsas lipídicas de espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados.

Determinación de la distribución de balsas lipídicas de la membrana plasmática de los espermatozoides

Con el fin de poder determinar la distribución del GM1 acoplados a las balsas lipídicas de la membrana plasmática de espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados, se marcaron con CTX-FITC durante 1 h.

Al analizar las muestras de espermatozoides, se determinaron 5 diferentes patrones de distribución de la fluorescencia, los cuales se clasificaron de acuerdo con la región donde predominó la fluorescencia y son como sigue:

Patrón A: espermatozoides con fluorescencia en la región del flagelo y cabeza. Patrón B: espermatozoides con fluorescencia intensa en la región de la cabeza y débil en el flagelo. Patrón B1: espermatozoides con fluorescencia en la región apical y post-acrosomal, con un anillo semicircular que marca el límite anterior del segmento ecuatorial y una débil fluorescencia en el flagelo. Patrón C: espermatozoides que presentaron fluorescencia solo en la cabeza. Patrón D: fluorescencia en la región post-acrosomal y pieza media (Fig. 13 y 14).

Al realizar el análisis cuantitativo de cada patrón en cada grupo experimental se presentaron los siguientes porcentajes: Espermatozoides no capacitados que mostraron patrón A, 88.7 %; patrón B, 6.3 % y patrón C, 5 %. Para los espermatozoides capacitados: patrón A, 5.5 %; patrón B, 22.7 % y el patrón C, 71.8 %. Para los espermatozoides criopreservados, además de los patrones antes mencionados se observaron 2 patrones más (B1 y D) los porcentajes de los patrones fueron: patrón A,

57.8%; patrón B, 13.9 %; patrón B1, 1.7 %; patrón C, 17.1 % y patrón D, 9.5 % (Tabla 4 y Fig. 14).

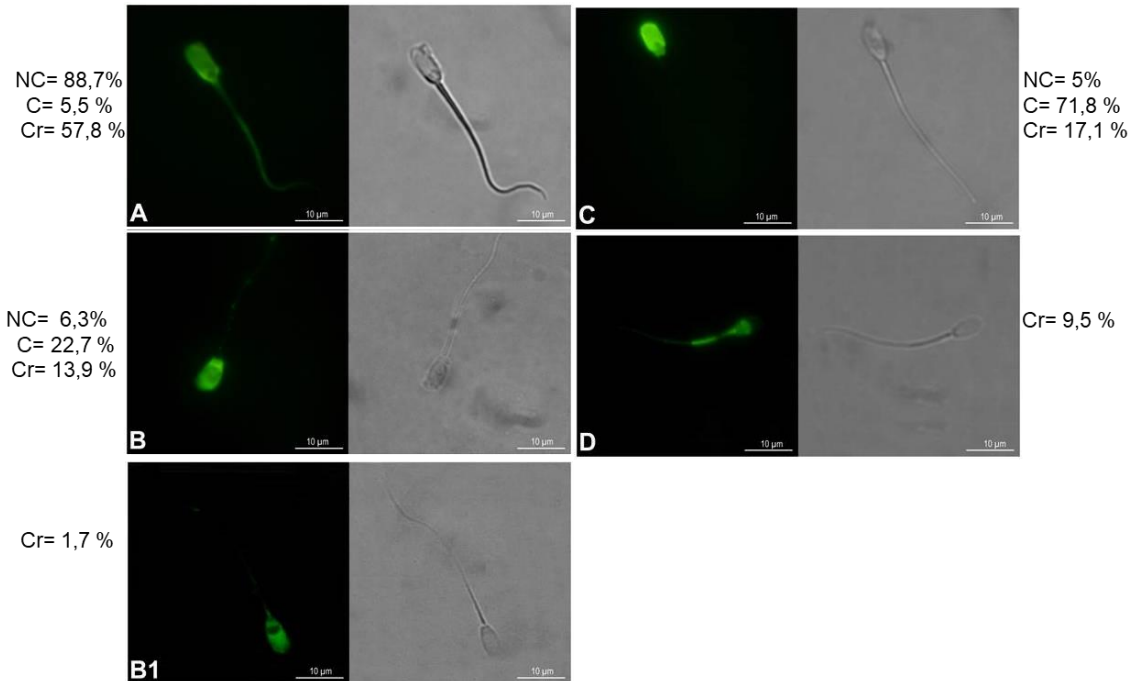


Figura 13. Patrones de fluorescencia de CTX-FITC para GM1 en la membrana de espermatozoides de cerdo. A, fluorescencia en flagelo y cabeza. B, fluorescencia intensa en la cabeza y débil en el flagelo. B1, fluorescencia en la región apical y post acrosomal y débil en el flagelo (en criopreservados). C, fluorescencia sólo en la cabeza. D, fluorescencia en la región post acrosomal y pieza media (en criopreservados). Lado izquierdo de cada fotografía, observación en fluorescencia. Lado derecho, observación en campo claro. Se muestran los porcentajes de cada patrón. Las preparaciones se observaron a 100 x.

Tabla 4. Porcentaje de espermatozoides de cerdo de acuerdo con los patrones de fluorescencia con CTX-FITC.

PATRÓN	NC	C	Cr
A	88.7 ± 5.9	5.5 ± 0.2	57.8 ± 13.1
B	6.3 ± 5.7	22.7 ± 5.1	13.9 ± 13.9
B1	0	0	1.7 ± 2.7
C	5 ± 6.4	71.8 ± 5	17.1 ± 14.5
D	0	0	9.5 ± 9.5

Datos obtenidos en dos muestras independientes, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney. Se encontraron diferencias significativas al comparar el patrón de fluorescencia A de espermatozoides no capacitados con el de criopreservados ($p < 0.05$). NC (no capacitados), C (capacitados) y Cr (criopreservados).

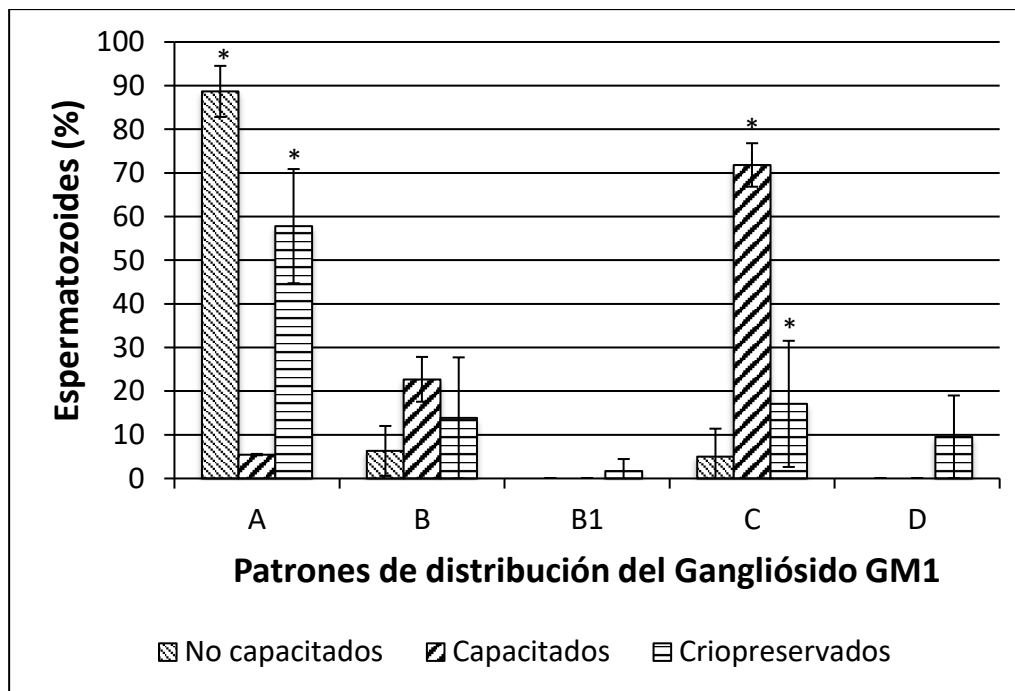


Figura 14. Patrones de distribución de fluorescencia en espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados. A: Flagelo y cabeza, B: Intensa en la cabeza, pero débil en el flagelo, B1: Región apical y post acrosomal, débil en el flagelo, C: sólo en la cabeza y D: en la región post-acrosomal y pieza intermedia. * diferencias significativas $p < 0.05$.

Cuantificación de colesterol

Después de realizar el análisis cuantitativo del colesterol de las muestras de espermatozoides y su sobrenadante, se obtuvieron los siguientes promedios: en los espermatozoides no capacitados $183.6 \pm 15.2 \mu\text{g/ml}$ y en el plasma seminal $140.6 \pm 53.9 \mu\text{g/ml}$. En el grupo de espermatozoides capacitados se encontró una mayor concentración de colesterol en el medio de capacitación ($349.5 \pm 25.3 \mu\text{g/ml}$) respecto a la concentración encontrada en los espermatozoides ($147.6 \pm 9.6 \mu\text{g/ml}$). En el grupo de espermatozoides criopreservados, los niveles de colesterol no fueron detectados en los espermatozoides. En contraste, se encontró una concentración de colesterol bastante elevada en el medio de congelación ($487.9 \pm 12.5 \mu\text{g/ml}$) (Tabla 5 y Fig. 15).

Tabla 5. Porcentaje de Concentración de colesterol en espermatozoides de cerdo y sobrenadante.

No capacitados		Capacitados		Criopreservados	
Spz	P.S	Spz	M.CAP	Spz	M.CON
183.6 ± 15.2	140.6 ± 53.9	147.6 ± 9.6	349.5 ± 25.3	0	487.9 ± 12.5

Los datos se obtuvieron de más de 3 muestras independientes y se aplicó una prueba de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada condición.

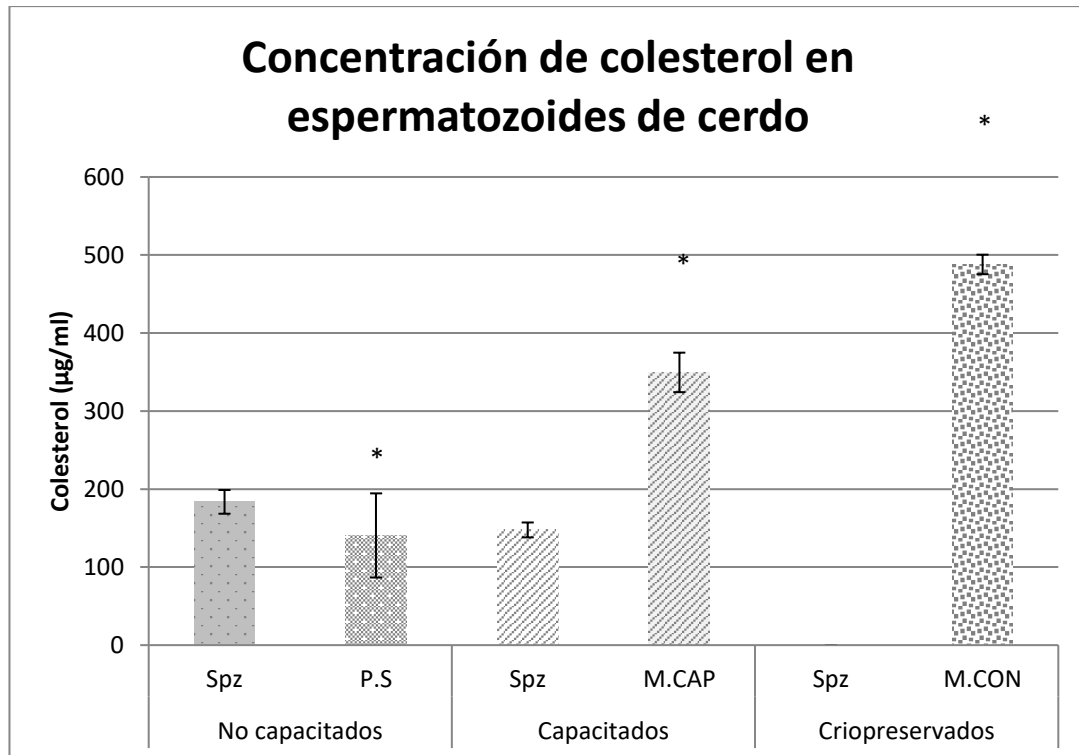


Figura 15. Concentración de colesterol ($\mu\text{g/ml}$) en espermatozoides de cerdo. Se observa una pérdida importante en los espermatozoides capacitados, ya que la concentración de colesterol en el medio de capacitación fue mayor que en los espermatozoides (349.5 y $147.6 \mu\text{g/ml}$ respectivamente); por otra parte, la pérdida de colesterol en los criopreservados fue dramática, pues prácticamente todo el colesterol se determinó únicamente en el medio de criopreservación ($487.9 \mu\text{g/ml}$). Spz (espermatozoides), P.S (plasma seminal), M.CAP (medio de capacitación) y M.CON (medio de criopreservación). * diferencias significativas ($p < 0.05$).

Discusión

La capacitación es un proceso que implica cambios bioquímicos y fisiológicos a través de los cuales el espermatozoide adquiere la habilidad de fertilizar el ovocito. Durante este proceso, las balsas lipídicas migran a la cresta apical de la cabeza del espermatozoide (Boerke *et al.* 2014) y a la región peri-acrosomal (Nixon *et al.* 2011). Las proteínas glicosiladas son redistribuidas en los espermatozoides, sugiriendo que los cambios en la exhibición de estos receptores podrían usarse como indicadores del proceso de capacitación y RA. Logramos aislar las balsas lipídicas de espermatozoides porcinos tanto no capacitados como capacitados e identificar el material DRM –que a menudo está vinculado con esas balsas– en la fracción de baja densidad, como se ha reportado anteriormente (Shadan *et al.* 2004, van Gestel *et al.* 2005).

Aunque el método estándar de purificación de balsas lipídicas es tratar a la célula con Tritón X 100 a 4 °C y recuperar las membranas resistentes a detergentes de una fracción ligera en una centrifugación en un gradiente de densidad, se ha postulado que este procedimiento podría remodelar la membrana original, de tal modo que el colesterol y los glicoesfingolípidos se relocalicen en nuevas estructuras que no existían en la membrana original. Esto se evitó empleando procedimientos alternativos de preparación de balsas lipídicas, sin utilizar detergentes, con resultados similares a la purificación con éstos últimos (Pilch *et al.* 2007). Una propiedad de las balsas lipídicas es su habilidad para reclutar proteínas específicas, tanto transmembranales como unidas a la membrana, ancladas a glicofosfolípidos o proteínas modificadas con cadenas acil-lipídicas o combinaciones de las anteriores (Anderson 1998). Además,

pueden contener proteínas específicas que se mantienen unidas al microdominio y tienen menos fluidez que las que están en el resto de la membrana celular. IZUMO, en espermatozoides intactos, se localiza en la porción dorsal de la cabeza del espermatozoide y después de la RA migra a lo largo de toda la cabeza del espermatozoide reaccionado, alcanzando áreas post y para acrosomales, mientras que la flotilina 2 migra sólo a la región ecuatorial (Miranda *et al.* 2009). El glicogangliósido GM3, inicialmente localizado en la región ecuatorial de espermatozoides no reaccionados, también desaparece después de la RA y se especula que su desaparición debe suceder para que el espermatozoide adquiera la capacidad de fusionarse con el óvulo (Miranda *et al.* 2009). Es claro que reacomodos en las membranas y en las balsas lipídicas ocurren en el espermatozoide, durante la capacitación y la RA, los cuales juegan un papel esencial para que suceda la fusión con el óvulo. En espermatozoides de ratón y de cobayo, está presente la caveolina 1 (CAV1) en la membrana plasmática rodeando la región acrosomal y el flagelo (Travis *et al.* 2001, Trevino *et al.* 2001).

En el presente estudio, encontramos proteínas asociadas con balsas lipídicas en espermatozoides tanto no capacitados como capacitados, un resultado acorde con hallazgos anteriores en espermatozoides porcinos (van Gestel *et al.* 2005) y humanos (Nixon *et al.* 2011). Sin embargo, este resultado es controvertido a la luz de lo que sucede en ratones donde, después de la capacitación ocurre una pérdida total de las proteínas asociadas con las balsas lipídicas (Sleight *et al.* 2005). Por lo tanto, se piensa que estas balsas se desasocian durante la capacitación de los espermatozoides en el

modelo murino (Sleight *et al.* 2005) y otras especies (Selvaraj *et al.* 2006, Selvaraj *et al.* 2007, Asano *et al.* 2009, Nixon y Aitken 2009).

Algunas de las proteínas identificadas no son de la membrana plasmática, tales como SUCLA2 y HSP60, aunque se ha reportado que las balsas lipídicas no se restringen a la membrana plasmática. De hecho, los microdominios lipídicos se forman en orgánulos subcelulares, incluidos el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, y la mitocondria (llamados microdominios tipo balsa) (Watanabe y Kondoh 2011, Garofalo *et al.* 2015). La proteína PRDX5 mitocondrial identificada en p15 ha sido reportado anteriormente en las balsas lipídicas de espermatozoides porcinos (van Gestel *et al.* 2005). Identificamos estas tres proteínas mitocondriales asociadas a DRM. No consideramos sorprendente este hallazgo al recordar que los espermatozoides porcinos requieren de las mitocondrias para realizar funciones tan importantes como la movilidad (Nesci *et al.* 2020).

Además, HSP60 ha sido encontrado en la superficie de los espermatozoides murinos, y está involucrada en el reconocimiento de la zona pelúcida (ZP) (Asquith *et al.* 2004). Se identificaron PGK2 y AK1 en vesículas de la membrana plasmática anterior de la cabeza (AHPM) de los espermatozoides porcinos capacitados y no capacitados (Kongmanas *et al.* 2015). La proteína MDH1 es una enzima citoplasmática que, hasta la fecha, no ha sido asociado con las balsas lipídicas. La extracción de las balsas lipídicas es un procedimiento complejo, y parece que esta proteína podría purificarse con las balsas al unirse a proteínas N-glicosiladas, o bien al asociarse con microdominios enriquecidos con colesterol-esfingolípidos (Marchand *et al.* 2002). La interacción de proteínas con las balsas lipídicas involucra no sólo a las proteínas

transmembranas o intrínsecas, sino también a las extrínsecas que son citoplasmáticas y dependen de señales que les permiten interactuar con las balsas lipídicas. Esto podría ocurrir porque los compartimentos subcelulares como mitocondrias, autofagosomas, caveolas y lisosomas, son muy dinámicos, con arquitecturas diversas e intrincadas que no siempre se preservan durante los procedimientos de aislamiento de membrana (Minogue y Waugh 2012).

Encontramos además que algunas glicoproteínas permanecen en la fracción de las balsas lipídicas después de la capacitación. La O-glicosilación de algunas proteínas aumentó considerablemente, y la N-glicosilación de otras proteínas disminuyó drásticamente. Estos resultados nos permiten asumir que las proteínas que permanecen en la DRM o en la fracción de las balsas lipídicas deben estar involucradas en eventos subsiguientes del proceso de fertilización.

Los residuos de carbohidratos juegan un papel importante en la regulación del reconocimiento célula-célula y la activación de los receptores de superficie de la membrana plasmática que desencadenan varias vías de transducción de señales, acorde al tipo de célula. En los gametos masculinos de varias especies, las cadenas glicosídicas de las proteínas de membrana, en particular, están involucradas en la adhesión de los espermatozoides al oviducto, en el reconocimiento, en la fusión del espermatozoide con el ovocito, y en la implantación del embrión (Wassarman y Litscher 2001). Las lectinas que utilizamos se unen a los carbohidratos que participan significativamente en los procesos que permiten a los espermatozoides adquirir su capacidad de fertilizar, y en el reconocimiento entre gametos. Luego, nos enfocamos en las bandas proteínicas que presentaron cambios en su glicosilación durante la

capacitación. En algunos casos, encontramos la misma proteína en bandas de pesos moleculares aparentemente diferentes, como lactadherina (en p45, p36, p34 y p24) y ZPBP1 (en p36, p24 y p18). Esto podría resultar de diferencias en la ocupación del sitio de glicosilación y/o variaciones en las estructuras de la cadena de glicano que incide en la tasa de migración en el gel, como se ha descrito anteriormente para otras células (Ducolomb *et al.* 2013). Además, dado que varias proteínas fueron identificadas en cada banda, no es posible determinar la contribución de cada glicoproteína a las diferencias en la detección de lectina que observamos entre los espermatozoides capacitados y no capacitados.

Demostramos que varias proteínas glicosiladas con residuos Gal y Man permanecen después de la capacitación y que otras aumentan; por ejemplo, SPAM-1 y MFGE8 que encontramos en p64 y AQN3 en la banda p18. Esta banda contiene proteínas que participan en la adhesión y unión con la ZP del ovocito. Estas glicoproteínas están relacionadas con la unión del espermatozoide al ovocito, y se encontraron en las vesículas AHPM de los espermatozoides porcinos (Day *et al.* 2002, Kongmanas *et al.* 2015). Es interesante notar que varios estudios subrayan la importancia en estos procesos de carbohidratos y enzimas modificadoras de glicanos. De hecho, los residuos Gal participan en la interacción espermatozoide-oviducto en el puerco (Green *et al.* 2001), mientras que los residuos Man son esenciales para la unión óvulo-esperma en bovinos (Amari *et al.* 2001). En los ratones, la galactosiltransferasa está vinculada con la RA y se reubica en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide mediante exocitosis acrosomal (Nixon *et al.* 2001). Además, en humanos, se llegó a utilizar a finales del siglo pasado (1990) el marcaje con PNA para determinar el estatus

acrosomal del espermatozoide (Mortimer *et al.* 1990), así como en un estudio en 2007 por Esteves y colaboradores (Esteves *et al.* 2007). La expresión de tACE en la superficie celular depende de las características funcionales y morfológicas de los espermatozoides (Aleksinskaya *et al.* 2006) y es importante para el transporte a través del oviducto y en la unión con la ZP (Hagaman *et al.* 1998). Identificamos tACE en la banda p64 que dio señales para residuos Man, GlcNAc, y NeuAc, de acuerdo con su N-glicosilación, descrita anteriormente en humanos (Yu *et al.* 1997), y con su caracterización en las vesículas AHPM de los espermatozoides porcinos (Kongmanas *et al.* 2015).

En humanos, los residuos GlcNAc/NeuAc reconocidos por WGA cubren la superficie de la membrana plasmática de los espermatozoides y decrecen después de la RA (Fierro *et al.* 1996). En puercos, estos residuos disminuyeron considerablemente después de la capacitación y la RA (Jiménez *et al.* 2003). En el presente estudio, observamos que algunas de las proteínas glicosiladas con GlcNAc en los microdominios lipídicos se conservan después de la capacitación; lo que sugiere que quizá sean requeridas para la RA y durante el proceso de fertilización. Otros autores han encontrado que la distribución y concentración de los receptores a WGA están asociados directamente con la fertilidad masculina y que disminuyen en muestras de semen que tienen anomalías morfológicas (Lassalle y Testart 1994).

También encontramos que algunas de las glicoproteínas sialiladas en las balsas lipídicas de los espermatozoides porcinos aumentaron después de la capacitación, pero otras disminuyeron. Además, identificamos glicoproteínas cuya sialilación es potencialmente regulada durante la capacitación de esos espermatozoides. Las

glicoproteínas sialiladas fueron detectadas anteriormente en la superficie de espermatozoides humanos móviles (Lassalle y Testart 1994). La sialilación de los glicoconjugados contribuye a la carga negativa que los espermatozoides adquieren durante la maduración epididimaria y juega un papel dual en la maduración y fertilización del esperma. De hecho, los sialoglicoconjugados de superficie de los espermatozoides pueden ayudar en la unión de las crestas oviductales al proteger, o enmascarar, otras proteínas de membrana que quizá tengan un papel en el reconocimiento espermatozoide-ovocito durante la capacitación. Por ejemplo, los residuos NeuAc de los espermatozoides del gallo se correlacionan con la habilidad de atravesar la vagina y ser secuestrados después, en el tracto reproductivo de la gallina (Froman y Engel 1989). Además, NeuAc puede proteger la superficie de los espermatozoides del reconocimiento inmune durante la capacitación (Lassalle y Testart 1994).

Del mismo modo, identificamos a las proteínas SPMI, pB1, PSP-I, AQN3 y AWN, todas ellas pertenecientes a la familia espermadhesina, así como ACR, ACRBP, ZPBP1 y MFGE8 que participan en las interacciones esperma-ovocito. La mayoría de estas proteínas fueron caracterizadas anteriormente en las vesículas AHPM del esperma porcino capacitado y no capacitado (Kongmanas *et al.* 2015). Su presencia en la DRM asociada con la capacitación en las balsas lipídicas del esperma porcino soporta la noción de que están, efectivamente, asociadas con las balsas para participar en el reconocimiento inicial esperma-ZP. Las espermadhesinas están presentes en la superficie de los espermatozoides y constituyen el componente más grande del plasma seminal. La mayoría desaparece durante la capacitación, pero las que persisten en la

superficie de los espermatozoides capacitados participan en la unión a la ZP (Topfer-Petersen *et al.* 1998), mientras que la espermadhesina AQN1 tiene un papel en la formación de la reserva de espermatozoides oviductales (Ekhlesi-Hundrieser *et al.* 2005). La proteína precursora AQN3 del inhibidor de la motilidad de los espermatozoides del plasma seminal se ha reportado en las balsas lipídicas de los espermatozoides porcinos (van Gestel *et al.* 2005), pero ningún reporte anterior menciona su glicosilación. Nuestros resultados sugieren que la AQN3 podría ser N- y O-glicosilada. La espermadhesina PSP-I desencadena el reclutamiento de las células inmunes después del apareamiento, para iniciar una cascada de eventos inmunológicos (Rodríguez-Martínez *et al.* 2010). Además, mostramos por primera vez que PSP-I y la proteína plasmática seminal pB1 probablemente están asociadas con las balsas lipídicas de los espermatozoides porcinos.

Kongmanas *et al.* (2015) reportaron que una fracción de las proteínas de unión a la ZP acrosómicas abundaban en el espermatozoide capacitado y mostraron que la zonadhesina, proacrosina/acrosina y ACRBP fueron transportadas a la superficie de la membrana plasmática del esperma vivo con acrosoma intacto durante la capacitación. Al interactuar, pueden transitar en forma de un complejo desde el acrosoma hasta la superficie del esperma. La adquisición de la habilidad de adherir a la ZP es un proceso complejo que ocurre en eventos de maduración post-testicular. Una hipótesis sostiene que ciertos receptores del espermatozoide podrían requerir un ensamble activo y/o presentación en la forma de un complejo dinámico de reconocimiento de la zona pelúcida (Nixon *et al.* 2005, Reid *et al.* 2011).

Con respecto a las glicoproteínas que mostraron cambios durante la criopreservación, tenemos que en la banda de 145 kDa, al realizar los ensayos con la lectina PNA, no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre PRNC y PRCr, pero al utilizar DSA sí se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Eso quiere decir que los residuos de galactosa no se están modificando después de la criopreservación, pero sí los de GlcNAc, lo que nos da idea de su importancia ya que la calidad espermática disminuye de manera importante después de ese proceso. En p45, donde se identificó a PGK2, SUCLA2 y ADAM5, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre PRCr y PRC, al realizar los ensayos con la lectina DSA, es decir, con respecto a los residuos de GlcNAc, las glicoproteínas con estos residuos de carbohidratos se están modificando de manera similar en estas dos condiciones, lo cual podría estar indicando que el proceso de criopreservación induce parcialmente la capacitación o se comporta como si estuviera induciendo la capacitación. Es interesante resaltar que todos los valores de densidad óptica de las glicoproteínas de balsas lipídicas de espermatozoides criopreservados son menores a los de los no capacitados, lo cual podría estar reflejando una alteración de manera general de los residuos de carbohidratos reconocidos por estas lectinas, a saber: galactosa con DSA, ácido siálico con SNA, manosa con GNA y GlcNAc con DSA o simplemente reflejar que su proporción es menor en la mezcla de proteínas de los espermatozoides no capacitados.

Así, el estudio de los carbohidratos y glicoproteínas expresados en espermatozoides, que participan en los procesos del reconocimiento de gametos es un tópico que precisa de estudiarse con profundidad.

Por otra parte, se encontraron 5 patrones de fluorescencia de CTX-FITC para GM1 en la membrana de espermatozoides de cerdo, tres de ellos, A, B y C, se presentaron en los espermatozoides no capacitados, capacitados y criopreservados. El patrón A, que presentó fluorescencia en el flagelo y cabeza, se observó principalmente en los espermatozoides no capacitados (88.7%), seguido de los criopreservados (57.8%), lo que podría dar la idea de que la criopreservación afecta la distribución de las balsas lipídicas, pues al compararlos se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$), ya que GM1 es un marcador de estos dominios lipídicos. Sin embargo, al observar el patrón B, que presentó fluorescencia intensa en la cabeza y débil en el flagelo, vemos que se presentó mayormente en los espermatozoides capacitados (22.7%) seguido por los criopreservados (13.9%), en contraste con los no capacitados, en donde apenas se observó este patrón (6.3%), lo cual sugiere, que los espermatozoides después de criopreservarse adoptan algunas cualidades parecidas a la capacitación, como es la distribución de balsas lipídicas. Algo parecido ocurrió en el patrón C, fluorescencia sólo en la cabeza, que se observó principalmente en los capacitados (71.8%), seguido por los criopreservados (17.1%) y mínimamente en los no capacitados (5%). Con los otros dos patrones, B1, fluorescencia en la región apical, post acrosomal y débil en el flagelo, así como el patrón D, fluorescencia en la región post acrosomal y pieza media, vemos que hay una desorganización de las balsas lipídicas en un porcentaje pequeño de espermatozoides criopreservados (1.7 y 9.5 respectivamente). Nuestros resultados permiten visualizar que GM1, en espermatozoides no capacitados, se encuentra localizado en el flagelo, cuando ocurre la capacitación migran a la cabeza del espermatozoide, lo cual concuerda con resultados realizados en otros estudios en espermatozoides de cerdo (Shadan *et al.*

2004, Bou Khalil *et al.* 2006). Por otro lado, las muestras que presentaron mayor cantidad de colesterol en los espermatozoides fueron las de espermatozoides no capacitados, con $183.6 \pm 15.2 \mu\text{g/ml}$. Se observó una pérdida importante en los espermatozoides capacitados, ya que la concentración de colesterol en el medio de capacitación fue mayor ($349.5 \mu\text{g/ml}$) que en los espermatozoides ($147.6 \mu\text{g/ml}$), estos datos están de acuerdo con lo reportado por otros investigadores (Shadan *et al.* 2004, Colas 2013). Por otra parte, la pérdida de colesterol en los criopreservados fue dramática, pues prácticamente todo el colesterol se detectó únicamente en el medio de criopreservación ($487.9 \mu\text{g/ml}$). La pérdida excesiva de colesterol se ha relacionado con una desestabilización de las balsas lipídicas, pues se pierden proteínas (Shadan *et al.* 2004), además se ha demostrado que el colesterol en los microdominios lipídicos juega un papel importante en la regulación de procesos fisiológicos, por ejemplo, en canales iónicos (Lam *et al.* 2004). Así pues, nuestros resultados permiten tener una idea del por qué, con la criopreservación, disminuyen notablemente algunos parámetros de la calidad espermática, tales como la viabilidad y movilidad, que además ya se ha postulado puede deberse a una desorganización de los lípidos de la membrana (Guthrie y Welch 2005), los cuales son vulnerables a especies reactivas de oxígeno promotoras de estrés oxidante (Wathes *et al.* 2007) y factores como el óxido nítrico, el cual es necesario para la movilidad (Lewis *et al.* 1996, Donnelly *et al.* 1997).

Conclusiones

1. De acuerdo con el marcaje con GM1, las balsas lipídicas se redistribuyeron durante la capacitación espermática. Se desplazaron del flagelo hacia la cabeza del espermatozoide.
2. Las glicoproteínas asociadas con balsas lipídicas aumentaron en PRC, las glicosiladas con NueAc, Gal, Man y GlcNAc, y disminuyeron en los PRCr, de acuerdo con lo observado en los ensayos con lectinas.
3. Se identificaron 20 proteínas, glicadas o potencialmente glicadas en balsas lipídicas.
4. Quince de ellas no habían sido reportadas en espermatozoides de cerdo.
5. Los espermatozoides criopreservados perdieron completamente el colesterol.

Literatura Citada

- Ackermann, F., N. Zitranski, D. Heydecke, B. Wilhelm, T. Gudermann y I. Boekhoff (2008). "The Multi-PDZ domain protein MUPP1 as a lipid raft-associated scaffolding protein controlling the acrosome reaction in mammalian spermatozoa." J Cell Physiol **214**(3): 757-768.
- Aleksinskaya, M.A., M.A. Nikolaeva, S.M. Danilov, O.S. Elistratova y G.T. Sukhikh (2006). "Quantitative study of testicular angiotensin-converting enzyme on the surface of human spermatozoa." Bull Exp Biol Med **141**(1): 36-39.
- Amari, S., N. Yonezawa, S. Mitsui, T. Katsumata, S. Hamano, M. Kuwayama, Y. Hashimoto, A. Suzuki, Y. Takeda y M. Nakano (2001). "Essential role of the nonreducing terminal alpha-mannosyl residues of the N-linked carbohydrate chain of bovine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding." Mol Reprod Dev **59**(2): 221-226.
- Anderson, R.G. (1998). "The caveolae membrane system." Annu Rev Biochem **67**: 199-225.
- Arnoult, C., I.G. Kazam, P.E. Visconti, G.S. Kopf, M. Villaz y H.M. Florman (1999). "Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6757-6762.
- Asano, A., V. Selvaraj, D.E. Buttke, J.L. Nelson, K.M. Green, J.E. Evans y A.J. Travis (2009). "Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct sub-types of membrane rafts." J Cell Physiol **218**(3): 537-548.

- Asquith, K.L., R.M. Baleato, E.A. McLaughlin, B. Nixon y R.J. Aitken (2004). "Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm-zona recognition." J Cell Sci **117**(Pt 16): 3645-3657.
- Baba, T., Y. Niida, Y. Michikawa, S. Kashiwabara, K. Kodaira, M. Takenaka, N. Kohno, G.L. Gerton y Y. Arai (1994). "An acrosomal protein, sp32, in mammalian sperm is a binding protein specific for two proacrosins and an acrosin intermediate." J Biol Chem **269**(13): 10133-10140.
- Bailey, J.L., C. Lessard, J. Jacques, C. Breque, I. Dobrinski, W. Zeng y H.L. Galantino-Homer (2008). "Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry." Theriogenology **70**(8): 1251-1259.
- Baron, S., P. Vangheluwe, M.R. Sepulveda, F. Wuytack, L. Raeymaekers y J. Vanoevelen (2010). "The secretory pathway Ca(2+)-ATPase 1 is associated with cholesterol-rich microdomains of human colon adenocarcinoma cells." Biochim Biophys Acta.
- Bavister, B., M. Leibfried y G. Lieberman (1983). "Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium." Biol Reprod **28**(1): 235-247.
- Boerke, A., P.S. Tsai, N. Garcia-Gil, I.A. Brewis y B.M. Gadella (2008). "Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction." Theriogenology **70**(8): 1188-1196.
- Boerke, A., J. van der Lit, F. Lolicato, T.A. Stout, J.B. Helms y B.M. Gadella (2014). "Removal of GPI-anchored membrane proteins causes clustering of lipid

- microdomains in the apical head area of porcine sperm." Theriogenology **81**(4): 613-624.
- Bou Khalil, M., K. Chakrabandhu, H. Xu, W. Weerachatanukul, M. Buhr, T. Berger, E. Carmona, N. Vuong, P. Kumarathanan, P.T. Wong, D. Carrier y N. Tanphaichitr (2006). "Sperm capacitation induces an increase in lipid rafts having zona pellucida binding ability and containing sulfogalactosylglycerolipid." Dev Biol **290**(1): 220-235.
- Breininger, E., P.D. Cetica y M.T. Beconi (2010). "Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm." Theriogenology **74**(6): 1036-1049.
- Brown, D. y E. London (1998a). "Function of lipid rafts in biological membrane." Annu Rev Cell Dev Biol **14**: 111-136.
- Brown, D.A. y E. London (1998b). "Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes." J Membr Biol **164**(2): 103-114.
- Carvajal, G., C. Cuello, M. Ruiz, J.M. Vazquez, E.A. Martinez y J. Roca (2004). "Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival." J Androl **25**(3): 389-396.
- Chapman, A.D., A. Cortes, T.R. Dafforn, A.R. Clarke y R.L. Brady (1999). "Structural basis of substrate specificity in malate dehydrogenases: crystal structure of a ternary complex of porcine cytoplasmic malate dehydrogenase, alpha-ketomalonate and tetrahydroNAD." J Mol Biol **285**(2): 703-712.
- Chen, K., C. Knorr, G. Moser, K. Gatphayak y B. Brenig (2004). "Molecular characterization of the porcine testis-specific phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) gene and its association with male fertility." Mamm Genome **15**(12): 996-1006.

- Colas, C. (2013). "Remodelling of Lipid Rafts during In vitro Capacitation and Acrosome Reaction of Ram Spermatozoa." Biochemistry & Analytical Biochemistry **02**(02).
- Conejo-Nava, J., R. Fierro, C.G. Gutierrez y M. Betancourt (2003). "Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C." Arch Androl **49**(4): 287-295.
- Cross, N.L. (1996). "Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness." Mol Reprod Dev **45**(2): 212-217.
- Cross, N.L. (2003). "Decrease in order of human sperm lipids during capacitation." Biol Reprod **69**(2): 529-534.
- Cross, N.L. (2004). "Reorganization of lipid rafts during capacitation of human sperm." Biol Reprod **71**(4): 1367-1373.
- Darin-Bennett, A. y I.G. White (1977). "Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock." Cryobiology **14**(4): 466-470.
- Davis, B.K. (1981). "Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7560-7564.
- Davis, B.K., R. Byrne y K. Bedigian (1980). "Studies on the mechanism of capacitation: albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(3): 1546-1550.
- Davis, B.K., R. Byrne y B. Hungund (1979). "Studies on the mechanism of capacitation. II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation in vitro." Biochim Biophys Acta **558**(3): 257-266.

- Day, A.E., C.R. Quilter, C.A. Sargent y A.J. Mileham (2002). "Characterization of the porcine sperm adhesion molecule gene SPAM1- expression analysis, genomic structure, and chromosomal mapping." Anim Genet **33**(3): 211-214.
- de Vries, K.J., T. Wiedmer, P.J. Sims y B.M. Gadella (2003). "Caspase-independent exposure of aminophospholipids and tyrosine phosphorylation in bicarbonate responsive human sperm cells." Biol Reprod **68**(6): 2122-2134.
- Domingues, C.C., A. Ciana, A. Buttafava, B.R. Casadei, C. Balduini, E. de Paula y G. Minetti (2010). "Effect of cholesterol depletion and temperature on the isolation of detergent-resistant membranes from human erythrocytes." J Membr Biol **234**(3): 195-205.
- Donnelly, E.T., S.E. Lewis, W. Thompson y U. Chakravarthy (1997). "Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition." Mol Hum Reprod **3**(9): 755-762.
- Ducolomb, Y., H. Gonzalez-Marquez, R. Fierro, I. Jimenez, E. Casas, D. Flores, E. Bonilla, Z. Salazar y M. Betancourt (2013). "Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization." Theriogenology **79**(6): 896-904.
- Ekhlesi-Hundrieser, M., K. Gohr, A. Wagner, M. Tsoleva, A. Petrunkina y E. Topfer-Petersen (2005). "Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig." Biol Reprod **73**(3): 536-545.
- Ensslin, M., T. Vogel, J.J. Calvete, H.H. Thole, J. Schmidtke, T. Matsuda y E. Topfer-Petersen (1998). "Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar

- sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins." Biol Reprod **58**(4): 1057-1064.
- Esteves, S.C., R.K. Sharma, A.J. Thomas, Jr. y A. Agarwal (2007). "Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test." Int Braz J Urol **33**(3): 364-374.
- Fierro, R., M.C. Bene, B. Foliguet, G.C. Faure y G. Grignon (1998). "Evaluation of human sperm acrosome reaction and viability by flow cytometry." Ital J Anat Embryol **103**(4): 75-84.
- Fierro, R., B. Foliguet, G. Grignon, M. Daniel, M.C. Bene, G.C. Faure y P. Barbarino-Monnier (1996). "Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry." Arch Androl **36**(3): 187-196.
- Flesch, F.M., J.F. Brouwers, P.F. Nievelstein, A.J. Verkleij, L.M. van Golde, B. Colenbrander y B.M. Gadella (2001). "Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane." J Cell Sci **114**(Pt 19): 3543-3555.
- Flesch, F.M. y B.M. Gadella (2000). "Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization." Biochim Biophys Acta **1469**(3): 197-235.
- Florman, H.M., C. Arnoult, I.G. Kazam, C. Li y C.M. O'Toole (1998). "A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels." Biol Reprod **59**(1): 12-16.

- Fraser, L. y E. Herold (1990). "Expression of capacitation-dependent changes in chlortetracycline fluorescence patterns in mouse spermatozoa requires a suitable glycolysable substrate." J Reprod Fertil **88**(2): 611-621.
- Froman, D.P. y H.N. Engel, Jr. (1989). "Alteration of the spermatozoal glycocalyx and its effect on duration of fertility in the fowl (*Gallus domesticus*)." Biol Reprod **40**(3): 615-621.
- Fry, D.C., S.A. Kuby y A.S. Mildvan (1986). "ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(4): 907-911.
- Fujihara, Y., Y. Satouh, N. Inoue, A. Isotani, M. Ikawa y M. Okabe (2012). "SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia." Development **139**(19): 3583-3589.
- Gadella, B.M. y R.A. Harrison (2000). "The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane." Development **127**(11): 2407-2420.
- Gadella, B.M., P.S. Tsai, A. Boerke y I.A. Brewis (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." Int J Dev Biol **52**(5-6): 473-480.
- Garner, D.L. y E. Hafez, S .E. (1993). Spermatozoa and seminal plasma. Reproduction in Farm Animals. E.S.E. Hafez. Philadelphia, Lea & Febiger: 165-187.
- Garofalo, T., V. Manganeli, M. Grasso, V. Mattei, A. Ferri, R. Misasi y M. Sorice (2015). "Role of mitochondrial raft-like microdomains in the regulation of cell apoptosis." Apoptosis **20**(5): 621-634.

- Gibson, N.J., L.P. Tolbert y L.A. Oland (2009). "Roles of specific membrane lipid domains in EGF receptor activation and cell adhesion molecule stabilization in a developing olfactory system." PLoS One **4**(9): e7222.
- Gilmore, J.A., J. Liu, A.T. Peter y J.K. Critser (1998). "Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation." Biol Reprod **58**: 28-36.
- Go, K.J. y D.P. Wolf (1985). "Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation." Biol Reprod **32**(1): 145-153.
- Green, C.E., J. Bredl, W.V. Holt, P.F. Watson y A. Fazeli (2001). "Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro." Reproduction **122**(2): 305-315.
- Gurcel, C., A.S. Vercoutter-Edouart, C. Fonbonne, M. Mortuaire, A. Salvador, J.C. Michalski y J. Lemoine (2008). "Identification of new O-GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging." Anal Bioanal Chem **390**(8): 2089-2097.
- Guthrie, H.D. y G.R. Welch (2005). "Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa." Reprod Fertil Dev **17**(4): 467-477.
- Gylfason, G.A., E. Knutsdottir y B. Asgeirsson (2010). "Isolation and biochemical characterisation of lipid rafts from Atlantic cod (*Gadus morhua*) intestinal enterocytes." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **155**(1): 86-95.
- Haase, B., C. Schlotterer, M.E. Hundrieser, H. Kuiper, O. Distl, E. Topfer-Petersen y T. Leeb (2005). "Evolution of the spermadhesin gene family." Gene **352**: 20-29.
- Hafez, E.S.E. y B. Hafez (2017). Reproduction in farm animals, Wiley-Blackwell.

- Hagaman, J.R., J.S. Moyer, E.S. Bachman, M. Sibony, P.L. Magyar, J.E. Welch, O. Smithies, J.H. Krege y D.A. O'Brien (1998). "Angiotensin-converting enzyme and male fertility." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2552-2557.
- Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade y K. Simons (1998). "Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components." J Cell Biol **141**(4): 929-942.
- Hernandez, M., J. Roca, J.J. Calvete, L. Sanz, T. Muino-Blanco, J.A. Cebrian-Perez, J.M. Vazquez y E.A. Martinez (2007). "Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars." J Androl **28**(5): 689-697.
- Hoessli, D., S. Ilangumaran, A. Soltermann, P. Robinson, B. Borisch y Nasir-Ud-Din (2000). "Signaling through sphingolipid microdomains of the plasma membrane: the concept of signaling platform." J Glycoconj **17**: 191-197.
- Holt, W.V., A. Medrano, L.M. Thurston y P.F. Watson (2005). "The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope." Theriogenology **63**(2): 370-382.
- Iwamoto, T., H. Hiroaki, Y. Furuichi, K. Wada, M. Satoh, T. Osada y C. Gagnon (1995). "Cloning of boar SPMI gene which is expressed specifically in seminal vesicle and codes for a sperm motility inhibitor protein." FEBS Lett **368**(3): 420-424.
- Jaureguiberry, M.S., M.A. Tricerri, S.A. Sanchez, H.A. Garda, G.S. Finarelli, M.C. Gonzalez y O.J. Rimoldi (2010). "Membrane organization and regulation of cellular cholesterol homeostasis." J Membr Biol **234**(3): 183-194.
- Jiménez, I., R. Fierro, H. González-Márquez, G. Mendoza-Hernández, S. Romo y B. M (2006). "Carbohydrate affinity chromatography indicates that Arylsulfatase-A

- from capacitated boar sperm has mannose and N-acetylglucosamine/sialic acid residues." Archives of Andrology **52**(6): 455-462.
- Jiménez, I., H. González-Márquez, R. Ortiz, M. Betancourt, J. Herrera y R. Fierro (2002). "Expression of lectin receptors en the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boar by flow cytometry." Arch Androl **48**: 159-166.
- Jiménez, I., H. González-Márquez, R. Ortiz, J.A. Herrera, A. García, M. Betancourt y R. Fierro (2003). "Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa." Theriogenology **59**: 1171-1180.
- Johnson, J.D., J.G. Mehus, K. Tews, B.I. Milavetz y D.O. Lambeth (1998). "Genetic evidence for the expression of ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in multicellular eucaryotes." J Biol Chem **273**(42): 27580-27586.
- Kabouridis, P.S., J. Janzen, A.L. Magee y S.C. Ley (2000). "Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes." Eur J Immunol **30**(3): 954-963.
- Karp, G. (2006). *Biología celular y molecular*. México, Mc. Graw-Hill: 118-133.
- Kim, H.M., B.H. Jeong, J.Y. Hyon, M.J. An, M.S. Seo, J.H. Hong, K.J. Lee, C.H. Kim, T. Joo, S.C. Hong y B.R. Cho (2008). "Two-photon fluorescent turn-on probe for lipid rafts in live cell and tissue
10.1021/ja711391f [doi]." J Am Chem Soc **130**(13): 4246-4247.
- Knoops, B., A. Clippe, C. Bogard, K. Arsalane, R. Wattiez, C. Hermans, E. Duconseille, P. Falmagne y A. Bernard (1999). "Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family." J Biol Chem **274**(43): 30451-30458.

- Kongmanas, K., H. Kruevaisayawan, A. Saewu, C. Sugeng, J. Fernandes, P. Souda, J.B. Angel, K.F. Faull, R.J. Aitken, J. Whitelegge, D. Hardy, T. Berger, M.A. Baker y N. Tanphaichitr (2015). "Proteomic Characterization of Pig Sperm Anterior Head Plasma Membrane Reveals Roles of Acrosomal Proteins in ZP3 Binding." J Cell Physiol **230**(2): 449-463.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**: 680-685.
- Lam, R.S., A.R. Shaw y M. Duszyk (2004). "Membrane cholesterol content modulates activation of BK channels in colonic epithelia." Biochim Biophys Acta **1667**(2): 241-248.
- Lassalle, B. y J. Testart (1994). "Human zona pellucida recognition associated with removal of sialic acid from human sperm surface." J Reprod Fertil **101**(3): 703-711.
- Lay, K.M., K. Ashizawa, T. Nakada y H. Tatemoto (2011a). "N-glycosylation of zona glycoproteins during meiotic maturation is involved in sperm-zona pellucida interactions of porcine oocytes." Theriogenology **75**(6): 1146-1152.
- Lay, K.M., R. Oshiro, C. Arasaki, K. Ashizawa y H. Tatemoto (2011b). "Role of acidification elicited by sialylation and sulfation of zona glycoproteins during oocyte maturation in porcine sperm-zona pellucida interactions." J Reprod Dev **57**(6): 744-751.
- Lewis, S.E., E.T. Donnelly, E.S. Sterling, M.S. Kennedy, W. Thompson y U. Chakravarthy (1996). "Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility." Mol Hum Reprod **2**(11): 873-878.

- Loeser, C.R. y D.R. Tulsiani (1999). "The role of carbohydrates in the induction of the acrosome reaction in mouse spermatozoa." Biol Reprod **60**(1): 94-101.
- López-Salguero, J.B., R. Fierro, J.C. Michalski, I. Jiménez-Morales, T. Lefebvre, O. Mondragón-Payne, S.F. Baldini, A.S. Vercoutter-Edouart y H. González-Márquez (2020). "Identification of lipid raft glycoproteins obtained from boar spermatozoa." Glycoconj J **37**(4): 499-509.
- Marchand, S., A. Devillers-Thiery, S. Pons, J.P. Changeux y J. Cartaud (2002). "Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts." J Neurosci **22**(20): 8891-8901.
- Martin, G., N. Cagnon, O. Sabido, B. Sion, G. Grizard, P. Durand y R. Levy (2007). "Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa." Hum Reprod **22**(2): 380-388.
- Miller, D.J. y R.L. Ax (1990). "Carbohydrates and fertilization in animals." Mol Reprod Dev **26**(2): 184-198.
- Minogue, S. y M.G. Waugh (2012). "Lipid rafts, microdomain heterogeneity and inter-organelle contacts: Impacts on membrane preparation for proteomic studies." Biology of the Cell **104**(10): 618-627.
- Miranda, P.V., A. Allaire, J. Sosnik y P.E. Visconti (2009). "Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm." Biol Reprod **80**(5): 897-904.
- Monier, S., R.G. Parton, F. Vogel, J. Behlke, A. Henske y T.V. Kurzchalia (1995). "VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro." Mol Biol Cell **6**(7): 911-927.

- Mori, E., H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, T. Mori y S. Takasaki (2011). "Purification of N-acetyllactosamine-binding activity from the porcine sperm membrane: possible involvement of an ADAM complex in the carbohydrate-binding activity of sperm." J Reprod Dev **58**(1): 117-125.
- Mori, E., S. Kashiwabara, T. Baba, Y. Inagaki y T. Mori (1995). "Amino acid sequences of porcine Sp38 and proacrosin required for binding to the zona pellucida." Dev Biol **168**(2): 575-583.
- Morrissey, J.H. (1981). "Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity." Anal Biochem **117**(2): 307-310.
- Mortimer, D., E.F. Curtis y A.R. Camenzind (1990). "Combined use of fluorescent peanut agglutinin lectin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa." Hum Reprod **5**(1): 99-103.
- Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T.V. Kurzchalia y K. Simons (1995). "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10339-10343.
- Naz, R.K. y P.B. Rajesh (2004). "Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction." Reprod Biol Endocrinol **2**: 75.
- Nelson, W.J. y E. Rodriguez-Boulan (2004). "Unravelling protein sorting." Nat Cell Biol **6**(4): 282-284.
- Nesci, S., M. Spinaci, G. Galeati, C. Nerozzi, A. Pagliarani, C. Algieri, C. Tamanini y D. Bucci (2020). "Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism." Theriogenology **144**: 82-88.
- Nixon, B. y R.J. Aitken (2009). "The biological significance of detergent-resistant membranes in spermatozoa." J Reprod Immunol **83**(1-2): 8-13.

- Nixon, B., K.L. Asquith y R. John Aitken (2005). "The role of molecular chaperones in mouse sperm-egg interactions." Mol Cell Endocrinol **240**(1-2): 1-10.
- Nixon, B., Q. Lu, M.J. Wassler, C.I. Foote, M.A. Ensslin y B.D. Shur (2001). "Galactosyltransferase function during mammalian fertilization." Cells Tissues Organs **168**(1-2): 46-57.
- Nixon, B., L.A. Mitchell, A.L. Anderson, E.A. McLaughlin, K. O'Bryan M y R.J. Aitken (2011). "Proteomic and functional analysis of human sperm detergent resistant membranes." J Cell Physiol **226**(10): 2651-2665.
- Ostrom, R.S., R.A. Bunday y P.A. Insel (2004). "Nitric oxide inhibition of adenylyl cyclase type 6 activity is dependent upon lipid rafts and caveolin signaling complexes." J Biol Chem **279**(19): 19846-19853.
- Pesch, S. y M. Bergmann (2006). "Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation." Micron **37**(7): 597-612.
- Peterson, G.L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem **83**(2): 346-356.
- Petters, R.M. (1994). "Transgenic livestock as genetic models of human disease." Reprod Fertil Dev **6**(5): 643-645.
- Pike, L.J. (2003). "Lipid rafts: bringing order to chaos." J Lipid Res **44**(4): 655-667.
- Pike, L.J. (2006). "Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function." J Lipid Res **47**(7): 1597-1598.
- Pilch, P.F., R.P. Souto, L. Liu, M.P. Jedrychowski, E.A. Berg, C.E. Costello y S.P. Gygi (2007). "Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae." J Lipid Res **48**(10): 2103-2111.

- Pinaud, F., X. Michalet, G. Iyer, E. Margeat, H.P. Moore y S. Weiss (2009). "Dynamic partitioning of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-rich microdomains imaged by single-quantum dot tracking." Traffic **10**(6): 691-712.
- Plucienniczak, G., A. Jagiello, A. Plucienniczak, D. Holody y J. Strzezek (1999). "Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma." Mol Reprod Dev **52**(3): 303-309.
- Primakoff, P., H. Hyatt y D.G. Myles (1985). "A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida." J Cell Biol **101**(6): 2239-2244.
- Reid, A.T., K. Redgrove, R.J. Aitken y B. Nixon (2011). "Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction." Asian J Androl **13**(1): 88-96.
- Rodgers, W. y J.K. Rose (1996). "Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1515-1523.
- Rodriguez-Martinez, H., F. Saravia, M. Wallgren, E.A. Martinez, L. Sanz, J. Roca, J.M. Vazquez y J.J. Calvete (2010). "Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow." J Reprod Immunol **84**(1): 57-65.
- Romero-Calvo, I., B. Ocon, P. Martinez-Moya, M.D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin y F.S. de Medina (2010). "Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots." Anal Biochem **401**(2): 318-320.

- Roy, S., R. Luetterforst, A. Harding, A. Apolloni, M. Etheridge, E. Stang, B. Rolls, J.F. Hancock y R.G. Parton (1999). "Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains." Nat Cell Biol **1**(2): 98-105.
- Sancho, S., I. Casas, H. Ekwall, F. Saravia, H. Rodriguez-Martinez, J.E. Rodriguez-Gil, E. Flores, E. Pinart, M. Briz, N. Garcia-Gil, J. Bassols, A. Pruneda, E. Bussalleu, M. Yeste y S. Bonet (2007). "Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of sperm membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs." Reproduction **134**(1): 111-121.
- Sanz, L., J.J. Calvete, K. Mann, W. Schafer, E.R. Schmid, W. Amselgruber, F. Sinowatz, M. Ehrhard y E. Topfer-Petersen (1992). "The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida-binding protein isolated from boar spermatozoa." FEBS Lett **300**(3): 213-218.
- Sanz, L., J.J. Calvete, K. Mann, W. Schafer, E.R. Schmid y E. Topfer-Petersen (1991). "The amino acid sequence of AQN-3, a carbohydrate-binding protein isolated from boar sperm. Location of disulphide bridges." FEBS Lett **291**(1): 33-36.
- Sargiacomo, M., P.E. Scherer, Z. Tang, E. Kubler, K.S. Song, M.C. Sanders y M.P. Lisanti (1995). "Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9407-9411.
- Scheiffele, P., P. Verkade, A.M. Fra, H. Virta, K. Simons y E. Ikonen (1998). "Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells." J Cell Biol **140**(4): 795-806.
- Schroeder, F., H. Huang, A.L. McIntosh, B.P. Atshaves, G.G. Martin y A.B. Kier (2010). "Caveolin, sterol carrier protein-2, membrane cholesterol-rich microdomains and intracellular cholesterol trafficking." Subcell Biochem **51**: 279-318.

- Schroeder, R.J., S.N. Ahmed, Y. Zhu, E. London y D.A. Brown (1998). "Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains." J Biol Chem **273**(2): 1150-1157.
- Schuck, S., M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko y K. Simons (2003). "Resistance of cell membranes to different detergents." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5795-5800.
- Selvaraj, V., A. Asano, D.E. Buttke, J.L. McElwee, J.L. Nelson, C.A. Wolff, T. Merdushev, M.W. Fornes, A.W. Cohen, M.P. Lisanti, G.H. Rothblat, G.S. Kopf y A.J. Travis (2006). "Segregation of micron-scale membrane sub-domains in live murine sperm." J Cell Physiol **206**(3): 636-646.
- Selvaraj, V., D.E. Buttke, A. Asano, J.L. McElwee, C.A. Wolff, J.L. Nelson, A.V. Klaus, G.R. Hunnicutt y A.J. Travis (2007). "GM1 dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa." J Androl **28**(4): 588-599.
- Shadan, S., P.S. James, E.A. Howes y R. Jones (2004). "Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa." Biol Reprod **71**(1): 253-265.
- Simons, K. y R. Ehehalt (2002). "Cholesterol, lipid rafts, and disease." J Clin Invest **110**(5): 597-603.
- Simons, K. y E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-572.

- Simons, K. y E. Ikonen (2000). "How cells handle cholesterol." Science **290**(5497): 1721-1726.
- Singer, S. y G. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(23): 720-731.
- Sleight, S.B., P.V. Miranda, N.W. Plaskett, B. Maier, J. Lysiak, H. Scoble, J.C. Herr y P.E. Visconti (2005). "Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation." Biol Reprod **73**(4): 721-729.
- Somerharju, P., J.A. Virtanen, K.H. Cheng y M. Hermansson (2009). "The superlattice model of lateral organization of membranes and its implications on membrane lipid homeostasis." Biochim Biophys Acta **1788**(1): 12-23.
- Sonnino, S., A. Prinetti, H. Nakayama, M. Yangida, H. Ogawa y K. Iwabuchi (2008). "Role of very long fatty acid-containing glycosphingolipids in membrane organization and cell signaling: the model of lactosylceramide in neutrophils 10.1007/s10719-008-9215-8 [doi]." Glycoconj J.
- Sousa, A.P., C.S. Gomes-Santos y J. Ramalho-Santos (2006). "Localization of SNAREs, NSF and Caveolin 1 in human spermatozoa: relationship with seminal parameters." Arch Androl **52**(5): 347-353.
- Stan, R.V. (2005). "Structure of caveolae." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 334-348.
- Suarez, S.S. (1996). "Hyperactivated motility in sperm." J Androl **17**(4): 331-335.
- Suzuki, F. y R. Yanagimachi (1989). "Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-reactive membrane sterols during in vitro capacitation of golden hamster spermatozoa." Gamete Res **23**(3): 335-347.

- Topfer-Petersen, E., M. Ekhlesi-Hundrieser y M. Tsoleva (2008). "Glycobiology of fertilization in the pig." Int J Dev Biol **52**(5-6): 717-736.
- Topfer-Petersen, E. y A. Henschen (1987). "Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase." FEBS Lett **226**(1): 38-42.
- Topfer-Petersen, E., A. Romero, P.F. Varela, M. Ekhlesi-Hundrieser, Z. Dostalova, L. Sanz y J.J. Calvete (1998). "Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives." Andrologia **30**(4-5): 217-224.
- Travis, A.J., T. Merdiushev, L.A. Vargas, B.H. Jones, M.A. Purdon, R.W. Nipper, J. Galatioto, S.B. Moss, G.R. Hunnicutt y G.S. Kopf (2001). "Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa." Dev Biol **240**(2): 599-610.
- Trevino, C.L., C.J. Serrano, C. Beltran, R. Felix y A. Darszon (2001). "Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm." FEBS Lett **509**(1): 119-125.
- Tulsiani, D.R., Y.H. Komiya y Y. Araki (1997). "Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event." Biol Reprod **57**(3): 487-494.
- van Gestel, R.A., I.A. Brewis, P.R. Ashton, J.B. Helms, J.F. Brouwers y B.M. Gadella (2005). "Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells." Mol Hum Reprod **11**(8): 583-590.
- Vassilieva, E.V., A.I. Ivanov y A. Nusrat (2009). "Flotillin-1 stabilizes caveolin-1 in intestinal epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **379**(2): 460-465.
- Vercoutter-Edouart, A.S., M.C. Slomianny, O. Dekeyzer-Beseme, J.F. Haeuw y J.C. Michalski (2008). "Glycoproteomics and glycomics investigation of membrane

- N-glycosylproteins from human colon carcinoma cells." Proteomics **8**(16): 3236-3256.
- Visconti, P.E., J.L. Bailey, G.D. Moore, D. Pan, P. Olds-Clarke y G.S. Kopf (1995a). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." Development **121**(4): 1129-1137.
- Visconti, P.E., H. Galantino-Homer, X. Ning, G.D. Moore, J.P. Valenzuela, C.J. Jorgez, J.G. Alvarez y G.S. Kopf (1999a). "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation." J Biol Chem **274**(5): 3235-3242.
- Visconti, P.E. y G.S. Kopf (1998). "Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation." Biol Reprod **59**(1): 1-6.
- Visconti, P.E., D. Krapf, J.L. de la Vega-Beltrán, J.J. Acevedo y A. Darszon (2011). "Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation." Asian J Androl **13**(3): 395-405.
- Visconti, P.E., G.D. Moore, J.L. Bailey, P. Leclerc, S.A. Connors, D. Pan, P. Olds-Clarke y G.S. Kopf (1995b). "Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway." Development **121**(4): 1139-1150.
- Visconti, P.E., X. Ning, M.W. Fornes, J.G. Alvarez, P. Stein, S.A. Connors y G.S. Kopf (1999b). "Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation." Dev Biol **214**(2): 429-443.

- Visconti, P.E., J. Stewart-Savage, A. Blasco, L. Battaglia, P. Miranda, G.S. Kopf y J.G. Tezon (1999c). "Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm." Biol Reprod **61**(1): 76-84.
- Wang, L., C. Beserra y D.L. Garbers (2004). "A novel aminophospholipid transporter exclusively expressed in spermatozoa is required for membrane lipid asymmetry and normal fertilization." Dev Biol **267**(1): 203-215.
- Wassarman, P. y E. Litscher (2001). "Multiple functions of mouse zona pellucida glycoprotein mZP3, the sperm receptor." Ital J Anat Embryol **106**(2 Suppl 2): 21-32.
- Wassarman, P.M. (1992). "Mouse gamete adhesion molecules." Biol Reprod **46**(2): 186-191.
- Watanabe, H. y G. Kondoh (2011). "Mouse sperm undergo GPI-anchored protein release associated with lipid raft reorganization and acrosome reaction to acquire fertility." J Cell Sci **124**(Pt 15): 2573-2581.
- Waterhouse, K.E., P.O. Hofmo, A. Tverdal y R.R. Miller, Jr. (2006). "Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm." Reproduction **131**(5): 887-894.
- Wathes, D.C., D.R. Abayasekara y R.J. Aitken (2007). "Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction." Biol Reprod **77**(2): 190-201.
- Watson, P.F. (2000). "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen." Anim Reprod Sci **60-61**: 481-492.

- Westendorf, P., L. Richter y H. Treu (1975). "[Deep freezing of boar sperma. Laboratory and insemination results using the Hulsenberger paillete method]." Dtsch Tierarztl Wochenschr **82**(7): 261-267.
- Yamauchi, S., S. Nakamura, K.M. Lay, T. Azuma, T. Yakabi, N. Muto, T. Nakada, K. Ashizawa y H. Tatemoto (2009). "Characteristics of Okinawan native agu pig spermatozoa after addition of low-density lipoprotein to freezing extender." J Reprod Dev **55**(5): 558-565.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. The Physiology of Reproduction. E. Knobil y J.D. Neill. New York, Raven Press. **I**: 189-317.
- Yildiz, C., C. Fleming, P. Ottaviani y C. McKerlie (2008). "Fresh and frozen-thawed sperm quality, nuclear DNA integrity, invitro fertility, embryo development, and live-born offspring of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mice." Cryobiology **57**(2): 156-162.
- Yildiz, C., P. Ottaviani, N. Law, R. Ayearst, L. Liu y C. McKerlie (2007). "Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse." Reproduction **133**(3): 585-595.
- Yu, X.C., E.D. Sturrock, Z. Wu, K. Biemann, M.R. Ehlers y J.F. Riordan (1997). "Identification of N-linked glycosylation sites in human testis angiotensin-converting enzyme and expression of an active deglycosylated form." J Biol Chem **272**(6): 3511-3519.
- Zeng, Y., E.N. Clark y H.M. Florman (1995). "Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion." Dev Biol **171**(2): 554-563.

Zhu, L., E. Bao, R. Zhao y J. Hartung (2009). "Expression of heat shock protein 60 in the tissues of transported piglets." Cell Stress Chaperones **14**(1): 61-69.

Productos derivados de este trabajo de tesis.

Glycoconjugate Journal (2020) 37:499–509
<https://doi.org/10.1007/s10719-020-09924-0>

ORIGINAL ARTICLE



Identification of lipid raft glycoproteins obtained from boar spermatozoa

José Benito López-Salguero¹ · Reyna Fierro² · Jean-Claude Michalski³ · Irma Jiménez-Morales² · Tony Lefebvre³ · Oscar Mondragón-Payne⁴ · Steffi F. Baldini³ · Anne-Sophie Vercoutter-Edouart³ · Humberto González-Márquez²

Received: 9 January 2020 / Revised: 25 March 2020 / Accepted: 8 April 2020 / Published online: 4 May 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

The surface of the spermatozoa is coated with glycoproteins the redistribution of which during in vitro capacitation plays a key role in the subsequent fertilization process. Lipid rafts are membrane microdomains involved in signal transduction through receptors and include or recruit specific types of proteins and glycoproteins. Few studies have focused on identifying glycoproteins resident in the lipid rafts of spermatozoa. Proteins associated with lipid rafts modify their localization during capacitation. The objective of the study was to identify the glycoproteins associated with lipid rafts of capacitated boar spermatozoa through a



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00121

Matrícula: 2121800666

Caracterización de glicoproteínas y colesterol de los microdominios de la membrana de espermatozoides de cerdo durante la capacitación y criopreservación.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 18 del mes de octubre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR
DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA
DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ



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

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JOSE BENITO LOPEZ SALGUERO

JOSE BENITO LOPEZ SALGUERO
ALUMNO

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

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

VOCAL

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

VOCAL

DR. JULIO CESAR CHAVEZ ZAMORA

SECRETARIO

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ