

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



**FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Fisiología**

**IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO FUNCIONAL
DE LAS PRINCIPALES PROTEÍNAS
TIROSINA FOSFATASA EN LOS
ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFEROS**

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Extremadura presentada por:

LAURO GONZÁLEZ FERNÁNDEZ

Cáceres, Diciembre de 2009



FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**Campus Universitario
Avenida de la Universidad s/n
10071-CÁCERES
Teléfono: 927 257000 (Ext.51379)
Fax: 927 257110**

D. José Antonio Tapia García, Doctor por la Universidad de Extremadura y Profesor Contratado Doctor en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICA

Que la presente memoria presentada por D. Lauro González Fernández, con el título “Identificación y estudio funcional de las principales proteínas tirosina fosfatasa en los espermatozoides de mamíferos”, ha sido realizada bajo mi dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura, y entendiendo que se halla finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizo su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Cáceres, a 3 de Noviembre de 2009.

Fdo: D. José A. Tapia García

Este trabajo ha sido realizado con cargo a los Proyectos
de Investigación 2PR04C015 y BFU2007-62423
y con la ayuda de una beca del plan de Formación de personal
Investigador (FPI) de la Junta de Extremadura.

AGRADECIMIENTOS

Todos los que me conocen saben lo que me ha costado llegar hasta aquí, pero a pesar de todo ha merecido la pena por toda la gente que he ido conociendo a lo largo de estos años.

En primer lugar quiero agradecer a mi director de tesis José Antonio Tapia por todo el apoyo y ayuda que me ha mostrado siempre, incluso en los malos momentos que han pasado desde que empezamos. Sobre todo agradecerle la paciencia que ha tenido y convencerme de seguir adelante a pesar de todos los imprevistos que iban surgiendo.

Agradecer a Luis García Marín y Julia Bragado por la oportunidad que me dieron de empezar en esto y confiar en mí desde el primer momento y ayudarme a conseguir becas que me permitieron seguir investigando.

Una de estas becas me llevó hasta Madrid, que aunque la cosa no salió bien en el campo científico, en el campo personal supuso un gran cambio. En Madrid conocí a gente de las que aprendí mucho y que recordaré siempre. En especial a Tamara y Ascensión, con las que juntos iniciamos una tesis que nunca acabamos, pero que acabó con una gran amistad que espero dure mucho tiempo. Pasamos malos momentos pero sobre todo me quedo con todos los buenos momentos que pasamos fuera del laboratorio y “algunos dentro”. Agradecer también a toda la gente que me ayudó y apoyó en Madrid: Ruth “Perrator”, Anabel “Sor Julia”, Diego, las dos Martas, Manu, Borja, Anita, Ángeles, Oscar,.... Y a mis tíos y primas de Madrid.

Al Departamento de Fisiología por poner a mi disposición todo el material necesario para elaborar esta tesis. A todos los profesores por su ayuda: Ginés, Rosado, Pariente, Pedro Camello, Cristina y Antonio. A Mercedes por hacer que los días malos fueran buenos y por esas conversaciones que teníamos sobre cualquier tema. Y a Carmen por aguantar mis bromas y “estar siempre mejor que yo”.

A Inés y Manu, que aunque se fueron a Irlanda y me dejaron “solo” fueron las personas más importantes desde el principio dentro y fuera del laboratorio. Dentro por ayudarme siempre en todas las dudas y problemas que iba teniendo con los experimentos y fuera por todas esas conversaciones

sobre ciencia y sobre todo por las que no eran de ciencia. A Megen y “Vaikir” por esas fiestas de cumpleaños.

Como no agradecer a Jota (nunca una jota dio para tanto) por estar siempre dispuesto a ayudarme aunque estuviera en Francia. A Isaac, por escuchar siempre los problemas que me iban surgiendo y su apoyo con la informática. A Pedro Cosme por estar siempre dispuesto a hacer una broma y hacer que los días fueran divertidos. A Javi por ser tan buena gente y por aclararme cualquier duda que iba teniendo con el citómetro. A Elena por no saber “perder” al tenis. Al Ángel por soportarme todos los días. A Sara y Bea por promover fiestas en mi casa y por ser “Cartulis”. Y a Juan por esas visitas que me hacía todos los días y ese apoyo que me mostró dentro y fuera del laboratorio. Gracias por esas barbacoas, fiestas en mi casa, por los partidos de tenis, los días de cañas, las comidas de Departamento...

Y a todos los demás que han ido pasando o están en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria: Álvaro, María, Natalia, Lourdes, Nidhal, Juli, Hanene, Aicha, Laura, María, David, Yolanda, Charo...

Al Departamento de Inmunología y a Raquel Tarazona por poner a mi disposición el citómetro.

A los de Badajoz: Iñaki y “Francisco”, por su rapidez en la asistencia a cualquier acontecimiento que se organizaba en Cáceres.

A Alex por haberme ayudado y escuchado desde que empezamos en esto. Por todas esas conversaciones filosóficas y no tan filosóficas, por las cañas del Salas y las noches en el Luna.

A toda la Unidad de Reproducción de la Facultad de Veterinaria y a Fernando Peña por poner a mi disposición todo el material sin el cual no podría haber seguido con la tesis. A Cristina, Antolín, Elisa, Juanma, Clara, David, María Cruz.... Y a Bea por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo momento y por “vigilarme” y preocuparse por mí, has sido un gran apoyo y espero que sigas siéndolo. Y a Cuscús por estar siempre dispuesto a hacer el “Bradford”.

A Paco Centeno por saber enseñar y despertar en mí la curiosidad por la ciencia. A Chus por ayudarme con cualquier problema que me iba surgiendo desde que empecé la carrera de Bioquímica. A los que están o han

estado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria: Maribel “La Maestra”, Loli, Fran, Pablo, Marta, Felipe...

A mis amigos del pueblo, que aunque nunca entendieron lo que hacía, me ayudaron haciéndome pasar buenos momentos. Gracias a Pamela, Agustín, David, Iñaki, Óscar, Gustavo....

Al personal de limpieza de la Facultad de Veterinaria, en especial a Yoli y Andrea por estar siempre de buen humor. A Manolo y Pedro por esos buenos ratos en cafetería. Y a Paco por la compañía en las comidas.

Finalmente, y los más importantes, quisiera agradecer a mi familia todo el apoyo incondicional que siempre me mostraron y sin el cual nunca hubiera llegado hasta aquí. Gracias por apoyarme económicamente y sobre todo gracias por estar siempre ahí y confiar en mí. Gracias a mis padres, a mis hermanos: Cristina, Efrén, Silvia, y a Carlos, David y María José, siempre os estaré agradecido. Y a mis dos sobrinas: Aitana y Carla, por hacerme pasar buenos momentos y al que acaba de llegar: Hugo.

Y a toda la gente que he ido conociendo en estos años y que no he nombrado pero que son igual de importantes. Muchas gracias a todos.

A mi Familia

ABREVIATURAS

- **AC:** adenilato ciclasa.
 - **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
 - **AKAP:** proteína de anclaje a la proteína quinasa A.
 - **Akt:** ver PKB.
 - **aPKC:** PKC atípica.
 - **ARN:** ácido ribonucleico.
 - **PKB:** proteína quinasa B.
 - **AMPc:** adenosín monofosfato cíclico.
 - **ANOVA:** análisis de la varianza.
 - **ATP:** adenosín trifosfato.
 - **CABYR:** proteína de unión a Ca^{2+} regulada por fosforilación en tirosina.
 - **CD45:** ver PTPRC.
 - **CDC25:** proteína de ciclo de división celular 25.
 - **CDC14s:** proteína de ciclo de división celular homólogas 14.
 - **CMK:** calmodulina quinasa.
 - **CDKN3:** ciclina quinasa dependiente de inhibidor 3.
 - **cPKC:** PKC convencional.
 - **DAG:** diacilglicerol.
 - **DEP1:** ver PTPRJ.
 - **DUSP:** fosfatasa de especificidad dual.
 - **DUSP1:** fosfatasa de especificidad dual 1.
-

Abreviaturas

- **DUSP2:** fosfatasa de especificidad dual 2.
 - **DUSP3:** fosfatasa de especificidad dual 3.
 - **DUSP4:** fosfatasa de especificidad dual 4.
 - **DUSP6:** fosfatasa de especificidad dual 6.
 - **DUSP9:** fosfatasa de especificidad dual 9.
 - **DSP:** fosfatasa de especificidad dual.
 - **EEM:** error estándar de la media.
 - **EC₅₀:** concentración eficaz 50.
 - **EROs:** especies reactivas de oxígeno.
 - **ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares.
 - **FAP-1:** ver PTPN13.
 - **Fc:** fracción constante de las inmunoglobulinas.
 - **GAB1:** proteína de unión a Grb2.
 - **GCPR:** receptor acoplado a proteína G.
 - **GSK3:** glucógeno sintasa quinasa 3.
 - **HePTP:** ver PTPN7.
 - **IP₃:** inositol 1,4,5-trifosfato.
 - **IP₃R:** receptor del IP₃.
 - **JNK:** quinasa N-terminal de Jun (también denominada SAPK).
 - **KAP:** ver CDKN3.
 - **LMPTP:** tirosina fosfatasa de bajo peso molecular.
 - **MAPK:** quinasa activada por mitógenos.
-

- **MEK:** MAPK/ERK quinasa.
 - **MKP1:** ver DUSP1.
 - **MKP2:** ver DUSP4.
 - **MKP3:** ver DUSP6.
 - **MKP4:** ver DUSP9.
 - **NO:** óxido nítrico sintetasa.
 - **NOS:** óxido nítrico sintetasa.
 - **nPKC:** PKC novel.
 - **p38MAPK:** proteína de 38 kDa activada por mitógenos.
 - **PAC-1:** ver DUSP2.
 - **PBS:** tampón fosfato salino.
 - **PDK1:** proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítidos.
 - **PH:** dominio con homología pleckstrina.
 - **PI:** fosfoinosítidos (fosfatidilinositoles).
 - **PI3K:** fosfatidilinositol 3 quinasa.
 - **PIP₂:** fosfatidilinositol 4, 5-difosfato.
 - **PIP₃:** fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato.
 - **PKA:** proteína quinasa A.
 - **PKC:** proteína quinasa C.
 - **PKD:** proteína quinasa D.
 - **PLA:** fosfolipasa A.
 - **PLC:** fosfolipasa C.
-

Abreviaturas

- **PLD:** fosfolipasa D.
 - **PP1:** proteína fosfatasa 1.
 - **PP2A:** proteína fosfatasa 2A.
 - **PP2B:** proteína fosfatasa 2B o calcineurina.
 - **PRLs:** prolactinas.
 - **PTEN:** fosfatasa y homólogo de tensina.
 - **PTK:** proteína tirosina quinasa.
 - **PTP:** proteína tirosina fosfatasa.
 - **PTP1B:** ver PTPN1.
 - **PTP-BAS:** ver PTPN13.
 - **PTP1C:** ver PTPN6.
 - **PTP1D:** ver PTPN11.
 - **PTPH1:** ver PTPN3.
 - **PTPN1:** proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 1.
 - **PTPN3:** proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 3.
 - **PTPN6:** proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 6.
 - **PTPN7:** proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 7.
 - **PTPN11:** proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 11.
 - **PTPN13:** proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 13.
 - **PTPRA:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo A.
 - **PTPRB:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo B.
 - **PTPRC:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo C.
-

- **PTPRD:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo D.
 - **PTPRE:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo E.
 - **PTPRG:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo G.
 - **PTPRJ:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo J.
 - **PTPRK:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo K.
 - **PTPRS:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo S.
 - **PTPRZ:** proteína tirosina fosfatasa receptor tipo Z.
 - **RA:** reacción acrosómica.
 - **RPTP α :** ver PTPRA.
 - **RPTP β :** ver PTPRB.
 - **RPTP δ :** ver PTPRD.
 - **RPTP ϵ :** ver PTPRE.
 - **RPTP γ :** ver PTPRG.
 - **RPTP η :** ver PTPRJ.
 - **RPTP κ :** ver PTPRK.
 - **RPTP σ :** ver PTPRS.
 - **RPTP ζ :** ver PTPRZ.
 - **SH2:** dominios con homología Src 2.
 - **SHP1:** ver PTPN6.
 - **SHP2:** ver PTPN11.
 - **SOD:** superóxido dismutasa.
 - **TBM:** medio basal de Tyrode.
-

Abreviaturas

- **TCM:** medio completo de Tyrode.
- **VHR:** ver DUSP3.
- **ZP:** zona pelúcida.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.	DESARROLLO Y ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE	1
1.1.	Espermatogénesis	1
1.1.1.	Regulación de la espermatogénesis por apoptosis	5
1.2.	Maduración en el epidídimo	6
1.3.	Estructura del espermatozoide	7
1.3.1.	Cabeza	7
	Acrosoma	8
	Núcleo	9
1.3.2.	Flagelo	10
	Axonema	11
1.4.	Membrana plasmática	13
2.	CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DEL ESPERMATOZOIDE	14
2.1.	Motilidad	14
2.1.1.	Adquisición y tipos de movimiento	14
2.1.2.	Requerimientos energéticos	15
2.2.	Capacitación	17
2.3.	Reacción acrosómica	21
3.	MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE	26
3.1.	Fosforilación en tirosina	29
3.2.	Vías que regulan la fosforilación	32
3.2.1.	Vía AMPc/PKA	32
3.2.2.	Vía DAG/PKC	34
3.2.3.	Vía PKB/PI3K	36
3.2.4.	Vía MAP quinasa	37
3.3.	Proteínas tirosina fosfatasa	40
3.3.1.	Proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 11 (PTPN11 o SHP2)	45
3.4.	Proteínas serina/treonina fosfatasa	47
3.5.	Factores que influyen en la fosforilación en tirosina	48
3.5.1.	Calcio	48
3.5.2.	Colesterol	50
3.5.3.	Especies reactivas de oxígeno (EROs)	51
II.	OBJETIVOS	55
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.	METODOLOGÍA GENERAL	61
4.1.	Lista de reactivos	61
4.2.	Medios de incubación	67
4.3.	Obtención de las muestras	69
4.3.1.	Muestras de cerdo	69
4.3.2.	Muestras de caballo	70
4.3.3.	Muestras de perro	70
4.4.	Preparación de las muestras	70
4.5.	Tratamientos	71
5.	WESTERN BLOTTING	73
5.1.	Obtención de lisados celulares totales	74
5.2.	Obtención de fracciones subcelulares	75
5.3.	Cuantificación de proteínas	77

5.4.	Inmunoprecipitación -----	77
5.5.	Electroforesis-----	79
5.5.1.	Preparación de las muestras -----	80
5.5.2.	Preparación de los geles-----	81
5.6.	Electrotransferencia -----	83
5.7.	Bloqueo de la membrana -----	84
5.8.	Incubación con los anticuerpos -----	85
5.9.	Detección y cuantificación de la señal-----	88
6.	INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA CONFOCAL -----	89
6.1.	Inmunocitoquímica-----	89
6.2.	Microscopía confocal -----	91
7.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TIROSINA FOSFATASA-----	93
7.1.	Lisados celulares-----	93
7.2.	Inmunoprecipitación -----	93
7.3.	Medida de la actividad tirosina fosfatasa -----	94
8.	CITOMETRÍA DE FLUJO-----	96
8.1.	Incubación con las sondas -----	98
8.1.1.	Viabilidad-----	98
8.1.2.	Capacitación-----	99
8.1.3.	Reacción Acrosómica -----	100
9.	MOTILIDAD ESPERMÁTICA -----	103
10.	PROTOCOLO DE CONGELACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDEOS -----	105
11.	ANÁLISIS DE LOS DATOS-----	106
IV.	RESULTADOS-----	107
1.	IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS TIROSINA FOSFATASA EN LOS ESPERMATOZOIDEOS DE MAMÍFEROS -----	109
1.1.	Inmunodetección de proteínas tirosina fosfatasa en lisados de espermatozoides -----	109
1.2.	Distribución subcelular de PTPRB en los espermatozoides de mamíferos -----	114
1.3.	Distribución subcelular de la PTPN11 en los espermatozoides de mamíferos -----	117
1.4.	Distribución subcelular de DUSP4 en los espermatozoides de mamíferos -----	119
1.5.	Distribución subcelular de DUSP3 en los espermatozoides de mamíferos -----	121
2.	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TIROSINA FOSFATASA EN LOS ESPERMATOZOIDEOS DE MAMÍFEROS -----	123
2.1.	Medida de la actividad tirosina fosfatasa en los espermatozoides de cerdo en diferentes situaciones biológicas -----	123
2.2.	Efecto de los inhibidores de PTPs en la actividad y viabilidad de los espermatozoides de cerdo -----	126
2.3.	Efecto del pervanadato en la fosforilación de proteínas en tirosina en los espermatozoides de cerdo -----	129
2.4.	Efecto del ortovanadato y pervanadato en la motilidad de los espermatozoides de mamíferos -----	133
2.4.1.	Recuperación de la motilidad de los espermatozoides de mamíferos-----	135

2.5.	Actividad tirosina fosfatasa en los espermatozoides de cerdo congelados y refrigerados -----	137
2.6.	Efecto del estrés oxidativo en la actividad tirosina fosfatasa y en la viabilidad espermática-----	139
3.	ESTUDIO DE LA PROTEÍNA PTPN11 EN LOS ESPERMATOZOIDES DE CERDO---	141
3.1.	Estudio de la fosforilación de la PTPN11 en diferentes situaciones biológicas -----	141
3.2.	Efecto de la concentración de 8-Br- cAMP y del tiempo de incubación en la fosforilación de la PTPN11 -----	144
3.3.	Localización subcelular de la PTPN11 fosforilada-----	147
3.3.1.	Cuantificación de la fosforilación de la PTPN11 -----	150
3.4.	Efecto del inhibidor NSC-87877 en la viabilidad espermática -----	152
3.5.	Regulación de la actividad de la fosfatasa PTPN11 durante la capacitación, vías implicadas y efecto del inhibidor en la actividad PTP-----	154
3.6.	Efecto de la inhibición de la PTPN11 en la fosforilación en tirosina de diversas proteínas-----	155
3.7.	Papel de la PTPN11 en la regulación de la motilidad de los espermatozoides de cerdo -----	157
3.8.	Papel de la PTPN11 en el establecimiento de la reacción acrosómica en los espermatozoides de cerdo -----	158
3.9.	Papel de la PTPN11 en la regulación de la capacitación de los espermatozoides de cerdo -----	160
3.10.	Efecto de la inhibición de la PTPN11 en la fosforilación de p32 -----	162
3.11.	Regulación de la fosforilación de GAB1 por la PTPN11 en los espermatozoides de cerdo -----	164
V.	DISCUSIÓN -----	167
VI.	CONCLUSIONES -----	189
VII.	BIBLIOGRAFÍA -----	193

Preámbulo

El espermatozoide es una célula haploide altamente diferenciada, que se forma en los testículos mediante el proceso denominado espermatogénesis, y cuya única función es la de transportar el material genético de origen paterno hasta el ovocito. Una vez eyaculados, los espermatozoides deben sufrir una serie de transformaciones para llegar hasta el ovocito y posteriormente fusionarse con éste en el momento de la fecundación. Las primeras transformaciones que sufre el espermatozoide en el tracto genital femenino consisten en un proceso denominado capacitación. En este proceso el espermatozoide sufre una serie de cambios secuenciales y complejos, que abarcan la estructura y composición de la membrana, la fosforilación de diferentes proteínas o un aumento de su motilidad. Una vez que el espermatozoide alcanza el ovocito, se produce la interacción de éste con la zona pelúcida y se desencadena la reacción acrosómica que consiste en un proceso exocítico de enzimas hidrolíticas que van a degradar la zona pelúcida. Este fenómeno, acompañado de un incremento de la motilidad, permite la fusión del espermatozoide con el ovocito e introducir el material genético paterno en el ovocito.

Son muchos los estudios realizados en torno a la motilidad, la capacitación y la reacción acrosómica, dado que es necesario el buen funcionamiento de estos procesos para que el espermatozoide pueda culminar su función. En los últimos años se ha intensificado el estudio acerca de las proteínas quinasas implicadas en estos procesos, debido a que se ha demostrado una relación entre el incremento de la fosforilación en tirosina de numerosas proteínas con la motilidad, la capacitación y la reacción acrosómica, indicando que el proceso de fosforilación es de vital importancia en la función espermática. Sin embargo, pocos trabajos se han centrado en el estudio de las proteínas tirosina fosfatasa en los espermatozoides de mamíferos. Teniendo en cuenta que la fosforilación en tirosina es importante para la función espermática, la defosforilación llevada a cabo por las

Preámbulo

proteínas tirosina fosfatasa puede ser igualmente importante en esta regulación.

Por todo lo expuesto anteriormente decidimos estudiar las proteínas tirosina fosfatasa en los espermatozoides de mamíferos, intentando contribuir de esta forma al esclarecimiento de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la función espermática. Además, intentamos extender esta investigación a la regulación de las proteínas tirosina fosfatasa durante la conservación del esperma refrigerado y criopreservado.

I. INTRODUCCIÓN

1. DESARROLLO Y ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

Las células germinales, denominadas espermatogonias, sufren una serie de modificaciones secuenciales en los túbulos seminíferos de los testículos hasta transformarse en células haploides altamente diferenciadas, denominadas espermatozoides. Sin embargo, los espermatozoides al salir de los testículos son células sin capacidad fecundante y escasa capacidad móvil. Durante el tránsito a través del epidídimo sufren las últimas fases de maduración, necesarias para desarrollar la motilidad progresiva y adquirir la capacidad para fecundar al ovocito (*Figura 1.1-1*) (Amann, 2008).

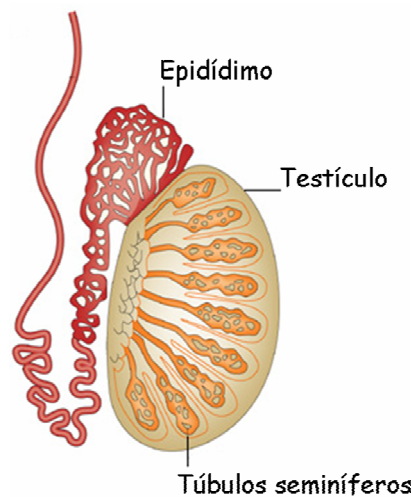


Figura 1.1-1. Estructura del testículo.

1.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual las células germinales diploides más primordiales, denominadas espermatogonias, se transforman en espermatozoides haploides. Este proceso a su vez se divide en otras cuatro etapas que ocurren secuencialmente y que se denominan

espermatocitogénesis, espermatidogénesis, espermiogénesis y espermiación, durante las cuales las células germinales van a sufrir los cambios necesarios para convertirse en un espermatozoide maduro (Figura 1.1-1).

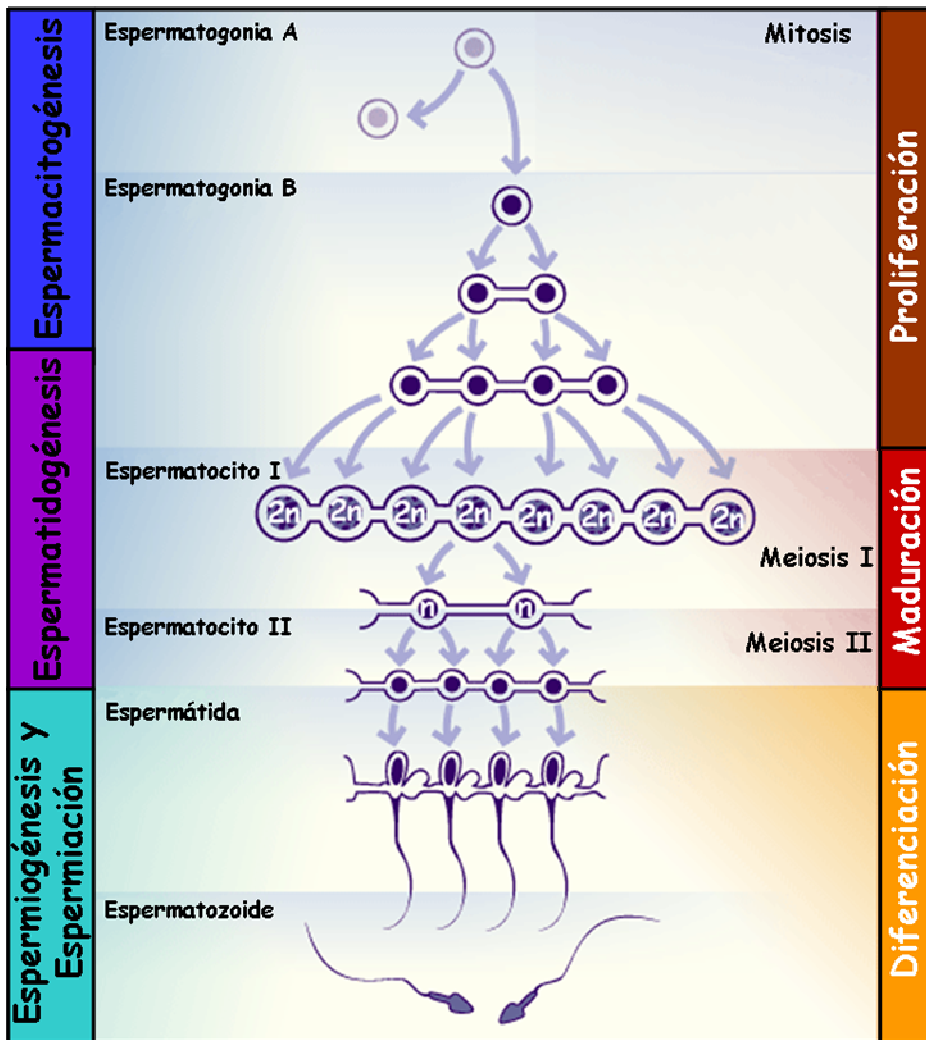


Figura 1.1-1. Esquema de las diferentes fases de la espermatogénesis.

Estas fases ocurren en el epitelio de los túbulos seminíferos, que está formado por células de Sertoli y varios tipos de células germinales (Figura 1.1-2). Las células de Sertoli juegan un papel muy importante en la

regulación y el desarrollo de la espermatogénesis, ya que estas células aportan soporte estructural y nutricional, fagocitan restos celulares de las células germinales, participan en la liberación del espermatozoide al lumen del túbulo seminífero y además producen factores que regulan la actividad mitótica de las espermatogonias (Amann, 2008; Johnson *et al.*, 2008). Es decir, la participación de las células de Sertoli es fundamental durante todas las fases de la espermatogénesis.

En la fase de **espermatocitogénesis** la espermatogonia sufre una serie de divisiones mitóticas, por un lado para mantener la población de espermatogonias (espermatogonias tipo A) y por otro lado para dar lugar a las espermatogonias tipo B que se van a dividir para generar espermaticitos primarios. En estas primeras divisiones las células germinales todavía mantienen la carga diploide (*Figura 1.1-1*) (Amann, 2008; Johnson *et al.*, 2008).

En la etapa de **espermatidogénesis** se producen divisiones meióticas mediante las cuales los espermaticitos se van a convertir en espermátidas con carga genética haploide. En una primera división meiótica el espermaticito primario se divide para dar lugar a dos espermaticitos secundarios haploides. Éstos, inmediatamente después, mediante la segunda división meiótica se van a transformar en espermátidas, unas células haploides más diferenciadas y pequeñas (*Figura 1.1-1*) (Amann, 2008; Johnson *et al.*, 2008).

En las fases de espermiogénesis y espermiación se producen los cambios morfológicos necesarios para que la espermátida se transforme en un espermatozoide maduro, sin alterar la carga genética. Durante la **espermiogénesis**, la espermátida redonda se transforma en una espermátida madura en la que ya se diferencian la cabeza y la cola. En esta etapa el espermatozoide todavía permanece unido a la célula de Sertoli (*Figura 1.1-1* y *Figura 1.1-2*) (Amann, 2008; Johnson *et al.*, 2008).

Finalmente en la fase de **espermiación** se produce la ruptura de las estructuras y puentes que anclan la espermatida madura a la célula de Sertoli y el espermatozoide es liberado al lumen de los túbulos seminíferos por donde posteriormente transita hacia el epidídimo. La espermatida en esta última fase pierde la mayor parte del citoplasma y se produce la condensación nuclear y la maduración del acrosoma y del flagelo (*Figura 1.1-1 y Figura 1.1-2*) (Amann, 2008; Johnson *et al.*, 2008).

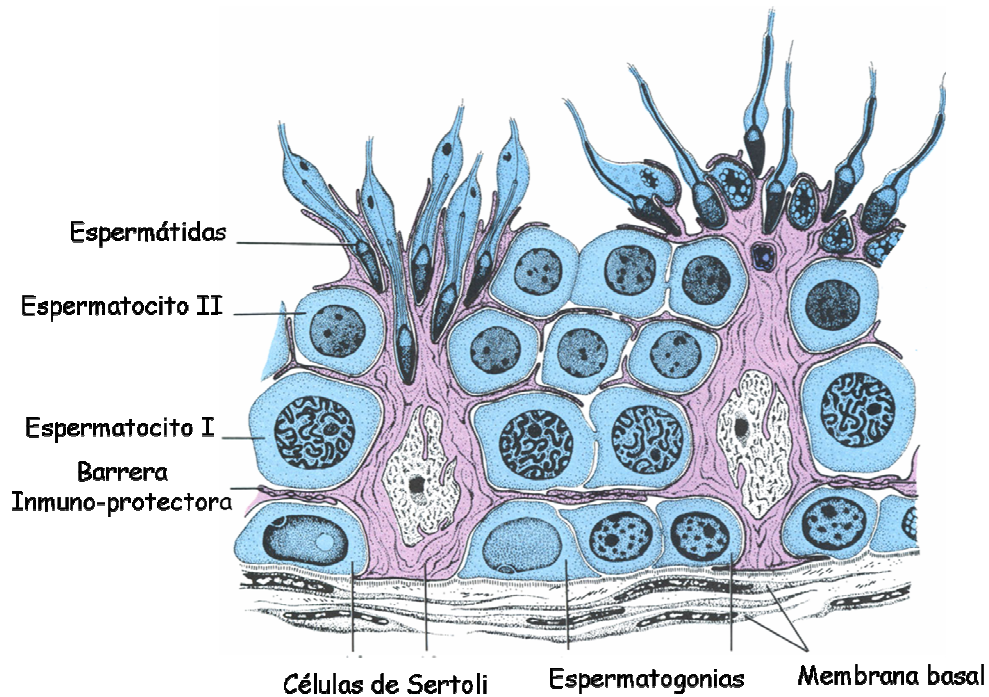


Figura 1.1-2. Organización celular del epitelio seminífero.

1.1.1. Regulación de la espermatogénesis por apoptosis

Durante los últimos años, numerosos estudios han demostrado que los procesos apoptóticos juegan un papel muy importante en la regulación de la espermatogénesis en los espermatozoides de mamíferos, incluyendo los espermatozoides de hombre (Kimura *et al.*, 2003; Pareek *et al.*, 2007; Ruwanpura *et al.*, 2008), de cerdo (Franca *et al.*, 2005), de caballo (Heninger *et al.*, 2004), de ratón (De *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1998; Koji *et al.*, 2001; Embree-Ku *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2002) y de rata (Yan *et al.*, 2000; Jahnukainen *et al.*, 2004). La pérdida de células germinales por mecanismos apoptóticos ocurre durante la espermatogénesis de forma normal en todas las especies de mamíferos, jugando un papel crítico en la determinación del número de espermatozoides que se producen y controlando la eficiencia final del proceso (Franca *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2008).

El fenómeno de apoptosis de células germinales se puede presentar en todas las fases de la espermatogénesis, aunque la espermatogonia y el espermatocito son los tipos celulares que más frecuentemente entran en apoptosis tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (Koji *et al.*, 2001; Franca *et al.*, 2005; Shaha, 2007; Sofikitis *et al.*, 2008). Se ha estimado que para la mayoría de las especies de mamíferos, hasta un 75 % de las espermatogonias tipo A degeneran por mecanismos apoptóticos de forma fisiológica en los testículos de animales adultos, indicando que la espermatogénesis normal se produce con un gran coste en relación al número de células que no completan su desarrollo y desaparecen por apoptosis (Levy & Seifer-Aknin, 2001; Franca *et al.*, 2005).

1.2. Maduración en el epidídimo

Anatómicamente en el epidídimo se diferencian tres secciones: cabeza, cuerpo y cola. A nivel histológico el epidídimo está formado por un epitelio pseudo-estratificado compuesto por varios tipos celulares. El tipo celular más importante es la “célula principal”, que constituye el 80 % del epitelio. Este tipo celular es responsable de la mayoría de las proteínas que se secretan al lumen del túbulo seminífero. Además, de forma similar a la barrera que forman las células de Sertoli en los túbulos, crean una barrera inmuno-protectora que es necesaria para la correcta maduración de los espermatozoides (Cornwall, 2009).

Los espermatozoides que entran en el epidídimo son funcionalmente inmaduros, ya que no poseen la capacidad de movimiento ni tampoco la capacidad de reconocer la zona pelúcida (capa de glicoproteínas que rodea al ovocito). Sin embargo, durante su paso por el epidídimo los espermatozoides van a sufrir modificaciones funcionales y morfológicas por la influencia de productos secretados por las células del epidídimo. Gracias a estos factores el espermatozoide adquiere varias propiedades funcionales como la motilidad y la capacidad de reconocer la zona pelúcida del ovocito. Colectivamente a estas modificaciones se las denomina “maduración epididimaria”. En la mayoría de los mamíferos, el espermatozoide tarda de 2 a 10 días en pasar a través del epidídimo. Una vez que los espermatozoides completan este tránsito se almacenan en la cola del epidídimo hasta la eyaculación (Toshimori, 1998; Franca *et al.*, 2005; Tulsiani, 2006).

1.3. Estructura del espermatozoide

Desde un punto de vista morfológico, las dos principales estructuras del espermatozoide de mamífero son la cabeza, más o menos plana y ovalada dependiendo de la especie, y la cola o flagelo, que se une a la cabeza por una estructura intermedia denominada pieza conectora. Rodeando a todas estas estructuras se encuentra la membrana plasmática (*Figura 1.3-1*) (Knobil & Neill's, 2006).

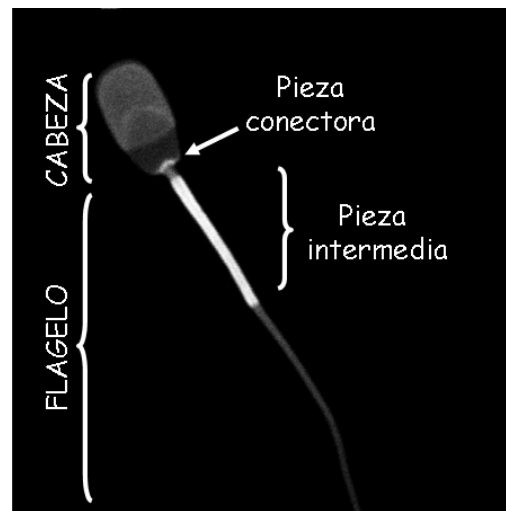


Figura 1.3-1. Esquema de la estructura del espermatozoide.

1.3.1. Cabeza

La cabeza contiene el acrosoma, el núcleo, estructuras del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma (*Figura 1.3-2*). En función de la localización del acrosoma en la cabeza se pueden distinguir varias regiones, siendo las principales la región apical, la región ecuatorial y la región postacrosómica. La región apical está situada en la parte anterior de la cabeza y contiene el acrosoma, en el extremo contrario se encuentra la región postacrosómica y entre éstas dos regiones se encuentra la región ecuatorial (*Figura 1.3-2*) (Boerke *et al.*, 2008).

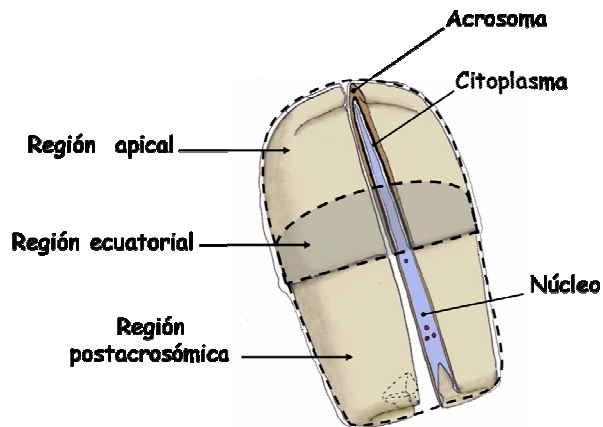


Figura 1.3-2. Estructura de la cabeza del espermatozoide.

Acrosoma

El acrosoma es una estructura vesicular derivada del aparato de Golgi que se forma durante las últimas fases de la espermatogénesis (Bou-Haila & Tulsiani, 2000). Está formado por una membrana que rodea a la matriz acrosomal. En esta membrana se distingue la membrana acrosomal externa, adyacente a la membrana plasmática que rodea a todo el espermatozoide, y la membrana acrosomal interna adyacente a la membrana nuclear (*Figura 1.3-3*) (Silva & Gadella, 2006).

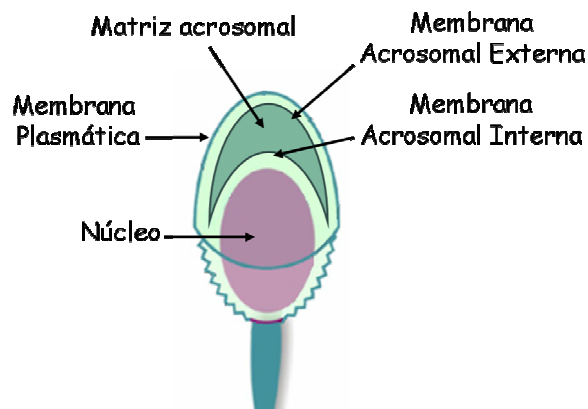


Figura 1.3-3. Esquema de la estructura del acrosoma del espermatozoide.

Una vez que el espermatozoide alcanza al ovocito se une a su zona pelúcida y a continuación se desencadenan una serie de señales en el espermatozoide que van a ocasionar que la membrana acrosomal externa se fusione con la membrana plasmática liberando el contenido del acrosoma en un proceso denominado “reacción acrosómica”. Este proceso de exocitosis del contenido acrosomal permite al espermatozoide atravesar la zona pelúcida y fecundar al ovocito debido a que el acrosoma contiene gran cantidad de enzimas hidrolíticas y de otros tipos que facilitan este proceso (Bou-Haila & Tulsiani, 2000).

Respecto al contenido enzimático del acrosoma destacan las glicohidrolasas ácidas con similares propiedades a las enzimas encontradas en los lisosomas como la hialuronidasa, α -D-galactosidasa, la α -D-manosidasa o la β -D-glucuronidasa (Tulsiani *et al.*, 1998). Otro grupo de enzimas presentes en el acrosoma son las proteasas, entre las que se incluyen proteasas específicas de serina (acrosina/proacrosina), proteasas específicas de cisteína (catepsinas) y metaloproteasas. La acrosina está presente tanto en el acrosoma como por toda la superficie del espermatozoide, y está implicada en la unión y penetración a la zona pelúcida del ovocito (Tulsiani *et al.*, 1998). Además de todas estas enzimas el acrosoma contiene esterases, sulfatasas, fosfatasas y fosfolipasas, todas ellas liberadas durante la reacción acrosómica (Tulsiani *et al.*, 1998).

Núcleo

El núcleo es la estructura que ocupa la mayor parte de la cabeza del espermatozoide. Se encuentra rodeado por el acrosoma y está altamente condensado para facilitar su transporte y evitar al mismo tiempo que el material genético se dañe en el trayecto hacia el ovocito. Las proteínas que se encuentran asociadas inicialmente al ADN son histonas. Sin embargo, durante la fase de espermiogénesis, éstas se van reemplazando por protaminas que son proteínas más pequeñas que las histonas, lo que permite

que el núcleo se compacte mucho más. En esta conformación compacta la transcripción de genes es prácticamente nula y aunque se piensa que pudiera existir cierta transcripción génica residual, desde luego ésta es mucho menor que la que se produce en las células somáticas (Miller *et al.*, 2005; Knobil & Neill's, 2006).

1.3.2. Flagelo

El flagelo es la estructura responsable del movimiento y está constituido por tres partes: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. En toda la longitud del flagelo existe una compleja estructura esencial para el movimiento denominada “axonema” que está constituida por un conjunto de pequeños tubos longitudinales o microtúbulos que se agrupan en dobletes y se distribuyen en uno central y nueve periféricos (*Figura 1.3-4 y Figura 1.3-5*) (Mortimer, 1997; Inaba, 2003). Además del axonema, en la **pieza intermedia** se encuentran nueve fibras longitudinales de aspecto denso asociadas a cada uno de los nueve dobletes periféricos, que reciben el nombre de “fibras densas”. En la pieza intermedia se localiza además una vaina mitocondrial constituida por mitocondrias dispuestas helicoidalmente rodeando las estructuras anteriores. La **pieza principal** ocupa la mayor parte del flagelo y está compuesta por una vaina fibrosa que rodea al axonema y a las fibras densas. Por último, la **pieza terminal** constituye el extremo final de la cola y está compuesta únicamente por el axonema sin vaina fibrosa (*Figura 1.3-4*) (Knobil & Neill's, 2006).

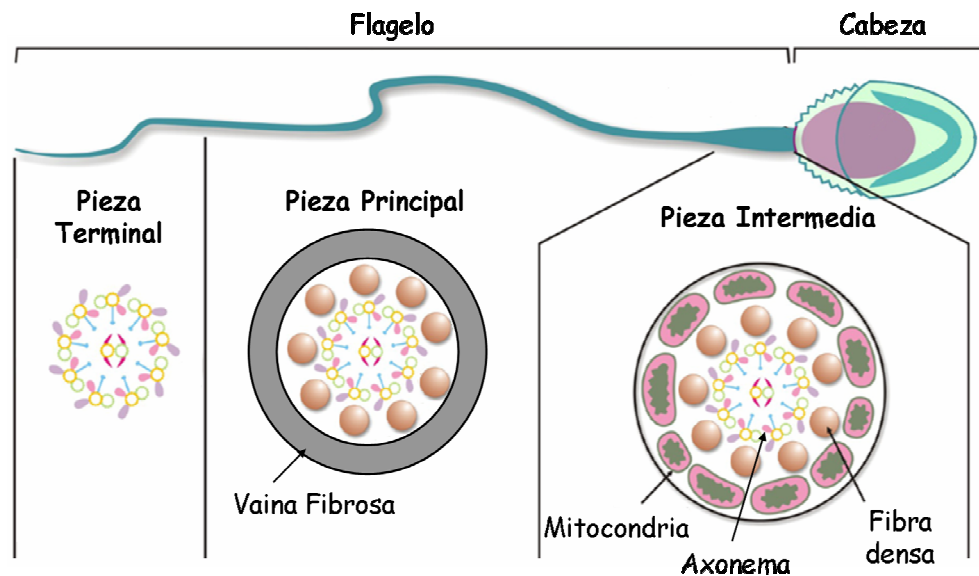


Figura 1.3-4. Esquema de la estructura del flagelo de espermatozoides de mamíferos.

Axonema

El axonema es la “maquinaria molecular” responsable de la motilidad. Como se ha indicado en el apartado anterior, el típico axonema está basado en 9 dobletes de microtúbulos externos y 2 tubos centrales unidos por los radios, estructura que es denominada “9+2” (*Figura 1.3-4* y *Figura 1.3-5*). El axonema es una sofisticada estructura compuesta por proteínas estructurales del citoesqueleto, proteínas motoras, chaperones moleculares, elementos de regulación como proteínas de unión a calcio, y proteínas quinasas y fosfatasas (Inaba, 2007).

Los microtúbulos están formados por α -tubulina y β -tubulina que se asocian entre sí para formar estas fibras. Las proteínas más importantes asociadas a los microtúbulos son las dineínas. Éstas se asocian como brazos sobre los dobletes de microtúbulos y en función de su disposición se clasifican en dineínas externas y dineínas internas (*Figura 1.3-5*) (Inaba, 2007). La dineína está formada por varios tipos de cadenas: cadenas pesadas, medias y ligeras. Las cadenas pesadas de dineína tienen actividad ATPasa y

son las responsables del inicio del movimiento al hidrolizar el ATP. El resto de las cadenas van a estar implicadas en interacciones entre proteínas y la transmisión del movimiento por todo el flagelo (Inaba, 2007).

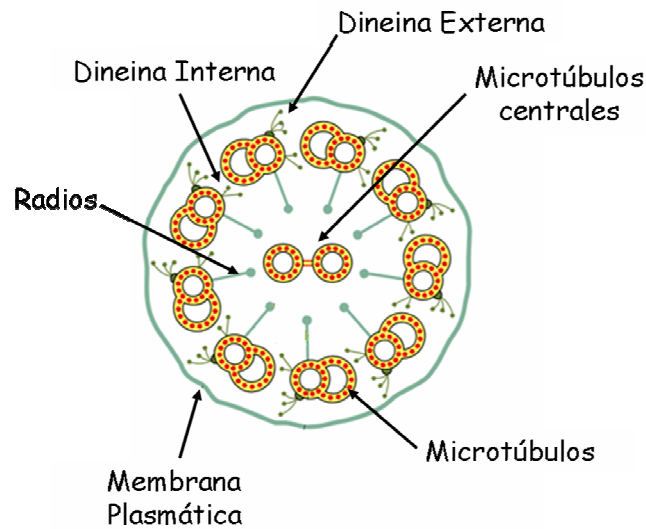


Figura 1.3-5. Esquema de la estructura del axonema de espermatozoides de mamíferos.

Las dineínas son el “motor” del axonema. Cuando los brazos de dineína son fosforilados, las ATPasas de dineína se activan e hidrolizan ATP, provocando un cambio conformacional de esta proteína que se transformará en movimiento (Tash, 1989). Para ello, los brazos de dineína interaccionan con sus dobletes de microtúbulos adyacentes y generan un movimiento que causa que los microtúbulos se deslicen uno sobre otro. Debido a que el axonema está anclado a la base de la cabeza, esta fuerza de deslizamiento global se transforma en un giro en el flagelo que, finalmente, genera el desplazamiento del espermatozoide (Satir, 1968; Summers & Gibbons, 1971; Brokaw, 1972; Shingyoji *et al.*, 1977; Brokaw, 1989).

1.4. Membrana plasmática

La membrana plasmática, al igual que ocurre en las células somáticas, tiene una estructura de bicapa lipídica, compuesta por diferentes tipos de lípidos y proteínas que cruzan la membrana o están ancladas a ella (Singer & Nicolson, 1972). La composición de la membrana en cuanto a la proporción de los diferentes tipos de lípidos presentes en las membranas de los espermatozoides es diferente a la de las células somáticas. Incluso, considerando solamente a los espermatozoides, esta composición va a ser también variable dependiendo de la especie (Lenzi *et al.*, 1996).

Además, en la membrana de los espermatozoides se pueden distinguir varias zonas denominadas “dominios” que van a presentar características diferentes en cuanto a su composición lipídica y estructura (Boerke *et al.*, 2008). Gracias a estos dominios cada región de la membrana va a desarrollar una función más o menos específica. Así, la unión del espermatozoide a la zona pelúcida es iniciada en una superficie concreta de la región apical; las fusiones de membrana involucradas en la reacción acrosómica también ocurren en la región apical y la membrana de la región ecuatorial está involucrada en la unión y fusión con el ovocito (Boerke *et al.*, 2008).

Un componente muy importante en la membrana plasmática es el colesterol, sin duda el esteroide más abundante en estas membranas biológicas. Éste actúa como una especie de “pegamento” estabilizando la bicapa lipídica. Cambios en la distribución y cantidad del colesterol fuerza a los dominios de la membrana a reorganizarse (Gadella *et al.*, 2008; Boerke *et al.*, 2008), siendo de vital importancia en el proceso denominado capacitación como veremos más adelante. Todo ello indica que la membrana plasmática en el espermatozoide juega un papel muy importante en el desarrollo de los cambios necesarios que permiten al espermatozoide llegar hasta el ovocito y fusionarse.

2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DEL ESPERMATOZOIDE

Para que el espermatozoide cumpla su función, que es la de transportar el material genético paterno hasta el ovocito y fusionarse con éste último, tiene que sufrir una serie de modificaciones que se engloban en un proceso denominado “capacitación”. Estas modificaciones van a permitir al espermatozoide, primero adquirir el movimiento necesario para llegar al ovocito gracias al movimiento del flagelo y, posteriormente, unirse y fusionarse con el ovocito gracias a la reacción acrosómica, como se ha indicado en el anterior apartado.

2.1. Motilidad

Se define como motilidad a la capacidad de desplazamiento del espermatozoide y aunque se suelen utilizar indistintamente, en términos estrictos es distinto del concepto de movilidad. Este último se corresponde con la capacidad de un espermatozoide de moverse, aunque esto no siempre implique un desplazamiento entre dos puntos. Cuando existe un movimiento con desplazamiento se denomina “motilidad progresiva”.

2.1.1. Adquisición y tipos de movimiento

Tras su formación en los túbulos seminíferos, los espermatozoides tardan varios días en recorrer el epidídimo y durante este tiempo van cambiando su capacidad mótil. Así, los espermatozoides extraídos de las primeras porciones del epidídimo son inmóviles y pasan de ser inmóviles a adquirir un movimiento circular no progresivo en la región de la cabeza del epidídimo. En la región de la cola del epidídimo este movimiento se transforma en un movimiento lineal y progresivo (Cornwall, 2009).

En la mayoría de los espermatozoides maduros de mamífero existen dos tipos de movimiento, la “motilidad activada” que aparece en el eyaculado fresco y la motilidad que ocurre en el sitio de fertilización denominada “motilidad hiperactivada” (Katz & Yanagimachi, 1980; Suarez & Osman, 1987). Respecto a la “motilidad activada” que presentan los espermatozoides frescos, se caracteriza por un movimiento simétrico y de baja amplitud del flagelo que dirige al espermatozoide en una dirección más o menos recta. Esta forma de motilidad tiene el objetivo de propulsar al espermatozoide a través del tracto genital femenino (Turner, 2006).

Una vez que el espermatozoide llega hasta el ovocito, el patrón del movimiento cambia y los batidos del flagelo se vuelven asimétricos y de gran amplitud, este movimiento es denominado “motilidad hiperactivada” y tiene una trayectoria circular o en ocho (Yanagimachi, 1970). Este tipo de movimiento ayudaría al espermatozoide a penetrar las membranas del ovocito (Suarez *et al.*, 1991; Stauss *et al.*, 1995; Ho & Suarez, 2001).

2.1.2. Requerimientos energéticos

Los espermatozoides son capaces de generar energía a través de vías metabólicas tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Numerosas enzimas glicolíticas han sido identificadas en la pieza principal del flagelo en espermatozoides de mamíferos, incluyendo la hexoquinasa, lactato deshidrogenasa (LDH) y gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa (GADP-S) (Nagdas *et al.*, 2005; Nagdas *et al.*, 2006). Una vez que los monosacáridos son transformados a glucosa 6 fosfato (G 6-P), esta molécula entra en la vía glucolítica para generar piruvato. La molécula de piruvato puede transformarse a lactato por la LDH, o bien entrar en el ciclo de Krebs (Peña *et al.*, 2009).

La metabolización del lactato a través del ciclo de Krebs genera mucho más ATP que la glucólisis anaeróbica y produce altas cantidades de poder

reductor en forma de dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato (NADPH). Este último es de gran importancia en el mantenimiento de la vía anabólica, en el control del potencial redox intracelular y del pH. El equilibrio entre la glucólisis anaeróbica y la glucólisis aeróbica depende de varios factores como la concentración de oxígeno, los niveles intracelulares de ATP y numerosos factores intracelulares como el óxido nítrico (Peña *et al.*, 2009).

Tradicionalmente se ha considerado que el principal papel de la mitocondria en el espermatozoide era la producción de energía para la motilidad espermática a través de la fosforilación oxidativa. Actualmente, existe cierta controversia acerca de esta función de la mitocondria en los espermatozoides (Marin *et al.*, 2003; Mukai & Okuno, 2004; Rodriguez-Gil, 2006). Esta discrepancia es debida a que las mitocondrias se encuentran sólo en la pieza intermedia, por lo que la fosforilación oxidativa sólo ocurre a este nivel. Sin embargo, las quinasas flagelares y las dineínas-ATPasas necesitan grandes cantidades de ATP en toda la extensión del flagelo para mantener la motilidad. Este hecho parece indicar que el ATP producido en la mitocondria no es suficiente para mantener la motilidad a lo largo de todo el flagelo (Turner, 2003). Se ha propuesto que el propio movimiento del flagelo y los complejos enzimáticos situados a lo largo de la cola promueven la rápida difusión del ATP de las mitocondrias de la pieza intermedia a todo el flagelo (Ruiz-Pesini *et al.*, 2007).

Sin embargo, estudios en ratones han demostrado que una fosforilación oxidativa defectuosa no inhibe la motilidad espermática (Escalier, 2006). Esto concuerda con investigaciones que demuestran que los espermatozoides de cerdo incorporan muy poca cantidad del lactato en el ciclo de Krebs, indicando una alta actividad de glucólisis anaeróbica en estas células (Marin *et al.*, 2003). Otros trabajos, sin embargo, describen que los espermatozoides

de búfalo dependen del ciclo de Krebs para el mantenimiento de la motilidad espermática (Mukai & Okuno, 2004; Aitken *et al.*, 2004).

Todo lo expuesto hasta ahora parece indicar que el aporte de energía necesario para el movimiento va a depender de la especie y de las condiciones en las que se encuentre el espermatozoide, pudiendo utilizar la vía de la glucólisis anaeróbica, la cadena de fosforilación oxidativa mitocondrial o ambas en función de las circunstancias (Storey, 2008).

2.2. Capacitación

Los espermatozoides de mamíferos recién eyaculados no son capaces de fecundar sino que, para desarrollar esta función, deben experimentar una serie de cambios denominados globalmente como “capacitación espermática” (Austin, 1951; de Lamirande *et al.*, 1997b). El proceso de capacitación se inicia durante el tránsito de los espermatozoides por el cervix o cuello uterino, se continúa posteriormente en los cuernos uterinos y se completa en el oviducto a nivel de la “ampolla”.

Las alteraciones que ocurren durante la capacitación “in vivo” son muy sustanciales e incluyen varias modificaciones intra- y extra-celulares que aún no han sido definidas completamente. Entre las modificaciones bien conocidas destacan la eliminación de proteínas del plasma seminal absorbidas en la membrana y la modificación y reorganización de componentes de la membrana plasmática (Bou-Haila & Tulsiani, 2009). Así, durante la capacitación se produce un cambio en la distribución de lípidos en los diferentes dominios de la membrana, hecho que es importante para el posterior reconocimiento y fusión con el ovocito (Boerke *et al.*, 2008). El colesterol y el sulfato de colesterol de la membrana de los espermatozoides limitan la permeabilidad iónica de la misma y la inserción y movilidad de las proteínas dentro de la bicapa lipídica, brindando de este modo una mayor rigidez y estabilización de la membrana (Suzuki, 1988). Durante el proceso

de la capacitación, los componentes de la superficie espermática son modificados o eliminados por secreciones del aparato reproductor femenino. Por ejemplo, la desulfatación del colesterol sulfato que desestabiliza la bicapa fosfolipídica y permite la activación acrosomal. La pérdida de colesterol altera la permeabilidad y fluidez de la membrana plasmática permitiendo la entrada de iones, especialmente de calcio y bicarbonato a través de canales (Bou-Haila & Tulsiani, 2009). La distribución de varios fosfolípidos de membrana también se ve alterada durante el proceso de capacitación. Debido a la activación de una translocasa bidireccional denominada “escramblasa”, lípidos como la fosfatidilserina, fosatidiletanolamina, fosfatidilcolina y esfingomielinina cambian de posición dentro de la bicapa lipídica (*Figura 2.2-1*) (Flesch *et al.*, 2001; Gadella & Harrison, 2002; Gadella *et al.*, 2008).

Se ha sugerido que el movimiento transmembrana del bicarbonato podría ser el responsable del aumento intracelular de pH (Zeng *et al.*, 1996; Cross & Razy-Faulkner, 1997). Esta alcalinización del citoplasma del espermatozoide provoca la apertura de canales de calcio y por tanto, la entrada masiva de este catión (Topfer-Petersen *et al.*, 2000) que será esencial para el inicio de la reacción acrosómica. La importancia del bicarbonato y del calcio en el proceso de capacitación también se ha puesto de manifiesto al reconocer a estas sustancias como inductoras de la capacitación “in vitro” (Tardif *et al.*, 2001; Tardif *et al.*, 2003).

Estos iones van a ser los responsables de la activación de la adenilato ciclasa (AC) soluble que produce adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual va iniciar la activación de numerosas cascadas de señalización a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA) (*Figura 2.2-1*). Esta vía del AMPc/PKA se activa en los espermatozoides de diferentes especies de mamíferos durante la capacitación y como veremos más adelante, tiene un papel fundamental en la regulación de este proceso (Visconti *et al.*, 1995b; Leclerc *et al.*, 1996; Visconti *et al.*, 1997; Aitken *et al.*, 1998). La activación

de la vía del AMPc/PKA y de otras vías de señalización que aparentemente participan en menor medida, inducen un cambio en el estado de fosforilación, tanto en serina/treonina como en tirosina, de determinadas proteínas reguladoras que modifican su estado de actividad, su localización subcelular o ambas. Finalmente dichas proteínas modificarán, a su vez, la conformación de diversas proteínas estructurales y el estado de actividad de proteínas efectoras que también participan en la capacitación (Breitbart, 2002; Bravo *et al.*, 2005).

Los espermatozoides de mamífero pueden ser capacitados “in vitro” mediante la incubación en un medio suplementado con sustratos energéticos como glucosa y piruvato, iones como bicarbonato y calcio y un aceptor de colesterol, normalmente albúmina sérica, la proteína más abundante en el tracto genital femenino (Dow & Bavister, 1989). La utilización de medios “in vitro” inductores de la capacitación han permitido estudiar este proceso en mayor detalle en diversas especies. Sin embargo, hay muchos aspectos de la capacitación cuya regulación y función son desconocidas, como la fosforilación en tirosina de diversas proteínas o los cambios de “tipo apoptótico” que tienen lugar.

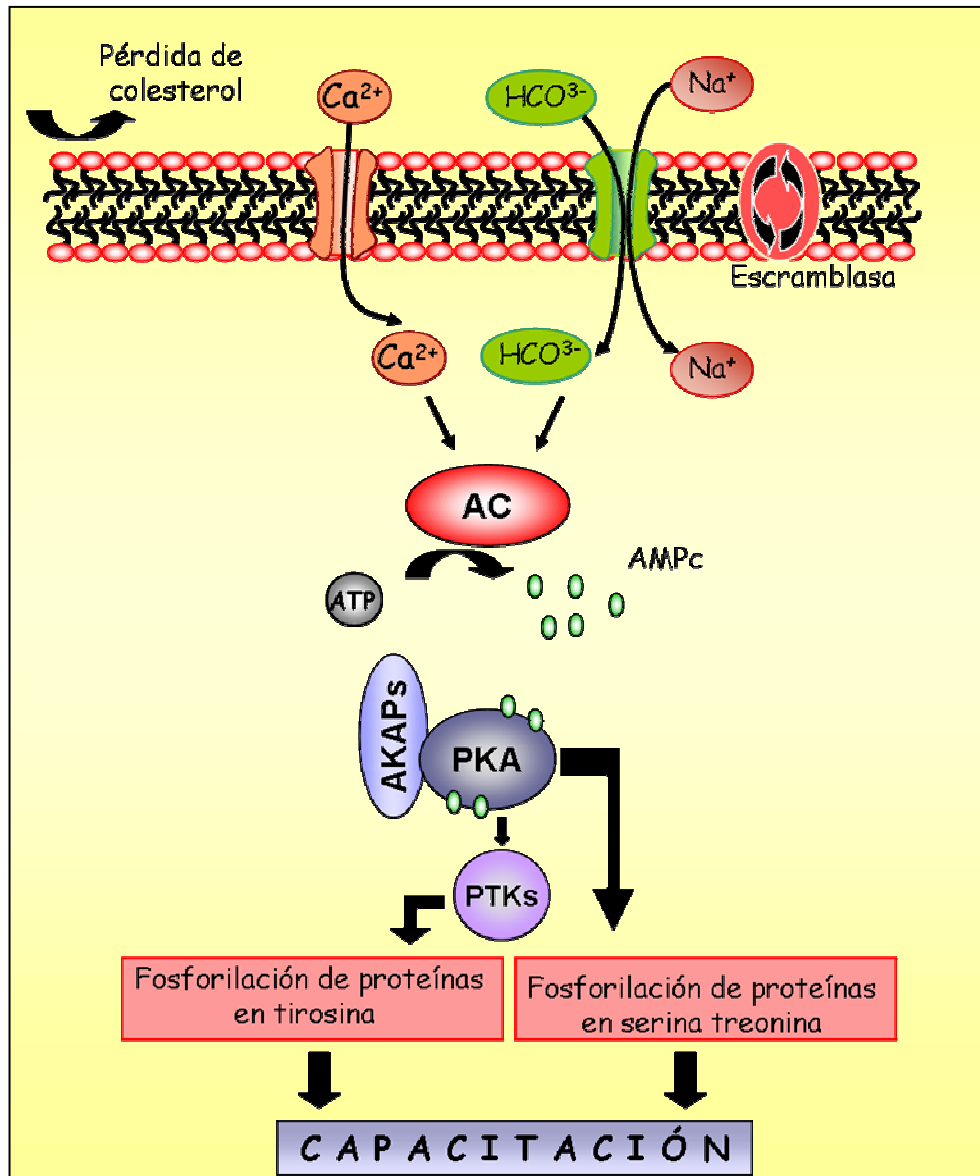


Figura 2.2-1. Principales vías de señalización intracelular involucradas en la motilidad y en la capacitación de espermatozoides de mamíferos.

2.3. Reacción acrosómica

Como se ha indicado anteriormente la reacción acrosómica (RA) en los espermatozoides de mamíferos es básicamente un proceso de exocitosis dependiente de calcio (Fraser *et al.*, 1995). En la mayoría de las especies de mamíferos es necesario que se produzca la RA, como consecuencia de la capacitación, para que tenga lugar la fusión con la zona pelúcida (ZP) del ovocito (Aitken & West, 1990; Fraser, 1994). En estas especies, la ZP está compuesta principalmente por tres tipos de glicoproteínas: glicoproteína de zona pelúcida 1 (ZP1), ZP2 y ZP3. Bleil y colaboradores (1980) demostraron que ZP3 era el primer ligando en unirse al espermatozoide, desencadenando la reacción acrosómica. La unión entre la ZP y el espermatozoide puede producirse por interacciones de tipo proteína – proteína, como en el caso de ZP3 y la proteína tirosina quinasa de 95 KDa, un receptor tirosina quinasa presente en la membrana del espermatozoide; o bien por unión proteína-carbohidrato, como la unión entre ZP3 y la proteína galtasa, una proteína de membrana que se une a la N-acetil-glucosamina de ZP3 (Brewis & Wong, 1999).

En cualquier caso, la unión de las glicoproteínas de la zona pelúcida del ovocito con receptores del espermatozoide va a desencadenar la apertura de canales de calcio provocando la entrada de este ión, un aumento de pH y la activación de receptores acoplados a proteínas G y fosfolipasas, que también van a desempeñar un papel muy importante en la reacción acrosómica (Brucker & Lipford, 1995). Como consecuencia de estos eventos se produce un incremento en la concentración de calcio intracelular y la degradación de fosfatidilinositoles de membrana por fosfolipasas tipo C (PLC) para producir diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). El DAG activa a la proteína quinasa C (PKC) y el IP₃ moviliza calcio de los depósitos al unirse a los receptores de IP₃ localizados en la membrana de estos depósitos (*Figura 2.3-1*) (Breitbart & Spungin, 1997). Tanto el calcio como el DAG actúan

como segundos mensajeros intracelulares en eventos que participan en la fusión entre la membrana acrosomal externa y la plasmática, produciéndose la exocitosis acrosomal (O'Toole *et al.*, 1996; Breitbart & Spungin, 1997).

La PKC induce entrada de calcio a través de la activación de canales de calcio situados en la membrana plasmática (Spungin & Breitbart, 1996). Además, el vaciamiento de los depósitos de calcio provocado por el IP_3 induce una entrada de calcio desde el exterior a través de canales (SOC) (Breitbart, 2003). Este aumento de calcio citoplasmático es un paso crítico que regula la reacción acrosómica (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2006). Tanto es así, que en los espermatozoides incubados en un medio libre de calcio no es posible inducir la RA (Bou-Haila & Tulsiani, 2009). Aparte del calcio otra molécula importante en la reacción acrosómica es el AMPc. La incubación de espermatozoides humanos (De Jonge *et al.*, 1991) y de carnero (Garde & Roldan, 2000) con análogos de AMPc o activadores de la AC induce un incremento en la RA, poniendo de manifiesto la importancia de la vía AMPc/PKA en la activación de este proceso (*Figura 2.3-1*).

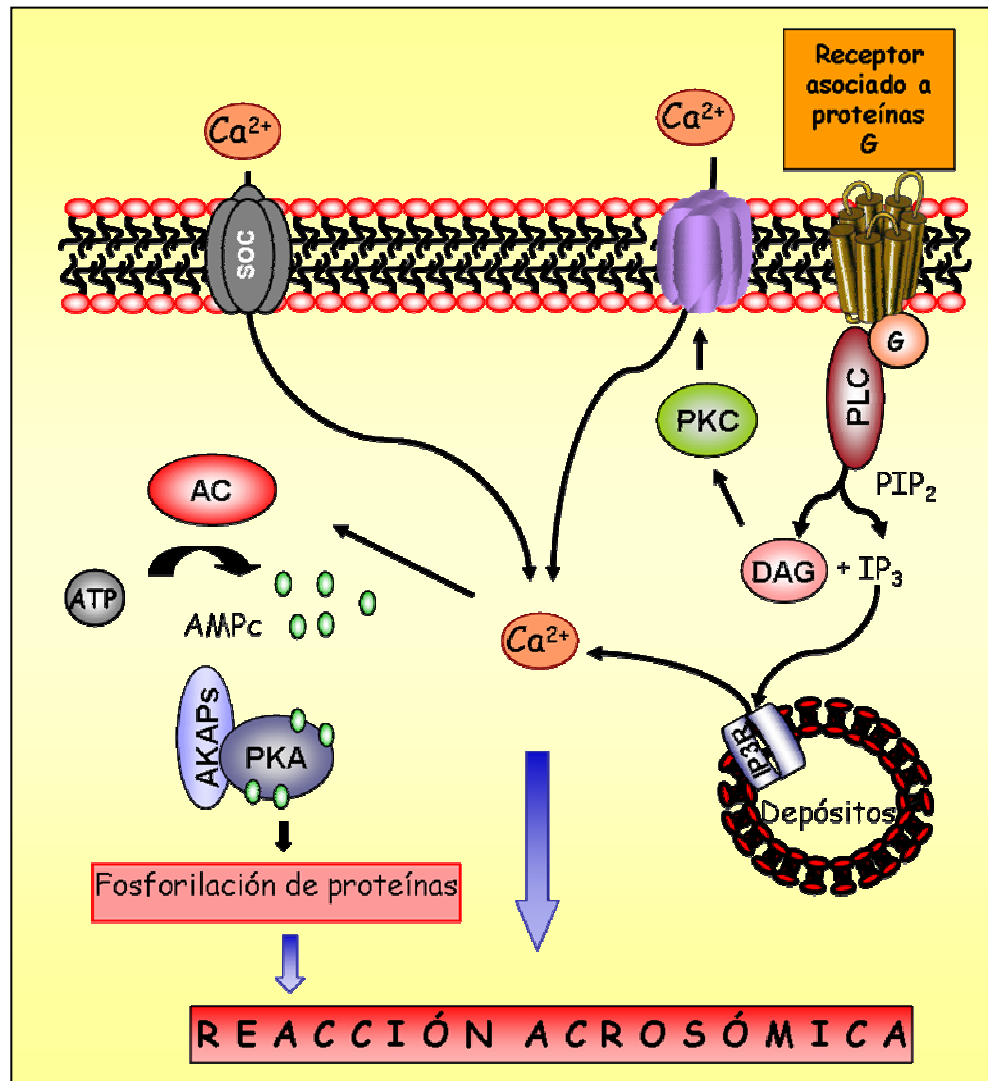


Figura 2.3-1. Principales vías de señalización intracelular involucradas en la reacción acrosómica de espermatozoides de mamíferos.

Además, existen diversos agentes fisiológicos y no fisiológicos, capaces de inducir la reacción acrosómica “in vitro” en los espermatozoides de los mamíferos, requiriendo o no de una capacitación previa. Los inductores fisiológicos son sustancias que el espermatozoide encontrará durante la fertilización “in vivo” (Bou-Haila & Tulsiani, 2009). Entre los compuestos

más utilizados se encuentran la progesterona (Emiliozzi *et al.*, 1996), ZP solubilizadas (Arnoult *et al.*, 1996), la heparina y algunos ionóforos (Aitken & West, 1990; Cross, 1996). El mecanismo de estimulación de la reacción acrosómica depende del agente, así la progesterona, una hormona producida durante la ovulación, induce la reacción acrosómica por interactuar con un receptor asociado a proteínas G heterotriméricas (GPCR) de la membrana plasmática del espermatozoide. Por otra parte, los ionóforos son moléculas capaces de estimular la RA en espermatozoides previamente capacitados, mediante la inducción de un flujo de calcio hacia el interior celular por la apertura de poros en la membrana (Cummins *et al.*, 1991). De entre los diferentes ionóforos disponibles, el A23187 es el más utilizado en espermatología para inducir la RA (Carrell *et al.*, 1992).

Desde un punto de vista estructural la inducción de la reacción acrosómica y la exocitosis del contenido acrosomal ocurren en varios pasos. Primero, hay una fusión de la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa en varias regiones del acrosoma. Segundo, la fusión de las membranas causa la formación de vesículas y la liberación progresiva del contenido acrosomal a lo largo del tiempo (*Figura 2.3-2*). El proceso es lento y está regulado por cambios en la membrana del espermatozoide y elementos del citoesqueleto, tales como fibras de F-actina presentes entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, las cuales deben ayudar al espermatozoide a penetrar gradualmente la ZP. Finalmente, la poderosa acción de las enzimas hidrolíticas, liberadas en la superficie de la ZP junto con la hiperactivación espermática hacen posible penetrar el ovocito y fertilizarlo (Bou-Haila & Tulsiani, 2009).

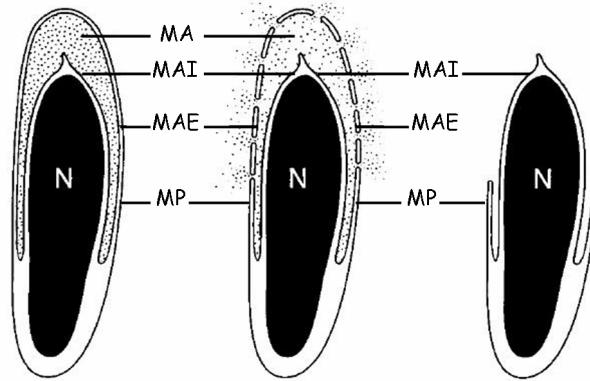


Figura 2.3-2. Esquema de los cambios que ocurren durante la reacción acrosómica en espermatozoides de mamíferos. **MA:** Matriz acrosomal, **MAI:** Membrana Acrosomal Interna, **MAE:** Membrana Acrosomal Externa, **MP:** Membrana plásmica, **N:** Núcleo.

3. MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE

Uno de los mecanismos más comúnmente utilizado por las células eucariotas para regular la actividad de proteínas es mediante la adición o eliminación de grupos fosfato en residuos de serina, treonina o de tirosina. La adición de un grupo γ -fosfato desde la molécula de ATP a un residuo susceptible de una proteína es realizado por las proteínas quinasas. El efecto contrario, es decir la eliminación de estos grupos fosfato es realizado por las proteínas fosfatasas. Ambos mecanismos de fosforilación y defosforilación pueden inducir modificaciones conformacionales en las proteínas que tienen como consecuencia la activación o inhibición de éstas (Mathews *et al.*, 2002). Además de regular el estado de actividad de las proteínas, la fosforilación puede modificar las propiedades de las proteínas en múltiples aspectos como las localizaciones subcelulares, asociaciones intra- e inter-moleculares, degradación proteolítica, etc. Todas estas modificaciones de las propiedades de las proteínas que dependen de la fosforilación permiten que éste sea uno de los mecanismos postraduccionales más utilizados por la célula para el control de varios procesos como el crecimiento celular, control del ciclo celular, ensamblaje del citoesqueleto, modulación de la corriente iónica y en definitiva, el control de la señalización intracelular en diversos aspectos (Sun & Tonks, 1994; Hunter, 2000; Pawson, 2004; Hunter, 2007).

Debido a que aparentemente hay una escasa o nula actividad transcripcional en la célula espermática, el mecanismo de fosforilación y defosforilación es muy importante en estas células y está implicado en fenómenos tales como la maduración en el epidídimo, el proceso de capacitación, la hiperactivación, la interacción con la zona pelúcida y la reacción acrosómica (Naz & Rajesh, 2004; Tulsiani *et al.*, 2007; Salicioni *et al.*, 2007; de Lamirande & O'Flaherty, 2008).

Basado en la especificidad de sustrato, las proteínas quinasas y fosfatasas han sido primariamente clasificadas en las siguientes tres categorías básicas: las específicas de residuos serina/treonina, las específicas de residuos tirosina y finalmente, las quinasas y fosfatasas de especificidad dual (Sun & Tonks, 1994; Alonso *et al.*, 2004).

Varios estudios basados en *Western blotting* o en proteómica han demostrado la presencia en espermatozoides de mamíferos de numerosas proteínas serina/treonina quinasa involucradas en la regulación de numerosos procesos, incluyendo la PKA (Kalab *et al.*, 1998; Tardif *et al.*, 2004; Harayama *et al.*, 2004a; Harayama *et al.*, 2004b; Luconi *et al.*, 2005; Harayama & Miyake, 2006; Salicioni *et al.*, 2007; Harayama & Nakamura, 2008), la PKB (Nauc *et al.*, 2004; Aparicio *et al.*, 2007a), la PKC (Harayama & Miyake, 2006; Ashizawa *et al.*, 2006), la PKD (Gonzalez-Fernandez & Tapia, 2007), la GSK3 (Aparicio *et al.*, 2007b), las MAP quinasas (Almog *et al.*, 2008) y la PDK1 (Lu *et al.*, 1999), entre otras.

El número de proteínas tirosina quinasa (PTKs) que han sido identificadas por *Western blotting* o bien por estudios de proteómica en espermatozoides de mamíferos va en aumento. Así, se han descrito receptores de factores de crecimiento (Furuya *et al.*, 1993; Cotton *et al.*, 2006), componentes de la familia de tirosina quinasas Src (Leclerc & Goupil, 2002; Baker *et al.*, 2006), quinasas de adhesión focal (Chieffi *et al.*, 2003), componentes de la familia de tirosina quinasas Syk (Harayama *et al.*, 2004a), tirosina quinasas de la familia Tec (Lalancette *et al.*, 2006) y c-terminal Src quinasas (Harayama *et al.*, 2004a), entre otras. En cuanto a las proteínas quinasas de especificidad dual, se ha descrito por *Western blotting* la presencia de MEK en espermatozoides de cerdo miniatura (Kawano *et al.*, 2008).

La importancia de todas estas quinasas en la regulación espermática se ha demostrado en numerosos estudios. Se ha demostrado la participación de quinasas específica de Ser/Thr, de Tyr o duales en la regulación de la motilidad, la capacitación y la reacción acrosómica (Visconti & Kopf, 1998; Breitbart, 2002; Breitbart, 2003; Aparicio *et al.*, 2005; Marin-Briggiler *et al.*, 2005; Harayama & Miyake, 2006; Almog *et al.*, 2008; Kawano *et al.*, 2008; Lemoine *et al.*, 2009; Breitbart *et al.*, 2009). Cambios en el patrón de fosforilación también se producen durante la maduración y el tránsito por el epidídimo de los espermatozoides (Lu *et al.*, 1999). Sin embargo el papel de cada una de estas quinasas es variable en función de la situación fisiológica del espermatozoide e incluso de la especie. Sirva como ejemplo el papel de la PKA y de la PKC en la motilidad espermática. Por un lado se ha demostrado que el inhibidor específico de la PKA, el H89, inhibe la motilidad en espermatozoides humanos (Bajpai & Doncel, 2003) y de verraco (Holt & Harrison, 2002), mientras que activadores de la PKC inducen un aumento en la motilidad de espermatozoides humanos (Rotem *et al.*, 1990) y una disminución en los de gallo (Ashizawa *et al.*, 2006). Por otro lado, la inhibición de la PKC con inhibidores específicos produce una disminución en la motilidad de espermatozoides de hombre (Rotem *et al.*, 1990) y de hámster (Nagdas *et al.*, 2002), pero no tiene efectos en los de verraco (Holt & Harrison, 2002), indicando que tanto la PKC como la PKA participan en la regulación de la motilidad con un papel que es variable en función de la especie. Finalmente, además de la PKC y la PKA, en la regulación de la motilidad espermática parece que también juegan un papel fundamental las MAPK (Almog *et al.*, 2008) y como veremos en el siguiente apartado, las proteínas tirosina quinasa (PTKs).

A pesar de que, como se ha indicado, el papel de las proteínas quinasas es fundamentalmente regular la función espermática, se conoce comparativamente mucho menos de la presencia y función de las fosfatasas en los espermatozoides de mamíferos.

3.1. Fosforilación en tirosina

El proceso de fosforilación en tirosina ha sido relacionado con la regulación de una gran variedad de funciones celulares, como el crecimiento, procesos de adhesión, cambios en el citoesqueleto, control del ciclo celular o exocitosis (Aplin *et al.*, 1999; Schlaepfer *et al.*, 1999; Hubbard & Till, 2000). Todas estas características son típicas de células somáticas, sin embargo en los espermatozoides eyaculados, la fosforilación en tirosina también juega un papel importante.

La primera evidencia de la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina en espermatozoides de mamífero fue descrita por Leyton y Saling (1989) que, utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina, identificaron 3 proteínas de 52, 75 y 95 kDa en espermatozoides de ratón. Estudios posteriores a este trabajo inicial han demostrado la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina en los espermatozoides de numerosas especies, incluyendo toro (Spungin *et al.*, 1995), hámster (Kulanand & Shivaji, 2001), cerdo (Flesch *et al.*, 1999), caballo (Pommer *et al.*, 2003), perro (Petrunkina *et al.*, 2003) y hombre (Luconi *et al.*, 1996).

Uno de los mayores esfuerzos para establecer la relación entre las diferentes proteínas fosforiladas con una función específica, ha sido localizar las proteínas fosforiladas en tirosina en las regiones del espermatozoide. El flagelo parece ser el componente de la célula que sufre un mayor grado de fosforilación en tirosina. Usando la técnica de inmunocitoquímica se han localizado proteínas fosforiladas en tirosina en el flagelo de espermatozoides de hombre (Naz *et al.*, 1991; Carrera *et al.*, 1996; Leclerc *et al.*, 1997), de mono (Mahony & Gwathmey, 1999), de hámster (Si & Okuno, 1999), de rata (Lewis & Aitken, 2001) y de ratón (Urner *et al.*, 2001). Usando esta técnica Urner y colaboradores (2001) localizaron proteínas fosforiladas en el flagelo durante la capacitación, la unión a la zona pelúcida y la fusión en

espermatozoides de ratón. Además, observaron que durante la capacitación había un incremento en la proporción de espermatozoides con proteínas fosforiladas en la pieza principal y que este incremento en la fosforilación de la pieza principal precedía a la fosforilación de las proteínas de la pieza intermedia. Un incremento significativo en la fosforilación, principalmente en el flagelo durante la capacitación, también ha sido observado en espermatozoides de hombre (Carrera *et al.*, 1996; Leclerc *et al.*, 1997).

Además de en la cola, también se ha detectado fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en la cabeza del espermatozoide. Así, en los espermatozoides humanos mantenidos en condiciones capacitantes, se ha observado un incremento tanto en el número de células que mostraban proteínas fosforiladas como en el grado de fosforilación, especialmente en la región apical de la cabeza (Naz *et al.*, 1991). Además, en estos estudios se detectó un cambio en el patrón de fluorescencia de sitios fosfo-específicos, desde las regiones de la cola de los espermatozoides no capacitados hacia la región apical de los espermatozoides capacitados. Dado que la región apical en el espermatozoide está involucrada en la interacción espermatozoide-ovocito, el cambio del patrón de fosforilación de las regiones podría tener una significancia fisiológica durante la fecundación (Naz & Rajesh, 2004).

Los estudios descritos hasta el momento indican que el grado de fosforilación en tirosina de diversas proteínas se incrementa en los espermatozoides durante la capacitación, sin embargo pocas proteínas que experimentan fosforilación en tirosina han sido identificadas hasta el momento. En espermatozoides humanos, la proteína de anclaje a la proteína quinasa A (AKAP) localizada en la vaina fibrosa es la proteína que experimenta mayor fosforilación en tirosina durante la capacitación. Resultados similares han sido descritos utilizando espermatozoides de hámster, donde la proteína AKAP4 ha sido descrita como la proteína que más fosforilación en tirosina experimenta durante la capacitación (Jha & Shivaji,

2002). Por el contrario, en ratón la AKAP4 es fosforilada en serina/treonina, poniendo de manifiesto la variabilidad de fosforilaciones de la misma proteína según la especie (Naz & Rajesh, 2004).

Otra proteína que es fosforilada durante la capacitación es la proteína de unión a calcio y regulada por fosforilación en tirosina (CABYR), que ha sido localizada en la pieza principal de espermatozoides humano (Naaby-Hansen *et al.*, 2002) y se cree que pueda estar relacionada en la regulación de la fosforilación en tirosina mediada por las rutas de señalización de calcio.

Por otro lado, existen numerosos estudios desarrollados en espermatozoides de cerdo en los que se relaciona la fosforilación en tirosina de determinadas proteínas con la capacitación (Kalab *et al.*, 1998; Flesch *et al.*, 1999; Dube *et al.*, 2003) y con la reacción acrosómica (Kalab *et al.*, 1998). En este sentido, el grado de fosforilación en tirosina de la proteína p32 ha sido propuesto como un marcador de capacitación en esta especie (Tardif *et al.*, 2001; Tardif *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 2005). Esta proteína es una forma fosforilada en tirosina de sp32, una proteína de unión a la proacrosina, que está implicada en la maduración de la proacrosina a acrosina (Dube *et al.*, 2005). Además también se inducen fosforilaciones de proteínas de la membrana plasmática, las cuales se cree que pueden iniciar la unión a la zona pelúcida y la reacción acrosómica (Flesch *et al.*, 1999), indicando que este tipo de fosforilaciones juegan un papel muy importante en la regulación de proteínas implicadas en procesos tan importantes como la capacitación o la reacción acrosómica.

Además, la fosforilación en tirosina parece tener un papel importante en la regulación de la motilidad, aunque el efecto en motilidad depende de la especie. Se ha demostrado que la inhibición de proteínas tirosina quinasa con inhibidores específicos como genisteína, tirfostina, erbastatina, herbimicina A o estaurosporina reducen la fosforilación en tirosina de proteínas y la

motilidad en espermatozoides humanos (Holt & Harrison, 2002; Bajpai *et al.*, 2003; Bajpai & Doncel, 2003). La tirfostina inhibe la fosforilación de proteínas y la hiperactivación en espermatozoides de hámster (Si & Okuno, 1999). Sin embargo, ni la genisteína, ni la tirfostina modificaron la motilidad en espermatozoides de ratón (Uma *et al.*, 2000), indicando que el efecto del inhibidor es variable en función de la especie. Finalmente, la fosforilación en tirosina de las proteínas del flagelo del espermatozoide parece estar relacionada con la adquisición de la “motilidad hiperactivada” (Mahony & Gwathmey, 1999; Nassar *et al.*, 1999) que, como se ha indicado anteriormente, es requerida para que el espermatozoide penetre en el ovocito.

3.2. Vías que regulan la fosforilación

Muchas de las rutas de señalización intracelular que regulan la homeostasis en las células somáticas también están presentes en los espermatozoides y también participan en la regulación en estas células. Así, en los espermatozoides de diferentes especies se han descrito las vías de la PKA, de la PKC, del calcio, de la PI3K y de las MAPK, participando todas ellas en la regulación de importantes funciones. A continuación se describen las principales vías de señalización descritas en espermatozoides, los componentes que las integran y los principales procesos que regulan.

3.2.1. Vía AMPc/PKA

La adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), el calcio y el bicarbonato son agentes esenciales en las cascadas de señalización intracelular que permiten adquirir capacidad de fecundar al espermatozoide (*Figura 2.2-1*). Numerosos estudios demuestran que durante el proceso de capacitación se incrementa la concentración intracelular del AMPc, asignándole a este segundo mensajero un papel esencial en la regulación de este proceso (White & Aitken, 1989; Visconti *et al.*, 1995b).

El AMPc es producido a partir de la adenosina trifosfato (ATP) por la adenilato ciclasa (AC) (*Figura 2.2-1*). En los espermatozoides de mamíferos parece que la isoforma principal de esta enzima es una isoforma soluble que es estimulada directamente por la acción del bicarbonato y el calcio (Hyne & Garbers, 1979; Gross *et al.*, 1987). Es decir, el aumento en la concentración de AMPc está relacionado con un aumento tanto en la concentración de calcio como de bicarbonato durante el proceso de capacitación debido a que ambos tienen un modo común de actuación estimulando la actividad de la adenilato ciclasa presente en los espermatozoides de mamíferos (Hyne & Garbers, 1979; Gross *et al.*, 1987). Sin embargo, a pesar del importante papel del calcio y del bicarbonato en la capacitación, este papel se circunscribe a la activación de la adenilato ciclasa con la concomitante producción de AMPc, siendo este último segundo mensajero el realmente implicado en el establecimiento de los cambios capacitantes del espermatozoide. Esta hipótesis está fundamentada en trabajos que demuestran que el AMPc por sí sólo es capaz de producir capacitación en espermatozoides de cerdo en ausencia de calcio y/o bicarbonato (Visconti *et al.*, 1995b).

La principal diana intracelular del AMPc es la proteína quinasa A (PKA). Visconti y colaboradores (1997) demostraron que durante la capacitación existe un aumento en la actividad de la PKA en espermatozoides de ratón. Utilizando una aproximación opuesta, es decir inhibiendo la actividad de la PKA, otros estudios llegaron a conclusiones equivalentes. En estos estudios posteriores se demostró que la inhibición de la actividad de la PKA se acompaña de una inhibición tanto de la capacitación como de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina en un medio capacitante, indicando que la PKA es el principal efector del AMPc en la capacitación y que, durante la capacitación, se produce un incremento en la fosforilación en tirosina de diferentes proteínas (Botelho *et al.*, 1988).

Debido a que la PKA es una serina/treonina quinasa, es decir únicamente es capaz de fosforilar en residuos de serina y/o treonina a sus sustratos, la fosforilación en tirosina estimulada por la activación de la vía de señalización AMPc/PKA durante el proceso de capacitación, implica necesariamente la activación intermedia de proteínas tirosina quinasa, la inactivación de proteínas tirosina fosfatasa, o el establecimiento de ambos mecanismos concomitantemente (Visconti & Kopf, 1998; Breitbart, 2002).

Además de activar proteínas tirosina quinasa, la PKA puede fosforilar y activar a importantes efectores de otras vías de señalización. En este sentido se ha demostrado que la PKC y quinasas dependientes de Ca/calmodulina (CAMK) pueden ser activadas en los espermatozoides de mamíferos por mecanismos dependientes de AMPc/PKA y que éstas otras quinasas también estarían implicadas en la regulación de los cambios capacitantes del espermatozoide (Rotem *et al.*, 1990; Visconti *et al.*, 1997; Igotz & Suarez, 2005; Marin-Briggiler *et al.*, 2005). Es decir, la vía del AMPc/PKA tiene un papel central en la regulación de los eventos moleculares que se desarrollan durante el proceso de capacitación (*Figura 2.2-1*).

3.2.2. Vía DAG/PKC

La PKC es una familia de serina/treonina quinasas formada por numerosas isoformas, que se divide en tres grupos atendiendo a su estructura y requerimientos alostéricos: las PKCs convencionales (cPKC), que dependen de calcio y son activadas por fosfolípidos, diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol (TPA); las PKCs noveles (nPKC) que se activan por DAG y TPA pero son insensibles a calcio; y las PKCs atípicas (aPKC) que no responden ni a DAG ni TPA y son insensibles a calcio (Newton, 1995).

La principal vía de activación de la PKC depende de la activación de fosfolipasas C (PLC), que hidrolizan fosfatidilinositoles de membrana para producir DAG e inositol trifosfato (IP₃). El IP₃ induce un aumento de calcio

citosólico mediante la activación de los recetores específicos de IP₃ localizados en la membrana de los depósitos de calcio. Además de muchos otros efectos biológicos, el calcio es un cofactor para la activación de las cPKC y las quinasas dependientes de Ca/calmodulina (CAMK). Por otra parte, el DAG es el primer agente activador de las cPKC y nPKC, regulando su translocación a las membranas biológicas y produciendo cambios de conformación necesarios para adquirir competencia catalítica (Newton, 1995) (*Figura 2.3-1*). Además de este mecanismo de regulación se ha descrito la activación de la PKC mediante fosforilación por la PDK1 vía PI3K (Mora *et al.*, 2004), activación dependiente de fosfolipasa A (PLA) (Newton, 1995; Liu, 1996; Newton, 1997) y activación de PKCs dependiente de fosfolipasa D (PLD) (Liu, 1996)

En células somáticas la familia de quinasas PKC está implicada en la regulación de múltiples procesos celulares, incluyendo el crecimiento y diferenciación celular, desarrollo de tumores, apoptosis, envejecimiento, y muchos otros (Blobe *et al.*, 1996; Musashi *et al.*, 2000). Respecto a los espermatozoides se ha descrito la presencia de la PKC en diferentes especies de mamíferos, donde parece que pueden jugar un papel regulando la reacción acrosómica (Brucker & Lipford, 1995; O'Toole *et al.*, 1996; Breitbart & Spungin, 1997; Breitbart, 2003) y probablemente, la motilidad en algunas especies (ver apartado 3). En este sentido, se ha descrito recientemente que la PKC está implicada en la hiperactivación del movimiento flagelar en espermatozoides de cerdo, participando en un mecanismo dependiente de la vía AMPc/PKA (Harayama & Miyake, 2006) (*Figura 2.3-1*).

3.2.3. Vía PKB/PI3K

La fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), es una quinasa de lípidos que cataliza la adición de una molécula de fosfato específicamente a la posición 3 del anillo inositol de los fosfatidilinositoles (PI) (Rameh & Cantley, 1999). La PI3K presenta dos subunidades de diferente peso molecular denominadas subunidades p85 y p110 o subunidades reguladora y catalítica, respectivamente. Existen múltiples isoformas de PI3K en las células de mamíferos que se dividen a su vez en varias clases en función de su sustrato específico, de su estructura o de su mecanismo de regulación (Wymann & Pirola, 1998).

El producto principal de la PI3K es el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). Este fosfatidilinositol permite el anclaje y activación de proteínas con dominios con homología pleckstrina (dominios PH) como las quinasas PDK1 y Akt/PKB, la fosfatasa de lípidos PTEN y algunas otras (Toker & Cantley, 1997). Por lo tanto, las quinasas reclutadas y activadas mediante la producción de PIP₃ por la subunidad catalítica de la PI3K son muy diversas y, a su vez, poseen una pléyade de dianas intracelulares que están implicadas en la regulación de importantes funciones. En este sentido se ha descrito que la vía de señalización de la PI3K estaría implicada en diferentes tipos celulares en la regulación de la motilidad, la exocitosis, la regulación del ciclo celular, la proliferación y la supervivencia (Wymann & Pirola, 1998; Coffey *et al.*, 1998; Scheid & Woodgett, 2001).

Una de las principales dianas moleculares de la PI3K es la PKB/Akt (Toker & Cantley, 1997). En células somáticas la PKB/Akt fosforila y regula la función de muchas proteínas celulares involucradas en procesos que incluyen la regulación del metabolismo, apoptosis y proliferación (Coffey *et al.*, 1998; Scheid & Woodgett, 2001). Respecto a las células germinales, se ha descrito la presencia de la PI3K en espermatozoides de ratón, de hámster,

de cerdo y humanos (Feng *et al.*, 1998; Luconi *et al.*, 2001; Nagdas *et al.*, 2002; Aparicio *et al.*, 2005) donde participarían en la regulación de la motilidad y supervivencia de estas células. Así, se ha descrito que la inhibición de la PI3K en los espermatozoides de hámster induce una disminución de la hiperactivación observada durante la capacitación (Nagdas *et al.*, 2002). Además se ha descrito que la inhibición de la PI3K utilizando el inhibidor específico LY294002 regula parámetros de la motilidad en espermatozoides de cerdo (Aparicio *et al.*, 2005).

Además de la motilidad parece que la PI3K también participa en la regulación de la viabilidad espermática. Así, en espermatozoides de cerdo el LY294002 inhibe la viabilidad de éstas células, sin modificar la capacitación ni la reacción acrosómica (Aparicio *et al.*, 2007b). Sin embargo, el papel regulador de la PI3K en la reacción acrosómica parece depender de la especie en estudio o bien del inhibidor empleado, puesto que Fisher y colaboradores (1998) demostraron que la reacción acrosómica en espermatozoides humanos es inhibida al bloquear la actividad de la PI3K con wortmanina, otro inhibidor específico de esta quinasa. Otros estudios más recientes también describen que una inhibición de la PI3K inhibe la reacción acrosómica en espermatozoides de gallo (Lemoine *et al.*, 2009) y en espermatozoides bovinos y murinos (Breitbart *et al.*, 2009).

3.2.4. Vía MAP quinasa

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), también conocidas como quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) son proteínas serina/treonina quinasas. En mamíferos se conocen cuatro grandes cascadas de MAPK: quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2), quinasa de amino terminal C-jun (JNK), p38 y ERK5 (Nishimoto & Nishida, 2006). Las cascadas se inician por mitógenos y factores de crecimiento en el caso de la ruta ERK1/2, mientras que el estrés y los procesos inflamatorios constituyen los principales activadores de la cascada

de JNK y p38. La activación de las MAPKs se produce a través de una cascada de señalización secuencial en la que las proteínas G de pequeño tamaño de la familia Ras asociadas a la membrana activan una MAPK quinasa quinasa (MAPK3) que fosforila y activa una MAPK quinasa (MAPK2) que finalmente fosforila a MAPK (Seger & Krebs, 1995; Gutkind, 1998; Pearson *et al.*, 2001; Murphy & Blenis, 2006; Yoon & Seger, 2006). Las MAPKs experimentan una doble fosforilación en residuos de treonina y tirosina y están reguladas por las MAPK2, unas quinasas de especificidad dual. Una vez fosforiladas, las MAPKs activan una gran variedad de sustratos, tales como proteínas estructurales, quinasas, factores de transcripción y otras enzimas (Chuderland & Seger, 2005). En células somáticas están implicadas en la diferenciación, proliferación, supervivencia, migración, crecimiento y apoptosis (Murphy & Blenis, 2006; Yoon & Seger, 2006).

Se ha detectado la presencia de ERK 1/2 en las fases de espermatogénesis y en el espermatozoide epididimario. En las primeras fases estaría implicada en las divisiones mitóticas de la espermatogonia y en las primeras divisiones meióticas y en el epidídimo estaría relacionado con la adquisición de la motilidad (Lu *et al.*, 1999). La ERK 1/2 es activada gradualmente según el espermatozoide pasa de ser inmóvil al principio del epidídimo a ser completamente mótil al final de éste (Lu *et al.*, 1999).

En espermatozoides maduros de hombre se ha detectado por *Western blotting* e inmunocitoquímica la presencia de ERK1/2 y p38, pero no de JNK (Luconi *et al.*, 1998a; Almog *et al.*, 2008). En este estudio la ERK1/2 se localiza a lo largo de la cola, mientras que la p38 se localiza en la zona postacrosomal y en la cola (Almog *et al.*, 2008). Utilizando inhibidores de ERK1/2 y de p38 han demostrado que mientras ERK1/2 estimula la motilidad, la p38 la inhibe. Sin embargo ambas proteínas estimulan la reacción acrosómica en un proceso no bien definido (Almog *et al.*, 2008). Sin

embargo, otros autores han localizado la isoforma ERK2 (Luconi *et al.*, 1998b), la proteína adaptadora Shc (Morte *et al.*, 1998) y Ras (Naz *et al.*, 1992) en la cabeza de espermatozoides humanos indicando que esta vía podría ser importante para la regulación de proteínas en esta localización. Se ha especulado que MAPK fosforila proteínas que regulan la fosforilación en tirosina indirectamente (Naz & Rajesh, 2004). La inhibición de MAPK con inhibidores específicos bloquea la fosforilación en tirosina asociada con la capacitación (O'Flaherty *et al.*, 2005) y la reacción acrosómica (du Plessis *et al.*, 2002). Un estudio reciente describe la presencia de la isoforma ERK1 y p38 en espermatozoides de gallo, sin embargo estos autores utilizando inhibidores, encuentran que ERK1 está implicada en la motilidad y la RA, mientras que p38 no (Lemoine *et al.*, 2009).

Aunque, como se ha indicado previamente, hay numerosos estudios sobre las MAPKs en los espermatozoides relacionando estas proteínas con diversas funciones, sin embargo no está claro como se regulan estas proteínas en este modelo celular. Por ejemplo, si bien se han descrito sus potenciales funciones y cuáles podrían ser los activadores de estas rutas en espermatozoides, no está claro el mecanismo de inhibición. Se ha propuesto que esta inhibición es ejercida por fosfatasas de las MAPKs (MKPs), las cuales son capaces de defosforilar residuos en tirosina/treonina, es decir fosfatasas de especificidad dual, que serán abordadas en el siguiente apartado. Sin embargo no hay que descartar a otras fosfatasas como proteínas tirosina fosfatasa (PTPs) que potencialmente también serían capaces de defosforilar y por lo tanto inactivar las MAPK (Almog & Naor, 2008).

3.3. *Proteínas tirosina fosfatasa*

Como ya se ha expuesto en apartados anteriores, la fosforilación es un mecanismo de regulación de proteínas que está implicado en multitud de procesos fisiológicos en células somáticas y también en los espermatozoides.

En base a la secuencia de aminoácidos de su dominio catalítico y en la especificidad de sustrato, las proteínas tirosina fosfatasas pueden ser agrupadas en 4 clases, cada una con un rango de sustrato específico (*Tabla 3.3-1*) (Sun & Tonks, 1994; Alonso *et al.*, 2004) :

- **Clase I:** Mecanismo catalítico basado en cisteína. Aquí encontramos las PTPs clásicas, que son específicas de tirosina y se dividen a su vez en base a su localización subcelular en proteínas tirosina fosfatasa receptor (RPTP) y no receptor (NRPTP). Además de éstas, en esta clase I también encontramos a las fosfatasas de especificidad dual (DSP) que son mucho más diversas en términos de especificidad de sustrato y son clasificadas en 6 subgrupos. Entre ellos, el subgrupo más estudiado es el de las *fosfatasas de MAPK (MKPs)* que, como su nombre indica, se caracteriza por contener las fosfatasas con capacidad de defosforilar las ERK, JNK y p38. Otro subgrupo importante son las denominadas *DSP atípicas*, que además de defosforilar las MAPKs defosforilan más sustratos, como el ARN mensajero. Otro subgrupo engloba a las *CDC14s*, que están involucradas en la regulación de la mitosis mediante la defosforilación de quinasas dependientes de ciclo celular (CDK). Los otros dos subgrupos: *PTENs* y *miotubularinas*, son capaces de defosforilar fosfolípidos además de proteínas. Así, mientras PTEN defosforila fosfatidilinosítoles de membrana plasmática, las miotubularinas defosforilan fosfatidilinosítoles de las membranas

internas. Finalmente, acerca de los dos últimos subgrupos denominados *slingshots* y *PRLs* se tiene muy poca información (Alonso *et al.*, 2004).

- **Clase II:** Mecanismo catalítico basado en cisteína. En este grupo encontramos solamente una tirosina fosfatasa de bajo peso molecular denominada *LMPTP*. Aunque *LMPTP* puede defosforilar un gran número de proteínas tirosina quinasa, la función fisiológica es todavía desconocida (Alonso *et al.*, 2004).
- **Clase III:** Mecanismo catalítico basado en cisteína. Este grupo esta representado por tres proteínas tirosina/treonina fosfatasa reguladoras del ciclo celular denominadas *CDC25*. Al igual que las *CDC14s*, estas proteínas defosforilan *CDKs* y están implicadas en la regulación del ciclo celular (Alonso *et al.*, 2004).
- **Clase IV:** Mecanismo catalítico basado en aspartato. Pertenecen a esta clase un grupo de proteínas muy poco estudiadas denominadas *Eya*. Éstas actúan como proteínas tirosina/serina fosfatasa y además funcionan como factores de transcripción. Hasta el momento se conoce que esta clase de fosfatasa juega un papel muy importante en la ontogénesis del ojo (Alonso *et al.*, 2004).

Grupo	Nº de genes	Especificidad de sustrato
Clase I		
PTP Clásicas	21	P Tirosina
RPTPs		
NRPTPs	17	P Tirosina
DSPs		
MKPs	11	P Tirosina, P Treonina
DSPs atípicas	19	P Tirosina, P Treonina, RNAm
Slingshots	3	P Serina
PRLs	3	P Tirosina
CDC14s	4	P Serina, P Treonina
PTENs	5	D3-fosfoinosítidos
Myotubularins	16	PI(3)P
Clase II		
LMPTP	1	P Tirosina
Clase III		
CDC25	3	P Tirosina, P Treonina
Clase IV		
EyA	4	P Tirosina, P Serina?

Tabla 3.3-1. Esquema de la clasificación de las PTPs basada en la secuencia de los dominios catalíticos descritos en el genoma humano (Alonso *et al.*, 2004).

Las PTPs de clase I son las más importantes en el mantenimiento de los niveles de fosforilación en tirosina en células somáticas y están involucradas en la regulación de muchos procesos fisiológicos (Sun & Tonks, 1994; Alonso *et al.*, 2004).

Si bien hay numerosos estudios sobre proteínas quinasas y sobre la fosforilación en espermatozoides de mamíferos, hay muy pocos trabajos sobre la identificación y funciones de las proteínas fosfatasas en estas células. Estas proteínas son componentes cruciales en las vías de señalización que implican fosforilación, ya que pueden modular la intensidad y/o duración de

la señal o bien iniciar “per se” la cascada de fosforilación (Sun & Tonks, 1994; Alonso *et al.*, 2004).

Se ha estudiado la presencia de estas fosfatasas en la espermatogénesis usando la técnica RT-PCR en espermatozoides de ratón, encontrando 5 PTPs: PTPRD, PTPRE, PTPN5, PTPN1 y PTPN2 en espermatogonias de ratón (Kaneko *et al.*, 1993). Posteriormente, Shima y colaboradores (2004) analizaron la expresión de 36000 transcritos mediante la técnica RNA microarrays durante las diferentes etapas de la espermatogénesis. Identificaron numerosas PTPs y DSPs que eran reguladas durante el desarrollo de la célula germinal, mostrando diferentes grado de expresión dependiendo de la fase de la espermatogénesis (Shima *et al.*, 2004). En la última fase de maduración, DUSP3, DUS13 y PTPN4 estaban presentes en las espermátidas (Shima *et al.*, 2004). La proteína DUSP22 era detectada sólo durante las fases de la espermatogénesis y no en el espermatozoide maduro, indicando la importancia de esta proteína en la regulación de la espermatogénesis (Namekawa *et al.*, 2006). Todos estos estudios ponen de manifiesto la presencia de fosfatasas en el espermatozoide durante su formación y desarrollo y la importancia del mecanismo de defosforilación llevado a cabo por las fosfatasas.

Respecto al espermatozoide adulto eyaculado, utilizando técnicas como *Western blotting* o inmunocitoquímica, han sido descritas hasta el momento muy pocas PTPs. Se ha identificado la PTP1N en espermatozoides de rata (Seligman *et al.*, 2004), de ratón (Tomes *et al.*, 2004) y de hombre (Tomes *et al.*, 2004). Otra fosfatasa identificada en lisados de espermatozoides de verraco es la PTEN (Aparicio *et al.*, 2007a). Utilizando RTPCR e inmunocitoquímica Teng y colaboradores (2007) han identificado en espermatozoides humanos cuatro variantes alterativas de la proteína fosfatasa CDC25, sugiriendo que esta fosfatasa pueda tener una función diferente de la regulación del ciclo celular que demuestra en células somáticas. Algunos

estudios de las proteínas tirosina fosfatasa utilizando inhibidores específicos, demuestran que estas proteínas regulan diferentes parámetros de la célula espermática, bien de forma positiva o de forma negativa dependiendo de la especie de estudio. Así, en cuanto a la regulación de la fosforilación en tirosina, se ha encontrado un aumento de la fosforilación en espermatozoides de cerdo incubados con el análogo 8-Br-cAMP en presencia de ortovanadato, un inhibidor selectivo de proteínas tirosina fosfatasa (Harayama *et al.*, 2004b; Harayama & Nakamura, 2008). En un estudio reciente también se ha descrito un aumento de la fosforilación en tirosina en espermatozoides bovinos incubados en un medio capacitante en presencia de ortovanadato (Pons-Rejraji *et al.*, 2009). Sin embargo, un estudio previo de Luconi y colaboradores (1995) no detectó un incremento en la fosforilación en tirosina de proteínas en lisados de espermatozoides humanos incubados con ortovanadato durante la capacitación “in vitro”, sugiriendo que la fosforilación en tirosina durante la capacitación espermática en espermatozoides humanos puede ser exclusivamente atribuida a PTKs. Por el contrario, Tomes y colaboradores (2004) han descrito un incremento significativo en la fosforilación en tirosina de proteínas de espermatozoides de esta misma especie, incubados bajo condiciones capacitantes en presencia de pervanadato.

En cuanto a la función espermática, se ha demostrado que la inhibición de la actividad tirosina fosfatasa con ortovanadato produce una inhibición de la motilidad en espermatozoides de hámster (Devi *et al.*, 1999). La actividad PTP también ha sido medida en espermatozoides de hombre y de ratón, y su inhibición con pervanadato, defostatin y óxido de fenilarsina, inhibe la motilidad en los espermatozoides humanos y la reacción acrosómica en espermatozoides de ratón y hombre (Tomes *et al.*, 2004). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo por Pons-Rejraji y colaboradores (2009) utilizando espermatozoides bovinos demuestran que la incubación con ortovanadato en medio capacitante facilita un aumento de la reacción acrosómica, sin afectar

al porcentaje de espermatozoides capacitados. Además, un estudio muy reciente ha demostrando un papel importante de la proteína PTPN1 en la maquinaria de fusión que participa en la reacción acrosómica en espermatozoides humanos (Zarelli *et al.*, 2009). Estos estudios parecen indicar que estas proteínas podrían regular la motilidad espermática y la reacción acrosómica.

3.3.1. Proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 11 (PTPN11 o SHP2)

De entre las proteínas tirosina fosfatasa, una de las proteínas más ampliamente estudiada en células somáticas es la proteína PTPN11. Esta proteína está formada por dos dominios SH2 (N-SH2 y C-SH2), un dominio proteína tirosina fosfatasa (dominio PTP), un dominio C-terminal con al menos dos sitios de fosforilación en tirosina (Y542 y Y580) y un motivo rico en prolina. En estado basal la actividad de la PTPN11 es suprimida por interacciones intramoleculares entre residuos de los dominios SH2 y la superficie catalítica del dominio PTP. La unión de los dominios SH2 a los residuos de tirosina fosforilados de receptores de membrana o de proteínas adaptadoras como GAB1, libera el dominio catalítico activando la proteína. Esta proteína también es activada por fosforilación en tirosina de los residuos 542 o 580 del extremo C-terminal de la propia proteína. Una vez fosforilados, estos residuos interactúan intra-molecularmente con los dominios SH2 liberando el dominio catalítico (*Figura 3.3-2*) (Heinrich *et al.*, 2003).

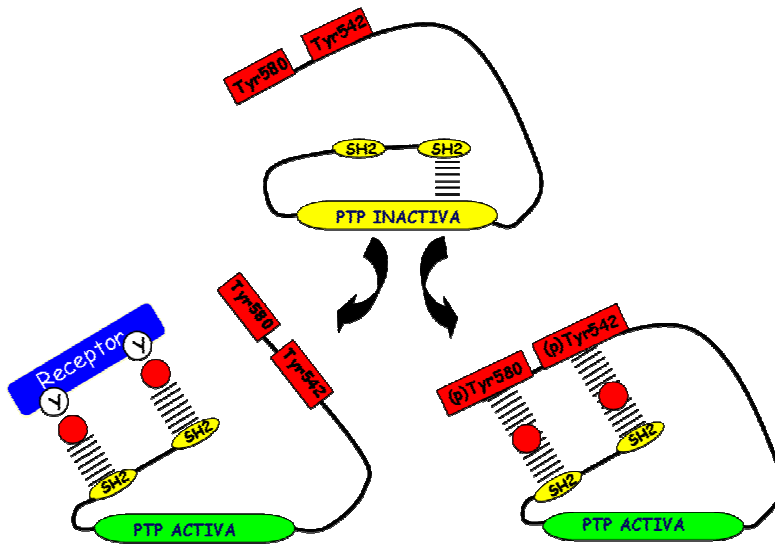


Figura 3.3-2. Esquema de la regulación de la proteína PTPN11 (Heinrich *et al.*, 2003).

Numerosos trabajos ponen de manifiesto la importancia de esta proteína en la transmisión de estímulos extracelulares por receptores y en la regulación de numerosas vías intracelulares en células somáticas (Feng, 1999; Neel *et al.*, 2003). Así se ha descrito que la proteína PTPN11 es requerida para la completa activación de la vía Ras/ERK a través de la familia de quinasas Src (SFK) en fibroblastos de ratón (Zhang *et al.*, 2004). La PTPN11 regula negativamente la activación de la vía PI3K/AKT en fibroblastos estimulados con el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Zhang *et al.*, 2002). Otro trabajo describe que la PTPN11 actúa como un efector negativo en la activación de JNK por estrés celular en fibroblastos de ratón (Shi *et al.*, 1998). Aunque todas las funciones fisiológicas demostradas de la PTPN11 requieren la actividad catalítica, algunos estudios sugieren funciones de esta proteína en forma inactiva, actuando en estos casos como una proteína adaptadora con función catalítica (Chan *et al.*, 2008).

3.4. Proteínas serina/treonina fosfatasa

Además de las PTPs, otro grupo enzimático con actividad fosfatasa son las proteínas serina/treonina fosfatasa (PPasas) que defosforilan residuos de serina/treonina y están involucradas en gran cantidad de funciones celulares (Cohen, 2002). Estas fosfatasas son metaloproteínas y estructuralmente presentan una subunidad catalítica y otra reguladora. La subunidad catalítica se divide en 4 grupos, incluyendo la proteína fosfatasa 1 (PP1), proteína fosfatasa 2A (PP2A), proteína fosfatasa 2B (PP2B o calcineurina) y proteína fosfatasa 2C (PP2C) (Han *et al.*, 2007).

En los espermatozoides de diferentes especies han sido identificadas hasta el momento las fosfatasas: PP1, PP2A y PP2B. Así, en espermatozoides epididimarios de oveja se ha detectado la PP1 y la PP2A (Vijayaraghavan *et al.*, 1996), la PP1 en espermatozoides de hombre, ratón, hámster y búfalo (Ahmad *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996; Chakrabarti *et al.*, 2007) y la PP2B en espermatozoides de hombre (Tash *et al.*, 1988; Ahmad *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1996).

Estas fosfatasas parecen jugar un papel muy importante en la regulación de la motilidad según se desprende de diversos estudios. La inhibición de las proteínas fosfatasas PP1 y PP2A con inhibidores específicos como la caliculina A y el ácido okadaico estimulan la motilidad en espermatozoides de gallo (Ashizawa *et al.*, 2006). Estos inhibidores también estimulan la motilidad en espermatozoides de hombre y de mono (Smith *et al.*, 1996) (Ahmad *et al.*, 1995). En espermatozoides de ratón se ha demostrado que la PP1 y la PP2A están involucradas en el mantenimiento de la motilidad progresiva (Goto & Harayama, 2009). Por lo tanto, parece que las PPasas juegan un papel negativo en el mantenimiento de la motilidad.

Además, las PPasas podrían estar desempeñando un papel en la regulación de la RA, ya que al incubar los espermatozoides de gallo con caliculina A y ácido okadaico en presencia de un inductor de la RA, este efecto se ve potenciado (Ashizawa *et al.*, 2006). Sin embargo ocurre lo contrario en espermatozoides de cerdo, donde la incubación con caliculina A inhibe la reacción acrosómica (Adachi *et al.*, 2008). Ambos estudios parecen indicar una participación variable de estas fosfatasa en la regulación de la RA en función de la especie.

3.5. Factores que influyen en la fosforilación en tirosina

La fosforilación en tirosina en los espermatozoides de mamíferos puede estar regulada por varias vías de señalización, descritas anteriormente. Estas vías de señalización están reguladas por numerosos factores que van a modificar la fosforilación en tirosina en determinados momentos durante el tránsito del espermatozoide por el tracto genital femenino. Algunos de esos factores son el calcio, el colesterol y las especies reactivas de oxígeno (EROs).

3.5.1. Calcio

Como ya hemos indicado anteriormente, el calcio es un ión que juega un papel fundamental en procesos como la motilidad, la capacitación y la reacción acrosómica. El aumento de la concentración intracelular de calcio que se produce en el espermatozoide durante estos procesos puede ser debido a una entrada de calcio desde el medio extracelular o de una salida de calcio desde los depósitos intracelulares que el espermatozoide posee (Costello *et al.*, 2009).

La entrada de calcio desde el medio extracelular, está mediada por algunos canales iónicos. Varios canales permeables a calcio han sido encontrados en espermatozoides de mamíferos, incluyendo canales operados

por voltaje (Ca(v)s), canales TRP (llamados así por su homología con las proteínas “*transient receptor potencial*” que median la transducción luminosa en la mosca *Drosophila*), canales operados por nucleótidos cíclicos y canales CatSper (Jungnickel *et al.*, 2001; Darszon *et al.*, 2005). En espermatozoides de ratón se ha descrito el canal TRP2 que ha sido localizado en la región anterior de la cabeza. Este canal parece tener un papel importante en la entrada de calcio desde el exterior inducido por la unión de ZP3 de la zona pélucida durante la reacción acrosómica (Jungnickel *et al.*, 2001). Otra familia de canales encontrados en espermatozoides son CatSpers, una familia de canales específica de espermatozoides que han sido localizados en la pieza principal del flagelo. Son activados débilmente por voltaje, por aumento de pH y por hiperpolarización de la membrana (Navarro *et al.*, 2008). Estos canales han sido implicados en la motilidad y fertilización en espermatozoides de ratón, dado que los espermatozoides de ratones *knockout* de esta proteína son incapaces de sufrir la hiperactivación dando lugar a ratones estériles (Ren *et al.*, 2001). Otro tipo de canales descritos en espermatozoides son los canales operados por voltaje (Ca(v)s), que han sido asociados con la motilidad y la capacitación (Darszon *et al.*, 2007).

Al igual que en las células somáticas, en los espermatozoides se puede producir un aumento de las concentraciones de calcio intracelular por el vaciamiento de los depósitos intracelulares. Se ha descrito en espermatozoides de diferentes especies al menos un depósito en la zona cuello-pieza intermedia y otro en la zona peri-acrosomal. La salida de calcio de estos depósitos, además de estar mediada por los receptores IP₃ como ya hemos visto anteriormente, está regulada por diferentes bombas y canales de iones (Costello *et al.*, 2009).

La relación entre el calcio y la fosforilación en tirosina no está clara. Hay trabajos que relacionan un aumento de la concentración de calcio con la fosforilación en tirosina tanto en espermatozoides de ratón (Visconti *et al.*,

1995a) como de hombre (Leclerc *et al.*, 1998). Sin embargo, otros estudios han demostrado un efecto contrario, indicando que el calcio regula negativamente la fosforilación en tirosina durante la capacitación. En estos trabajos describen que el calcio inhibe la fosforilación en espermatozoides de hombre y de ratón por una disminución en la disponibilidad del ATP intracelular (Baker *et al.*, 2004). En definitiva, el aumento de calcio intracelular durante la capacitación ha sido descrito en espermatozoides de varias especies de mamíferos y es presumible que tales cambios modulen la fosforilación en tirosina regulando la capacitación y la reacción acrosómica (Baldi *et al.*, 2000a; Naz & Rajesh, 2004).

3.5.2. Colesterol

Como ya hemos indicado anteriormente la composición lipídica de la membrana plasmática de los espermatozoides es diferente a la de la membrana plasmática de las células somáticas y el colesterol juega un papel muy importante en estas células. El colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides es transferido a proteínas de alto peso molecular como la albúmina y lipoproteínas de alta densidad presentes en el tracto genital femenino (Naz & Rajesh, 2004).

La pérdida de colesterol de la membrana plasmática está asociada con la activación de las vías de señalización relacionadas con la capacitación (Visconti *et al.*, 1999). Las ciclodextrinas promueven la pérdida de colesterol de la membrana plasmática de los espermatozoides de ratón, lo que conlleva un incremento en la capacitación y la fosforilación de proteínas en tirosina a través de la vía AMPc/PKA (Visconti *et al.*, 1999). Además, inhibiendo la PKA se disminuye el grado de fosforilación inducido por BSA o por las ciclodextrinas (Osheroff *et al.*, 1999). Estos trabajos indican un papel importante del colesterol en la fosforilación en tirosina, mediada a través de la vía AMPc/PKA. La pérdida de colesterol puede tener una influencia indirecta sobre las

vías de señalización, ya que un aumento de la fluidez de la membrana puede incrementar la permeabilidad de ésta a varios iones como el calcio y el bicarbonato, que a su vez actúan como mensajeros intracelulares (Naz & Rajesh, 2004).

3.5.3. Especies reactivas de oxígeno (EROs)

Las especies reactivas de oxígeno (EROs), también llamadas “radicales libres”, son moléculas pequeñas con una gran facilidad para difundir e interactuar con otras moléculas debido a la presencia de electrones desapareados en su capa de valencia. Este desequilibrio en su capa de valencia provoca que estas moléculas interactúen con otras moléculas produciendo oxidaciones que causan enormes daños en proteínas, ADN y lípidos. Las EROs se producen principalmente en las mitocondrias. Cuando el oxígeno sufre reducciones incompletas en la cadena de transporte electrónico no forma agua, sino moléculas intermedias como el anión superóxido ($O_{2}^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Mathews *et al.*, 2002). Otro radical que se produce en la célula es el óxido nítrico (NO) que se sintetiza a partir de la L-arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS) y que tiene una reactividad muy elevada, similar a la del anión superóxido (de Lamirande & O'Flaherty, 2008). Las EROs han sido relacionadas con problemas vasculares, cáncer, neuropatías, etc. (de Lamirande & O'Flaherty, 2008)

En espermatozoide se ha demostrado los efectos tóxicos de las EROs (Aitken, 1994). Sin embargo, también se ha demostrado que estas moléculas en bajas concentraciones producen activación celular y juegan un papel muy importante como segundos mensajeros en la transducción de señales (Droge, 2002; Filomeni *et al.*, 2005). En este sentido se ha demostrado un importante papel de las EROs en los espermatozoides. Al añadir enzimas que degradan estas moléculas, como la enzima superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa, se bloquea la capacitación y se inhibe la fosforilación en tirosina. Por el

contrario, la adicción moderada de EROs promueve la capacitación e incrementa la fosforilación en tirosina (de Lamirande & Gagnon, 1993a; de Lamirande & Gagnon, 1993b; Leclerc *et al.*, 1997; O'Flaherty *et al.*, 1999; O'Flaherty *et al.*, 2006a; O'Flaherty *et al.*, 2006b). Desde un punto de vista fisiológico se ha demostrado que el espermatozoide produce bajas concentraciones de EROs necesaria para la capacitación (de Lamirande & Gagnon, 1993b; de Lamirande & Gagnon, 1995). Efecto que parece mediado por un cambio en la concentración de AMPc. Así, el tratamiento de espermatozoides con enzimas catalizadoras de EROs previene el incremento de AMPc necesario para la capacitación, y la adicción de EROs causa un incremento de AMPc (Zhang & Zheng, 1996; Aitken *et al.*, 1998; Herrero *et al.*, 1999; Herrero *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta estos resultados se ha propuesto que las EROs podrían actuar activando directamente la adenilato ciclasa.

La hiperactivación espermática también está controlada por las EROs, ya que la adicción de SOD y catalasa previene este proceso y la adicción exógena de EROs estimula la hiperactivación. El mecanismo por el que las EROs actúan, estaría relacionado con el incremento de fosforilaciones de proteínas flagelares (Leclerc *et al.*, 1997; de Lamirande *et al.*, 1997a; O'Flaherty *et al.*, 2004a; O'Flaherty *et al.*, 2005). Finalmente, la reacción acrosómica está también regulada por las EROs, de tal forma que la adicción de SOD y catalasa inhiben y la adicción de EROs estimulan la reacción acrosómica (de Lamirande *et al.*, 1998; O'Flaherty *et al.*, 1999; Herrero *et al.*, 2003; O'Flaherty *et al.*, 2004b). Las proteínas fosforiladas en tirosina relacionadas con la reacción acrosómica es revertida con SOD y catalasa en presencia de A23187 (de Lamirande *et al.*, 1998).

El mecanismo por el cual las EROs regulan la reacción acrosómica y la fosforilación en los espermatozoides aún no es conocida. Sin embargo, dado que la modulación del estado de oxidación de los grupos SH de las proteínas

por las EROs es una modificación fácil de realizar, con capacidad de ser reversible, económica desde el punto de vista energético y específica para la célula, éste podría ser uno de los mecanismos de actuación (Sen, 2000; de Lamirande & Gagnon, 2003; Filomeni *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009). Uno de los grupos enzimáticos susceptibles de sufrir este mecanismo regulador son las PTPs. Los grupos SH de los residuos de cisteína de los centros activos de las fosfatasas son susceptibles de ser oxidados por estos radicales inhibiendo la actividad de estas enzimas. (Filomeni *et al.*, 2005; Salmeen & Barford, 2005; Chen *et al.*, 2009). No hay pruebas directas de que las EROs inactiven las fosfatasas de los espermatozoides pero este mecanismo podría estar implicado como complementario a la activación de varias quinasas durante la capacitación y la reacción acrosómica.

II. OBJETIVOS

Con los antecedentes anteriormente expuestos nos propusimos alcanzar los siguientes objetivos:

1. Identificar las diferentes proteínas tirosina fosfatasa en los espermatozoides de cerdo, caballo y perro y estudiar la distribución subcelular de las proteínas identificadas.
2. Estudiar la implicación de las PTPs en la funcionalidad del espermatozoide de esas especies.
3. Valorar el efecto de la criopreservación y la refrigeración de los espermatozoides en el estado de la actividad tirosina fosfatasa y su posible empleo para la optimización de esta tecnología.
4. Identificar los mecanismos moleculares de activación y regulación de la proteína tirosina fosfatasa PTPN11 en los espermatozoides de mamíferos.
5. Estudiar la implicación de la proteína tirosina fosfatasa PTPN11 en la regulación de la función espermática.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

4. Metodología general

4.1. Lista de reactivos

➤ A

- 8-Br-cAMP: 8-bromo adenosina-3',5'-monofosfato cíclico. Sigma-Aldrich.
- A23187 (calcimicina): ionóforo del calcio obtenido en *Streptomyces chartreusensis*. Calbiochem.
- Ácido deoxicólico (ácido 5 β -colan-24-oico-3 α , 12 α -diol). Sigma-Aldrich.
- Ácido cítrico. Sigma Aldrich.
- Ácido okadaico. Calbiochem.
- Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (30%). Bio-Rad.
- Anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina (TU-02). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-CDKN3 (C-18). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-CDKN3. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-DUSP3. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-DUSP4. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-E-cadherina. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina 4G10. Upstate Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-PTPN1. BD-Transduction laboratories.

- Anticuerpo monoclonal anti-PTPN6 (D11). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-PTPN6. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-PTPN11. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-PTPRA. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-PTPRB. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo monoclonal anti-PTPRC. BD-Transduction laboratories.
- Anticuerpo policlonal anti-actina. Sigma-Aldrich.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPN11 (pY542). Cell Signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPN11 (pY580). Cell Signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-DUSP1 (H-66). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-DUSP2 (C-20). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-DUSP3 (N-19). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-DUSP4 (H-67). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-DUSP6 (N-18). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-DUSP6 (C-20). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-DUSP9 (C-20). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-GAB1. Cell signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-GAB1 (pY627). Cell signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPN3 (N-19). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPN3 (T-20). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPN7 (L-15). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPN11. Cell signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPN13 (C-20). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPRB (C-20). Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-PTPRD (C-18). Santa Cruz Biotechnology.

- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo, conjugado con la peroxidasa de rábano picante. Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo, conjugado con la sonda fluorescente Alexa 488. Molecular Probes.
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con la peroxidasa de rábano picante. Pierce Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón, conjugado con la sonda fluorescente Alexa 488. Molecular Probes.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de ratón, no conjugado (anticuerpo puente). Pierce Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de oveja anti-IgG de cabra, conjugado con la peroxidasa de rábano picante. Pierce Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de oveja anti-IgG de cabra, conjugado con la sonda fluorescente Alexa 488. Molecular Probes.
- APS: Persulfato amónico. Bio-Rad.
- Azul de bromofenol. Bio-Rad.
- **B**
- BSA: Albúmina sérica bovina, Fracción V. Sigma-Aldrich.
- **C**
- Caliculina A. Alexis Biochemicals.
- Comassie Azul brillante G-250. Bio-Rad.
- Cocktail de inhibidores de proteasas. Roche.
- **D**
- DIFMUP: 6,8-Difluor-4-metilumbeliferil fosfato. Molecular Probes.
- DMSO: Dimetilsulfóxido. Sigma-Aldrich.
- DTT: Ditioneitol. Sigma-Aldrich.
- D-glucosa. Sigma-Aldrich.

➤ **E**

- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. Sigma-Aldrich.
- EGTA: Ácido etilenglicol-bis (β -aminoetiléter) N,N,N',N'-tetraacético. Sigma-Aldrich.
- Equex STM. Nova Chemicals sales Inc.
- EthD-1: ver homodímero de etidio.

➤ **F**

- Fluoruro de Sodio. Sigma-Aldrich.
- Formaldehído. Sigma-Aldrich.

➤ **G**

- Glicina. Sigma-Aldrich.
- Glicerol. Sigma-Aldrich.

➤ **H**

- HEPES: Ácido N-[Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]. Sigma-Aldrich.
- Homodímero de etidio-1. Molecular Probes.

➤ **I**

- INRA 96[®]. IMV8 Technologies.

➤ **L**

- Lactato de sodio. Fluka.
- Lactosa. Panreac.
- Líquido fijador: GBX Fixer / Replenisher. Kodak.
- Líquido revelador: GBX Developer / Replenisher. Kodak.

➤ **M**

- Marcador de peso molecular *SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard*. Invitrogen
- Membranas de nitrocelulosa. Schleicher & Schuell.

- Mercaptoetanol: 2-mercaptoetanol. Bio-Rad.
- Merocianina 540. Molecular Probes.
- MOPS: Ácido 3-[N-morfolino]propano sulfónico. Sigma-Aldrich.
- **N**
- NSC-87877. Calbiochem.
- **O**
- Ortovanadato sódico. Sigma-Aldrich.
- **P**
- Película fotosensible. Amersham.
- Peróxido de Hidrógeno. Sigma-Aldrich.
- Piruvato de sodio. Fluka.
- Lectina PNA de *Arachis hypogaea*, conjugado con la sonda fluorescente Alexa 488. Molecular Probes.
- Poli-L-lisina. Sigma-Aldrich.
- Proteína A/G recombinante en soporte de agarosa. Santa Cruz Biotechnology.
- **R**
- Reactivo de Bradford. Bio-Rad.
- Reactivo de lisis *CelyticTM M*. Sigma-Aldrich.
- **S**
- SDS: Dodecil sulfato sódico. Sigma-Aldrich.
- Solución de Ponceau. Sigma-Aldrich.
- Sustratos para la reacción de quimioluminiscencia: SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate, SuperSignal® West Dura Chemiluminiscent Substrate, Pierce Biotechnology.
- SYBR-14. Molecular Probes.

➤ **T**

- Tampón Tris/glicina (x 10). Bio-Rad.
- Tampón Tris/glicina/SDS (x 10). Bio-Rad.
- TEMED: N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina. Bio-Rad.
- TPA: 13, acetato de 12, O-tetradecanoil forbol. Sigma-Aldrich.
- Triton X-100. Bio-Rad.
- TRIZMA base (TRIS): Tris[hidroximetil] aminometano. Sigma-Aldrich.
- TRIZMA HCl (TRIS): Tris[hidroximetil] aminometano. Sigma-Aldrich.
- Tween 20. Bio-Rad.

➤ **Y**

- YO-PRO-1. Molecular Probes.

El resto de reactivos utilizados rutinariamente en el laboratorio para la preparación de soluciones eran de grado analítico. El agua utilizada para las soluciones era bidestilada o agua ultra-pura por filtración (Purelab Classic).

4.2. Medios de incubación

Los medios de incubación utilizados en este trabajo se prepararon utilizando agua ultra-pura (Purelab Classic). Tras la elaboración, se ajustó el pH a 7.4 y se comprobó que la osmolaridad estaba comprendida entre 290-300 mOsm·Kg⁻¹. Los medios se prepararon el mismo día de su uso y se calentaron a 38 °C antes de utilizarlos.

- **Tyrode's basal medium** (TBM): El medio no capacitante utilizado para la incubación de los espermatozoides de cerdo fue el medio *Tyrode's basal medium* modificado (Tabla 4.2-1) (Bravo et al., 2005).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
HEPES	20 mM
NaH ₂ PO ₄	0.3 mM
NaCl	106 mM
KCl	4.7 mM
MgSO ₄	0.4 mM
Glucosa	5.5 mM
Piruvato de sodio	1 mM
Lactato de sodio	21.6 mM
EGTA	5 mM

Tabla 4.2-1. Composición del medio Tyrode's basal medium (TBM).

- ***Tyrode's complete medium*** (TCM): Para inducir la capacitación en los espermatozoides de cerdo se utilizó el medio capacitante *Tyrode's complete medium* con algunas modificaciones (*Tabla 4.2-2*) (Bravo *et al.*, 2005).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
HEPES	20 mM
NaH ₂ PO ₄	0.3 mM
NaCl	96 mM
KCl	4.7 mM
MgSO ₄	0.4 mM
Glucosa	5.5 mM
Piruvato de sodio	1 mM
Lactato de sodio	21.6 mM
NaHCO ₃	25 mM
CaCl ₂	2 mM
BSA	0.3%

Tabla 4.2-2. Composición del medio capacitante *Tyrode's complete medium* (TCM). Antes de añadir el CaCl₂ se burbujeó el medio con carbógeno durante 10 minutos para equilibrar el pH.

- **Medio Tris-glucosa:** El medio utilizado para lavar e incubar los espermatozoides de perro fue un medio Tris-Glucosa (*Tabla 4.2-3*) (Núñez-Martínez *et al.*, 2007).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl	200 mM
Glucosa	70 mM
Ácido cítrico	63 mM
BSA	3%
Penicilina	1000 UI/ml
Dihidroestreptomicina	1 mg/ml

Tabla 4.2-3. Composición del medio Tris-glucosa.

4.3. Obtención de las muestras

4.3.1. Muestras de cerdo

Las dosis comerciales utilizadas en este trabajo provenían de cerdos de raza ibérica, que eran utilizadas para inseminación artificial. Las dosis se obtuvieron del centro de inseminación artificial “Semen Porcino Andalucía S.L.” (Aznalcollar, Sevilla).

Cada dosis contenía 80 ml de un diluyente comercial (MRA-A, Kubus, Madrid) a una concentración de 30×10^6 espermatozoides por ml, aproximadamente. Normalmente las dosis comerciales se utilizaron el mismo día en el que se obtuvieron, salvo en algunas ocasiones en las que se

almacenaron a 17 °C durante 24 horas antes de su uso. Un total de 30 cerdos de raza ibérica se utilizaron en este estudio.

4.3.2. Muestras de caballo

El semen de caballo fue obtenido de 6 caballos de raza andaluza provenientes del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura (Cáceres). El semen fue recogido usando una vagina artificial modelo *Missouri* previamente lubricada y calentada a 45-50 °C.

El semen fue llevado inmediatamente al laboratorio donde se analizó la concentración y la motilidad, posteriormente se mezcló con el diluyente comercial INRA 96[®] con una dilución 1:1 y se centrifugó durante 10 minutos a 600 g. Finalmente los espermatozoides se resuspendieron en INRA 96[®] con una concentración aproximada de 100×10^6 espermatozoides por ml.

4.3.3. Muestras de perro

Las muestras de perro se obtuvieron de 4 perros mestizos de propiedad privada (entre 15-20 Kg de peso y entre 2-4 años de edad) mediante masturbación. La muestra se recogió en un tubo graduado previamente calentado a 37 °C y se analizó para comprobar la concentración y la motilidad. Posteriormente el semen fue diluido 1:1 en el medio Tris-Glucosa (*Tabla 4.2-3*) a 37 °C y se centrifugó durante 8 minutos a 700 g a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y los espermatozoides se resuspendieron nuevamente en el medio Tris-Glucosa a una concentración aproximada de 70×10^6 espermatozoides por ml.

4.4. Preparación de las muestras

Una vez obtenidas las muestras, los espermatozoides de perro y de caballo se diluyeron en los medios específicos de cada especie a una concentración de 100 millones por ml. En el caso de los espermatozoides de cerdo antes de concentrarlos a 100 millones por ml, para la realización de los

experimentos se lavaron dos veces con medio no capacitante (TBM) centrifugando a 1000 g durante 3 minutos. Finalmente se resuspendió en el medio TBM o TCM (medio capacitante) (*Tabla 4.2-1 y Tabla 4.2-2*).

4.5. Tratamientos

Los espermatozoides se incubaron en viales de incubación a diferentes tiempos, entre 10 minutos y hasta 4 horas, a 38 °C o bien a 17 °C con diferentes inhibidores y estimuladores (*Tabla 4.5-1*). En algunas ocasiones la incubación se prolongo durante varios días a 17°C.

Para estudiar la vía del AMPc/PKA se utilizó un activador de la PKA permeable y no hidrolizable, el 8-Br-cAMP.

Para inducir la reacción acrosómica se utilizó el ionóforo A23187, en medio capacitante.

Para inhibir las proteínas serina/treonina fosfatasa se utilizaron diferentes inhibidores: ácido okadaico, caliculina A, fluoruro de sodio y pirofosfato de sodio.

Para inhibir la proteína PTPN11 se utilizó el inhibidor específico NSC-87877.

Para inhibir las proteínas tirosina fosfatasa se utilizaron el ortovanadato y pervanadato dos inhibidores específicos. El pervanadato se preparó mezclando ortovanadato de sodio 100 mM con peróxido de hidrógeno 100 mM, seguido de una incubación de 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Para estudiar la vía DAG/PKC se utilizó el TPA, un activador de la PKC.

La concentración utilizada de los diferentes compuestos fue ajustada usando varias concentraciones, comprobando cual era la dosis más efectiva sin que la viabilidad se viera comprometida. Además a la hora de escoger la concentración adecuada, se tuvieron en cuenta trabajos publicados anteriormente, la EC₅₀ de los compuestos utilizados, la solubilidad del compuesto y las recomendaciones del fabricante.

COMPUESTO	DIANA	CONCENTRACIÓN
8-Br-cAMP	Proteína quinasa A	1 mM
A23187	Inductor de la reacción acrosómica	1 μ M
Ácido Okadaico	Proteínas Serina/treonina fosfatasa	1 μ M
Caliculina A	Proteínas Serina/treonina fosfatasa (PP1,PP2A)	1 μ M
Fluoruro de Sodio	Proteínas Serina/treonina fosfatasa	50 mM
NSC-87877	PTPN11	10-100 μ M
Ortovanadato sódico	Proteínas tirosina fosfatasa	10-50 μ M
Pervanadato	Proteínas tirosina fosfatasa	10-100 μ M
TPA	PKC	1 μ M

Tabla 4.5-1. Compuestos utilizados, diana y concentración utilizada.

5. Western blotting

La técnica *Western blotting* permite identificar diferentes proteínas según su peso molecular e incluso permite identificar el estado de fosforilación de las proteínas en diferentes residuos. Esta técnica fue descrita por primera vez por Towbin H. (1979). El nombre *Western blotting* fue acuñado por Burnette W.N. (1981) que basaba el nombre en la técnica "*Southern blotting*", una técnica desarrollada para la detección de ADN por Southern E.M. (1975). También es llamada "*Inmunoblotting*" debido a que se usan anticuerpos para detectar antígenos de interés, lo que permite detectar una única proteína dentro de un lisado celular compuesto por multitud de proteínas.

La técnica *Western blotting* agrupa una serie de métodos y técnicas: extracción de proteínas, electroforesis y transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa, bloqueo de la membrana, incubación con los anticuerpos y detección de las proteínas a estudiar (*Figura 4.5-1*). Todas estas técnicas se detallan a continuación.

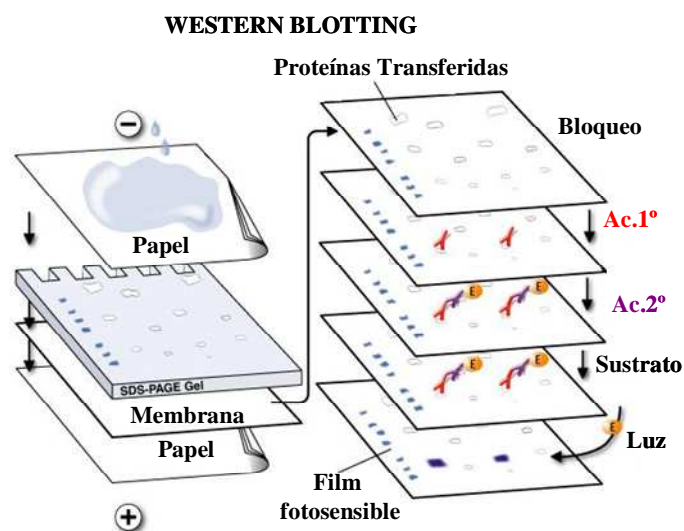


Figura 4.5-1. Esquema de la técnica *Western blotting*.

5.1. Obtención de lisados celulares totales

Una vez tratadas las células con los diferentes tratamientos, 1 ml de la suspensión celular se centrifugó durante 1 minuto a 2000 g. Después de la centrifugación el sobrenadante se descartó y el precipitado de células se resuspendió en 1 ml de tampón fosfato salino (PBS) (*Tabla 5.1-1*) mantenido a 4°C. Después de una nueva centrifugación en las mismas condiciones anteriores el sobrenadante fue nuevamente retirado y se procedió a lisar las células en 300 µl de tampón de lisis (*Tabla 5.1-2*) para extraer las proteínas. Para optimizar la extracción proteica, los lisados se sonicaron durante 5 segundos. Además, para aumentar la eficacia de los detergentes a la hora de solubilizar las proteínas no citosólicas, los lisados se mantuvieron durante 30 minutos en agitación constante a 4 °C.

Después de esta incubación los lisados se centrifugaron a 15000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante de esta centrifugación (fracción soluble) se recogió para su posterior estudio y el precipitado (fracción insoluble), compuesto mayoritariamente de citoesqueleto y restos nucleares, se descartó.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	5.6 mM
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1.1 mM
KH ₂ PO ₄	1.5 mM

Tabla 5.1-1. Composición del tampón fosfato salino (PBS). El pH se ajustó a 7.4.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1%
Deoxicolato	1%
EGTA	1 mM
EDTA	0.4 mM
Ortovanadato	0.2 mM
Inhibidores de proteasas	1 %

Tabla 5.1-2. Composición del tampón de lisis para la extracción de lisados totales. El inhibidor de proteasas y el ortovanadato se añadieron en fresco y se ajustó el pH a 7.4.

5.2. Obtención de fracciones subcelulares

Debido a la poca cantidad de citoplasma que contiene la célula espermática, se incrementó el número de células para aumentar la concentración proteica de la fracción citosólica. En torno a 1000 millones de células se lavaron con PBS y se lisaron en 800 μ l de tampón de lisis a 4 °C para la obtención de la fracción citosólica (Tabla 5.2-1).

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl	50 mM
NaCl	150 mM
EGTA	1.5 mM
EDTA	0.4 mM
Ortovanadato	0.2 mM
Inhibidores de proteasas	1 %

Tabla 5.2-1. Composición del tampón de lisis para la extracción de la fracción citosólica. El inhibidor de proteasas y el ortovanadato se añadieron en fresco y se ajustó el pH a 7.4.

Dado que este tampón de lisis no contiene detergentes, para romper las células, se sonicó 5 veces durante 5 segundos, esperando 15 segundos entre sonicación y sonicación para no sobrecalentar la muestra. De esta forma las células se lisaron para liberar el contenido citoplasmático. Esta suspensión fue centrifugada durante 10 minutos a 600 g y el precipitado de esta centrifugación, que está compuesto mayoritariamente por células sin lisar, fue descartado. El sobrenadante, compuesto de la fracción citosólica y de la fracción particulada se centrifugó a 60000 g durante 30 minutos a 4 °C para separar ambas fracciones. Después de esta centrifugación el sobrenadante está compuesto de la fracción citosólica que utilizaremos para estudios posteriores. El precipitado fue resuspendido en tampón de lisis sin detergentes y lavado por centrifugación a 10000 g durante 5 minutos. Este paso se repitió 3 veces para eliminar completamente los restos de la fracción citosólica que hubieran podido quedar. El precipitado resultante de las anteriores centrifugaciones se resuspendió en el tampón de lisis completo utilizado para la extracción de lisados totales (*Tabla 5.1-2*). A continuación la

muestra se procesó como se ha descrito anteriormente para la obtención de lisados totales, de esta forma obtenemos la fracción de membrana para estudios posteriores.

5.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo descrito por Bradford M.M. (1976) Este método se basa en la capacidad del colorante azul brillante de *Coomassi 250* de unirse a residuos aromáticos y arginina de las proteínas. Esta unión produce un cambio de absorción del colorante de 465 nm a 595 nm (de rojo a azul). Midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro se puede cuantificar la cantidad de proteínas dado que la intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de proteínas.

5.4. Inmunoprecipitación

La base de esta técnica consiste en inmunopurificar la proteína de interés para posteriormente desarrollar otros protocolos. De esta forma la IP permite aumentar la sensibilidad del método para detectar proteínas que están en bajas concentraciones en el lisado celular o realizar ensayos específicos de actividad. En la IP se utiliza el anticuerpo específico frente a la proteína a estudiar unido a una matriz que nos va a permitir recoger el inmunoprecipitado (*Figura 5.4-1*).

Una vez obtenido el lisado celular, éste se incubó con las proteínas A y G unidas a la agarosa, un polisacárido inerte que forma una matriz en forma de bolas. Las proteínas A y G son proteínas de la pared celular de *Streptococcus* que se unen a la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas G (IgG) con gran afinidad. Las proteínas A y G están unidas a la agarosa a través del extremo amino terminal y el grupo ϵ -amino de la lisina. La agarosa confiere un carácter insoluble al complejo proteína A/G/agarosa, con lo que resulta fácil separarlos por centrifugación (*Figura 5.4-1*).

Para la inmunoprecipitación se utilizaron 600 μg de proteínas del lisado celular y se diluyó la muestra hasta 1 ml con tampón de lisis. A este volumen se le añadieron 3 μg del anticuerpo específico de la proteína y se incubaron durante 2 horas en agitación constante a 4 °C. Después de esta incubación se añadieron 25 μl de proteína A/G y se incubaron durante 1 hora en agitación constante a 4°C. Pasado este tiempo se centrifugó el complejo a 1000 g durante 3 minutos a 4 °C para recoger las bolas de agarosa donde estará unida nuestra proteína a través del anticuerpo (*Figura 5.4-1*). Para asegurarnos de que la única proteína que queda unida es la proteína a estudiar se lavaron las bolas de agarosa 2 veces con tampón de lisis y otras 2 veces con PBS y se utilizaron en estudios posteriores.

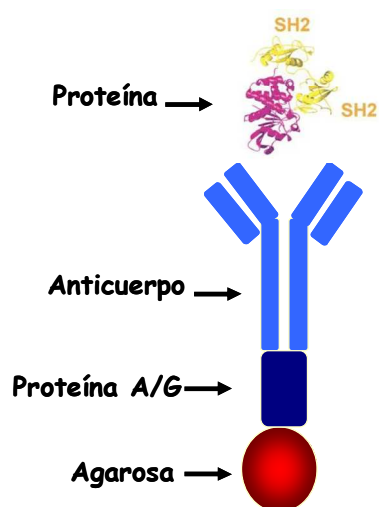


Figura 5.4-1. Esquema de la Inmunoprecipitación.

La Fc del anticuerpo es reconocida por las proteínas A/G que están unidas a la agarosa. Cuando el anticuerpo se une a la proteína a estudiar la recogemos por centrifugación.

5.5. Electroforesis

Cuando un campo eléctrico es aplicado a una solución, las moléculas de soluto con carga neta positiva se desplazan hacia el cátodo y las moléculas con carga negativa se desplazan hacia el ánodo. Este desplazamiento se denomina electroforesis. La velocidad de las moléculas depende de dos factores: la fuerza ejercida por el campo eléctrico (q) y la fuerza de fricción que ejerce el entorno sobre la partícula (f), cuanto mayor sea la molécula mayor será la fricción. La movilidad electroforética (μ) de una molécula viene determinada por la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{q}{f} = \frac{Z \cdot e}{f}$$

Donde Z es el número de unidad de carga, e la unidad de carga del electrón o protón y f el coeficiente de fricción. Dado que f depende del tamaño y la forma de la molécula la ecuación nos indica que la movilidad de una molécula depende de su carga y tamaño. Dado que cada molécula tiene una carga ($Z \cdot e$) proporcional a su tamaño y que el coeficiente de fricción aumenta con la longitud, podemos decir que un macro-ión cuya carga es proporcional a su longitud tiene una movilidad libre, independiente de su tamaño (Mathews *et al.*, 2002).

La electroforesis en gel puede darse en condiciones no desnaturizantes en donde la proteína va a mantener su estructura y por lo tanto su forma y carga. En estas condiciones la proteína se va a separar en función de su tamaño y carga. O puede darse en condiciones desnaturizantes en donde la proteína es previamente desnaturizada mediante detergentes iónicos y calor. Gracias a la presencia de un detergente iónico, que favorece la desnaturización y aporta la carga negativa necesaria para convertirse en un macro-anión, las proteínas sólo se van a separar en función de su tamaño independientemente de su carga (Mathews *et al.*, 2002).

En el presente trabajo hemos utilizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) descrito por Laemmli (1970), es decir, una electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

5.5.1. Preparación de las muestras

Una vez obtenidos los lisados celulares y después de haber estimado su concentración, el lisado se mezcló con un tampón de carga concentrado 4 veces (4X) (*Tabla 5.5-1*) de tal forma que la concentración final fuera de 1X. Este tampón de carga contiene agentes con poder reductor como el DTT y 2-mercaptoetanol necesarios para impedir la formación de puentes disulfuro y mantener la proteína en conformación lineal, además del detergente SDS que va a proporcionar carga negativa a la proteína. En el caso de las muestras inmunoprecipitadas el tampón de carga se utilizó con una concentración 2X y 12.5 µl de esta dilución se añadió a 25 µl de las bolas de agarosa.

En cualquiera de las dos situaciones (lisados totales o muestras IP) antes de cargar la electroforesis, las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95 °C para desnaturalizar las proteínas. En el caso de las muestras inmunoprecipitadas además de desnaturalizar la proteína en estudio, con el calor rompemos las uniones entre el complejo proteína/anticuerpo/agarosa. Después de calentar las muestras, se centrifugaron 1 minuto a 2000g, el sobrenadante fue posteriormente utilizado como se indica en el apartado siguiente.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl pH 6.8	0.4 M
DTT (ditiotreitól)	0.2 M
SDS	8 %
Glicerol	20 %
Azul de bromofenol	0.02 %
2-mercaptoetanol	5 %

Tabla 5.5-1. Composición del tampón de carga 4X. El 2-mercaptoetanol se añadió en fresco.

5.5.2. Preparación de los geles

El gel de acrilamida que se utilizó está compuesto de dos partes, una superior denominado gel de carga con una concentración de acrilamida del 4% y uno inferior o gel de separación con un porcentaje de acrilamida mayor que varía en función de la aplicación. En el gel de carga las muestras se van a compactar para entrar a la vez en el gel de separación, en el cual las proteínas se separan en función de su tamaño. La concentración de acrilamida del gel de separación va a depender del tamaño de la proteína que queremos estudiar y va a oscilar entre 8 y el 12% (Tabla 5.5-2). Los geles se prepararon en el interior de unos cartuchos de plástico de la compañía Invitrogen.

REACTIVO	Gel 4%	Gel 8%	Gel 10%	Gel 12%
Tris/HCl pH 8.8	375 mM	375 mM	375 mM	375 mM
Acrilamida/Bisacrilamida	4%	8%	10%	12%
APS(Persulfato amónico)	0.1%	0.05%	0.05%	0.05%
TEMED	0.1%	0.05%	0.05%	0.05%

Tabla 5.5-2. Composición de los geles de acrilamida.

Una vez que los geles polimerizaron se colocaron en una cubeta de electroforesis (*Xcell IITM MiniCell* de Invitrogen) que se rellenó con tampón de electroforesis (*Tabla 5.5-3*) para permitir la circulación de la corriente. Después se procedió a cargar las proteínas en los pocillos del gel en cantidad variable (entre 5 y 20 μ g), dependiendo de la proteína a estudiar. En el caso de las muestras inmunoprecipitadas la totalidad del sobrenadante fue cargado en el pocillo. Además se cargó un marcador de peso molecular compuesto de numerosas proteínas (*SeeBlue[®] Plus2 Pre-Stained Standard* de Invitrogen) con tamaño conocido, teñidas de diferentes colores para visualizarlas. Esto nos permitirá determinar el peso molecular de la proteína en estudio.

Una vez que las muestras fueron cargadas se aplicó un campo eléctrico con un voltaje constante de 90 mV mientras las muestras migraron a lo largo del gel de carga, y de 140 mV para el gel de separación con una fuente *PowerPac300* de Bio-Rad. Las muestras migran al ánodo debido a su carga negativa. Una vez completada la electroforesis las proteínas permanecen en el interior del gel separadas en función de su peso molecular.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl pH 8.3	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.01 %

Tabla 5.5-3. Composición del tampón de electroforesis.

5.6. Electrotransferencia

Las proteínas se transfirieron desde el gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa (tamaño del poro 0,45 μm) mediante una electrotransferencia húmeda (*Tabla 5.6-1*) utilizando una cubeta de transferencia *Mighty Small Transphor* de Hoefer Pharmacia Biotech. Para mantener baja la temperatura esta cubeta se sumergió en un baño de agua con hielo.

Antes de realizar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue equilibrada durante 10 minutos en tampón de transferencia y el gel durante 5 minutos. Para realizar la transferencia utilizamos papel de filtro empapado en el tampón de transferencia y seguimos el siguiente orden: polo negativo (cátodo), papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro, polo positivo (ánodo). Este “Sándwich” se colocó en la cubeta respetando la polaridad y se realizó la transferencia durante 3 horas a 380 mA. De esta forma las proteínas, que tendrán carga negativa, migrarán del cátodo al ánodo transfiriéndose desde el gel hacia la membrana de nitrocelulosa.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl pH 8.3	2.5 mM
Glicina	19.2 mM
Metanol	20 %

Tabla 5.6-1. Composición del tampón de transferencia.

5.7. Bloqueo de la membrana

Una vez que las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa, éstas se incubaron con un tampón de bloqueo (*Tabla 5.7-1*). Este tampón contiene una alta cantidad de proteínas, de tal forma que todos los sitios donde no hubiera proteínas unidas a la membrana son bloqueados por las proteínas del tampón. De esta forma se evitó la unión inespecífica de los anticuerpos que posteriormente se utilizaron para detectar las proteínas a estudiar. El bloqueo se realizó durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente, o bien durante toda la noche a 4 °C sin agitación.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl pH 7.4	50 mM
CaCl ₂	2 mM
NaCl	80 mM
Tween-20	0.05 %
Leche desnatada en polvo	5 %

Tabla 5.7-1. Composición del tampón de bloqueo.

5.8. Incubación con los anticuerpos

Tras el bloqueo de la membrana se procedió a la incubación de los diferentes anticuerpos primarios para detectar las diferentes proteínas a estudiar. Tanto la concentración usada de cada anticuerpo, así como las condiciones de incubación se optimizaron para cada anticuerpo. Los anticuerpos se diluyeron en tampón de bloqueo (*Tabla 5.8-1*) o en tampón de lavado (*Tabla 5.8-1*) suplementado con BSA al 5 %.

Toda la información sobre los anticuerpos primarios usados, tanto la compañía como las condiciones de incubación usadas se encuentran detalladas en las tablas *Tabla 5.8-2* y *Tabla 5.8-3*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris/HCl pH 7.4	50 mM
CaCl ₂	2 mM
NaCl	80 mM
Tween-20	0.05 %

Tabla 5.8-1. Composición del tampón de lavado.

Proteína	Compañía	Nº catálogo	Especie	Concentración	Incubación
PTPR C	BD	610266	Ratón	1/500	2 h/TA
CDKN3	SC(C18)	SC-475	Ratón	1/200	2 h/TA
CDKN3	BD	610335	Ratón	1/4000	2 h/TA
DUSP1	SC(H66)	SC-10796	Conejo	1/200	2 h/TA
DUSP2	SC(C20)	SC-1620	Cabra	1/200	2 h/TA
DUSP3	BD	610547	Ratón	1/250	2 h/TA
DUSP3	SC(N19)	SC-8889	Cabra	1/200	12 h/4°C
DUSP4	BD	610851	Ratón	1/250	12 h/4°C
DUSP4	SC(H67)	SC-10797	Conejo	1/200	2 h/TA
DUSP6	SC(N18)	SC-8598	Cabra	1/200	2 h/TA
DUSP6	SC(C20)	SC-8599	Cabra	1/200	2 h/TA
DUSP9	SC(C20)	SC-20463	Cabra	1/100	2 h/TA
PTPN1	BD	610140	Ratón	1/2000	2 h/TA
PTPN3	SC(N19)	SC-9789	Cabra	1/200	2 h/TA
PTPN3	SC(T20)	SC-9790	Cabra	1/200	2 h/TA
PTPN6	BD	610126	Ratón	1/500	2 h/TA
PTPN6	SC(D11)	SC-7284	Ratón	1/200	2 h/TA
PTPN7	SC(L15)	SC-21359	Cabra	1/200	2 h/TA
PTPN11	BD	610349	Ratón	1/500	12 h/4°C
PTPN11	CS	3752	Conejo	1/1000	12 h/4°C
PTPN13	SC(C20)	SC-1138	Cabra	1/200	2 h/TA
PTPRA	BD	610349	Ratón	1/500	2 h/TA
PTPRB	BD	610180	Ratón	1/250	2 h/TA
PTPRB	SC(C20)	SC-1114	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRD	SC(C18)	SC-10867	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRD	SC(K20)	SC-10868	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRE	SC(C20)	SC-1117	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRG	SC(C18)	SC-1111	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRG	SC(M18)	SC-1112	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRJ	SC(M15)	SC-13800	Cabra	1/200	2 h/TA
RPTPK	SC(H20)	SC-1113	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRS	SC(C19)	SC-10871	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRS	SC(K19)	SC-10873	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRS	SC(N16)	SC-10872	Cabra	1/200	12 h/4°C
PTPRZ	SC(C19)	SC-1110	Cabra	1/200	12 h/4°C

Tabla 5.8-2. Lista de proteínas tirosina fosfatasa evaluadas en este estudio y anticuerpos utilizados para identificar estas enzimas. BD: BD Biosciencias; SC: Santa Cruz Biotechnology; CS: Cell Signaling Technology.

Proteína	Compañía	Nº catálogo	Especie	Concentración	Incubación
E-Cadherina	BD	610181	Ratón	1/1000	12 h/4°C
PTPN11 (pY542)	CS	3751	Conejo	1/1000	12 h/4°C
PTPN11 (pY580)	CS	3754	Conejo	1/1000	12 h/4°C
Fosfotirosina (4G10)	Upstate	05-321	Ratón	1/10000	1 h/TA
GAB1	CS	3232	Conejo	1/1000	12 h/4°C
GAB1 (pY627)	CS	3231	Conejo	1/1000	12 h/4°C

Tabla 5.8-3. Lista de otras proteínas evaluadas en este estudio y anticuerpos utilizados. BD: BD Biosciencias; CS: Cell Signaling Technology.

Después de la incubación con el anticuerpo primario la membrana se lavó 2 veces con tampón de bloqueo durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el anticuerpo primario no unido. Una vez realizados los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Este anticuerpo secundario se unirá específicamente al anticuerpo primario mediante su unión a la fracción constante. Dependiendo del origen del anticuerpo primario se utilizaron diferentes anticuerpos secundarios para su detección:

- **Anti-ratón IgG** para los anticuerpos primarios IgG de ratón (monoclonales). Es un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce Biotechnology). La dilución utilizada fue de 1:3000 en tampón de bloqueo.

- **Anti-conejo IgG** para los anticuerpos primarios IgG de conejo (policlonales). Es un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz). La dilución utilizada fue de 1:8000 en tampón de bloqueo.
- **Anti-cabra IgG** para los anticuerpos primarios IgG de cabra (policlonales). Es un anticuerpo policlonal de conejo anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz). La dilución utilizada fue de 1:3000 en tampón de bloqueo.

Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana fue lavada 4 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente, dos de ellas con tampón de bloqueo y dos con tampón de lavado.

5.9. Detección y cuantificación de la señal

Para detectar las proteínas, primero se secó la membrana con papel de filtro y a continuación se incubó con una mezcla del sustrato de la peroxidasa y de Luminol durante 5 minutos. De esta forma se produce una reacción de quimioluminiscencia y la luz que se produce es detectada en un film fotosensible, de tal forma que en aquellas zonas donde esté presente la proteína específica, el film quedará impresionado.

Para evidenciar las bandas, el film impresionado se reveló incubándolo 3 minutos en una solución reveladora y 1 minuto en una solución fijadora lavando abundantemente con agua el film entre las dos incubaciones y al final. Una vez secado el film éste se escaneó y se cuantificó la intensidad de la señal mediante densitometría utilizando el programa informático *Gel Pro Analyzer 4.0*.

6. Inmunocitoquímica y microscopía confocal

La inmunocitoquímica es una técnica que nos permite analizar la distribución subcelular de diferentes proteínas. Al igual que la técnica *Western blotting* se basa en la utilización de un anticuerpo específico frente a la proteína en estudio. La diferencia es que el anticuerpo secundario utilizado en esta técnica en vez de producir luz, tiene una molécula fluorescente que nos permite visualizarla mediante microscopía convencional de fluorescencia o mediante microscopía confocal.

6.1. Inmunocitoquímica

Las células se incubaron en placas pretatadas con poli-L-lisina. Para ello se diluyó la poli-L-lisina en agua ultra-pura en proporción 1:7.5 y se añadió 0.5 ml a cada pocillo de la placa, se esperó 10 minutos y pasado este tiempo se retiró el líquido y se dejó secar.

Una vez completado el tratamiento los espermatozoides se lavaron con PBS y se diluyeron en este mismo tampón hasta alcanzar una concentración de 10 millones/ml. De esta suspensión celular se depositaron 15 μ l en la placa pretatada y se esperó 10 minutos para permitir que los espermatozoides se pegasen en el fondo. Posteriormente se incubó con formaldehído al 4% durante 15 minutos y después con Triton X-100 al 0.2% durante 5 minutos a temperatura ambiente para fijar y permeabilizar las células, lavando las muestras con PBS 3 veces durante 1 minuto entre las incubaciones. Por último se volvió a lavar con PBS 3 veces durante 10 minutos y se bloqueó la muestra con una solución de BSA al 5 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez completado el bloqueo se incubó la muestra con el anticuerpo primario (*Tabla 6.1-1*) toda la noche a 4° C en una cámara húmeda. A

continuación se lavó 3 veces con PBS durante 10 minutos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo Alexa-Fluor 488 que tiene una longitud de excitación de 488 nm y de emisión de 519 nm. Finalmente se volvieron a lavar las muestras 3 veces durante 10 minutos con PBS y se observaron en el microscopio confocal.

Este mismo protocolo se utilizó al hacer la inmunocitoquímica en suspensión, en la cual en vez de fijar los espermatozoides a la placa se trataban resuspendidos en PBS en un tubo *Eppendorf*. Las diferentes incubaciones con los diferentes tratamientos se realizaron centrifugan y resuspendiendo entre cada paso del protocolo.

Proteína	Dilución primario	Secundario/Dilución
PTPRB	1/75	Anti-cabra IgG Alexa 488, 1/400
DUSP4	1/100	Anti-ratón IgG Alexa 488, 1/400
DUSP3	1/100	Anti-conejo IgG Alexa 488, 1/400
PTPN11	1/75	Anti-ratón IgG Alexa 488, 1/400
PTPN11 (pY542)	1/75	Anti-conejo IgG Alexa 488, 1/400
PTPN11 (pY580)	1/75	Anti-conejo IgG Alexa 488, 1/400

Tabla 6.1-1. Anticuerpos y diluciones utilizadas en la inmunocitoquímica.

6.2. Microscopía confocal

El microscopio láser confocal es básicamente un microscopio óptico que incluye como fuente de luz un láser y un sistema electrónico que ayuda a la captación de imágenes. Gracias a ello se consigue por un lado un aumento en la resolución y por otro la obtención de imágenes de secciones ópticas extremadamente finas. De esta forma eliminamos la interferencia que produce la luz que llega de los diferentes campos ópticos de todo el grosor de la muestra que se observa, consiguiendo así que el enfoque se realice sobre un único plano (confocal). Por todo ello debido a que las imágenes obtenidas son digitales, se pueden obtener aumentos imposibles en la microscopía óptica (Mathews *et al.*, 2002).

El láser se enfoca sobre un volumen muy pequeño al nivel que se desea dentro de la muestra. La luz fluorescente proveniente de la excitación del anticuerpo 2º con el que hemos incubado la muestra viaja de vuelta a un detector a través de un poro que excluye la luz dispersada por otras regiones. La imagen que se construye electrónicamente a partir de esta señal representa un corte muy fino de elevada resolución que será de mayor intensidad en función de la cantidad de inmunoreactividad existente, es decir en función de la localización de la proteína en estudio. (*Figura 6.2-1*) (Mathews *et al.*, 2002). Para caracterizar perfectamente la localización subcelular, estas imágenes se combinaron con una imagen transmitida del espermatozoide, obtenida con luz visible

En este estudio hemos utilizado un microscopio confocal *MRC1024* de *Bio-Rad* con un láser de Argón y un filtro de absorción variable dependiendo del fluoróforo utilizado.

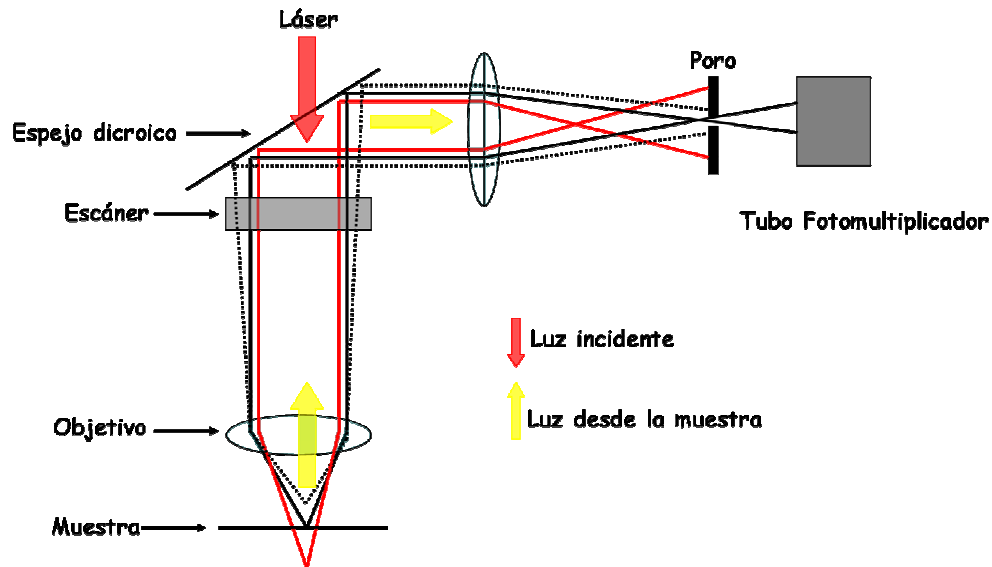


Figura 6.2-1. Esquema del funcionamiento de un microscopio confocal. Un rayo láser pasa a través de un escáner a un pequeño punto gracias a las lentes del objetivo. La fluorescencia que emite la muestra es recogida por el objetivo hasta un espejo dicróico que sólo va a reflejar la luz fluorescente hacia un poro. La luz que surge del plano focal de la muestra pasa a través del poro a un fotomultiplicador. La luz por encima o por debajo del plano focal no pasa por el poro y no se transmite (Mathews *et al.*, 2002).

7. Determinación de la actividad tirosina fosfatasa

Para la determinación de la actividad tirosina fosfatasa utilizamos lisados celulares obtenidos con el tampón de lisis *Celytic™ M* de Sigma, un tampón específico para la determinación de actividades enzimáticas. La actividad enzimática se determinó mediante la cuantificación de la fluorescencia de un sustrato de enzimas tirosina fosfatasa que al ser hidrolizado emite fluorescencia.

7.1. Lisados celulares

Después del tratamiento, las células se lisaron de la misma manera que para la técnica “*Wester blotting*” con la diferencia que se lisaron en un tampón de lisis comercial de Sigma. A este tampón añadimos inhibidores de proteasas al 1%. Este tampón contiene una concentración baja de detergentes no iónicos para no desnaturalizar las proteínas y mantenerlas en su conformación nativa. Una vez obtenido los lisados, se utilizaron para inmunoprecipitar o bien medir la actividad directamente.

7.2. Inmunoprecipitación

Para discriminar la actividad de una fosfatasa en concreto sin la interferencia del resto del lisado utilizamos la inmunoprecipitación, técnica descrita anteriormente. Para cuantificar la actividad de la PTPN11 se utilizaron 600 µg de proteínas del lisado y se diluyó la muestra hasta 1 ml con tampón de lisis comercial. A este ml le añadimos 25 µl de proteína A/G y 3 µg de anticuerpo anti-PTPN11. Esta mezcla se incubó 2 horas a 4 °C en agitación. Una vez pasado este tiempo se procedió a lavar las bolas de agarosa como ya hemos descrito anteriormente.

7.3. Medida de la actividad tirosina fosfatasa

El sustrato que utilizamos fue el DIFMUP (6,8-Difluor-4-metilumbeliferil fosfato), una molécula que contiene un grupo fosfato que al ser hidrolizado por las fosfatasas se convierte en DIFMU (6,8-difluor-7-hidroxi-4-metilcumarina). Esta molécula al ser excitada a 358 nm emite fluorescencia a 452 nm (*Figura 7.3-1*) (Chen *et al.*, 2006).

Para realizar el ensayo utilizamos un tampón de reacción para proteínas tirosina fosfatasa (*Tabla 7.3-2*)(Chen *et al.*, 2006). Para asegurarnos de que la actividad resultante procedía únicamente de proteínas tirosina fosfatasa se añadió al tampón de reacción el inhibidor fluoruro de sodio a una concentración de 50 mM, un potente inhibidor de proteínas serina/treonina fosfatasa. 20 µl del lisado celular fue diluido en 80 µl del tampón de reacción, el cual contenía DIFMUP a una concentración de 50 µM, utilizando placas multipocillos.

La fluorescencia de las muestras fue medida en un lector *Infinite® M200* de Tecan tras 30 minutos de incubación a 37 °C, a una longitud de onda de excitación de 358 nm y de emisión de 452 nm. En el caso de las muestras inmunoprecipitadas la incubación se realizó en el tubo donde estaban las bolas de agarosa añadiendo 100 µl del tampón de reacción. Pasados los 30 minutos la muestra se centrifugó y el sobrenadante se depositó en placas ELISA de 96 pocillos en las mismas condiciones para proceder a la medición (Chen *et al.*, 2006).

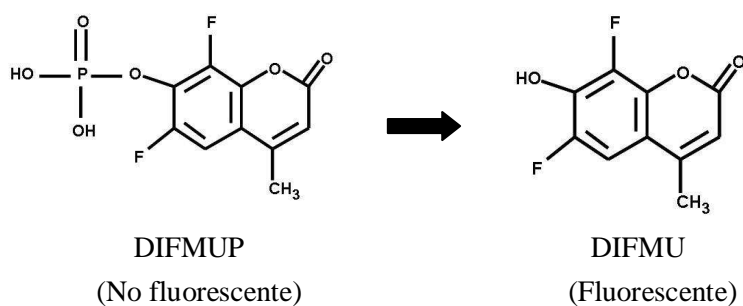


Figura 7.3-1. Estructura molecular de la molécula de DIFMUP.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
MOPS	25 mM
NaCl	50 mM
NaF	50 mM
Tween-20	0.05 %
DTT	1 mM

Tabla 7.3-2. Composición del tampón de reacción para la medición de actividad tirosina fosfatasa (PTP). El DTT se añadió en fresco y se ajustó el pH a 7.

8. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que nos permite evaluar características físicas y químicas de células en suspensión. Permite obtener información sobre el tamaño, complejidad de la célula y la fluorescencia que emiten. Gracias a esta información esta técnica nos permite medir numerosos parámetros celulares como antígenos de membrana, citoplasmáticos y nucleares, contenido de ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, apoptosis y potencial de membrana, entre otros (Howard M.Shapiro, 2003).

Esta técnica se basa en la interacción de uno o varios rayos láser con células en suspensión. Al chocar este haz con cada célula la luz se desvía y el cambio de dirección es registrado por fotomultiplicadores. De este modo se pueden medir gran cantidad de células en un periodo corto de tiempo (Howard M.Shapiro, 2003).

Lo primero que se analiza es la desviación que produce la luz que incide en la célula, se analiza la luz que se desvía en un ángulo menor a 10 grados, lo que se conoce como dispersión frontal o FSC (*forward scatter*) y también la luz que se desvía en más de 10 grados pero menos de 90, lo que se conoce como dispersión lateral o SSC (*side scatter*). FSC y SSC son parámetros intrínsecos de la célula que nos dan información acerca de su tamaño (FSC) y complejidad (SSC) lo que nos va a servir para seleccionar nuestra población de células para el análisis posterior (*Figura 7.3-1*) (Howard M.Shapiro, 2003).

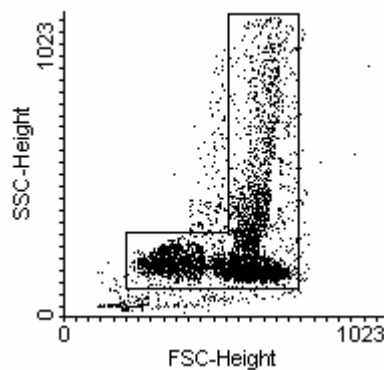


Figura 7.3-1. Esquema de las poblaciones seleccionadas.

En el caso de los espermatozoides de cerdo aparecen dos poblaciones mayoritariamente, en función de la orientación del espermatozoide en el momento del paso por el láser. Una a la izquierda que se va a corresponder con el espermatozoide cuando está en la misma dirección que el láser y otra cuando el espermatozoide pasa perpendicular al láser. Esta última población es menos definida y presenta un arrastre debido a que la superficie de difracción del láser es mayor. Una vez seleccionada la población que se va a analizar, se procede a la incubación con las sondas.

Para obtener más información de la célula, a la suspensión se le añade uno o varios fluorocromos o sondas que son moléculas que al ser excitadas por un rayo luminoso emiten luz de una determinada longitud de onda, que es registrada por fotodetectores ubicados perpendicularmente al fluido que transporta las células. Estas moléculas fluorescentes pueden estar acopladas a anticuerpos específicos que se unirán a determinadas proteínas o tener afinidad por diferentes moléculas ya sean ADN, proteínas o lípidos. La luz que desvía cada célula es recogida individualmente registrando la longitud de onda y su dirección para transformarla en pulsos de voltaje que son codificados y analizados por un ordenador con un programa adecuado (*Figura 7.3-2*) (Howard M.Shapiro, 2003).

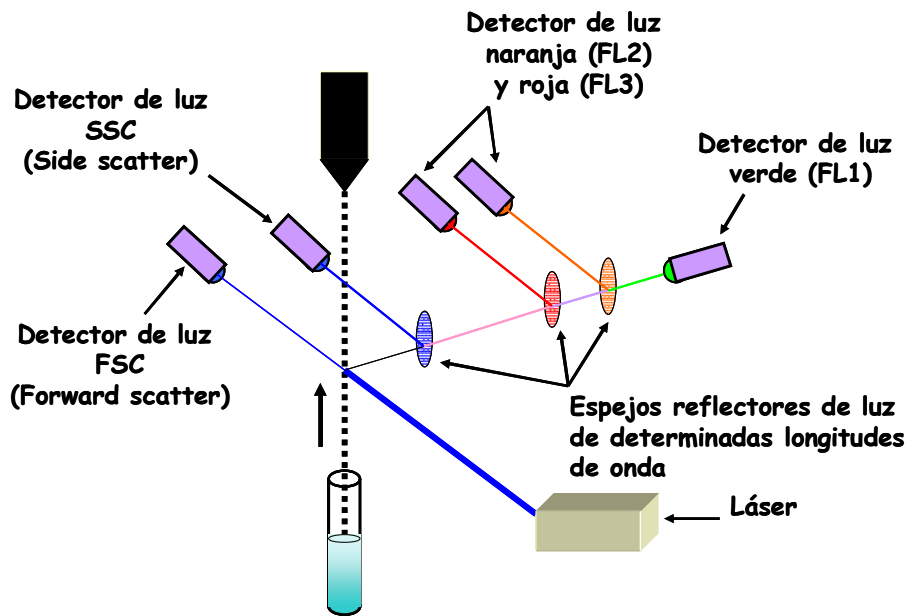


Figura 7.3-2. Esquema de las diferentes partes que componen un citómetro.

8.1. Incubación con las sondas

Una vez obtenidos los espermatozoides se incubaron en los diferentes medios de incubación a una concentración de 5×10^6 /ml. La incubación de las sondas se realizó en un tubo de citometría donde se añadió 100 μ l de la suspensión celular más la correspondiente sonda, las condiciones de incubación se detallan en la *Tabla 8.1-4*. Una vez pasado el tiempo de incubación se añadió 900 μ l de PBS y se analizaron las muestras con un citómetro *FACScan* de *Becton Dickinson* equipado con un láser de Argón (488 nm). Posteriormente analizamos la información obtenida durante la adquisición mediante el programa *Cell-Quest*.

8.1.1. Viabilidad

Para estudiar la viabilidad de los espermatozoides se utilizó la combinación de 2 sondas: Homodímero de etidio y SYBR-14. Ambas sondas tienen afinidad por el ADN. El SYBR-14 es una sonda permeable a la

membrana plasmática que entra en la célula y se une al ADN emitiendo fluorescencia a 516 nm, esta fluorescencia es recogida por el detector FL1 con un filtro de 525 nm. Por el contrario el homodímero de etidio es una sonda impermeable a la membrana plasmática que sólo entra en la célula cuando la membrana está dañada. Al unirse al ADN emite fluorescencia a 617 nm que es recogida por el detector FL3 con un filtro de 620 nm (Silva & Gadella, 2006). Con esta tinción, por lo tanto, aparecen 2 poblaciones que se corresponden con los espermatozoides vivos y muertos (*Figura 8.1-1*).

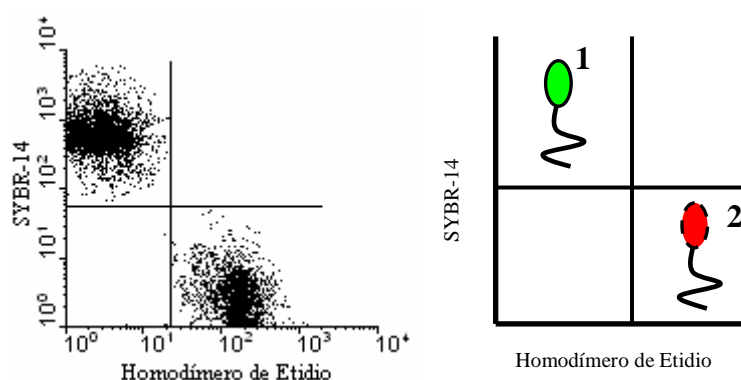


Figura 8.1-1. Esquema de las poblaciones obtenidas con SYBR-14/homodímero de etido. Con estas sondas obtenemos 2 poblaciones: espermatozoides vivos, SYBR-14 positivos (1) y espermatozoides muertos, Homodímero de Etidio positivos (2).

8.1.2. Capacitación

Para el análisis del estado de capacitación del espermatozoide de cerdo utilizamos la combinación de dos sondas: Merocianina 540 y YO-PRO-1. La merocianina es una sonda que tiene afinidad por los lípidos de la membrana plasmática, mostrando mayor afinidad por aquellos que están más desorganizados (espermatozoides capacitados). Esta sonda emite fluorescencia a 578 nm que es recogida por el detector FL2. El YO-PRO-1 es una sonda que tiene afinidad por el ADN y al igual que el homodímero de etidio es una sonda impermeable a la membrana. Esta sonda sólo va a entrar

en la célula cuando la membrana esté dañada, pero a diferencia del yoduro de propidio el YO-PRO-1 emite fluorescencia a 509 nm que es recogida con el detector FL1 (Silva & Gadella, 2006). Mediante el YO-PRO-1 descartamos los espermatozoides muertos. Con esta combinación de sondas obtenemos 3 poblaciones que indicará el grado de capacitación en espermatozoides vivos y el porcentaje en espermatozoides muertos (*Figura 8.1-2*).

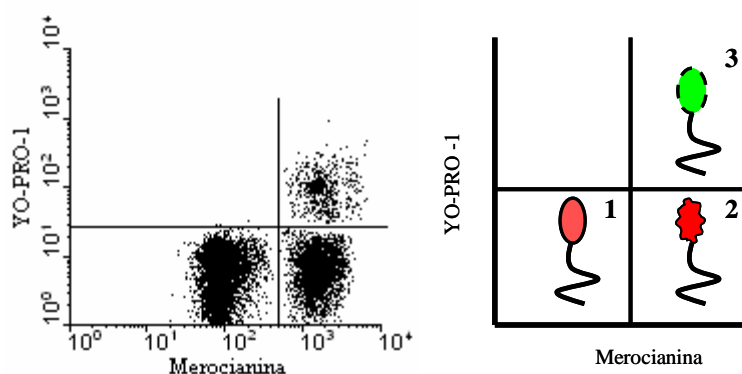


Figura 8.1-2. Esquema de las poblaciones obtenidas con merocianina/YO-PRO-1. Con estas sondas obtenemos 3 poblaciones: espermatozoides no capacitados: merocianina negativos, YO-PRO-1 negativos (**1**); espermatozoides capacitados: merocianina positivos, YO-PRO-1 negativos (**2**) y por último espermatozoides muertos, YO-PRO-1 positivos (**3**).

8.1.3. Reacción Acrosómica

Para analizar la reacción acrosómica utilizamos la sonda PNA, una lectina que tiene afinidad por carbohidratos de glicoproteínas que están exclusivamente localizadas en la membrana externa del acrosoma. Cuando esta sonda se une a la proteína diana indica que el acrosoma está expuesto o dañado (espermatozoides reaccionados). Esta sonda está conjugada con un fluoróforo y es detectada recogiendo la fluorescencia a 519 nm por el FL1. Para discriminar los espermatozoides muertos en este caso utilizamos el homodímero de etidio (Silva & Gadella, 2006). Con estas sondas obtenemos 4 poblaciones que indica el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos y

el porcentaje de espermatozoides reaccionados y no reaccionados (*Figura 8.1-3*).

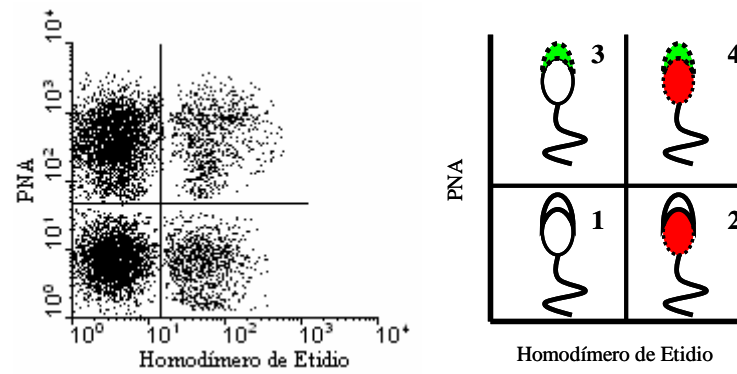


Figura 8.1-3. Esquema de las poblaciones obtenidas con PNA/homodímero de etidio. Con estas sondas obtenemos 4 poblaciones: espermatozoides vivos con el acrosoma intacto: PNA negativos, Homodímero de Etidio negativos (**1**); espermatozoides muertos con el acrosoma intacto: PNA negativos, Homodímero de Etidio positivos (**2**); espermatozoides vivos con el acrosoma dañado: PNA positivos, homodímero negativos (**3**) y por último espermatozoides muertos con el acrosoma dañado: PNA positivos, homodímero positivos (**4**).

Las concentraciones utilizadas para cada sonda así como las condiciones de incubación se detallan en la siguiente tabla:

Sonda	Excitación	Emisión	Detector	Concentración	Tiempo
Homodímero de Etidio	528	617	FL3 (filtro 620nm)	1 μ M	5 min
Merocianina	555	578	FL2 (filtro 575nm)	1.3 μ M	5 min
PNA	495	519	FL1 (filtro 525nm)	0.25 μ g/ml	5 min
SYBR-14	494	516	FL1 (filtro 525nm)	25 nM	5 min
YO-PRO-1	491	509	FL1 (filtro 525nm)	25 nM	5 min

Tabla 8.1-4. Características de las sondas y condiciones de incubación utilizadas.

9. Motilidad espermática

Para el estudio de la motilidad hemos utilizado un sistema computerizado de análisis seminal (C.A.S.A.), denominado ISAS[®]v1 (sistema integrado de análisis seminal v1) diseñado por Proiser S.L. (Valencia) que permite describir diferentes parámetros de motilidad. Este sistema está compuesto por un microscopio de contraste de fases conectado a una platina que mantiene la temperatura a 37 °C y una cámara de video de alta resolución conectada a un ordenador con un programa específico para el análisis.

Una vez que las células se incubaron con los tratamientos y tiempos específicos a una concentración de 50×10^6 /ml se procedió a medir la motilidad de los espermatozoides con unas cámaras específicas (cámaras leja[®]). En estas cámaras, atemperadas a 37 °C, se añadió 2.5 µl de la suspensión espermática y se procedió a medir los diferentes parámetros de la motilidad.

De cada muestra capturamos varias imágenes hasta obtener 200 espermatozoides por muestra. Las fotografías eran obtenidas en alta resolución y digitalizadas en un tiempo de procesamiento de 1 segundo utilizando un objetivo de contraste de fase negativo 10X. Posteriormente analizamos las imágenes eliminando los elementos incorrectamente capturados.

Con respecto a los ajustes de los parámetros del programa, aquellos espermatozoides con una velocidad media menor de 10 µm/s eran considerados inmóviles, mientras que aquellos con velocidades superiores a 15 µm/s eran considerados móviles. En cuanto a los ajustes del tamaño de los espermatozoides y otros parámetros específicos de cada especie analizada (cerdo, caballo y perro) eran ajustados usando las configuraciones

preestablecidas para cada especie según indicaciones del fabricante del programa (ISAS 1.0.6, Proiser S.L., Valencia, España).

10. Protocolo de congelación de los espermatozoides

Para congelar los espermatozoides de cerdo utilizamos un protocolo estándar descrito por Bwanga C.O. (1990) y modificado por Eriksson B.M. (2000). Después de centrifugar los espermatozoides y lavarlos con PBS, las células se mezclaron con el diluyente I (*Tabla 8.1-1*) hasta alcanzar una concentración de 1500×10^6 espermatozoides por ml. Esta mezcla se introdujo en una cámara fría durante 2,5 horas para disminuir la temperatura gradualmente hasta los 5°C. Una vez que la temperatura disminuyó hasta los 5°C, la suspensión se mezcló con el diluyente II (*Tabla 8.1-2*), previamente enfriado a 5°C, hasta alcanzar una concentración de 1000×10^6 espermatozoides por ml. Esta mezcla se cargó en pajuelas de 0,5 ml y una vez selladas se introdujeron rápidamente en vapores de nitrógeno líquido durante 30 minutos. Posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido donde permanecieron hasta el día de la descongelación.

DILUYENTE I	
Lactosa al 11% en agua	80%
Yema de huevo	20%

Tabla 8.1-1. Composición del diluyente I de congelación.

DILUYENTE II	
Diluyente I	92%
Glicerol	6,5%
Equex STM	1,5%

Tabla 8.1-2. Composición del diluyente II de congelación.

11. Análisis de los datos

Los resultados obtenidos empleando la técnica Western blotting se expresan en unidades arbitrarias normalizadas con respecto al control o con respecto a la respuesta máxima. En la determinación de la actividad fosfatasa los datos se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia emitida a 452 nm normalizada con respecto al control y estandarizamos en relación a la concentración de proteínas (100 µg/ml).

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Para la comparación estadística entre dos grupos se utilizó la prueba de t de Student. Cuando los grupos experimentales a comparar eran más de dos se utilizó el análisis de la varianza o ANOVA. Se consideraron resultados estadísticamente significativos cuando los valores de p eran menores de 0.05.

IV. RESULTADOS

1. Identificación y localización subcelular de proteínas tirosina fosfatasa en los espermatozoides de mamíferos

1.1. Inmunodetección de proteínas tirosina fosfatasa en lisados de espermatozoides

Para la identificación de las diferentes proteínas tirosina fosfatasa presentes en los espermatozoides de mamíferos utilizamos la técnica *Western blotting* descrita en la sección de Materiales y métodos (ver apartado *Western blotting*). En este estudio hemos utilizado lisados de espermatozoides de cerdo, caballo y perro. Para asegurarnos de la especificidad de los anticuerpos usados, paralelamente se utilizaron controles positivos que incluían lisados de tejidos de cerdo, perro y rata, así como lisados celulares de rata y humano (*Figura 1.1-1*). Estos controles nos permitieron evaluar si el anticuerpo era capaz de reconocer su diana en proteínas provenientes de especies no testadas, así como en especies previamente testadas por el fabricante. Para este estudio se utilizaron un grupo de 35 anticuerpos comerciales que eran capaces de reconocer 23 proteínas diferentes pertenecientes a la clase I de PTPs basadas en cisteína (*Tabla 1.1-3*).

De las 23 proteínas diana para esos 35 anticuerpos, se identificaron dos PTPs (PTPRB y PTPN11) y dos DSPs (DUSP3 y DUSP4) en lisados de espermatozoides de cerdo y de caballo (*Figura 1.1-1* y *Figura 1.1-2*). En el caso de los lisados de espermatozoides de perro, PTPRB no fue detectada y sólo se detectaron: PTPN11, DUSP3 y DUSP4 en esta especie (*Figura 1.1-1* y *Figura 1.1-2*). Se consideró una identificación positiva de la proteína cuando el anticuerpo reconoció la proteína en los lisados de espermatozoides y en los controles positivos (incluyendo

lisados de tejidos de cerdo o perro), y cuando el peso molecular de la banda coincidía con el descrito para esa proteína.

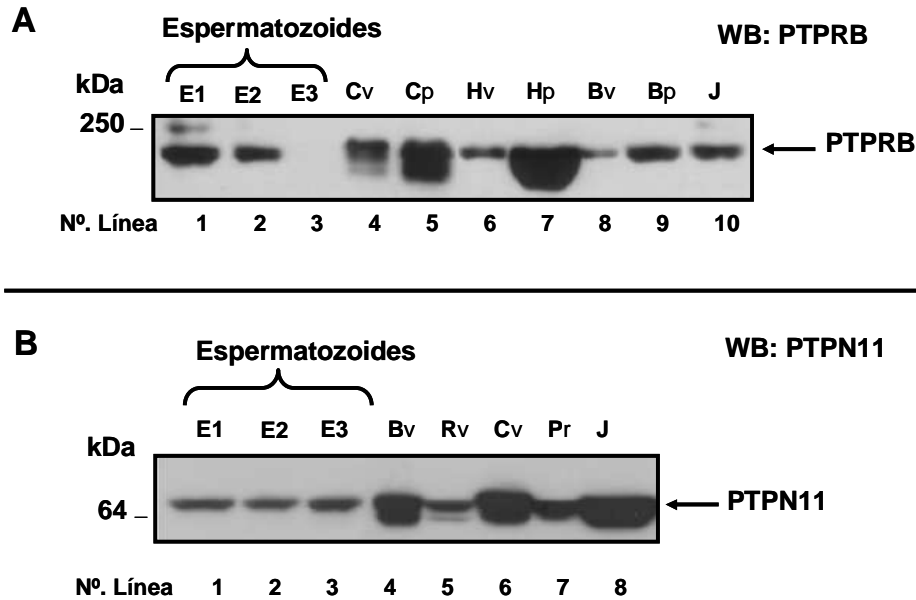


Figura 1.1-1. Identificación de PTPRB y PTPN11 en los espermatozoides de mamíferos. Los espermatozoides de cerdo (E1), caballo (E2) y perro (E3) se lisaron y se analizaron junto con controles positivos utilizando *Western blotting* como se indica en el apartado de Materiales y métodos, utilizando **(A)** un anticuerpo anti-PTPRB y **(B)** un anticuerpo anti-PTPN11 **(A)**. Como controles positivos se incluyeron lisados de cerebro de verraco (Cv, línea 4), lisados de cerebro de perro (Cp, línea 5), lisados de hígado de verraco (Hv, línea 6), lisados de hígado de perro (Hp, línea 7), lisados de bazo de verraco (Bv, línea 8), lisados de bazo de perro (Bp, línea 9) y lisados de células Jurkat (J) **(B)** Como controles positivos se incluyeron lisados de bazo de verraco (Bv, línea 4), lisados de riñones de verraco (Rv, línea 5), lisados de cerebro de verraco (Cv, línea 6), lisados de acinos pancreáticos de rata (Pr, línea 7) y lisados de células Jurkat (J, línea 8).

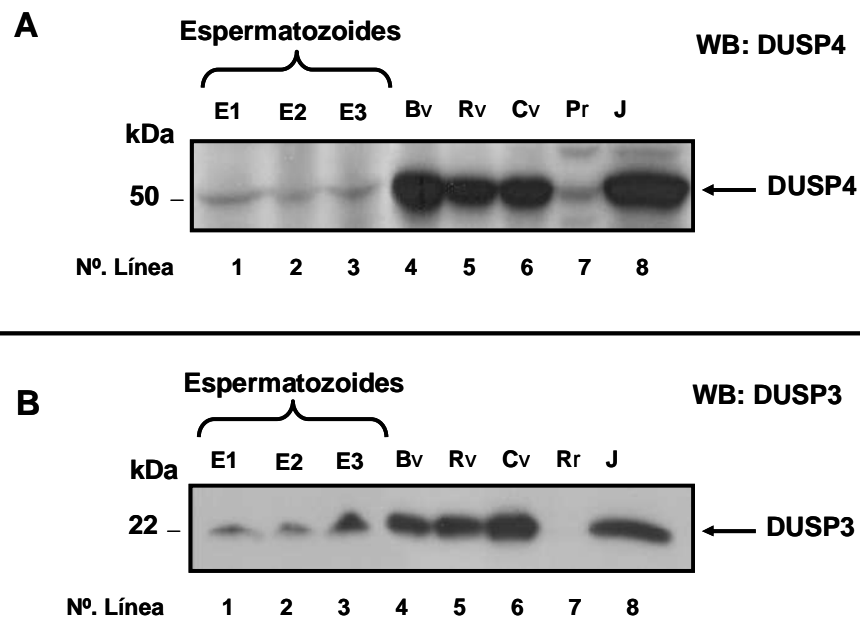


Figura 1.1-2. Identificación de DUSP4 y DUSP3 en los espermatozoides de mamíferos. Los espermatozoides de cerdo (E1), caballo (E2) y perro (E3) se lisaron y se analizaron junto con controles positivos por *Western blotting* utilizando **(A)** un anticuerpo anti-DUSP4 y **(B)** un anticuerpo anti-DUSP3. Como controles positivos se incluyeron lisados de bazo de verraco (Bv, línea 4), lisados de riñones de verraco (Rv, línea 5), lisados de cerebro de verraco (Cv, línea 6), lisados de acinos pancreáticos de rata (Pr, línea 7) y lisados de células Jurkat (J, línea 8).

Se consideró como proteínas ausentes en los espermatozoides, aquellas en las que la banda específica no apareció en el lisado de espermatozoides, mientras que el anticuerpo mostró inmunoreactividad con los controles positivos, incluyendo lisados de tejidos de cerdo y de perro. Dieciocho de los anticuerpos utilizados mostraron un resultado negativo, dado que la señal específica no aparecía en los lisados de espermatozoides, mientras que el anticuerpo detectó la proteína en los controles positivos. Estos anticuerpos se utilizaron para intentar identificar 16 PTPs pertenecientes a la clase I de PTPs basadas en cisteína (*Tabla 1.1-3*), las cuales claramente no están presentes en los espermatozoides de cerdo, caballo y perro: PTPRC (CD45), CDKN3,

DUSP1, DUSP2, DUSP6, DUSP9, PTPN1, PTPN3, PTPN6, PTPN7, PTPN13, PTPRA, PTPRG, PTPRJ, PTPRK y PTPRZ (datos no mostrados).

Además, otros 6 anticuerpos mostraron resultados dudosos al mostrar poca especificidad dado que aparecían demasiadas bandas. Algunos, por el contrario, mostraron ausencia de señal específica en los lisados, en los controles positivos o en ambos a la vez. Estos anticuerpos de resultado dudoso estaban diseñados para reconocer PTPRE, PTPRD y PTPRS (datos no mostrados).

Proteínas tirosina fosfatasa de clase I basadas en cisteína

Grupo	Nombre	N° de PTPs (N° de Ac.)	PTPs identificadas en los espermatozoides (a)		
			Cerdo	Caballo	Perro
<i>Fosfatasa clásicas</i>					
<i>RPTPs</i>	PTPRC, PTPRA, PTPRB, PTPRD, PTPRE, PTPRG, PTPRJ, PTPRK, PTPRS, PTPRZ	10 (15)	PTPRβ	PTPRβ	No
<i>NRPTPs</i>	PTPN1, PTPN3, PTPN6, PTPN7, PTPN11, PTPN13	6 (9)	PTPN11	PTPN11	PTPN11
<i>Fosfatasa de especificidad dual (b)</i>					
<i>MKPs</i>	DUSP1, DUSP2, DUSP4, DUSP6, DUSP9	5 (7)	DUSP4	DUSP4	DUSP4
<i>CDC14s</i>	CDKN3	1 (2)	No	No	No
<i>Atípicas DSPs</i>	DUSP3	1 (2)	DUSP3	DUSP3	DUSP3
TOTAL: 23 (35)			4	4	3

Tabla 1.1-3. Clasificación de las proteínas tirosina fosfatasa de clase I basadas en cisteína reconocidas por los anticuerpos usados en este estudio. (a) La inmunodetección y localización subcelular de estas proteínas en los espermatozoides se muestran en las figuras *Figura 1.2-1*, *Figura 1.3-1*, *Figura 1.4-1* y *Figura 1.5-1*. **(b)** MTMs, SSHs, PRLs, y PTEN, no han sido incluidas en este estudio.

1.2. Distribución subcelular de PTPRB en los espermatozoides de mamíferos

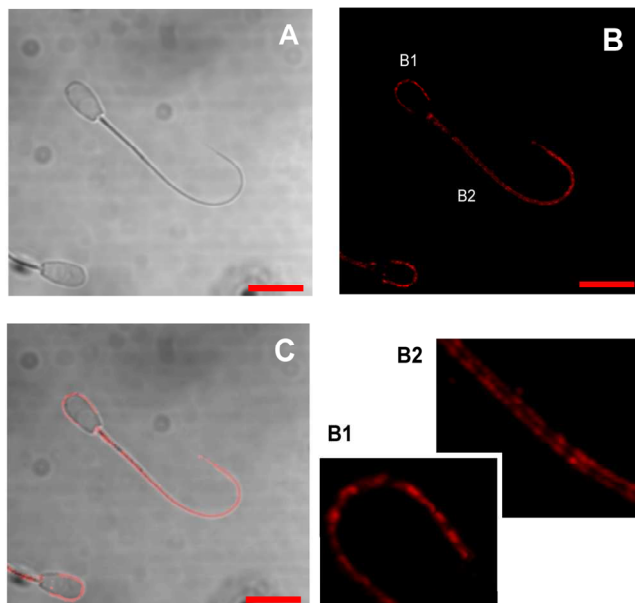
Después de identificar las diferentes proteínas fosfatasa en los espermatozoides de mamíferos por *Western blotting*, el siguiente paso fue estudiar la localización subcelular de las proteínas identificadas utilizando la técnica de inmunocitoquímica (ver apartado Inmunocitoquímica en Materiales y métodos).

En el caso de PTPRB la inmunofluorescencia se localizó por toda la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo (*Figura 1.2-1*), excepto por la región postacrosómica (*Figura 1.2-1, B1*). Para demostrar la especificidad de la señal, los espermatozoides también se incubaron en presencia del anticuerpo secundario. La inmunofluorescencia detectada en estos controles negativos fue muy baja (*Figura 1.2-1, paneles inferiores*). Resultados idénticos se obtuvieron con espermatozoides de caballo, en donde la fluorescencia apareció a lo largo de la cabeza y la cola excepto en la región postacrosómica (datos no mostrados). Por el contrario, la incubación de los espermatozoides de perro con los mismos dos anticuerpos anti-PTPRB no mostró inmunoreactividad (datos no mostrados). Estos resultados indican que PTPRB tiene una distribución similar en la membrana de espermatozoides de cerdo y caballo y refuerzan la idea de que la fosfatasa PTPRB no está presente en espermatozoides de perro.

Para corroborar la localización de PTPRB en la membrana de los espermatozoides de mamíferos, se obtuvieron las fracciones particuladas y solubles de los espermatozoides de cerdo, perro y caballo por separado (ver apartado Obtención de fracciones subcelulares). Los resultados muestran que PTPRB sólo aparece en la fracción de membrana de los espermatozoides de cerdo (*Figura 1.2-1, línea 2*) y de caballo (*Figura*

1.2-1, línea 4), mientras que la señal específica no aparece en la fracción de membrana de espermatozoides de perro (*Figura 1.2-1, línea 6*). Por el contrario, no detectamos inmunoreactividad con el anticuerpo anti-PTPRB en la fracción soluble de los espermatozoides de cada especie (*Figura 1.2-2, líneas 1, 3 y 5*). Además, la pureza de las fracciones fue evaluada utilizando un anticuerpo anti-E-Cadherina, que reconoce una proteína constitutivamente asociada a la membrana plasmática. Como era de esperar, la señal con este anticuerpo sólo apareció en la fracción de membrana (*Figura 1.2-2*), indicando la pureza de las fracciones. Estos resultados indican que la proteína PTPRB en los espermatozoides de cerdo y caballo, aparece asociada a la membrana plasmática.

PTPRB



Anti-Cabra IgG

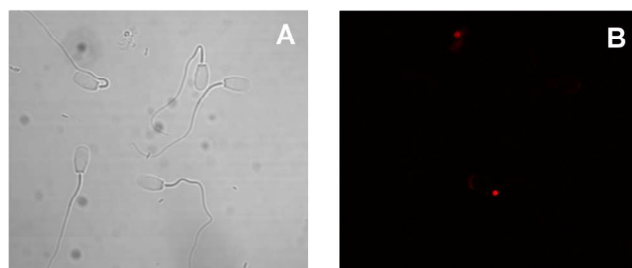


Figura 1.2-1. Inmunolocalización de PTPRB en los espermatozoides porcinos. Los espermatozoides se procesaron como se describe en Materiales y métodos (ver apartado Inmunocitoquímica) y posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-PTPRB. Las imágenes recogidas en los paneles **A**, **B** y **C** se obtuvieron utilizando un microscopio láser confocal (Bio-Rad MRC1024). El panel **A** muestra la imagen obtenida con luz transmitida. El panel **B** muestra la imagen de fluorescencia obtenida excitando la muestra a 488 nm con un láser de Argón y utilizando un filtro de absorción de 515 nm. El panel **C** muestra la superposición de ambas imágenes. Las áreas más representativas fueron aumentadas (**B1** y **B2**). Todas las imágenes se obtuvieron con un objetivo de inmersión de contraste de fases de 60 aumentos. Para comprobar la especificidad del anticuerpo se incubaron las muestras sólo con el anticuerpo secundario (Anti-cabra IgG).

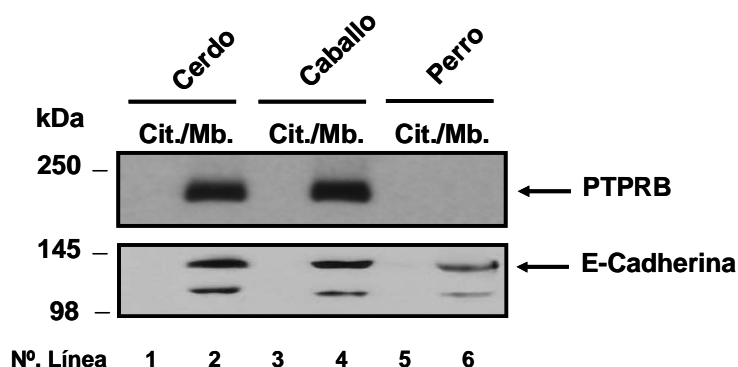
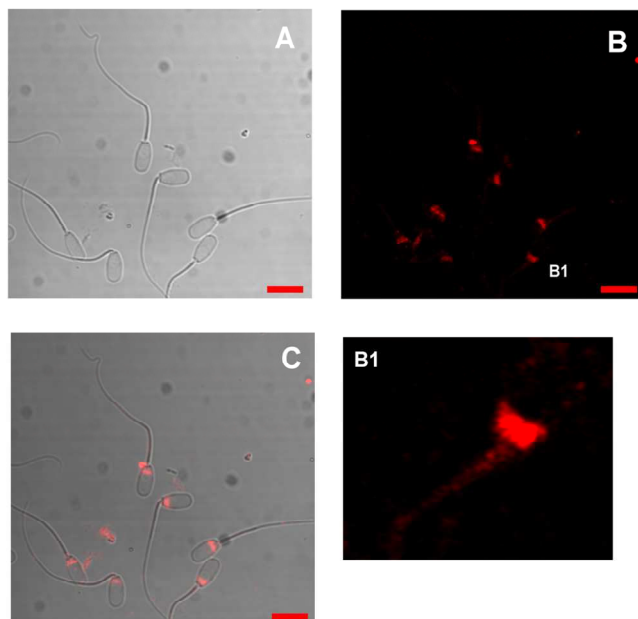


Figura 1.2-2. Inmunodetección de PTPRB en las fracciones subcelulares de los espermatozoides de mamíferos. Los lisados de las fracciones subcelulares de los espermatozoides de cerdo, caballo y perro se analizaron mediante *Western blotting* con un anticuerpo anti-PTPRB. El resultado expuesto es representativo de 3 experimentos realizados independientemente.

1.3. Distribución subcelular de la PTPN11 en los espermatozoides de mamíferos

Para determinar la distribución subcelular de la PTPN11 en los espermatozoides de mamíferos, éstas células se incubaron con un anticuerpo monoclonal de BD Biosciencias (*Figura 1.3-1*). En las tres especies, la PTPN11 fue localizada principalmente en la región postacrosómica y en la pieza intermedia, mostrando poca inmunofluorescencia en el resto de la cabeza y de la cola (*Figura 1.3-1, paneles superiores B y B1*) (datos de espermatozoides de caballo y de perro no mostrados). Resultados similares se obtuvieron con un anticuerpo policlonal anti-PTPN11 de Santa Cruz Biotechnology Inc. en las tres especies. Este anticuerpo mostró un patrón de fluorescencia muy similar al descrito anteriormente, aunque la intensidad de la señal de la cola fue más fuerte y mostró menos diferencia entre la fluorescencia de la región postacrosómica, la pieza intermedia, y el resto del flagelo (datos no mostrados). Finalmente, la inmunocitoquímica detectada en los controles negativos fue muy baja (*Figura 1.3-1, paneles inferiores*), indicando que la señal fue específica.

PTPN11



Anti-Ratón IgG

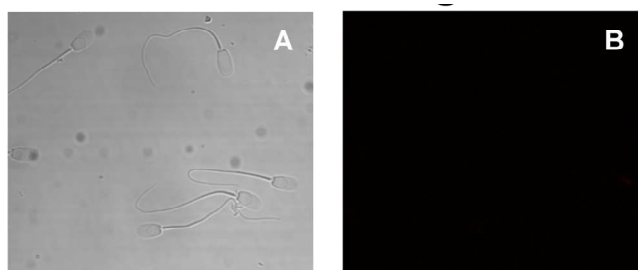
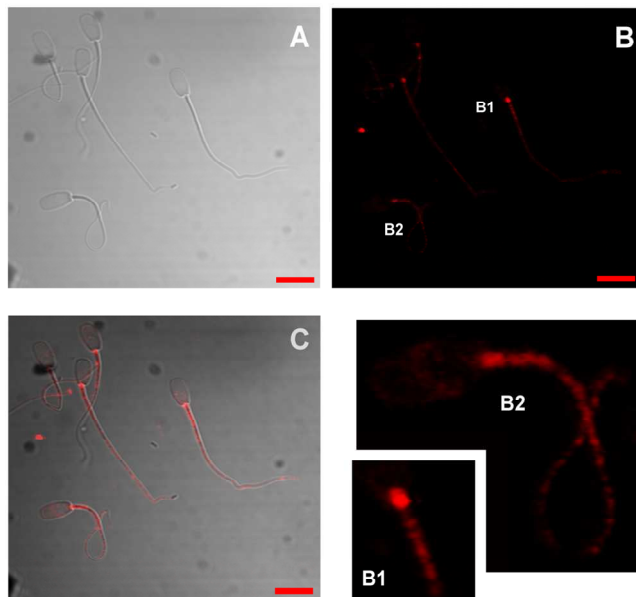


Figura 1.3-1. Inmunolocalización de la PTPN11 en los espermatozoides porcinos. Los espermatozoides se trataron como se describe en Materiales y métodos (ver Inmunocitoquímica) y posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-PTPN11. El panel **A** muestra la imagen obtenida con luz transmitida. El panel **B** muestra la imagen de fluorescencia y el panel **C** muestra la superposición de ambas imágenes. El área más representativa fue aumentada (**B1**). Para comprobar la especificidad del anticuerpo se incubaron las muestras sólo con el anticuerpo secundario (Anti-ratón IgG).

1.4. Distribución subcelular de DUSP4 en los espermatozoides de mamíferos

En los espermatozoides de cerdo la DUSP 4 fue localizada principalmente a lo largo de toda la cola, mientras que en la cabeza apareció poca fluorescencia (*Figura 1.4-1, panel superior B*). La mayor intensidad de fluorescencia apareció en la pieza conectora que une la cabeza con la cola (*Figura 1.4-1, B1 y B2*). En los espermatozoides de caballo y de perro, el patrón de la distribución de la fluorescencia fue idéntico, con poca o ninguna fluorescencia en la cabeza (datos no mostrados). La especificidad de la señal fue demostrada por la incubación de las muestras en ausencia del anticuerpo primario (control negativo), que mostró muy poca unión inespecífica (*Figura 1.4-1*).

DUSP4



Anti-Conejo IgG

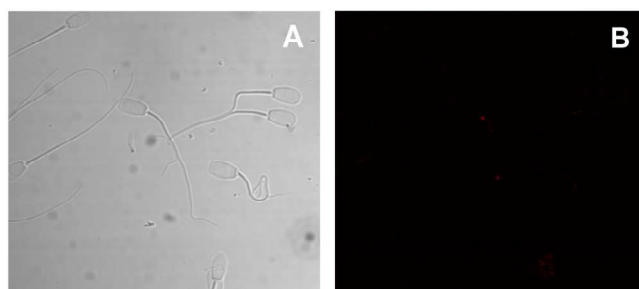


Figura 1.4-1. Inmunolocalización de DUSP4 en los espermatozoides porcinos. Los espermatozoides se trataron como se describe en Materiales y métodos (ver Inmunocitoquímica) y posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-DUSP4. El panel **A** muestra la imagen obtenida con luz transmitida. El panel **B** muestra la imagen de fluorescencia y el panel **C** muestra la superposición de ambas imágenes. Las áreas más representativas fueron aumentadas (**B1 y B2**). Para comprobar la especificidad del anticuerpo se incubaron las muestras sólo con el anticuerpo secundario (Anti-conejo IgG).

1.5. Distribución subcelular de DUSP3 en los espermatozoides de mamíferos

Finalmente, utilizando la inmunocitoquímica, estudiamos la distribución subcelular de DUSP3 en espermatozoides de mamíferos. La proteína DUSP3 fue principalmente localizada en el acrosoma y en la pieza intermedia de la cola del espermatozoide de cerdo (*Figura 1.5-1, paneles superiores*). Se detectó un incremento de la fluorescencia en la pieza intermedia en la mayoría de los espermatozoides (*Figura 1.5-1, paneles superiores B1 y B2*). Sin embargo, en algunos espermatozoides (aproximadamente el 20%-30%), este patrón de distribución fue diferente, mostrando inmunofluorescencia sólo en la pieza intermedia, con poca o ninguna inmunoreactividad en el acrosoma (*Figura 1.5-1, paneles inferiores*). En espermatozoides de caballo y de perro, el patrón de distribución de la fluorescencia de DUSP3 fue idéntico, incluyendo la ausencia ocasional de fluorescencia en el acrosoma en aproximadamente un 20%-30% de los espermatozoides (datos no mostrados). El control negativo muestra muy poca fluorescencia (*Figura 1.5-1*), indicando que la señal obtenida fue específica.

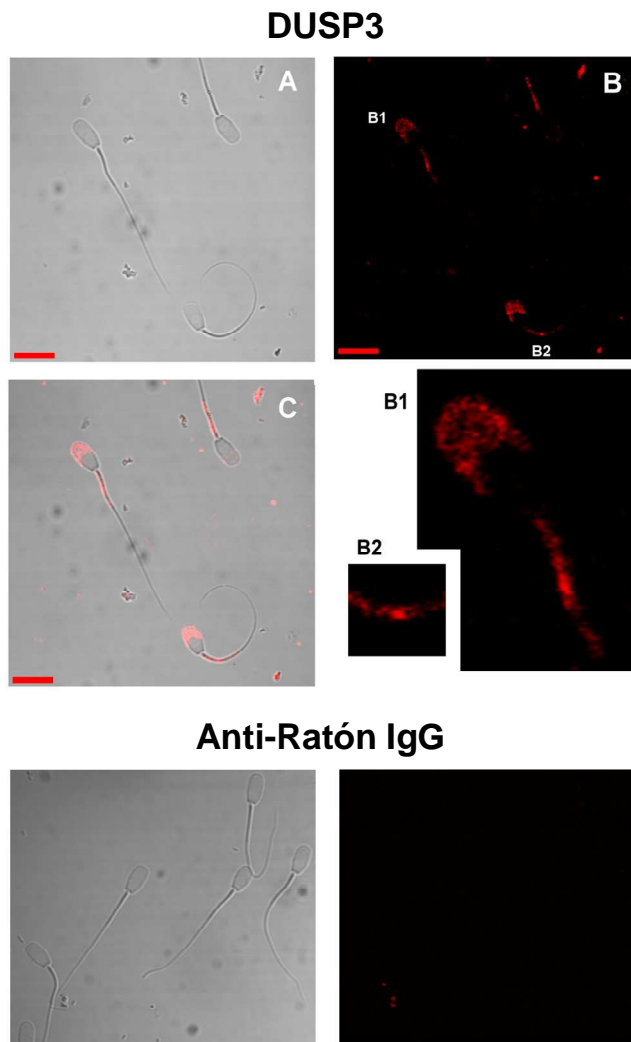


Figura 1.5-1. Inmunolocalización de DUSP3 en los espermatozoides porcinos. Los espermatozoides se trataron como se describe en Materiales y métodos (ver Inmunocitoquímica) y posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-DUSP3. El panel **A** muestra la imagen obtenida con luz transmitida. El panel **B** muestra la imagen de fluorescencia y el panel **C** muestra la superposición de ambas imágenes. Las áreas más representativas fueron aumentadas (**B1 y B2**). Para comprobar la especificidad del anticuerpo se incubaron las muestras sólo con el anticuerpo secundario (Anti-ratón IgG).

2. Estudio de la actividad tirosina fosfatasa en los espermatozoides de mamíferos

2.1. Medida de la actividad tirosina fosfatasa en los espermatozoides de cerdo en diferentes situaciones biológicas

Una vez identificadas las diferentes PTPs presentes en los espermatozoides de mamíferos y su distribución subcelular, nuestro siguiente objetivo fue medir la actividad de estas enzimas en los espermatozoides de cerdo. Esta cuantificación se realizó tanto en células mantenidas en condiciones basales (TBM, 3h, 38°C) como en células incubadas en condiciones inductoras de la capacitación (TCM, 3h, 38°C). Después de la incubación, los espermatozoides se lisaron para medir la actividad tirosina fosfatasa como se indica en el apartado de Materiales y métodos (ver Determinación de la actividad tirosina fosfatasa).

En espermatozoides porcinos incubados en condiciones basales la actividad PTP fue de $938,01 \pm 184,92$ pmol de fosfato en 30 minutos de incubación, normalizado por 100 μ g de proteína (*Figura 2.1-1, A*). Esta actividad basal se incrementó significativamente en los espermatozoides capacitados, pasando a $1382,65 \pm 181,74$ pmol/100 μ g proteína en 30 minutos de reacción (*Figura 2.1-1, A*). Cuando los datos se expresaron en términos porcentuales se obtuvieron resultados equivalentes, detectándose un incremento significativo de la actividad tirosina fosfatasa en los espermatozoides de cerdo incubados en condiciones capacitadas (58% sobre el control, $p < 0.05$) (*Figura 2.1-1, B*).

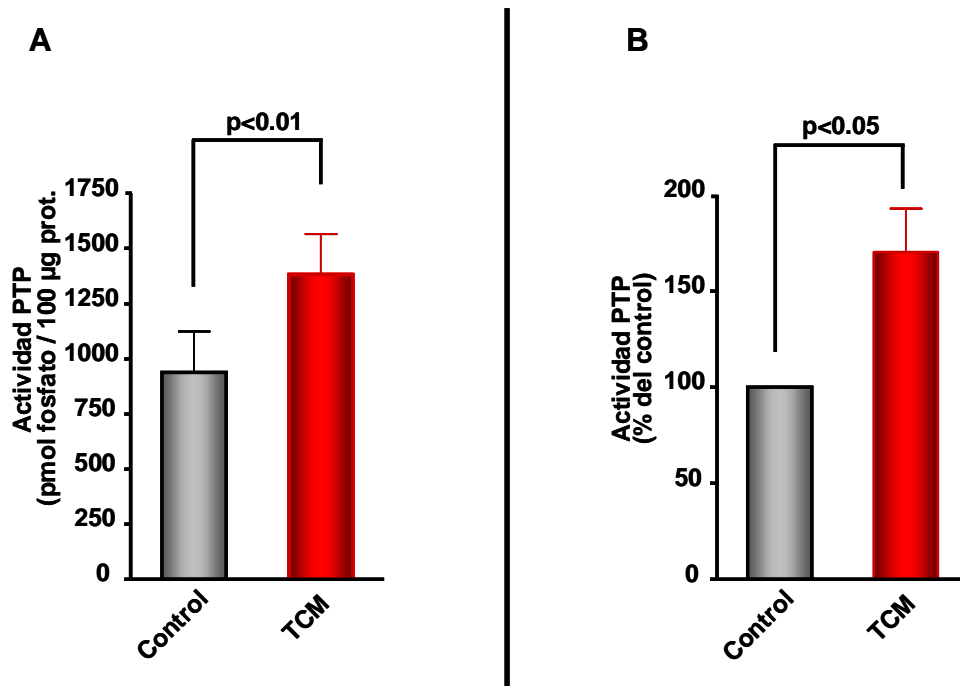


Figura 2.1-1. Actividad tirosina fosfatasa en los espermatozoides de cerdo. Después de la incubación de los espermatozoides de cerdo en medio no capacitante y medio capacitante durante 3 horas a 38°C se lisaron y se midió la actividad PTP (ver Determinación de la actividad tirosina fosfatasa). **(A)** Actividad tirosina fosfatasa expresada en picomoles liberados por 100 µg de proteínas durante 30 minutos de incubación con el sustrato DIFMUP. **(B)** Actividad PTP normalizada en relación al control (100%). Se muestran los resultados de la media \pm EEM de 9 experimentos independientes.

Una vez detectada que la actividad PTP basal es elevada y que está incrementada aún más en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes, estudiamos las posibles vías intracelulares implicadas en la regulación de estas enzimas. Para ello utilizamos agentes químicos que activan selectivamente la PKA y la PKC, que están implicadas en la actividad de la capacitación y la reacción acrosómica respectivamente. De forma sorprendente la incubación de los espermatozoides con el activador de la PKA, el 8-Br-cAMP, en condiciones que inducen un marcado incremento en la fosforilación en tirosina de diferentes proteínas (1 mM, 1 h, 38°C) (Harayama *et al.*, 2004b; Bravo *et al.*, 2005) no produjo cambios en la

actividad PTP con respecto al control (*Figura 2.1-2, A*). Esta ausencia de efecto con respecto al control es independiente del tiempo de incubación con el 8-Br-cAMP (*Figura 2.1-2, B*).

Sin embargo, la incubación de los espermatozoides con TPA (500 nM, 3h), un agente que selectivamente activa la PKC (Rotem *et al.*, 1992; Lax *et al.*, 1997) produjo un descenso significativo de la actividad PTP con respecto al control (*Figura 2.1-2, A*). En su conjunto estos resultados pueden indicar por un lado que la activación masiva de la PKA no causa una variación de la actividad PTP neta, mientras que la activación de la PKC reduce este parámetro.

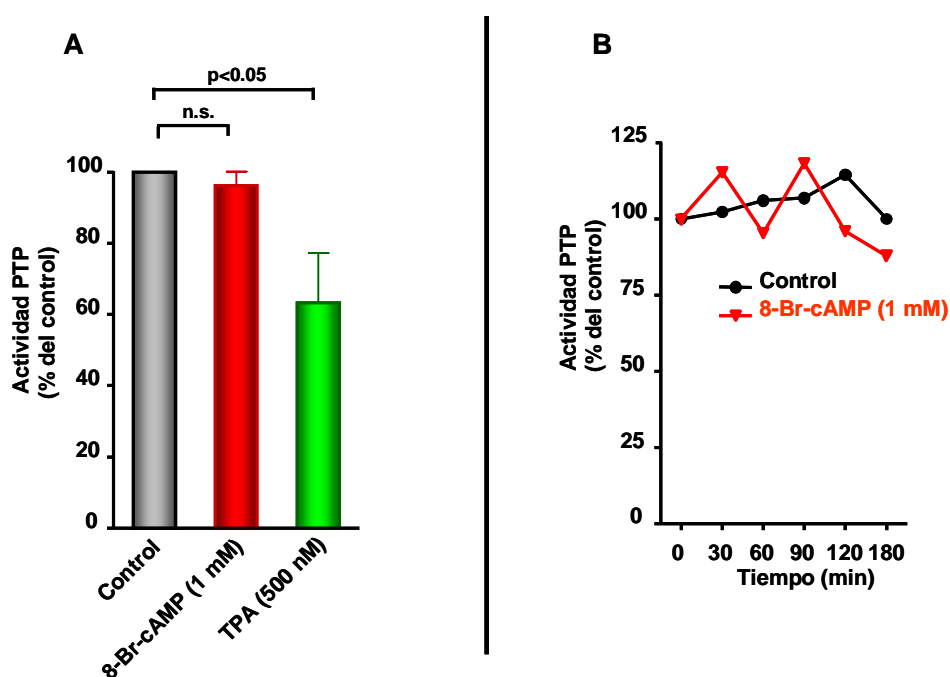


Figura 2.1-2. Actividad tirosina fosfatasa en presencia de diferentes agonistas. (A) Después de la incubación de los espermatozoides de cerdo con los agonistas durante 3 horas en medio no capacitante a 38°C se lisaron y se midió la actividad PTP (ver Determinación de la actividad tirosina fosfatasa). Se muestran los resultados de la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. **(B)** Los espermatozoides porcinos se incubaron en presencia de 8-Br-cAMP 1 mM y cada 30 minutos se lisaron para medir la actividad PTP hasta las 3 horas.

2.2. Efecto de los inhibidores de PTPs en la actividad y viabilidad de los espermatozoides de cerdo

Una vez establecido que varias PTPs están presentes en los espermatozoides de los mamíferos y que éstos podrían desempeñar un papel en la regulación de aspectos esenciales de la funcionalidad espermática, como la capacitación, decidimos caracterizar este posible papel utilizando el ortovanadato y el pervanadato inhibidores químicos específicos que han sido clásicamente utilizados con este fin (Huyer *et al.*, 1997). Una vez que los espermatozoides se incubaron con los inhibidores, se lisaron para medir la actividad PTP. La incubación de los espermatozoides con pervanadato causa una inhibición de la actividad tirosina fosfatasa de manera dependiente de la concentración, llegando a inhibir un 80% la actividad PTP en la concentración más alta (100 μ M). Sin embargo, la incubación con ortovanadato 1 mM sólo inhibió la actividad tirosina fosfatasa en torno al 40 % con respecto al control (*Figura 2.2-1, A*).

Además ambos inhibidores, inhiben significativamente la actividad PTP en espermatozoides estimulados con 8-Br-cAMP (1 mM). Lo mismo ocurrió cuando los espermatozoides se incubaron en medio TCM en presencia de los inhibidores, es decir, la actividad PTP disminuyó de forma significativa con respecto a los espermatozoides incubados en medio TCM (*Figura 2.2-1, B*).

Estos resultados indican que ambos inhibidores bloquean la actividad PTP tanto en condiciones basales como en los espermatozoides activados o capacitados, aunque el pervanadato es mucho más potente y eficaz que el ortovanadato en la inhibición de la actividad PTP.

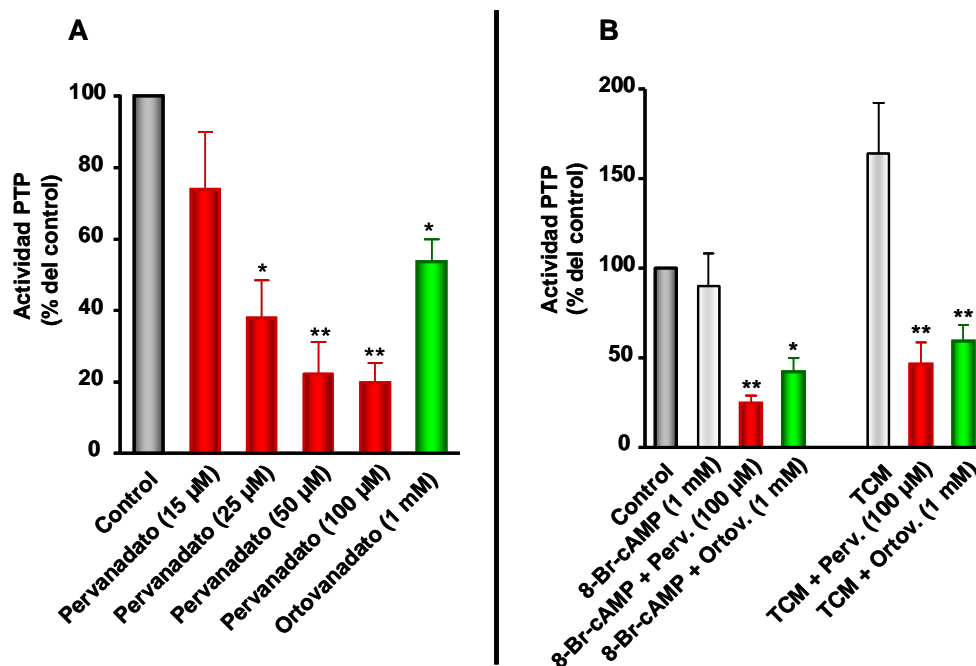


Figura 2.2-1. Actividad tirosina fosfatasa en presencia de inhibidores de PTPs en espermatozoides de cerdo. (A) Después de la incubación de los espermatozoides de cerdo con los inhibidores durante 3 horas en medio no capacitante a 38°C se lisaron y se midió la actividad PTP. Se muestran los resultados de la media \pm EEM de 3 experimentos independientes. Se muestra el resultado \pm EEM de 3 experimentos diferentes. (B) Los espermatozoides de cerdo se incubaron en diferentes situaciones biológicas para medir posteriormente la actividad PTP. Cada valor representa la media \pm EEM de 3 experimentos diferentes representados como el porcentaje del control. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) o (**) ($p < 0.01$) comparado con el valor control, mediante una t de Student para muestras desapareadas.

Para caracterizar la especificidad del efecto de los inhibidores, a la vez que se cuantificó la actividad PTP se midió la viabilidad de los espermatozoides mediante citometría de flujo, utilizando SYBR/Homodímero de etidio como sondas fluorescentes. Después de la incubación de los espermatozoides de cerdo con los inhibidores durante 3 horas en medio no capacitante a 38°C, la viabilidad no se vio afectada de forma significativa ni por el ortovanadato 1 mM ni por el pervanadato 100

μM comparado con el control (*Figura 2.2-2*), indicando que el efecto de la inhibición no depende de un descenso de células viables.

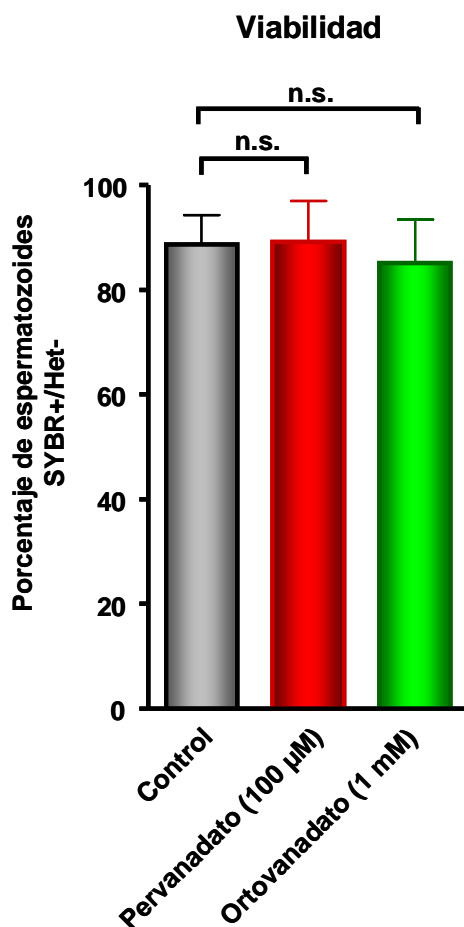


Figura 2.2-2. Efecto del ortovanadato y pervanadato en la viabilidad de los espermatozoides de cerdo. Los espermatozoides de cerdo se incubaron en medio TBM en ausencia y presencia de pervanadato (100 μM) y ortovanadato (1 mM) durante 3 horas a 38°C. Después de la incubación se midió la viabilidad utilizando las sondas SYBR/Ethd. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos realizados independientemente.

2.3. Efecto del pervanadato en la fosforilación de proteínas en tirosina en los espermatozoides de cerdo

Para estudiar la fosforilación de proteínas, los espermatozoides de cerdo se incubaron en diferentes condiciones durante 3 horas a 38°C, posteriormente se lisaron y la fosforilación fue evaluada utilizando la técnica *Western blotting* con un anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10).

En condiciones no capacitantes (TBM) se detectaron al menos cinco bandas cuyos pesos moleculares se corresponden con 42-47, 39-42, 36, 34 y 29 kDa (denominadas como p42-47, p39-42, p36, p34 y p29 respectivamente) (*Figura 2.3-1*). Tres bandas adicionales de alto peso molecular aparecieron cuando el film fue expuesto durante más tiempo. Los pesos moleculares de estas bandas fueron de 180, 125 y 103 Da (*Figura 2.3-1*). Las bandas p42-47 y p39-42 que aparecen en los espermatozoides incubados en TBM son fosforiladas en tirosina con similares niveles en todos los experimentos, independientemente del tratamiento utilizado. Estas bandas parecen corresponder a proteínas fosforiladas en tirosina de forma constitutiva en espermatozoides de cerdo. Estos resultados coinciden con estudios previos (Harayama *et al.*, 2004b).

Respecto a los resultados obtenidos en los espermatozoides incubados en condiciones capacitantes, solamente dos bandas que aparecen en los lisados de espermatozoides no capacitados (p36 y p34) aparecen sin cambios en los lisados de espermatozoides incubados en un medio capacitante (TCM, 3 horas, 38°C) (*Figura 2.3-1, comparar línea 1 y 3*). Por el contrario la fosforilación en tirosina de las bandas p180, p125, p103 y p29 se incrementó claramente en los lisados de espermatozoides incubados en condiciones capacitantes comparado con los lisados de los espermatozoides no capacitados (*Figura 2.3-1, comparar línea 1 y 3*). Además de éstas, al menos

otra banda adicional parece fuertemente fosforilada en tirosina en los lisados de espermatozoides de cerdo incubados bajo condiciones capacitantes. Esta banda tiene un peso molecular de 32 kDa (p32), y previamente ha sido descrito que una fosforilación en tirosina de esta proteína en los espermatozoides de cerdo es dependiente del estado de capacitación (Tardif *et al.*, 2001; Harayama *et al.*, 2004b; Dube *et al.*, 2005). En nuestras condiciones hemos obtenido un resultado similar puesto que esa banda solo aparece en los espermatozoides de cerdo incubados en condiciones capacitantes (*Figura 2.3-1, comparar línea 1 y 3*).

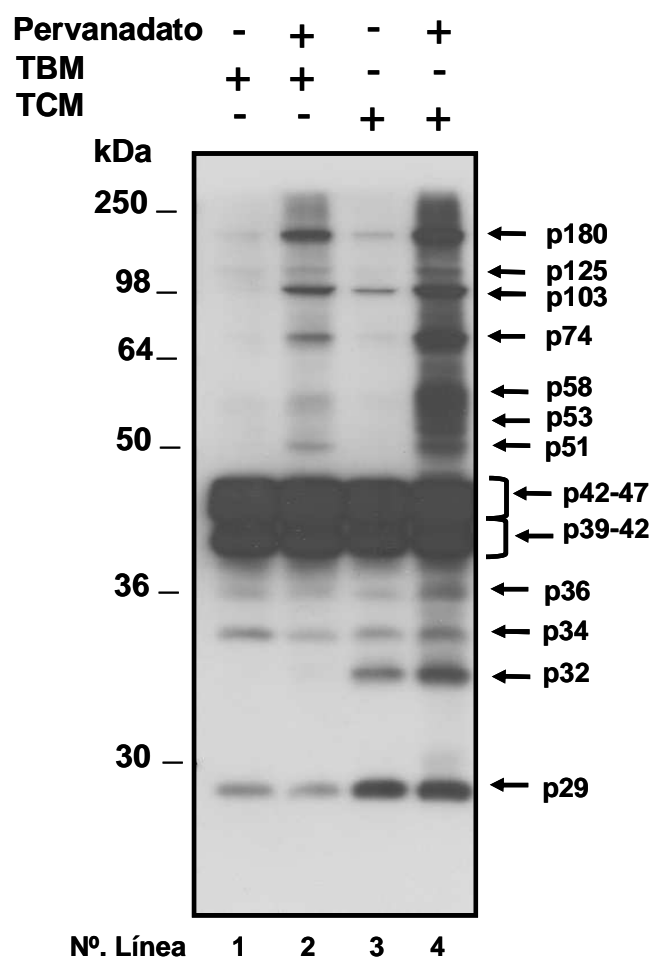


Figura 2.3-1. Efecto del pervanadato sobre la fosforilación en tirosina de diferentes proteínas de espermatozoides de cerdo. Los espermatozoides de cerdo incubados en TBM (línea 1), TBM con pervanadato (línea 2), TCM (línea 3) y TCM con pervanadato (línea 4) durante 3 horas a 38°C se lisaron y se analizó el estado de fosforilación en tirosina de las proteínas utilizando el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10. Se muestra un resultado representativo de 4 experimentos realizados independientemente.

Estos resultados indican que varias proteínas son fosforiladas en tirosina durante la capacitación espermática, probablemente por la acción de proteínas tirosina quinasa (Tardif *et al.*, 2001; Dube *et al.*, 2005). Para

investigar si las proteínas tirosina fosfatasa tienen algún papel en la regulación de la fosforilación en tirosina en espermatozoide de cerdo, usamos pervanadato, un inhibidor potente y permeable de PTPs y DSPs (Fantus *et al.*, 1989; Mikalsen & Kaalhus, 1998), y evaluamos su efecto en la fosforilación en tirosina de proteínas de espermatozoides de cerdo capacitados y no capacitados. La incubación de los espermatozoides de cerdo con 100 μ M de pervanadato durante 3 horas de incubación en medio TBM causó un incremento marcado en la fosforilación en tirosina de al menos seis proteínas. El peso molecular de estas proteínas fue de 180, 125, 103, 74, 58 y 51 KDa (p180, p130, p125, p74, p58 y p51, respectivamente) (*Figura 2.3-1, línea 2*). Tres de estas bandas fosforiladas en tirosina (p74, p58 y p51) no aparecen en espermatozoides de cerdo incubados en TBM sin pervanadato y las otras tres bandas (p180, p130, y p125) muestran un incremento en la fosforilación en tirosina con pervanadato (*Figura 2.3-1, comparar línea 1 y 2*). Estos resultados indican que una o varias proteínas fosfatasa sensibles a pervanadato (PTPs y DSPs) deberían estar activas en espermatozoides no capacitados, manteniendo bajo el nivel de fosforilación en tirosina. Por el contrario, la fosforilación en tirosina de cinco bandas de bajo peso molecular que aparecen en espermatozoides incubados sólo en TBM (p42-47, p39-42, p36, p34 y p29) no cambia o es incluso, ligeramente inhibido con el pretratamiento con pervanadato (*Figura 2.3-1, comparar línea 1 y 2*), indicando que el nivel de fosforilación en tirosina de algunas otras proteínas no está inicialmente regulado por las proteínas tirosina fosfatasa, al menos en condiciones basales.

Finalmente la incubación de los espermatozoides de cerdo con 100 μ M de pervanadato durante 3 horas en un medio capacitante causó un incremento generalizado en la fosforilación en tirosina de todas las proteínas, comparado con espermatozoides incubados en TBM o TCM sin inhibidores (*Figura 2.3-1, línea 4*). El incremento en la fosforilación en tirosina inducida por pervanadato en espermatozoides capacitados fue evidente en todas las bandas

excepto en las bandas no reguladas p42-47 y p39-42, las cuales son fosforiladas en tirosina independientemente del tratamiento, (*Figura 2.3-1, todas las líneas*) y la banda p29, la cual también aparece con similar intensidad en TCM sin pervanadato (*Figura 2.3-1, compara línea 3 y 4*). Estos resultados indican que la fosforilación en tirosina de casi todas las proteínas que son fosforiladas en tirosina durante la capacitación en espermatozoides de cerdo es regulada por proteínas fosfatasa sensibles a pervanadato (PTPs y DSPs).

2.4. Efecto del ortovanadato y pervanadato en la motilidad de los espermatozoides de mamíferos

Estudios anteriores han demostrado que el ortovanadato a una concentración de 50 μM inhibe completamente la actividad PTP en los espermatozoides de hámster (Devi *et al.*, 1999). Resultados similares se obtuvieron en espermatozoides de humano y de ratón usando pervanadato 1 mM (Tomes *et al.*, 2004). Para estudiar el papel que las proteínas tirosina fosfatasa desempeñan en la motilidad, los espermatozoides de cerdo se incubaron en presencia de ortovanadato y pervanadato y la motilidad se evaluó usando un sistema CASA. La incubación de los espermatozoides de cerdo durante 60 minutos en presencia de ambos inhibidores produjo una inhibición drástica de la motilidad de una manera dependiente de la concentración. Debido al diferente mecanismo de acción del ortovanadato y el pervanadato (Fantus *et al.*, 1989; Mikalsen & Kaalhus, 1998), éste último requirió una concentración más baja para producir el mismo efecto que el ortovanadato en la motilidad. En cualquier caso, ambos fueron capaces de inhibir completamente la motilidad en espermatozoides de cerdo en el rango micromolar (*Figura 2.4-1, A*).

Para valorar la especificidad del efecto de ambos inhibidores utilizamos la concentración máxima utilizada. Sin embargo, para evitar las posibles

diferencias entre especies en respuesta a los inhibidores de proteínas fosfatasa que previamente han sido descritos (Devi *et al.*, 1999; Tomes *et al.*, 2004) incrementamos las concentraciones a 75 μM para el ortovanadato y 50 μM para el pervanadato. En estas condiciones, ambos inhibidores causaron una completa inhibición de la motilidad espermática en las tres especies evaluadas (Figura 2.4-1, B), sin que la viabilidad sea afectada (Figura 2.2-2).

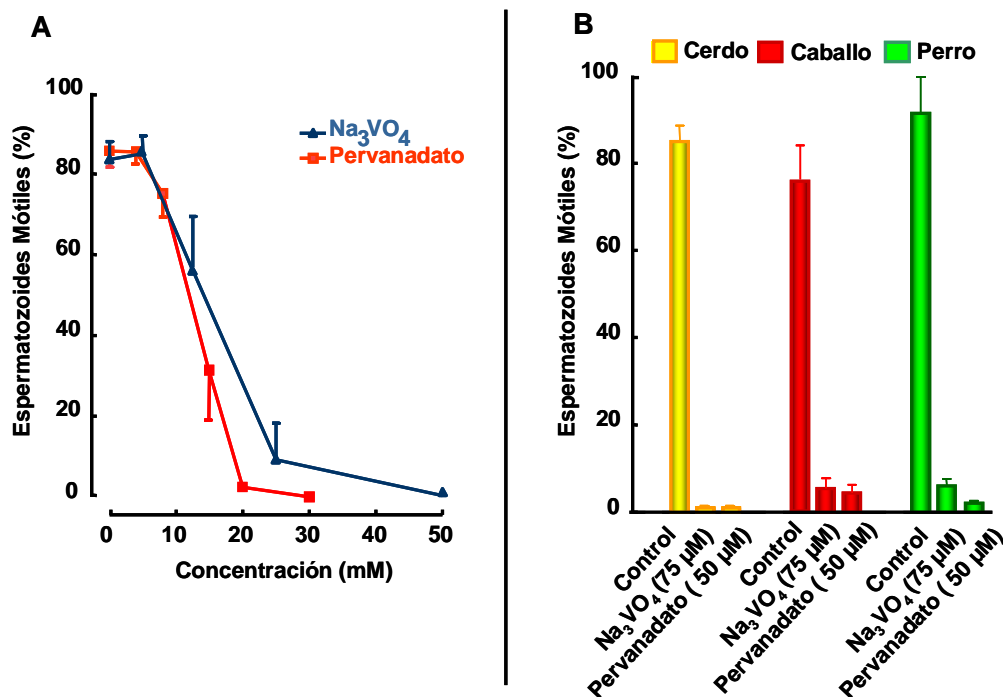


Figura 2.4-1. Efecto del ortovanadato y el pervanadato en la motilidad de los espermatozoides de cerdo. (A) La motilidad de los espermatozoides porcinos fue estimada objetivamente tras la incubación durante 60 minutos en presencia de concentraciones crecientes de ortovanadato o pervanadato en un medio TCM. Los resultados son la media \pm EEM de 12 experimentos independientes realizados con semen de 5 verracos diferentes. **(B)** Los espermatozoides de cerdo, caballo y perro se incubaron en ausencia de inhibidores (control), en presencia de ortovanadato (75 μM), o en presencia de pervanadato (50 μM) durante 60 minutos. Finalizada la incubación la motilidad fue evaluada mediante un equipo CASA. Los resultados son la media \pm EEM del porcentaje de la motilidad total utilizando al menos 3 machos diferentes de cada especie ($n \geq 3$).

2.4.1. Recuperación de la motilidad de los espermatozoides de mamíferos

Para caracterizar mejor el efecto que el pervanadato y el ortovanadato muestran en la regulación de la motilidad espermática, estudiamos si la inhibición inducida por estos compuestos en los espermatozoides de mamíferos es reversible o no. Para ello los espermatozoides se incubaron con los inhibidores y después se retiró el medio para volver a incubarlos sin el inhibidor.

Con este objetivo se incubaron los espermatozoides de cerdo, caballo y perro durante 10 minutos en presencia de 75 μM de ortovanadato o 50 μM de pervanadato. Esta incubación causa una rápida inhibición de la motilidad espermática, con un porcentaje de 95%-100% de espermatozoides estáticos con respecto al control. Después de esta incubación las células se centrifugaron y se resuspendieron en un medio fresco previamente calentado a 37°C. La motilidad fue inmediatamente medida en las tres especies (*Figura 2.4-2, A-C tiempo 0*) y posteriormente cada 10 minutos durante 1 hora. Los resultados muestran que los espermatozoides de cerdo (*Figura 2.4-2, A*), de caballo (*Figura 2.4-2, B*) y de perro (*Figura 2.4-2, C*) son capaces de recuperar la motilidad después del pretratamiento con ortovanadato (75 μM) o pervanadato (50 μM). Esta recuperación fue extremadamente rápida con una recuperación de la motilidad en torno al 10-30% de las células en el tiempo 0 (inmediatamente después de resuspender las células en medio fresco) (*Figura 2.4-2, A-C*). Después de 10 minutos sin el inhibidor aproximadamente el 80% de los espermatozoides de perro eran mótils con respecto al control (*Figura 2.4-2, C*) y después de 20 minutos en el caso de los espermatozoides de cerdo y caballo (*Figura 2.4-2, A y B*). Finalmente, la recuperación de la motilidad fue completa a los 60 minutos de incubación, sin diferencias estadísticamente significativas entre los espermatozoides tratados y sin tratar en las tres especies. Todos estos resultados indican que la inhibición de la actividad PTP induce un rápido y potente efecto inhibitorio de la motilidad espermática que

es completamente reversible. Nuestros resultados refuerzan la idea de que una o más proteínas fosfatasa sensibles a vanadato pueden tener un papel crítico en la regulación de la motilidad en los espermatozoides de mamíferos.

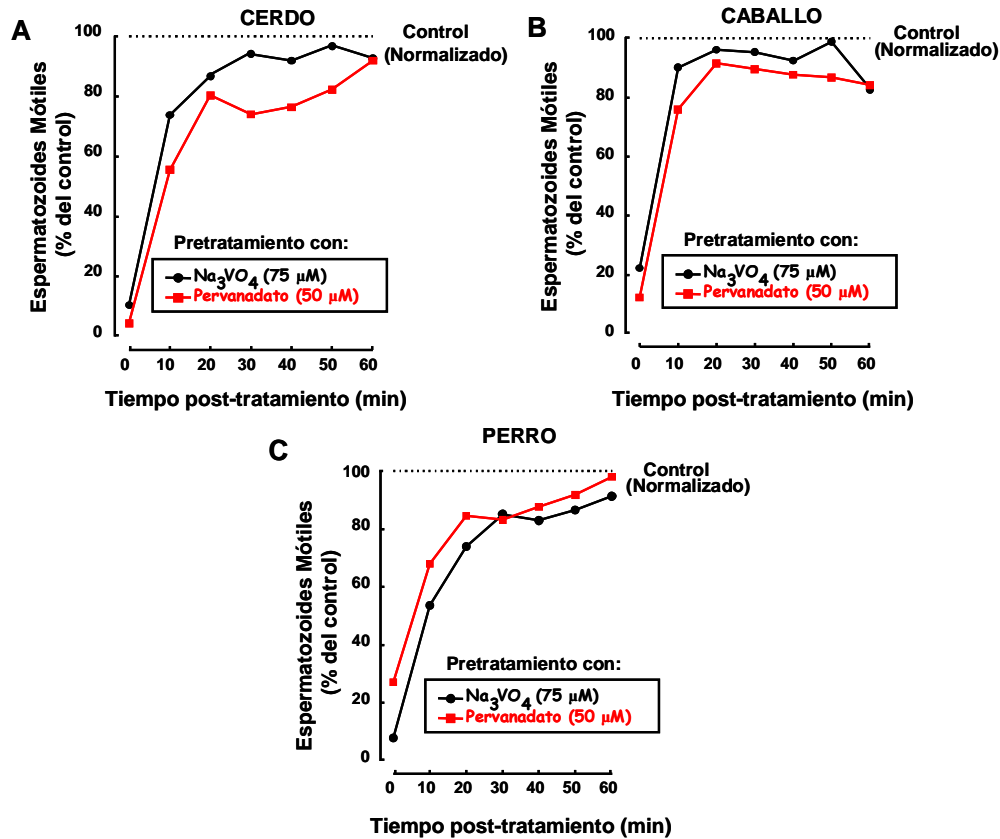


Figura 2.4-2. Reversión del efecto del ortovanadato y el pervanadato en la motilidad de espermatozoides de mamíferos. Después del pretratamiento de las células durante 10 minutos con los inhibidores, se retiró el medio y las células se incubaron en medio fresco sin inhibidor. Se midió la motilidad cada 10 minutos durante 1 hora. Las gráficas muestran la media del porcentaje de la motilidad total normalizada con respecto al control (100%) de espermatozoides de cerdo (A), de caballo (B) y de perro (C). Al menos 3 machos diferentes de cada especie fueron utilizados ($n \geq 3$).

2.5. Actividad tirosina fosfatasa en los espermatozoides de cerdo congelados y refrigerados

Para estudiar la regulación de la actividad PTP durante los procedimientos rutinarios de preservación de los espermatozoides porcinos, utilizamos semen refrigerado y semen criopreservado. Ambos procedimientos reducen marcadamente la actividad PTP en los espermatozoides, indicando que este parámetro podría ser causa o consecuencia de la menor capacidad fecundante de este semen. En el semen mantenido en refrigeración a 17°C la actividad PTP experimentó una reducción gradual de la actividad PTP en función del tiempo, que es significativa a partir del tercer día de almacenaje (*Figura 2.5-1, B*). Esta pérdida de actividad fosfatasa en semen refrigerado no se corresponde con una reducción de la viabilidad, sino que, al contrario de lo que ocurre en los espermatozoides criopreservados (*Figura 2.5-1, B*), la reducción de la actividad PTP no parecen ser directamente dependiente de una pérdida de células viables. La inhibición de la actividad PTP podría estar asociada con cambios subletales relacionados con una pérdida de la capacidad fecundante de los espermatozoides almacenados a 17°C.

Por el contrario durante la criopreservación también se produce una reducción muy significativa de la actividad PTP. Sin embargo, esta reducción se correlaciona directamente con un descenso de la viabilidad de la población espermática. Es asumible, por lo tanto, que las células que sobreviven a la criopreservación demuestren una actividad PTP equiparable a la que demuestra la población no criopreservada (*Figura 2.5-1, A*).

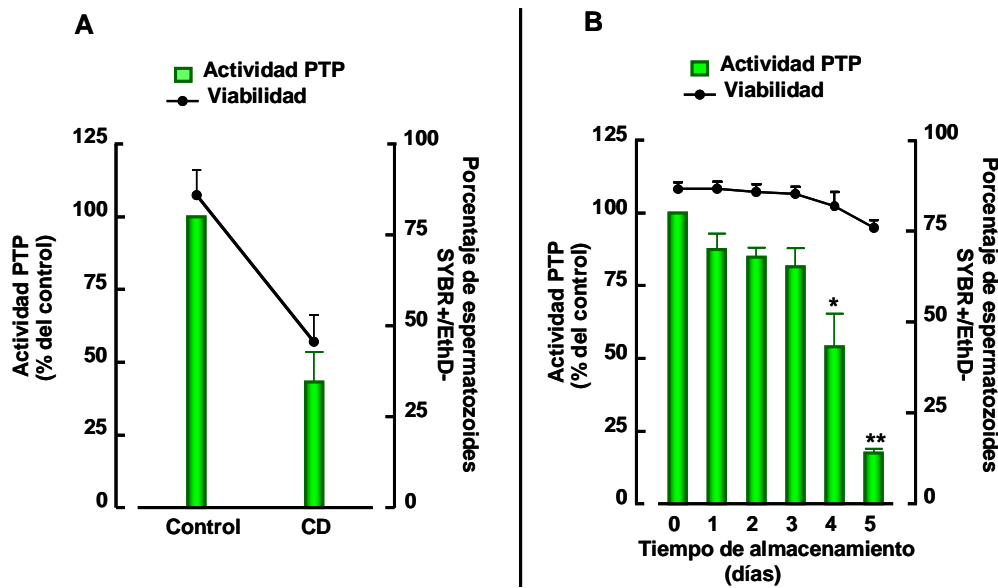


Figura 2.5-1. Actividad PTP durante la criopreservación y la conservación a 17°C de los espermatozoides porcinos: relación con la viabilidad espermática. (A) Las dosis comerciales de espermatozoides porcinos se almacenaron durante 24 horas (control) o se sometieron a un protocolo estándar de congelación. Después de 24 horas los espermatozoides se descongelaron (C/D: Congelado/Descongelado) y se cuantificó la viabilidad y la actividad PTP en ambas poblaciones. **(B)** Las dosis comerciales de espermatozoides porcinos se almacenaron a 17°C en un extender comercial (MRA, Kubus, Madrid). Una alícuota de esa población fue extraída diariamente durante 5 días consecutivos y se evaluó la viabilidad y la actividad PTP. Cada valor representa la media \pm EEM de 3 experimentos diferentes representados como el porcentaje del control. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) o (**) ($p < 0.01$) comparado con el valor control, mediante una t de Student para muestras desapareadas.

2.6. Efecto del estrés oxidativo en la actividad tirosina fosfatasa y en la viabilidad espermática

El estrés oxidativo puede ser una de las principales causas de la pérdida de funcionalidad observada en los espermatozoides criopreservados y refrigerados (Peña *et al.*, 2009). Además una de las principales dianas intracelulares de las EROs son las PTPs, por ello decidimos estudiar el efecto del estrés oxidativo en la actividad PTP en los espermatozoides de cerdo. La incubación de estas células en medio no capacitante en presencia de H₂O₂ redujo la actividad PTP de forma significativa con respecto al control. La intensidad del efecto descrito fue muy dependiente del tiempo de incubación y de la concentración (*Figura 2.6-1, A*). La incubación de los espermatozoides porcinos en medio no capacitante a 38°C con una concentración de 100 µM de H₂O₂ inhibió casi completamente la actividad PTP (*Figura 2.6-1, A*).

Para estudiar si el efecto del estrés oxidativo sobre la actividad PTP puede ser controlable en estas células, incubamos los espermatozoides en presencia de un agente antioxidante natural, la cinantánina (Lopez *et al.*, 2008) cuantificando a continuación la actividad. El efecto de una concentración de 100 µM de H₂O₂ en la actividad PTP fue parcialmente revertido al incubar los espermatozoides en presencia de cinantánina (*Figura 2.6-1, B*). Sin embargo, no se consiguió restaurar completamente la actividad PTP ni siquiera tras preincubar las células varias horas con la cinantánina antes de inducir el estrés oxidativo con H₂O₂ ni tampoco utilizando concentraciones mayores (datos no mostrados).

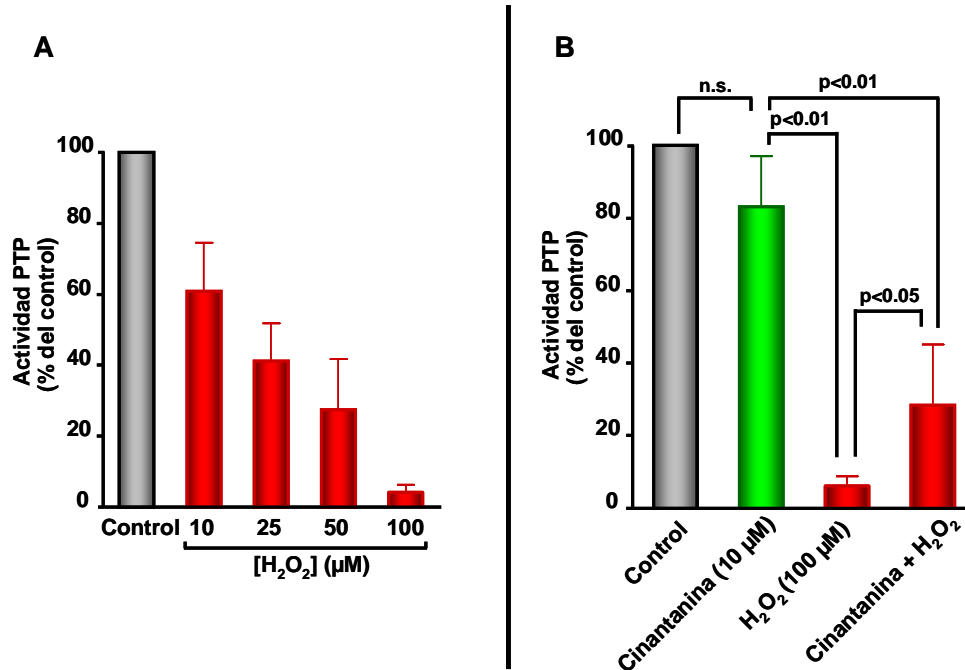


Figura 2.6-1. Efecto del estrés oxidativo en la actividad de PTP en los espermatozoides porcinos. (A) Los espermatozoides de cerdo se incubaron con concentraciones crecientes de H₂O₂ durante 1 hora a 38°C en condiciones no capacitantes (TBM). **(B)** Dosis comerciales de espermatozoides de cerdo se incubaron durante 3 horas en medio TBM en presencia o ausencia del antioxidante natural cinantánina (10 μM) (Lopez *et al.*, 2008). Después de las incubaciones los espermatozoides se lisaron y se midió la actividad PTP. Cada valor representa la media ± EEM de 3 experimentos diferentes representados como el porcentaje del control. El asterisco (*) indica diferencias significativas (p<0.05) o (**) (p<0.01) comparado con el valor control, mediante una t de Student para muestras desapareadas.

3. Estudio de la proteína PTPN11 en los espermatozoides de cerdo

En nuestro grupo estudiamos las vías intracelulares relacionadas con la capacitación y la reacción acrosómica, fundamentalmente las reguladas por fosforilación en tirosina. En base a su localización, una de las PTPs potencialmente relacionadas con la regulación de la capacitación es la PTPN11. Esta fosfatasa interviene en la regulación de numerosas vías intracelulares en células somáticas. Sin embargo, se conoce muy poco de su función y regulación en los espermatozoides de mamíferos.

3.1. Estudio de la fosforilación de la PTPN11 en diferentes situaciones biológicas

La regulación de la actividad de la PTPN11 se produce por interacciones de sus dominios SH2 con el centro catalítico de la proteína. La fosforilación de los residuos 542 y 580 en tirosina induce la unión con estos dominios SH2, liberando el centro catalítico y activando de esta forma la proteína. Esta interacción también se puede producir por la unión a residuos fosforilados de receptores de membrana o de proteínas adaptadoras como GAB1. Por lo tanto una forma de estudiar la actividad de la proteína PTPN11 es a través del estudio de la fosforilación de los residuos 542 y 580 con anticuerpos fosfoespecíficos.

Una vez identificada la proteína PTPN11 en los espermatozoides porcinos y establecida su localización subcelular, utilizamos dos anticuerpos fosfoespecíficos para estudiar su regulación, uno de esos anticuerpos reconoce la proteína fosforilada en el residuo tirosina 542 (anti-PTPN11 pY542) y otro reconoce la proteína fosforilada en el residuo tirosina 580 (anti-PTPN11 pY580). Al realizar sendos *Western blotting* con ambos anticuerpos anti-PTPN11 fosforilada, se detectó con ambos anticuerpos una

única banda cuyo peso molecular se corresponde con la proteína PTPN11 descrita previamente en espermatozoides de cerdo. Respecto al nivel de fosforilación, los resultados muestran que los espermatozoides incubados en TBM no muestran fosforilación de la PTPN11 en ninguno de los dos residuos. Sin embargo, cuando estas células son incubadas en medio TCM durante 3h a 38°C, se detectó la fosforilación de la PTPN11 en los dos residuos de tirosina estudiados (*Figura 3.1-1, A y B, línea 2*) La incubación de los espermatozoides de cerdo con el análogo 8-Br-cAMP en medio TBM durante 3 horas indujo la fosforilación de la PTPN11 en los dos residuos (*Figura 3.1-1, Ay B, línea 4*), mientras que la incubación con TPA no indujo la fosforilación de la PTPN11 en ninguno de los dos residuos (*Figura 3.1-1, A y B, línea 5*). Finalmente, según estudios previos la incubación de los espermatozoides en un medio TCM suplementado con el ionóforo A23187 (1 μ M/3 h) incrementó el porcentaje de células con el acrosoma reaccionado en aproximadamente el 45 %, comparado con los incubados en medio TCM sin ionóforo (Bravo *et al.*, 2005). Sin embargo, este tratamiento inhibió completamente la fosforilación en los dos residuos de la PTPN11 en los espermatozoides de cerdo (*Figura 3.1-1, A y B, línea 3*).

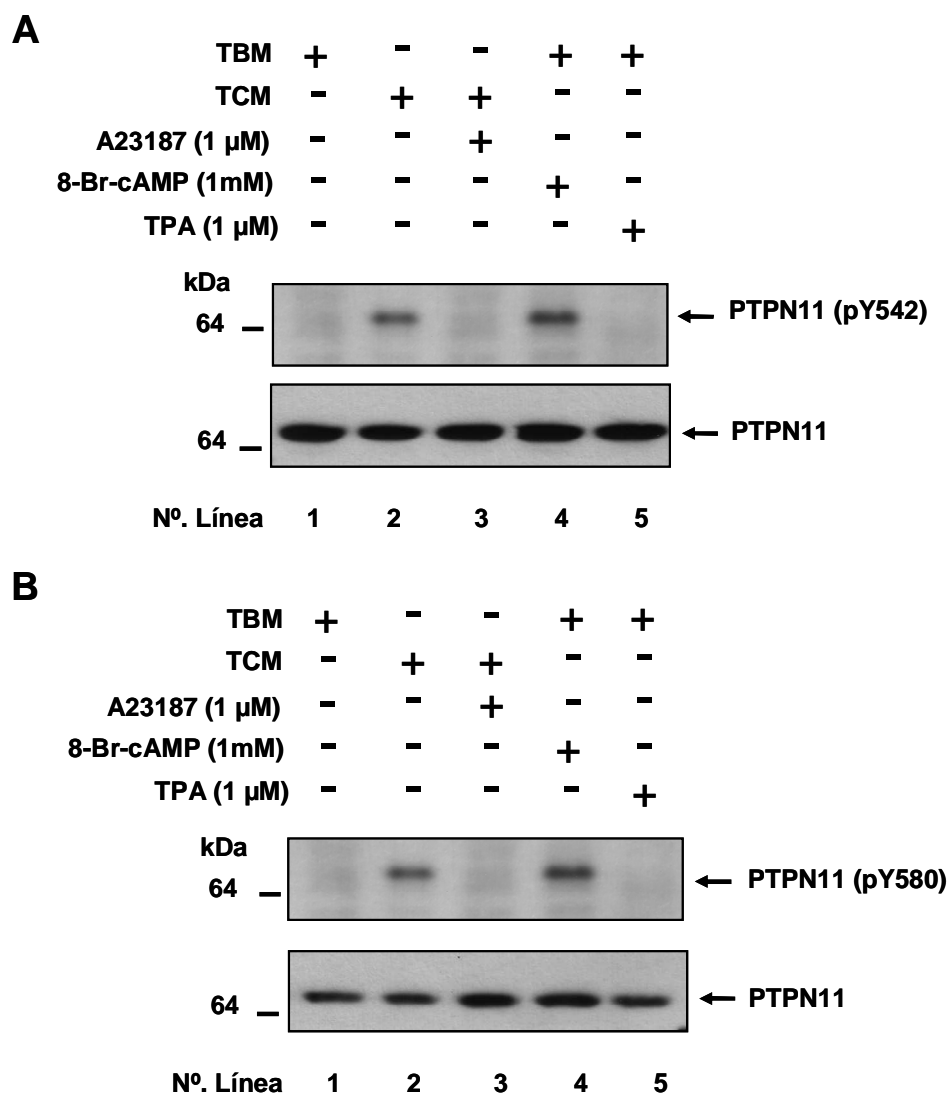


Figura 3.1-1. Efecto del ionóforo A23187, del análogo 8-Br-cAMP y del TPA en la fosforilación de la PTPN11. Después de la incubación de los espermatozoides de cerdo durante 3 horas a 38°C con los diferentes tratamientos se lisaron y se analizaron mediante *Western blotting* utilizando los anticuerpos **(A)** anti-PTPN11 (pY542) y **(B)** anti-PTPN11 (pY580). Se muestra el resultado más representativo de 3 experimentos realizados independientemente.

Estos resultados indican que la PTPN11 es fosforilada internamente en los residuos de tirosina 542 y 580 durante la capacitación, mientras que estas fosforilaciones desaparecen durante el establecimiento de la reacción acrosómica. Los mediadores intracelulares responsables de este efecto parecen implicar a la PKA, mientras que la PKC no parece estar implicada en la regulación de la fosforilación en los residuos de tirosina 542 y 580 de la PTPN11.

3.2. Efecto de la concentración de 8-Br- cAMP y del tiempo de incubación en la fosforilación de la PTPN11

A continuación decidimos valorar el efecto de la vía intracelular cAMP/PKA en la fosforilación de la PTPN11. Con este objetivo incubamos las células en un medio TBM durante 3 horas con el análogo 8-Br-cAMP a diferentes concentraciones y valoramos la fosforilación de esta fosfatasa. Los resultados indican que el 8-Br-cAMP, induce la fosforilación de la PTPN11 de forma dependiente de la concentración. Así, con 0.1 mM de 8-Br-cAMP apareció fosforilación de PTN11 en los dos residuos (*Figura 3.2-2*), llegando a la máxima respuesta con 1 mM de 8-Br-cAMP, concentración utilizada en otros trabajos en espermatozoides de cerdo (Bravo *et al.*, 2005).

Una vez caracterizado el efecto de la concentración del 8-Br-cAMP, estudiamos a continuación el efecto del tiempo en la fosforilación de la PTPN11 inducida en los espermatozoides tras la activación de la vía cAMP/PKA. Al incubar estas células en un medio TBM a 38°C en presencia de 1 mM de 8-Br-cAMP, el nivel de fosforilación de la PTPN11 se incrementó de forma dependiente del tiempo en los dos residuos estudiados. Tras 1 hora de incubación no fuimos capaces de detectar un incremento en la fosforilación de la PTPN11. Sin embargo, la fosforilación fue evidente a las 2 horas y continuó incrementándose hasta alcanzar un nivel de fosforilación 20

veces superior después de 5 horas de incubación en presencia de 8-Br-cAMP (Figura 3.2-1). Los resultados indican que la fosforilación en tirosina de la PTPN11 está finamente regulada por la activación de la vía cAMP/PKA en los espermatozoides.

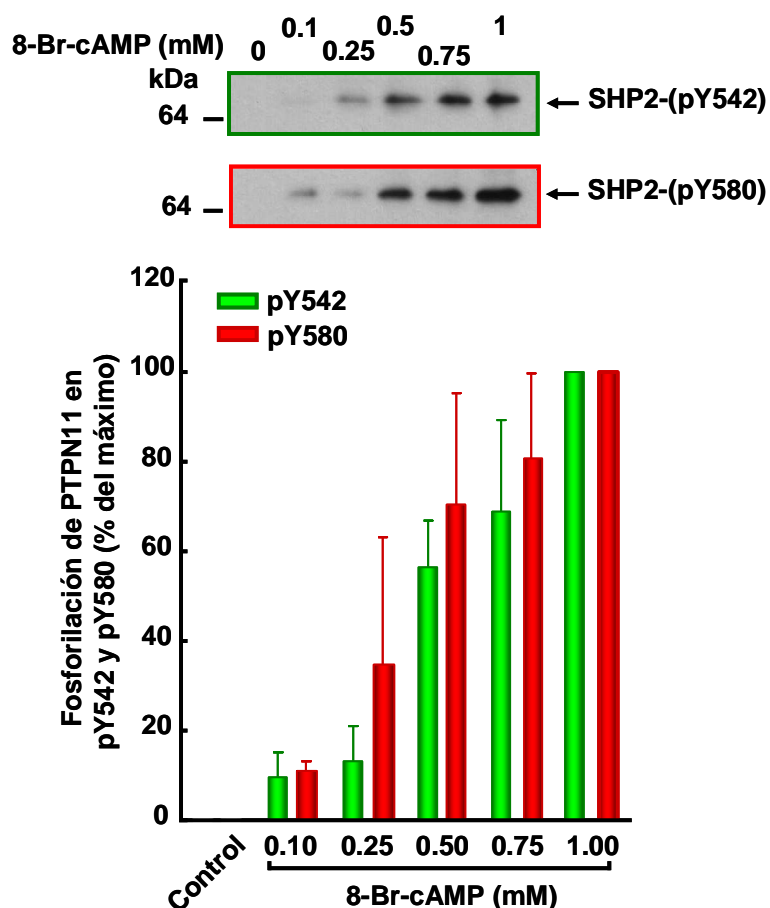


Figura 3.2-1. Efecto de tiempo en la fosforilación de la PTPN11 en espermatozoides de cerdo incubados con 1 mM de 8-Br-cAMP. Después de una incubación a diferentes tiempos en TBM a 38°C con 1 mM de 8-Br-cAMP (línea 1-6), los espermatozoides se lisaron y se analizó el estado de fosforilación de la PTPN11 mediante *Western blotting* con un anticuerpo anti-PTPN11 (pY542) y anti-PTPN11 (py580). Cada valor representa la media \pm EEM de 3 experimentos diferentes representado como el porcentaje de la máxima respuesta (5 horas).

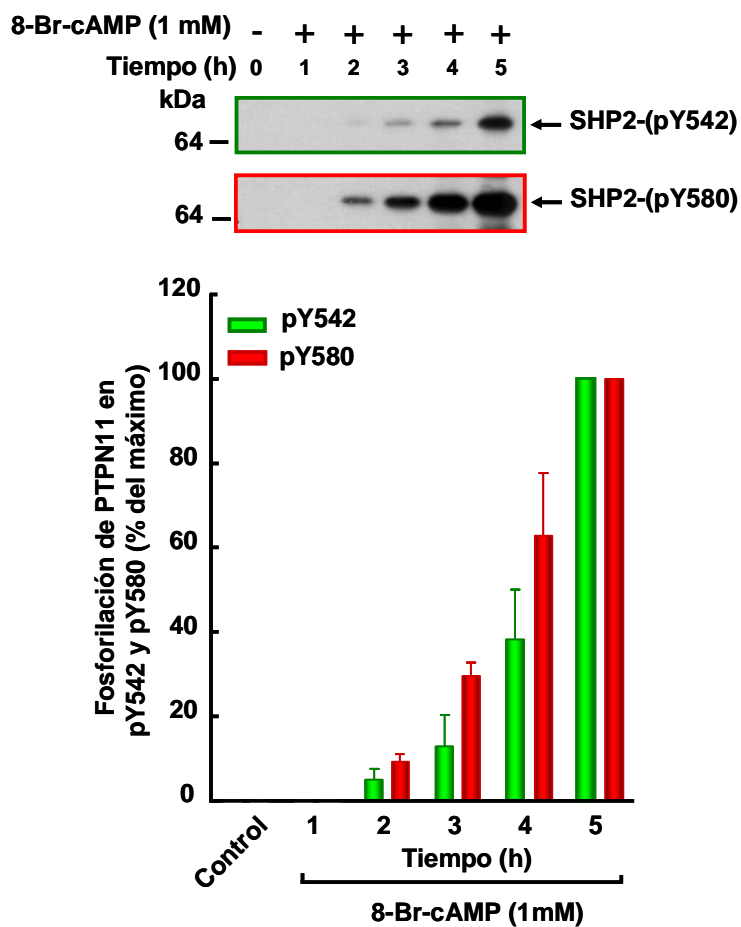


Figura 3.2-2. Efecto de la concentración de 8-Br-cAMP en la fosforilación de la PTPN11. Después de una incubación de 3 horas a 38°C con diferentes concentraciones de 8-Br-cAMP (líneas 1-6) los espermatozoides se lisaron y se analizó el estado de fosforilación de la PTPN11 mediante *Western blotting* con anti-PTPN11 (pY542) y PTPN11 (pY580). Cada valor representa la media \pm EEM de 3 experimentos diferentes representados como el porcentaje de la máxima respuesta (8-Br-cAMP 1 mM).

3.3. Localización subcelular de la PTPN11 fosforilada

Después de estudiar la regulación de la fosforilación de la PTPN11, nuestro siguiente objetivo fue estudiar la distribución subcelular de la PTPN11 fosforilada en los espermatozoides control y en los espermatozoides estimulados durante 3 horas en medio TBM en presencia de 8-Br-cAMP 1 mM, utilizando inmunocitoquímica y microscopía confocal.

En los espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes no fuimos capaces de detectar fluorescencia ni con el anticuerpo que reconoce la proteína fosforilada en tirosina en el residuo 542 (*Figura 3.3-1*) ni con el anticuerpo que reconoce la proteína fosforilada en tirosina en el residuo 580 (*Figura 3.3-2*). Sin embargo, cuando los espermatozoides se incubaron en presencia de 8-Br-cAMP y se analizaron utilizando inmunocitoquímica, apareció fluorescencia por toda la cola del espermatozoide, esto ocurrió con los dos anticuerpos que reconocían la proteína PTPN11 fosforilada en un porcentaje de células elevado pero no en todas. Respecto a las células que mostraron fluorescencia, de forma sorprendente la mayor intensidad de la señal apareció en la cola del espermatozoide y más aún en la pieza principal y terminal (*Figura 3.3-1* y *Figura 3.3-2*). Estos resultados junto con los resultados que obtuvimos con la técnica *Western blotting* parecen indicar que la proteína PTPN11 se fosforila cuando se activa la vía AMPc/PKA, lo que nos podría indicar un posible papel en la capacitación espermática. Además, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el anticuerpo que reconoce la forma no fosforilada de la PTPN11 (*Figura 1.3-1*) podría producirse la translocación de esta proteína en el momento de su fosforilación

PTPN11 (PY542)

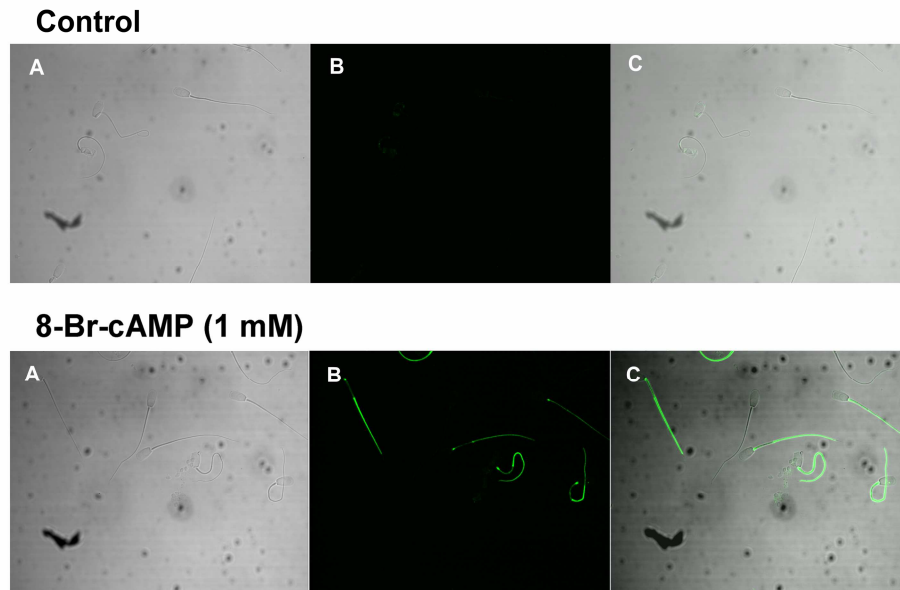


Figura 3.3-1. Localización subcelular de la PTPN11 fosforilada en el residuo Tirosina 542. Los espermatozoides de cerdo se incubaron durante 3 horas a 38°C en medio TBM en ausencia (paneles superiores) o presencia de 8-Br-cAMP 1 mM (paneles inferiores). Después de la incubación las muestras se procesaron como se describe en Materiales y métodos (ver Inmunocitoquímica) y se incubaron con el anticuerpo anti-PTPN11 (pY542). El panel **A** muestra la imagen obtenida con luz transmitida. El panel **B** muestra la imagen de fluorescencia y el panel **C** muestra la superposición de ambas imágenes.

PTPN11 (PY580)

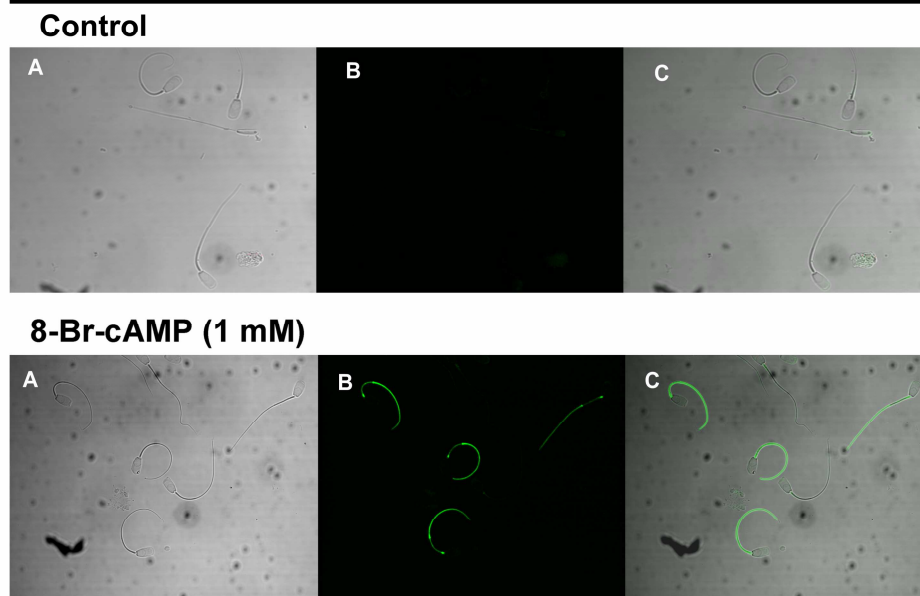


Figura 3.3-2. Localización subcelular de la PTPN11 fosforilada en el residuo Tirosina 580. Los espermatozoides de cerdo se incubaron durante 3 horas a 38°C en medio TBM en ausencia (paneles superiores) o presencia de 8-Br-cAMP 1 mM (paneles inferiores). Después de la incubación las muestras se procesaron como se describe en Materiales y métodos (ver Inmunocitoquímica) y se incubaron con el anticuerpo anti-PTPN11 (pY580). El panel **A** muestra la imagen obtenida con luz transmitida. El panel **B** muestra la imagen de fluorescencia y el panel **C** muestra la superposición de ambas imágenes.

3.3.1. Cuantificación de la fosforilación de la PTPN11

En el anterior experimento no todas las células mostraron fluorescencia, sólo un porcentaje de células. Para cuantificar la fluorescencia de las células de forma objetiva, las células incubadas con los anticuerpos fosfoespecíficos de la PTPN11 se analizaron mediante citometría de flujo.

En el control el porcentaje de células que mostraron fluorescencia es bajo, en torno al 11% para el anticuerpo anti-PTPN11 (pY542) y el 8% para el anticuerpo anti-PTPN11 (pY580). Cuando las células son tratadas con 8-Br-cAMP se incrementó el porcentaje de células marcadas, pasando al 27,7 % y al 33 % de las células con los anticuerpos 542 y 580 respectivamente (*Figura 3.3-3, A*). Esto indica que la PTPN11 podría estar implicada en el establecimiento de la capacitación, aunque su activación se produce aparentemente de forma secuencial en diferentes células.

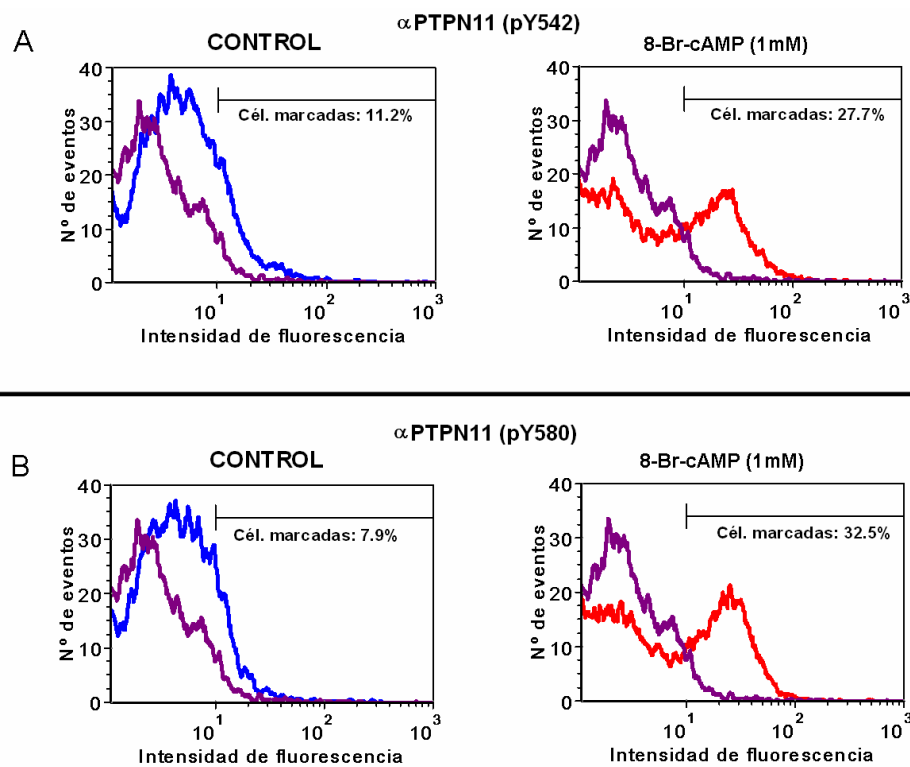


Figura 3.3-3. Cuantificación de la fosforilación de la PTPN11 por citometría. Los espermatozoides de cerdo se incubaron durante 3 horas a 38°C en medio TBM en ausencia y presencia de 8-Br-cAMP 1 mM. Después de la incubación las muestras se procesaron como se describe en Materiales y métodos (ver Inmunocitoquímica). En este caso la inmunocitoquímica se realizó con las células en suspensión y se analizaron por citometría de flujo. **(A)** Se muestra el número de células y la intensidad de fluorescencia obtenida para el anticuerpo anti-PTPN11 (pY542). **(B)** Se muestra el número de células y la intensidad de fluorescencia obtenida para el anticuerpo anti-PTPN11 (pY580). La línea morada muestra la señal obtenida en las células incubadas solamente en presencia del anticuerpo 2º y las líneas azul y roja en presencia del anticuerpo 1º seguido de la incubación con el 2º.

3.4. Efecto del inhibidor NSC-87877 en la viabilidad espermática

Para estudiar una posible función de la fosfatasa PTPN11 en los espermatozoides utilizamos el compuesto NSC-87877, un inhibidor específico de esta proteína (Chen *et al.*, 2006). Antes de valorar el efecto de este compuesto en la funcionalidad espermática, comprobamos que no modifica la viabilidad de los espermatozoides tanto en condiciones capacitantes como en condiciones no capacitantes.

Tomando como referencia la EC_{50} descrita para este compuesto, realizamos experimentos de viabilidad celular utilizando una concentración de 25 μ M, 50 μ M y 100 μ M. Los resultados obtenidos indican que la concentración de 25 μ M no modifica la viabilidad celular de los espermatozoides incubados en medio TBM, ni la de los espermatozoides incubados en medio TCM (*Figura 3.4-1*). Sin embargo, dosis más altas de 50 μ M y 100 μ M de NSC-87877 redujeron significativamente la viabilidad de los espermatozoides, al igual que ocurre en células somáticas (Chen *et al.*, 2006). Por ello estas dosis fueron descartadas, utilizando para estudios posteriores la concentración de 25 μ M

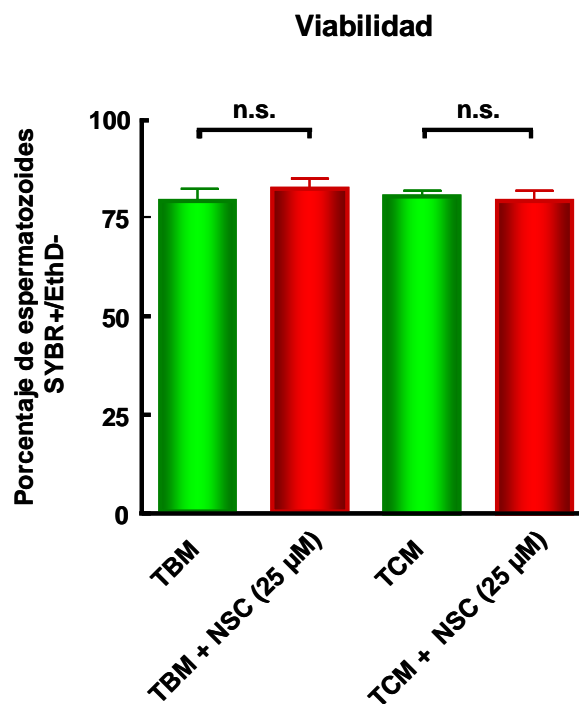


Figura 3.4-1. Efecto del inhibidor NSC-87877 en la viabilidad de los espermatozoides de cerdo. Los espermatozoides de cerdo se incubaron en medio TBM y TCM en ausencia y presencia del inhibidor NSC-87877 durante 3 horas a 38°C. Después de la incubación se midió la viabilidad utilizando las sondas SYBR/Ethd. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos realizados independientemente.

3.5. Regulación de la actividad de la fosfatasa PTPN11 durante la capacitación, vías implicadas y efecto del inhibidor en la actividad PTP

Para medir la actividad específica de la proteína PTPN11, utilizamos la inmunoprecipitación como se describe en Materiales y métodos. Al medir la actividad específica de esta proteína en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes se observó un aumento significativo de la actividad comparado con los espermatozoides incubados en condiciones no capacitantes (*Figura 3.5-1*), al igual que ocurría con la actividad fosfatasa general (*Figura 2.1-1*). Sin embargo, la incubación con 8-Br-cAMP induce un aumento de la actividad específica de la PTPN11, efecto no observado al medir la actividad fosfatasa general en presencia de 8-Br-cAMP, donde la actividad PTP no se modificó (*Figura 2.1-2, A y B*). En todos los tratamientos la incubación con el inhibidor redujo la actividad específica de la PTPN11 de forma significativa, llegando al 80 % en la mayoría de los tratamientos. La disminución de la actividad PTP general en presencia del inhibidor NSC-87877 indica especificidad de este compuesto, ya que la disminución de la actividad PTPN11 específica se refleja en este descenso de actividad PTP total (*Figura 3.5-1, A y B*).

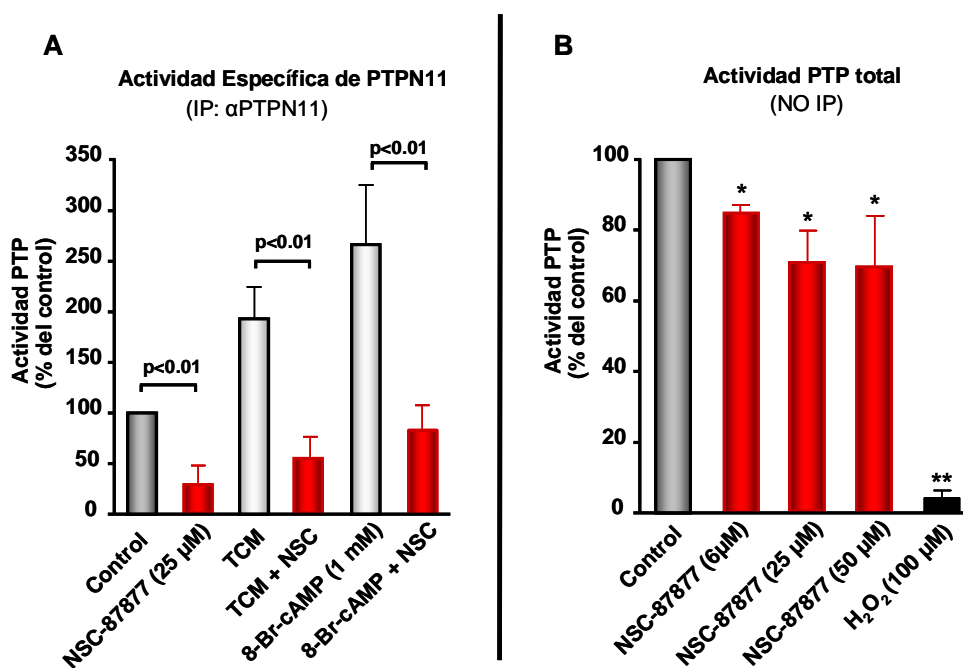


Figura 3.5-1. Efecto de la capacitación y la vía cAMP/PKA en la actividad de la PTPN11: bloqueo por el inhibidor específico NSC-87877. Los espermatozoides porcinos se incubaron con diferentes tratamientos durante 3 horas a 38°C en presencia o ausencia del NSC-87877. Después de la incubación, los espermatozoides se lisaron y se midió la actividad PTPN11 en inmunoprecipitados. Cada valor representa la media \pm EEM de 3 experimentos diferentes representados como el porcentaje del control. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) o (**) ($p < 0.01$) comparado con el valor control, mediante una t de Student para muestras desapareadas.

3.6. Efecto de la inhibición de la PTPN11 en la fosforilación en tirosina de diversas proteínas

Hasta ahora nuestros resultados indican que la PTPN11 podría ser un mediador intracelular de la señalización dependiente de la vía cAMP/PKA en los espermatozoides. Sin embargo, poco se sabe de los posibles sustratos de esta PTP en estas células. En una búsqueda de posibles sustratos de la PTPN11 en los espermatozoides utilizamos el inhibidor específico NSC-

87877 y analizamos la fosforilación en tirosina de las células estimuladas con 8-Br-cAMP utilizando un anticuerpo antifosfotirosina (4G10).

Los resultados muestran que la incubación de los espermatozoides porcinos con 8-Br-cAMP 1 mM suplementado con el inhibidor NSC-87877 25 μ M aumentó la fosforilación en tirosina de numerosas proteínas comparado con los espermatozoides incubados solamente con 8-Br-cAMP (Figura 3.6-1). Estos resultados indican que la proteína PTPN11 estaría implicada en la defosforilación de diversas proteínas cuya fosforilaciones depende de la activación de la vía AMPc/PKA en los espermatozoides de cerdo.

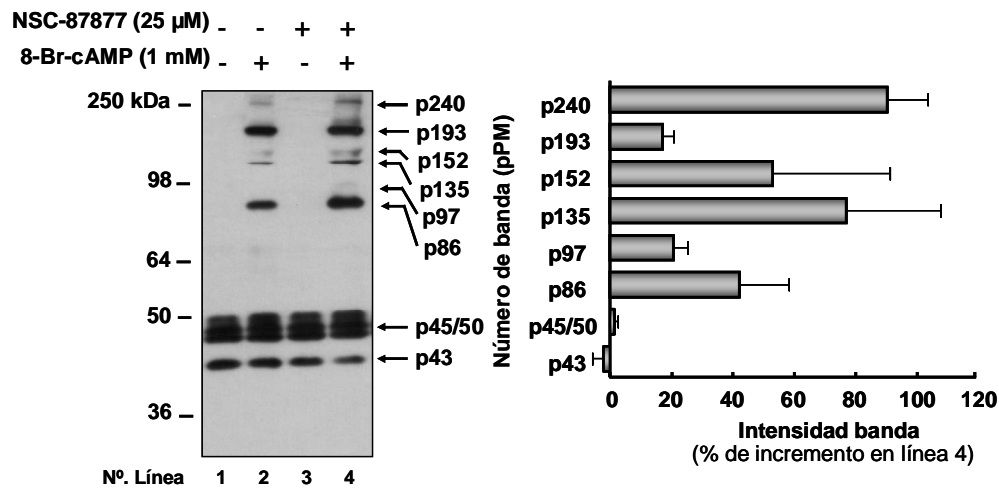


Figura 3.6-1. Efecto del inhibidor NSC-87877 sobre la fosforilación en tirosina de diferentes proteínas en presencia de 8-Br-cAMP en espermatozoides de cerdo. (Izquierda) Los espermatozoides de cerdo incubados en TBM (línea1), TBM con 8-Br-cAMP 1 mM (línea 2), TBM con NSC-87877 25 μ M (línea 3) y TBM con 8-Br-cAMP más NSC-87877 (línea 4) durante 3 horas a 38°C se lisaron y se analizó el estado de fosforilación en tirosina de las proteínas utilizando el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10. (Derecha) Densitometría de las bandas. Se muestra el incremento de las bandas de línea 4 con respecto a la línea 2. Cada valor representa la media \pm EEM de 3 experimentos diferentes representado con respecto a la intensidad de las bandas en 8-Br-cAMP.

3.7. Papel de la PTPN11 en la regulación de la motilidad de los espermatozoides de cerdo

Para estudiar el efecto de la proteína PTPN11 en la motilidad de los espermatozoides de cerdo, incubamos los espermatozoides en presencia del inhibidor NSC-87877 25 μ M en un medio capacitante y medimos la motilidad utilizando el sistema CASA. Durante 4 horas, cada 60 minutos una alícuota de la muestra fue medida. La motilidad fue descendiendo con el tiempo tanto en las muestras incubadas con inhibidor como sin inhibidor, sin que hubiera diferencias significativas entre los dos (*Figura 3.7-1*). A pesar de que la inhibición de las PTPs globalmente inhibe la motilidad, los resultados descritos parecen indicar que la PTPN11 no está implicada en la regulación de la motilidad espermática.

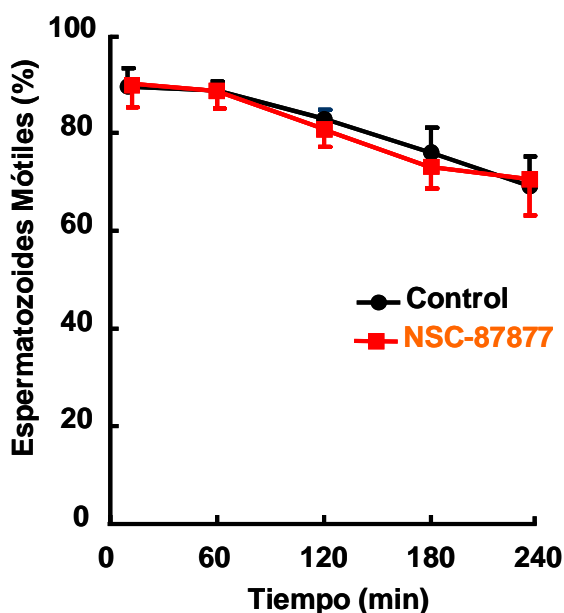


Figura 3.7-1. Efecto del inhibidor NSC-87877 sobre la motilidad de espermatozoides de cerdo. Los espermatozoides se incubaron en medio TCM a 38°C durante 4 horas. Cada hora la motilidad fue estimada objetivamente mediante un sistema CASA. Se representa la media \pm EEM de 3 experimentos realizados independientemente.

3.8. Papel de la PTPN11 en el establecimiento de la reacción acrosómica en los espermatozoides de cerdo

Para estudiar el posible papel de la proteína PTPN11 en el establecimiento de la reacción acrosómica de los espermatozoides de cerdo utilizamos el inhibidor NSC-87877. Los espermatozoides porcinos se incubaron durante 3 horas en un medio capacitante en presencia del ionóforo A23187 1 μ M para inducir la reacción acrosómica, en presencia o ausencia del inhibidor NSC-87877 25 μ M.

Como se muestra en los resultados, cuando los espermatozoides se incubaron en medio capacitante (TCM) el inhibidor no produjo cambios significativos en el número de células que sufrieron reacción acrosómica (alrededor del 18%), comparado con un 20% del control (*Figura 3.8-1*). Tampoco hubo cambios cuando los espermatozoides se incubaron en medio TCM suplementado con el ionóforo A23187 1 μ M en presencia del inhibidor, donde aproximadamente el 45 % de las células experimentaron la reacción acrosómica, comparado con el 50% de las células incubadas en TCM+A23187 sin inhibidor (*Figura 3.8-1*). Estos resultados parecen indicar que la proteína PTPN11 no estaría implicada en la inducción de la reacción acrosómica en los espermatozoides de cerdo.

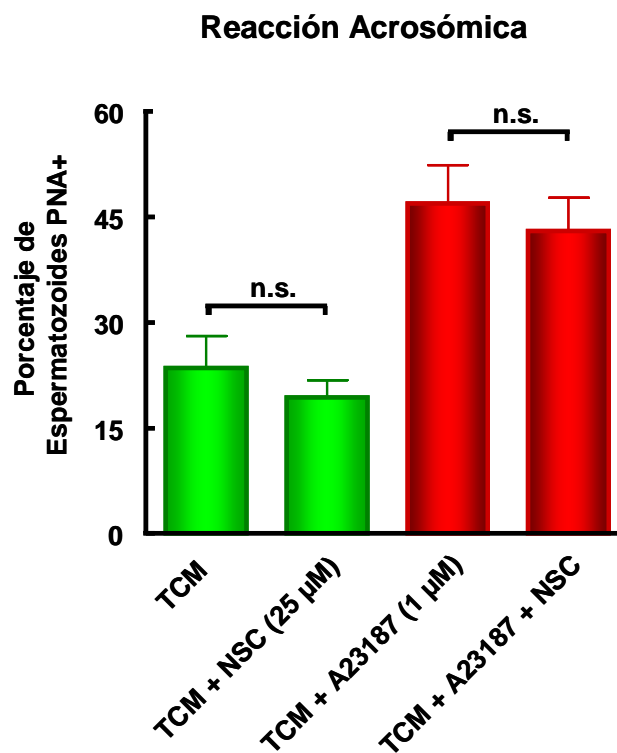


Figura 3.8-1. Efecto del inhibidor NSC-87877 en la regulación de la reacción acrosómica. Los espermatozoides de cerdo se incubaron en medio TCM durante 3 horas a 38°C en presencia o ausencia del ionóforo A23187 1 μ M y/o del inhibidor NSC-87877 25 μ M. Después del tratamiento los espermatozoides se incubaron con las sondas PNA/HEtd y se analizaron por citometría. Se muestra la media \pm EEM de tres experimentos realizados independientemente.

3.9. Papel de la PTPN11 en la regulación de la capacitación de los espermatozoides de cerdo

A continuación estudiamos el papel que podría jugar la fosfatasa PTPN11 en la capacitación espermática. Con este objetivo incubamos los espermatozoides en presencia o ausencia del inhibidor NSC-87877 durante 3 horas en un medio capacitante y no capacitante.

Los resultados indican que al incubar los espermatozoides porcinos en un medio no capacitante (TBM) en presencia del inhibidor NSC-87877, el número de células que sufrieron cambios de membrana asociados con la capacitación no se modifica significativamente (*Figura 3.9-1*). Sin embargo, cuando los espermatozoides se incubaron en el medio TCM suplementado con el inhibidor NSC-87877 el porcentaje de células que sufrieron cambios de membrana asociados con la capacitación se incrementó significativamente, alcanzando el 50% de la población. Este porcentaje fue de sólo el 20% de las células incubadas sin el inhibidor (*Figura 3.9-1*). Estos resultados indican que la proteína PTPN11 estaría implicada en la regulación de los cambios tempranos que ocurren en la membrana durante la capacitación en los espermatozoides de cerdo.

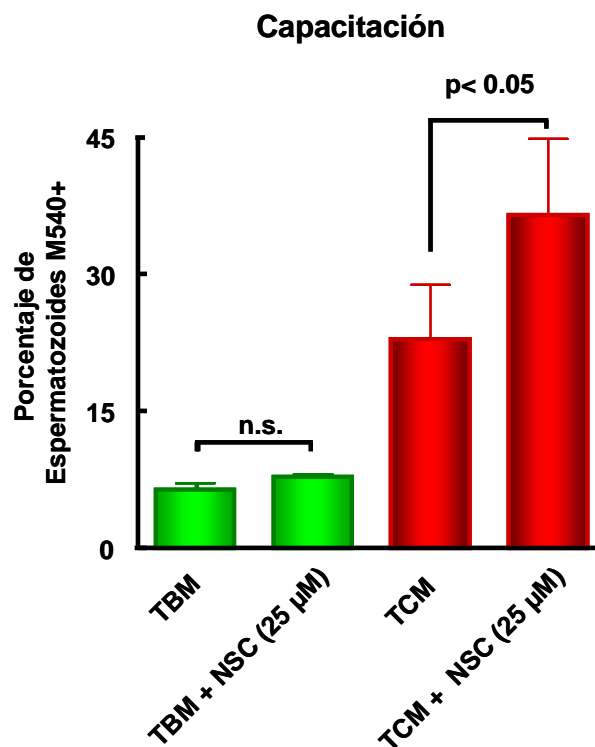


Figura 3.9-1. Efecto del inhibidor NSC-87877 en la capacitación de los espermatozoides de cerdo. Los espermatozoides de cerdo se incubaron en medio TCM durante 3 horas a 38°C en presencia o ausencia del inhibidor NSC-87877 (25 μM). Después del tratamiento se incubaron con las sondas M540/YOPRO-1 y se analizaron por citometría. Se muestra la media ± EEM de tres experimentos independientes.

3.10. Efecto de la inhibición de la PTPN11 en la fosforilación de p32

En la figura *Figura 3.6-1* se ha mostrado que la inhibición de la PTPN11 incrementa la fosforilación de varias proteínas con diversos pesos moleculares en respuesta a la activación celular con 8-Br-cAMP. Sin embargo, la proteína más comúnmente se fosforilada durante la inducción de la capacitación en los espermatozoides de cerdo es la p32. Para caracterizar si esta proteína es también un potencial sustrato de la PTPN11 en los espermatozoides, estudiamos la fosforilación de esta proteína en condiciones capacitantes en presencia del inhibidor NSC-87877 incubando las células a diferentes tiempos hasta 3 horas. En tiempos cortos de incubación (<2h), no observamos un aumento significativo en la fosforilación de la proteína p32 en nuestras condiciones, comparando las muestras control y las incubadas en presencia de NSC-87877. Sin embargo, a partir de la tercera hora de incubación, se produjo un incremento significativo en la fosforilación de p32 en presencia del inhibidor, alcanzando un incremento del 70% sobre las muestras control incubadas también 3 h pero en ausencia del inhibidor (*Figura 3.10-1*). Estos resultados indican claramente que la p32 es un sustrato de la PTPN11 en los espermatozoides de cerdo, y potencian la idea de que esta fosfatasa estaría implicada en la regulación del proceso de la capacitación en los espermatozoides de cerdo, posiblemente regulando la fosforilación de la proteína p32 y, muy probablemente, de otros sustratos.

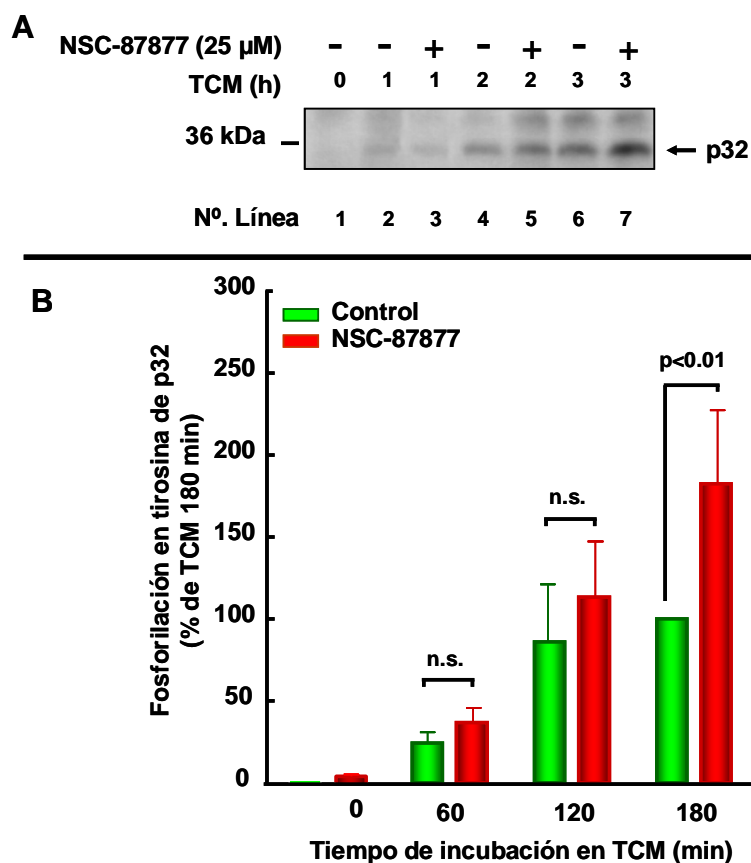


Figura 3.10-1. Efecto del inhibidor NSC-87877 en la fosforilación de la proteína p32. Los espermatozoides de cerdo se incubaron en medio TCM durante diferentes tiempos hasta 3 horas en presencia o ausencia del inhibidor NSC-87877 25 μ M. Los espermatozoides se lisaron y se analizaron mediante *Western blotting* utilizando el anticuerpo anti-fosfotirosina 4G10. **(A)** Se muestra el resultado más representativo de 3 experimentos realizados independientemente. **(B)** Cada valor representa la media \pm EEM de 3 experimentos diferentes representados como el porcentaje de la respuesta máxima (TCM; 180 min incubación).

3.11.Regulación de la fosforilación de GAB1 por la PTPN11 en los espermatozoides de cerdo

En células somáticas la tirosina fosfatasa PTPN11 ejerce la mayor parte de sus funciones a través de la interacción con proteínas adaptadoras, fundamentalmente a través de la proteína GAB1 (Hibi & Hirano, 2000; Liu & Rohrschneider, 2002). Esta regulación se ejerce a dos niveles, por un lado la interacción con la proteína adaptadora puede modular el estado de activación de la fosfatasa y, por el otro, la asociación con la proteína adaptadora también puede modificar la localización subcelular de la fosfatasa, dirigiendo la interacción con los sustratos adecuados. Para determinar si, al igual que ocurre en células somáticas, GAB1 está presente en los espermatozoides y, en caso afirmativo, puede ser regulada por la fosfatasa PTPN11, estudiamos la presencia y el estado de fosforilación de esta proteína adaptadora mediante *Western blotting* con anticuerpos fosfoespecíficos y valoramos el efecto de la inhibición de la fosfatasa PTPN11 en su fosforilación.

Los resultados indican que GAB1 se expresa en los espermatozoides y que, además, esta proteína es fosforilada en el residuo tirosina 627 en los espermatozoides incubados en condiciones capacitantes o activados con 8-Br-cAMP. Además, como se observa en la figura, la fosforilación de GAB1 fue significativamente superior en los espermatozoides incubados en un medio capacitante en presencia de NSC-87877 comparado con las células incubadas sólo en TCM (*Figura 3.11-1; comparar calles 3 y 4*), indicando que la regulación del estado de fosforilación de GAB1 depende de la actividad tirosina quinasa, pero también de la actividad de la fosfatasa PTPN11 y quizá de otras. Unos resultados muy similares fueron obtenidos al estudiar la fosforilación de GAB1 en espermatozoides incubados en presencia de 8-Br-cAMP 1 mM y NSC-87877, comparado con los

espermatozoides incubados sólo con 8-Br-cAMP en medio TBM (*Figura 3.11-1; comparar calles 5 y 6*). Estos resultados indican de nuevo que GAB1 es muy probablemente un sustrato de la PTPN11 en los espermatozoides y, por lo tanto, la regulación del estado de fosforilación de esta proteína adaptadora podría mediar muchas de las funciones en las que la PTPN11 está implicada, al igual que ocurre en las células somáticas.

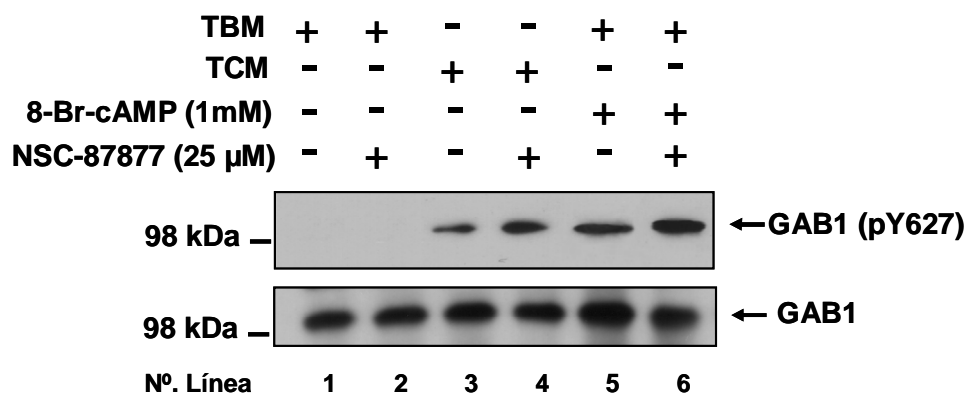


Figura 3.11-1. Efecto del inhibidor NSC-87877 en la fosforilación de la proteína GAB1. Los espermatozoides de cerdo se incubaron en medio TBM (línea 1), TBM con NSC-87877 25 μ M (línea 2), TCM (línea 3), TCM con NSC-87877 25 μ M (línea 4), TBM con 8-Br-cAMP 1 mM (línea 5) y TBM con 8-Br-cAMP más NSC-87877 25 μ M durante 3 horas a 38°C. Los espermatozoides se lisaron y se analizaron mediante *Western blotting* utilizando el anticuerpo fosfoespecífico anti-GAB1 (pY627) (panel superior) y el anticuerpo anti-GAB1 (panel inferior). Se muestra el resultado más representativo de 3 experimentos realizados independientemente.

V. DISCUSIÓN

Los espermatozoides de mamíferos recién eyaculados no poseen capacidad fecundante y deben sufrir una serie de transformaciones de tipo funcional y estructural absolutamente necesarias para desarrollar esta capacidad. Estas transformaciones se denominan globalmente como *capacitación espermática* o, simplemente, *capacitación*. Los primeros esbozos acerca de la capacitación espermática fueron publicados en los años 50 por Austin (1951) y Chang (1951), quienes describieron de forma independiente que el potencial fecundante del espermatozoide de conejo dependía enormemente del tiempo transcurrido entre la inseminación y el momento de la ovulación. Ambos autores indicaron en esos trabajos que era necesario que transcurriera un tiempo de varias horas entre ambos eventos para maximizar el potencial fecundante del espermatozoide, y ambos concluyeron que los espermatozoides de los mamíferos deben residir durante un tiempo en el tracto reproductivo de la hembra antes de adquirir la capacidad de penetrar los ovocitos (Austin, 1951; Chang, 1951). El término capacitación fue acuñado por Austin para referirse a los cambios que el espermatozoide experimenta durante este tiempo (Austin, 1951).

A pesar del tiempo transcurrido, pocos avances se han logrado desde entonces acerca de los eventos moleculares que regulan o inducen este proceso “in vivo”. No obstante, la capacitación puede ser reproducida “in vitro” mediante la incubación de los espermatozoides en medios especialmente diseñados para este fin. A partir del desarrollo de estos medios inductores de la capacitación, se han ido identificando a lo largo de los años una serie de cambios que tienen lugar “in vitro” durante el establecimiento de la capacitación. Así, se ha demostrado que durante este proceso se produce un cambio en la concentración intracelular de iones, fundamentalmente de calcio y bicarbonato; se produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno, hay cambios en la distribución de los fosfolípidos de la membrana, y hay también un marcado incremento en la fosforilación de proteínas, tanto en residuos de serina/treonina como en residuos de tirosina (Breitbart &

Naor, 1999; Gadella & Van Gestel, 2004; Harrison & Gadella, 2005; Gadella *et al.*, 2008).

La fosforilación en tirosina desempeña un importante papel en los espermatozoides durante la regulación de procesos tales como la maduración epididimaria, la motilidad, la capacitación, la hiperactivación, el reconocimiento celular y la reacción acrosómica (Naz & Rajesh, 2004; Tulsiani *et al.*, 2007; Salicioni *et al.*, 2007; de Lamirande & O'Flaherty, 2008), que son esenciales para que ocurra la fertilización. Desde hace una década se han realizado algunos progresos en cuanto a la identificación de las vías de señalización intracelular involucradas en la regulación de la fosforilación en tirosina de diferentes proteínas, que son cruciales en la función espermática (Turner *et al.*, 1999; Luconi *et al.*, 2005; Dube *et al.*, 2005), pero se ha prestado en general poca atención a los componentes moleculares involucrados en la regulación de estas vías. Varias proteínas tirosina quinasa, así como vías de señalización que llevan a su activación, han sido identificadas recientemente utilizando aproximaciones como *Western blotting*, inmunocitoquímica o proteómica (Furuya *et al.*, 1993; Leclerc & Goupil, 2002; Chieffi *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 2004a; Lalancette *et al.*, 2006; Cotton *et al.*, 2006; Baker *et al.*, 2006). Por el contrario se ha prestado menos atención a las proteínas tirosina fosfatasa (PTPs), que son también componentes cruciales en la señalización intracelular basada en la fosforilación en tirosina, dado que pueden potencialmente modular la intensidad y/o duración de la señal e incluso iniciar la cascada de fosforilación (Sun & Tonks, 1994; Alonso *et al.*, 2004).

Con el afán de clarificar la identidad y el papel que las PTPs podrían jugar en los espermatozoides de varias especies de mamíferos hemos desarrollado el presente estudio, donde hemos utilizado 35 anticuerpos comerciales diferentes que reconocen 23 de las proteínas fosfatasa de la clase I más ampliamente distribuidas (Alonso *et al.*, 2004). Los resultados

obtenidos muestran que cuatro proteínas tirosina fosfatasa (PTPRB, PTPN11, DUSP3, y DUSP4) están presentes en los espermatozoides de cerdo y de caballo, mientras que sólo PTPN11, DUSP3, y DUSP4 están presentes en los espermatozoides de perro (PTPRB no fue detectada). Este es el primer estudio que demuestra que las proteínas tirosina fosfatasa enunciadas anteriormente están presentes en los espermatozoides de mamíferos. Existen pocos estudios previos que identifiquen estas u otras PTPs en espermatozoides maduros de mamíferos. De hecho, de las proteínas fosfatasa de clase I basadas en cisteína, sólo PTPN1 (PTP1B), que se incluye dentro de la categoría de PTPs clásicas no receptores (NRPTPs), ha sido detectada previamente en lisados de espermatozoides de rata (Seligman *et al.*, 2004), ratón y hombre (Tomes *et al.*, 2004). Además, la proteína PTEN, una proteína fosfatasa de clase I basada en cisteína que defosforila lípidos y residuos fosforilados en tirosina, ha sido previamente identificada en nuestro laboratorio en lisados de espermatozoides de cerdo (Aparicio *et al.*, 2007a). Finalmente, usando RT-PCR y PCR cuantitativa, Teng y colaboradores han identificado recientemente en espermatozoides de humano cuatro variantes de procesamiento alternativo de la DSP CDC25B, que pertenece a la clase III de PTPs basadas en cisteína y que puede defosforilar residuos de fosfotirosina y fosfoserina (Teng *et al.*, 2007). No hay estudios acerca de la expresión y papel de las PTPs basadas en cisteína de clase II y PTPs basadas en aspartato en células espermáticas.

En contraste con estudios previos en los que se ha detectado la PTPN1 en espermatozoides murinos y humanos (Tomes *et al.*, 2004; Seligman *et al.*, 2004), en el presente estudio mostramos que esta fosfatasa no está presente en espermatozoides de cerdo, de caballo, o de perro. Estos resultados aparentemente contradictorios podrían estar reflejando la incapacidad de nuestros anticuerpos para detectar esta proteína en las especies usadas en este estudio. Sin embargo, varios resultados indican que probablemente este no es el caso. En primer lugar, todos los anticuerpos que muestran un resultado

negativo en este estudio (anticuerpo anti-PTPN1 y 15 anticuerpos adicionales) reconocen la banda específica en los controles positivos, indicando que el anticuerpo funciona correctamente en nuestras condiciones experimentales. En segundo lugar, los anticuerpos anti-PTPRB y anti-PTPN1 muestran inmunoreactividad con proteínas que no provienen ni de humanos ni de roedores, como por ejemplo proteínas fosfatasa de hígado y de cerebro de cerdo (datos no mostrados). Por lo tanto, los anticuerpos reconocen un epítipo en las proteínas que está bien conservado entre las diferentes especies de mamíferos, incluyendo las utilizadas para desarrollar este estudio. En tercer lugar, el anticuerpo anti-PTPN1 reconoce la proteína diana en otro estudio realizado en paralelo en nuestro laboratorio con espermatozoides humanos (González-Fernández L. et al., datos no publicados), confirmando que PTPN1 está presente en los espermatozoides de esta especie y que el anticuerpo funciona en nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, los resultados descritos parecen indicar que la presencia de diferentes proteínas tirosina fosfatasa en espermatozoides de mamíferos es variable dependiendo de la especie (ausencia de PTPRB en perro o ausencia de PTPN1 en cerdo, caballo y perro). El significado funcional de este resultado es aún desconocido pero podría reflejar la diferente regulación basada en la señalización de la fosforilación en tirosina en los espermatozoides de mamíferos de diferentes especies. Esta hipótesis está apoyada en el hecho de que las PTPs normalmente muestran una alta especificidad de sustrato y generalmente no tienen un papel redundante en las células (Alonso *et al.*, 2004).

Los diferentes perfiles de las PTPs identificadas en los espermatozoides podrían reflejar la expresión diferencial de estas enzimas durante las diferentes fases de la espermatogénesis. Estudios previos realizados en modelos murinos han descrito un número de transcritos de PTPs durante el desarrollo de la célula germinal y atribuyen un papel importante a estas enzimas en la progresión de la espermatogénesis. Así, un primer estudio

realizado por Kaneko y colaboradores demuestra la expresión de cinco PTPs en las células germinales masculinas (PTPRD, PTPRE, PTPN5[STEP], PTPN1, y PTPN2 [TCPTP]) (Kaneko *et al.*, 1993). De todas ellas sólo PTPN1 ha sido descrita en espermatozoides eyaculados de ratón (Tomes *et al.*, 2004), mientras que no hay información disponible acerca de las demás. En un estudio mucho más ambicioso, usando microarrays de ARN, Shima y colaboradores analizaron la expresión de aproximadamente 36000 transcritos a través de diferentes fases de la espermatogénesis (Shima *et al.*, 2004). Estos autores identificaron varias PTPs y DSPs que están reguladas cuantitativamente durante el desarrollo de las células germinales, demostrando por lo tanto que el perfil de los transcritos de las PTPs es variable durante las fases de la espermatogénesis (Shima *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que las PTPs y DSPs tendrían un papel importante en la maduración y progresión de la célula germinal masculina. De hecho, una de estas proteínas fosfatasa, la proteína DUSP22, parece que está expresada exclusivamente en las células germinales masculinas, sugiriendo un papel específico durante la espermatogénesis (Nakamura *et al.*, 1999). Con respecto a los últimos estadios de maduración, que podrían corresponderse con el perfil de los espermatozoides eyaculados, se ha descrito la expresión de DUSP3, DUSP13 y PTPN4 en espermátidas redondas (Shima *et al.*, 2004). En general los resultados obtenidos en células germinales masculinas, especialmente en las últimas fases de la maduración, indican que es factible que fosfatasas adicionales puedan también expresarse en los espermatozoides eyaculados de mamíferos.

La distribución subcelular de las PTPs y DSPs identificadas es muy variable, hallazgo que sugiere que estas enzimas probablemente desempeñan un papel específico en los espermatozoides. La proteína PTPRB fue localizada (en cerdo y en caballo) en la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide, principalmente a lo largo de la región acrosomal, y a lo largo de toda la cola (*Figura 1.2-1*). Este resultado era esperado ya que

PTPRB está descrita como una fosfatasa de tipo receptor transmembrana (Alonso *et al.*, 2004). Las otras tres fosfatasas identificadas están diferencialmente distribuidas dentro de la célula espermática pero no parecen estar asociadas con la membrana plasmática, al menos en los espermatozoides no estimulados usados en este estudio. La proteína PTPN11, una NRPTP citosólica (Alonso *et al.*, 2004), fue localizada principalmente en la cabeza, mayoritariamente en la región postacrosómica, y en la pieza intermedia de la cola (*Figura 1.3-1*). Por su parte, DUSP4 está principalmente distribuida a lo largo de la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal de la cola, aunque está difusamente distribuida por todo el espermatozoide (*Figura 1.4-1*). Sin embargo, en los espermatozoides de las tres especies encontramos poca o ninguna inmunoreactividad de esta fosfatasa en el núcleo. Este fue un resultado inesperado, ya que en células somáticas DUSP4 está localizada en el núcleo y, en menor proporción, distribuida de forma difusa por todo el citoplasma (Sloss *et al.*, 2005; Pulido & Hooft van Huijsduijnen, 2008). Este resultado probablemente indica que DUSP4 tiene una distribución diferente en las células germinales comparadas con células somáticas, que podría ser importante para definir su función en el espermatozoide (Sloss *et al.*, 2005). Finalmente, DUSP3 está localizada en la pieza intermedia del flagelo, mientras que su presencia en el acrosoma es variable, puesto que es detectada en esta región en un alto porcentaje de células pero no en todas ellas (*Figura 1.5-1*).

Una vez descrita la distribución subcelular de las fosfatasas identificadas en los espermatozoides, el siguiente paso consistió en determinar la regulación funcional de estas enzimas en este tipo celular. Las preguntas que nos planteamos fueron dos: ¿en qué condiciones se activan las PTPs en los espermatozoides? y ¿qué funciones desempeñan?. Para contestar a la primera pregunta fue determinante establecer un protocolo de ensayo enzimático de la actividad proteína tirosina fosfatasa. El protocolo diseñado está basado en la hidrólisis del fluoróforo DIFMUP y ha sido previamente utilizado en células

somáticas por distintos grupos de investigación (Chen *et al.*, 2006). La estandarización de este protocolo consiste en si mismo en un avance significativo puesto que hasta el momento los dos únicos estudios previos que han cuantificado la actividad PTP se basaban en aproximaciones colorimétricas (Devi *et al.*, 1999), que son poco sensibles (Montalibet *et al.*, 2005); o bien se basaban en la detección de isótopos radioactivos (Tomes *et al.*, 2004), que tienen una gran sensibilidad (Montalibet *et al.*, 2005) pero cuyo manejo es mucho más complicado por cuestiones obvias.

Al utilizar el protocolo basado en la hidrólisis del DIFMUP, encontramos que la actividad PTP en los espermatozoides es alta en condiciones basales, alcanzando unos 0.26 picomol de fosfato/mg proteína/min. Este valor es equiparable al descrito por otro grupo en espermatozoides humanos eyaculados (Devi *et al.*, 1999; Tomes *et al.*, 2004). Si consideramos que la ganancia de los sistemas de señalización basados en la fosforilación en tirosina debe ser muy grande (Hunter, 1989a; Hunter, 1989b; Hunter, 2009), es razonable que la fosforilación de los residuos de tirosina sea habitualmente baja para el común de las proteínas en casi todos los tipos celulares. Los espermatozoides no son una excepción y el nivel de fosforilación en tirosina es muy bajo en células no estimuladas (Luconi *et al.*, 1995; Leclerc *et al.*, 1996; Leclerc *et al.*, 1997; Tomes *et al.*, 2004; Harayama *et al.*, 2004b; Bravo *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2005) probablemente porque la actividad tirosina fosfatasa es muy alta y/o el nivel de actividad tirosina quinasa se mantiene reducido (Luconi *et al.*, 1995; Tomes *et al.*, 2004).

Al incubar los espermatozoides en condiciones capacitantes la actividad PTP se eleva en más del 75% sobre el nivel basal, lo que podría considerarse un resultado paradójico puesto que durante la capacitación se produce un marcado incremento en los niveles de fosforilación en tirosina en los espermatozoides de todas las especies de mamíferos investigadas hasta el momento (Harayama *et al.*, 2000; Urner & Sakkas, 2003; Harayama *et al.*,

2004a; Harayama *et al.*, 2004b). Sin embargo, en varios estudios previos (Tomes *et al.*, 2004; Harayama *et al.*, 2004b; Bravo *et al.*, 2005) y también en el presente trabajo (*Figura 2.3-1*), cuando se induce la capacitación espermática en presencia de inhibidores de la actividad PTP se detecta un marcado incremento en la fosforilación en tirosina de múltiples proteínas, indicando que la capacitación está mediada por un incremento concomitante tanto de la actividad PTP como de la actividad tirosina quinasa. En otras palabras, nuestros resultados y otros resultados previos (Tomes *et al.*, 2004; Harayama *et al.*, 2004b; Bravo *et al.*, 2005) parecen indicar que un incremento de actividad de ambos componentes de las cascadas de señalización, es decir quinasas y fosfatasas, es necesario para el establecimiento adecuado de los cambios de tipo capacitante en los espermatozoides. El panorama parece ser contrario durante la reacción acrosómica, donde se produce un acusado descenso en la fosforilación en tirosina de la mayor parte de sustratos (Bravo *et al.*, 2005).

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral también hemos investigado las cascadas de señalización intracelular que se activan en los espermatozoides para regular la actividad de las PTPs. Para ello incubamos los espermatozoides en presencia de 8-Br-cAMP y TPA, que respectivamente activan la vía cAMP/PKA y la vía DAG/PKC. De forma general, la actividad PTP en presencia del análogo permeable del cAMP no se modificó con respecto al control (*Figura 2.1-2, panel A*). No obstante, con este tratamiento se observó a lo largo del tiempo una oscilación en la actividad PTP en relación al control (*Figura 2.1-2, panel B*), que podría ser debida a mecanismos de retroalimentación (positiva y negativa) implicados en el mantenimiento del nivel de actividad PTP en un rango óptimo para la célula. Por otro lado, la actividad PTP se ve inhibida significativamente por la activación selectiva de la PKC. Este hecho podría indicar que los mecanismos intracelulares en los que mayoritariamente está implicada la PKC, se acompañarían por un descenso concomitante de la actividad PTP,

por ejemplo durante la reacción acrosómica (Baldi *et al.*, 2000b; Baldi *et al.*, 2002; Urner & Sakkas, 2003; Harayama & Miyake, 2006; de Lamirande & O'Flaherty, 2008). En este sentido se podría especular que el descenso de fosforilación en tirosina que se detecta en los espermatozoides mantenidos en condiciones que inducen la reacción acrosómica, está acompañado por un descenso concomitante de la actividad PTP que podría estar mediado por la activación de la PKC.

Uno de los hallazgos más interesantes en relación a la regulación de la actividad PTP en los espermatozoides, es que este parámetro está inhibido durante el almacenamiento de los espermatozoides, tanto durante la criopreservación como durante la refrigeración a 17°C (cerdo) o 5°C (caballo, no mostrado) en *diluyentes* comerciales. El origen de esta pérdida de actividad es aparentemente distinto en las dos situaciones. En el semen congelado/descongelado la caída de la actividad PTP en la población (que es muy acusada comparada con el semen fresco no congelado), se produce de forma paralela a un descenso de la viabilidad espermática similar al que ha sido descrito previamente (Medeiros *et al.*, 2002). Por el contrario, en el semen refrigerado también se produce un acusado descenso de la actividad a lo largo del tiempo, que no está originado por una pérdida de la viabilidad espermática puesto que las células viables constituyen en torno al 75-80% de la población durante todo el periodo investigado (*Figura 2.5-1*). La repercusión funcional de esta pérdida de actividad PTP durante el almacenamiento es desconocida por el momento. Aunque no existen estudios previos en los que se haya investigado la actividad PTP como un parámetro susceptible de estar alterado durante la preservación de los espermatozoides, otros muchos factores han sido analizados incluyendo la motilidad, la actividad mitocondrial, la apoptosis o la fosforilación en tirosina, entre otros (Watson, 2000; Bailey *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2002; Huo *et al.*, 2002; Dube *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2007; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2008). No disponemos de datos precisos acerca de si el descenso de la actividad PTP es

causa o consecuencia de algunos de esos parámetros. Sin embargo, al considerar que la motilidad es muy dependiente de la actividad PTP y teniendo en cuenta que el descenso de ambos se produce de forma simultánea (Huo *et al.*, 2002; Dube *et al.*, 2004) puede especularse que podrían estar relacionados. No obstante, es evidente que se necesitan más experimentos para establecer una relación directa entre ambos eventos, si es que efectivamente se produce.

Por otro lado, el mecanismo molecular implicado en la pérdida de actividad PTP durante la preservación del espermatozoide también ha sido investigado (*Figura 2.6-1*). Previamente ha sido descrito que muchos de los cambios que se producen en el espermatozoide durante la criopreservación o la refrigeración son consecuencia de un incremento desmesurado de las especies reactivas de oxígeno (EROs) por encima de la capacidad tamponadora o *scavenger* de estas células. Es decir, se produce una situación de estrés oxidativo (de Lamirande *et al.*, 1997a; de Lamirande & O'Flaherty, 2008). Una de las dianas intracelulares típicas de las EROs son las proteínas tirosina fosfatasa puesto que tienen en el sitio activo del dominio catalítico un residuo muy susceptible de oxidación lo que ocasiona una pérdida de la actividad enzimática que puede ser irreversible (Sun & Tonks, 1994; Alonso *et al.*, 2004; Tonks, 2005). Con estos antecedentes, nuestra hipótesis inicial fue que el estrés oxidativo podría estar implicado en la pérdida de actividad PTP durante la criopreservación y/o refrigeración. Aparentemente esta hipótesis podría ser cierta, desde el momento en que la inducción de estrés oxidativo con H₂O₂ causa un acusado descenso en la actividad PTP, que es dependiente de la concentración. Este efecto se ve acompañado, además por un marcado incremento en la fosforilación en tirosina de diferentes proteínas (no mostrado). Además, la reducción de la actividad PTP dependiente del estrés oxidativo pudo ser parcialmente revertida empleando varios antioxidantes. El compuesto que mayor efecto protector demostró fue la cinantánina, un polifenol derivado del laurel (Lopez *et al.*, 2008), con

propiedades antioxidantes (Bouaziz *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2008; Fernandez-Sanchez *et al.*, 2009). La valoración del efecto protector de compuestos antioxidantes y *scavengers* de radicales libres durante la crioreservación y la refrigeración espermática ha sido ensayada previamente (Pena *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2005; Aurich, 2008), aunque hasta el momento no se ha investigado el papel que podrían desarrollar las PTPs en los efectos investigados. No obstante, aunque no se conocen las dianas moleculares de los antioxidantes, el empleo de estos agentes ha demostrado mejorar la calidad espermática en aspectos como la motilidad, la permeabilidad de membrana o la estabilidad mitocondrial (Pena *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2005; Aurich, 2008). Todos estos efectos positivos podrían estar mediados por el mantenimiento de la actividad PTP en parámetros celulares adecuados.

La preincubación con pervanadato de espermatozoides de cerdo induce un incremento en el patrón de fosforilación en tirosina de varias bandas de peso molecular entre 50 a 180 kDa, aproximadamente. Sólo podemos especular acerca de la identidad de esas proteínas. Sin embargo, entre los pocos sustratos de tirosina quinasa que han sido descritos hasta el momento en espermatozoides de mamíferos, uno de los mejor caracterizados es la proteína p32, que es fosforilada durante la incubación en condiciones capacitantes en espermatozoides de cerdo (Harayama *et al.*, 2004b; Dube *et al.*, 2005; Harayama & Nakamura, 2008). Usando aproximaciones de proteómica, Dube y colaboradores han identificado esta proteína como una proteína de unión a la proacrosina, que estaría implicada en la maduración de la proacrosina a acrosina y que, probablemente, tiene un papel importante en la capacitación espermática y en la reacción acrosómica en espermatozoides porcinos (Dube *et al.*, 2005). Estos autores observaron que la p32 está localizada por todo el acrosoma en células capacitadas y no capacitadas y proponen que la distribución de la p32 en los compartimentos del acrosoma (soluble, membrana y matriz) puede ser regulado por el estado de

fosforilación. En el presente estudio, la fosforilación en tirosina de la p32 es incrementada por la inhibición de PTPs sensibles a pervanadato durante la capacitación, mientras que las PTPs sensibles a ortovanadato probablemente también estén involucradas (Harayama *et al.*, 2004b; Harayama & Nakamura, 2008). Basándonos en la distribución subcelular de la p32, tres fosfatasas (PTPRB, PTPN11 y DUSP3) son candidatas a regular esta proteína en espermatozoides de cerdo, ya que estas fosfatasas co-localizan en la cabeza espermática donde la p32 es probablemente fosforilada en tirosina (Tardif *et al.*, 2001). La distribución difusa con la que más predominantemente se ha descrito a la p32 dentro del acrosoma (Tardif *et al.*, 2001; Dube *et al.*, 2005) apunta a DUSP3 o PTPN11 como las fosfatasas más probablemente implicadas en la regulación de la p32. La identificación de las fosfatasas específicas de p32 ha sido abordada en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, como se verá más adelante.

Con respecto a la motilidad espermática, nuestro estudio claramente muestra que la inhibición de la actividad PTP causa un descenso rápido, completo y reversible de la motilidad de los espermatozoides de cerdo, caballo y perro. Parte de estos resultados coinciden con estudios previos que muestran que el bloqueo de la actividad PTP con inhibidores selectivos reduce la motilidad de los espermatozoides de hámster (Devi *et al.*, 1999), de hombre (Tomes *et al.*, 2004) y de ratón (Tomes *et al.*, 2004). Basándonos en su localización subcelular, las dos fosfatasas que más probablemente estarían involucradas en la regulación de la motilidad son PTPRB y DUSP4, ambas localizadas predominantemente en la cola del espermatozoide. En este sentido, Devi y colaboradores han descrito en un estudio previo que la actividad de las PTPs sensibles a pervanadato en la membrana de los espermatozoides de hámster está probablemente involucrada en la regulación de la motilidad (Devi *et al.*, 1999). Estos hallazgos previos, combinados con los datos del presente estudio mostrando que la PTPRB está asociada a la membrana plasmática, permite especular que PTPRB podría estar

involucrada en la regulación de la motilidad en los espermatozoides de mamíferos. Sin embargo, dado que en espermatozoides de perro PTPRB está ausente pero la motilidad está también afectada por inhibidores específicos de las PTPs, parece evidente que una o más PTPs adicionales estarían involucradas en la regulación de la motilidad espermática.

Basándonos en su distribución subcelular, otra fosfatasa que podría estar involucrada en la regulación de la motilidad es la proteína DUSP4, una proteína fosfatasa de especificidad dual encuadrada en el grupo de las proteínas fosfatasa de MAP quinasas que, en células somáticas, se localiza tanto en el citosol como en el núcleo y cuya función es inactivar las proteínas MAPK quinasas (ERK y JNK) (Sloss *et al.*, 2005; Pulido & Hooft van Huijsduijnen, 2008). Debido a que en los espermatozoides de mamíferos la JNK probablemente no está presente (Almog *et al.*, 2008), los sustratos más probables de DUSP4 en estas células son las proteínas ERK quinasas. Un estudio reciente de Almog y colaboradores apoya esta hipótesis, ya que muestra que las ERK quinasas están distribuidas por toda la cola en los espermatozoides humanos, con un patrón de distribución idéntico al descrito para DUSP4 en el presente estudio (Almog *et al.*, 2008). Es más, en este estudio se describe que la incubación de los espermatozoides humanos con ortovanadato incrementa la fosforilación y la activación de MAPK3 (ERK1) y MAPK1 (ERK2), indicando que las proteínas ERK quinasas están reguladas por proteínas tirosina fosfatasa en los espermatozoides humanos (Almog *et al.*, 2008). Por lo tanto, parece plausible que las ERKs sean sustratos de DUSP4 en los espermatozoides de mamíferos. Combinando resultados de trabajos previos (Sloss *et al.*, 2005; Almog *et al.*, 2008) con datos del presente estudio, se puede especular que la inhibición de DUSP4 por pervanadato u ortovanadato debe estar acompañada por un incremento en la fosforilación y activación de ERK (Almog *et al.*, 2008) y, consecuentemente, las ERKs mediarían en la inhibición de la motilidad inducida por inhibidores de PTPs (Devi *et al.*, 1999; Tomes *et al.*, 2004).

Aunque parece que las ERK quinasas están involucradas en la regulación de la motilidad espermática, su papel es controvertido. Un papel positivo de las ERK ha sido sugerido en espermatozoides de gallo (Ashizawa *et al.*, 1997), de hombre (Almog *et al.*, 2008) y de ratón (Lu *et al.*, 1999), mientras que otro estudio desarrollado por Weidinger (2005) muestra que las ERK quinasas estarían implicadas en la inhibición de la motilidad en los espermatozoides de hombre. En nuestro modelo, la estimulación de ERK (por inhibición de DUSP4) puede correlacionarse con la disminución de la motilidad, que es contrario a algunos modelos previamente publicados (Lu *et al.*, 1999; Almog *et al.*, 2008) pero coincide con otro (Weidinger *et al.*, 2005). Es evidente que son necesarios estudios adicionales para clarificar el papel que las ERK quinasas y la fosfatasa DUSP4 podrían estar jugando en la regulación de la motilidad de los espermatozoides de mamíferos.

Una vez concluido el estudio de la identificación, localización y regulación general de las PTPs, iniciamos el estudio de las funciones de las fosfatasas identificadas, empezando por la PTPN11. Nuestros resultados indican claramente que ésta fosfatasa está presente en los espermatozoides de mamíferos siendo, a nuestro entender, la primera descripción de esta fosfatasa en este tipo celular. En la segunda parte de nuestra Tesis Doctoral estudiamos su regulación y sus posibles funciones biológicas en los espermatozoides.

La activación de la PTPN11 se produce mediante la interacción específica de los dominios SH2 con residuos de tirosina fosforilados insertos en una secuencia específica, o bien mediante la interacción intramolecular de los residuos de tirosina 542 y 580 con esos mismos dominios SH2 (Neel *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2008). Por tanto, aunque inicialmente surgió cierta controversia, hoy parece aceptado que existe una relación directa entre el estado de fosforilación de esos residuos de tirosina y el estado de actividad de la fosfatasa (Neel *et al.*, 2003). En células somáticas la activación de la

PTPN11 se produce típicamente en respuesta a factores de crecimiento. Como es bien sabido, el mecanismo de actuación de los factores de crecimiento implica la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio intracelular de sus receptores correspondientes, lo que, además de estimular la actividad tirosina quinasa, produce sitios de unión para otros componentes moleculares que inician diferentes vías de señalización (Hunter, 1989b; Neel *et al.*, 2003; Hunter, 2009). Entre dichos componentes moleculares es habitual el concurso de proteínas adaptadoras (Feng, 1999; Neel *et al.*, 2003). En este sentido, en células somáticas el mecanismo de la activación de la PTPN11 depende de factores de crecimiento (y también otros agentes) parece estar mediado por la fosforilación de GAB1, una proteína adaptadora con multitud de tirosinas susceptibles de ser fosforiladas de forma regulada (Liu & Rohrschneider, 2002). No se descarta, sin embargo, que la activación de la PTPN11 se pueda producir por la unión directa al receptor o mediante el concurso de otras proteínas adaptadoras como SPROUTY (Jarvis *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2008).

La fosforilación en tirosina de PTPN11 en los residuos 542 y 580 se estimula en respuesta a una incubación en condiciones capacitantes (*Figura 3.1-1*). Esta fosforilación es mimetizada con la incubación de los espermatozoides en presencia de 8-Br-cAMP, en un efecto que es dependiente del tiempo y de la concentración (*Figura 3.2-1* y *Figura 3.2-2*). Por el contrario, la incubación de los espermatozoides en condiciones que inducen la reacción acrosómica parece que inhibe la fosforilación de PTPN11 (*Figura 3.1-1*). En este sentido, el TPA, que como se ha indicado anteriormente, es un compuesto que selectivamente estimula las PKCs, parece no modificar el estado de fosforilación de la PTPN11. En su conjunto, los resultados expuestos indican que la fosfatasa PTPN11 podría estar jugando un importante papel durante el establecimiento de la capacitación. Sin embargo, este papel parece menos importante durante la reacción

acrosómica puesto que el ionóforo y la activación de la PKC no tienen efectos en la activación de la PTPN11.

El papel que la proteína PTPN11 desempeña durante la capacitación también se investigó a nivel de actividad enzimática. Así, la actividad obtenida durante la incubación de los espermatozoides en condiciones capacitantes fue de aproximadamente el doble de la actividad detectada en los espermatozoides no capacitados. Además, la incubación de los espermatozoides en presencia de 8-Br-cAMP causó un incremento en la actividad de la PTPN11 de aproximadamente 2,5 veces el nivel basal. Este resultado indica que, al igual que ocurre en células somáticas, la fosforilación en tirosina en los residuos 542 y 580 y la actividad son fenómenos que discurren en paralelo, y refuerzan la idea de que la PTPN11 podría jugar un importante papel en la regulación de la capacitación. Por otra parte, aunque el nivel de actividad de las proteínas tirosina fosfatasa suele ser elevado en condiciones basales o no estimuladas, tanto en células somáticas (Zhao *et al.*, 1996; Cuncic *et al.*, 1999) como en espermatozoides (Tomes *et al.*, 2004) (Figura 2.1-1), nuestros resultados indican que la proteína PTPN11 tiene un nivel de actividad bajo en los espermatozoides. Este hecho también ha sido descrito previamente en células somáticas (Chen *et al.*, 2006), lo que podría indicar que la PTPN11 tiene un mecanismo de regulación diferente del resto de PTPs.

Para estudiar el posible papel fisiológico que la PTPN11 podría estar jugando en los espermatozoides de mamíferos utilizamos el inhibidor NSC-87877, un compuesto que ha sido desarrollado recientemente como un inhibidor potente y específico de esta clase de fosfatasas (Chen *et al.*, 2006). La incubación de los espermatozoides en presencia de este inhibidor a una concentración 25 μ M durante 3 horas, reduce muy significativamente la actividad específica de la PTPN11 en espermatozoides control, en espermatozoides incubados en condiciones capacitantes, o en

espermatozoides activados con 8-Br-cAMP (*Figura 3.5-1*). El efecto descrito se consiguió sin que el inhibidor, utilizado en las mismas condiciones, mostrase ningún efecto en la viabilidad de los espermatozoides de cerdo (*Figura 3.4-1*). Por lo tanto, este compuesto es de utilidad para investigar el posible papel biológico de la PTPN11 en los espermatozoides y lo utilizamos, por lo tanto, para estudiar la implicación de esta enzima en la regulación de diversas funciones del espermatozoide, como la fosforilación en tirosina, la motilidad y la adquisición de las capacidades fecundantes que, como es bien sabido, dependen del establecimiento de la capacitación y la reacción acrosómica.

El primer aspecto que nos interesó investigar fue el papel que la PTPN11 podría estar jugando en la regulación de la fosforilación en tirosina de distintas proteínas, lo que nos podría indicar los potenciales sustratos de esta fosfatasa en los espermatozoides. La incubación de los espermatozoides de cerdo con 8-Br-cAMP en presencia del inhibidor específico de la PTPN11 indica que al menos seis proteínas incrementan su estado de fosforilación en tirosina cuando la fosfatasa está inhibida (*Figura 3.6-1*). De momento sólo podemos especular acerca de la identidad de estos potenciales sustratos de la PTPN11 cuyos pesos moleculares oscilan entre 86 y 240 kDa y cuya dependencia de la fosfatasa para mantener su nivel de fosforilación es variable, oscilando entre apenas un 20% de incremento en una proteína de 123 kDa, hasta cerca del 100% en otras proteínas (*e.j. p240; Figura 3.6-1*).

Previamente hemos indicado que existe una relación inequívoca entre la actividad tirosina fosfatasa y la motilidad espermática. Esta relación, ha sido también evidenciada por otros autores (Devi *et al.*, 1999; Tomes *et al.*, 2004). Con estos antecedentes decidimos estudiar la posible relación entre la proteína PTPN11 y la motilidad mediante el uso del inhibidor específico NSC-87877. Los resultados obtenidos indican que esta fosfatasa no estaría implicada en la regulación de la motilidad puesto que la incubación en

presencia del inhibidor (25 μ M, 3 horas) en medio capacitante no modifica ninguno de los parámetros de motilidad evaluada. Conclusiones similares pueden extraerse con respecto al establecimiento de la reacción acrosómica, puesto que este mismo inhibidor tampoco modifica el porcentaje de células que experimentan este proceso. Este último resultado, sin embargo, era esperable desde el momento en que ni el ionóforo ni el TPA modifican el estado de fosforilación de la PTPN11 (*Figura 3.1-1*).

El siguiente aspecto de la fisiología espermática que estudiamos en relación a la proteína PTPN11 fue su implicación en el establecimiento de la capacitación y algunos cambios asociados a ella. Como es bien sabido, la incubación de los espermatozoides de cerdo en medios de incubación ricos en calcio y bicarbonato (TCM) causa un incremento en la fosforilación en tirosina (Tardif *et al.*, 2001; Tardif *et al.*, 2003), siendo la desorganización lipídica de la membrana plasmática uno de los eventos más tempranos de este proceso. La incubación de los espermatozoides en presencia de NSC-87877 en medio TCM causa un incremento significativo en el porcentaje de células que muestran cambios de membrana asociados a la capacitación estimado por la asociación con merocianina (*Figura 3.9-1*). Estos resultados parecen indicar que la proteína PTPN11 juega un papel negativo en la regulación de la capacitación espermática.

Uno de los eventos asociados a la capacitación en los espermatozoides es el incremento en la fosforilación en tirosina de numerosas proteínas, que sería dependiente de la activación de tirosinas quinasas por una vía de señalización dependiente de la proteína PKA (Harayama *et al.*, 2005). Nuestros resultados parecen indicar que podría estar revirtiendo estos procesos de fosforilación, modulando de este modo los cambios de tipo capacitante. Por el momento desconocemos cuáles son los potenciales sustratos de la PTPN11 que contrarrestan la capacitación. No obstante, una de las proteínas que mas comúnmente se fosforila en espermatozoides de cerdo durante el proceso de

capacitación es la p32 (Bravo *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que la incubación de los espermatozoides con el inhibidor específico de la PTPN11 se traduce en un incremento significativo y dependiente del tiempo del estado de fosforilación de la p32 parece evidente que esta proteína es un sustrato de la PTPN11 en espermatozoides de cerdo. No obstante, parece un poco arriesgado afirmar que el efecto que pueda estar jugando esta proteína en la capacitación dependa exclusivamente de su regulación a través de p32. Ya se ha comentado que 6 proteínas, además de la p32 son potenciales sustratos de la PTPN11 en los espermatozoides

Como se ha indicado previamente, la PTPN11 depende para su activación del estado de fosforilación en tirosina de los residuos 542 y 580 situados en su extremo C-terminal y también de su interacción con otras proteínas fosforilas en tirosina. Actualmente existe muy poca información disponible en los espermatozoides de proteínas adaptadoras que participan en la activación y modulación de la respuesta de las vías de señalización basadas en fosforilación en tirosina. La proteína adaptadora GAB1 está típicamente relacionada con la función de la fosfatasa PTPN11 en células somáticas (Chan *et al.*, 2008). Por todo esto decidimos investigar, (1) si esta proteína está presente en espermatozoides y (2) si está relacionada con la actividad de la proteína fosfatasa PTPN11. Nuestros resultados indican inequívocamente que GAB1 está presente en espermatozoides de cerdo, aunque aún no hemos estudiado su distribución subcelular. Según se desprende de los resultados obtenidos con el inhibidor NSC-87877 esta proteína estaría relacionada con la función de la PTPN11, al menos en condiciones donde se produce un incremento de la concentración intracelular de AMPc, puesto que el 8-Br-cAMP induce un incremento significativo en el nivel de fosforilación de GAB1. Estos resultados son preliminares y no sabemos con detalle los mecanismos moleculares ni el grado de implicación de esta proteína adaptadora en la regulación de la actividad y función de la PTPN11 en los espermatozoides de cerdo, que podría ser muy elevada al igual que ocurre en

células somáticas (Chan *et al.*, 2008). Tampoco es descartable que otras proteínas adaptadoras pudiesen estar realizando un efecto similar en los espermatozoides, como por ejemplo la proteína SPROUTY (Jarvis *et al.*, 2006) o de otras proteínas.

En resumen, en esta Tesis doctoral hemos identificado distintas PTPs y DSPs en espermatozoides de cerdo, caballo, y perro y hemos demostrado que están involucradas en la regulación de la motilidad, la fosforilación en tirosina de diversos sustratos, tanto en condiciones capacitantes como no capacitantes. A continuación hemos estudiado específicamente la fosfatasa PTPN11, describiendo su implicación en el establecimiento de la capacitación. En futuros trabajos nos centraremos en el papel fisiológico que otras fosfatasas puedan ejercer en los espermatozoides. Además intentaremos identificar sustratos específicos para cada una de ellas, caracterizando su regulación temporal y espacial.

VI. CONCLUSIONES

1. En los espermatozoides de los mamíferos están presentes varias proteínas tirosina fosfatasa, aunque nuestros resultados indican que la presencia de estas enzimas en los espermatozoides de los mamíferos es variable en función de la especie.

2. Estas enzimas juegan un papel muy destacado en la regulación de la funcionalidad del espermatozoide, controlando aspectos esenciales como la motilidad.

3. La actividad tirosina fosfatasa está comprometida durante el almacenamiento de los espermatozoides congelados o refrigerados y por lo tanto, podría ser un punto de control esencial para mantener las características adecuadas en esas células.

4. Una de las fosfatasas identificadas, la PTPN11, parece desempeñar un papel muy importante en la regulación de la capacitación y su estado de fosforilación podría ser un indicador del estado de capacitación.

5. Finalmente, el mecanismo de activación de la PTPN11 en los espermatozoides depende de la fosforilación en residuos de tirosina específicos que está regulada por la vía del APMc/PKA y parece requerir el concurso de proteínas adaptadoras.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Adachi J, Tate S, Miyake M, & Harayama H (2008). Effects of protein phosphatase inhibitor calyculin a on the postacrosomal protein serine/threonine phosphorylation state and acrosome reaction in boar spermatozoa incubated with a cAMP analog. *J Reprod Dev* **54**, 171-176.

Agarwal A, Prabakaran SA, & Said TM (2005). Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* **26**, 654-660.

Ahmad K, Bracho GE, Wolf DP, & Tash JS (1995). Regulation of human sperm motility and hyperactivation components by calcium, calmodulin, and protein phosphatases. *Arch Androl* **35**, 187-208.

Aitken RJ (1994). A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev* **6**, 19-23.

Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, & Irvine DS (1998). A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci* **111** (Pt 5), 645-656.

Aitken RJ, Ryan AL, Baker MA, & McLaughlin EA (2004). Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. *Free Radic Biol Med* **36**, 994-1010.

Aitken RJ & West KM (1990). Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* **13**, 433-451.

Almog T, Lazar S, Reiss N, Etkovitz N, Milch E, Rahamim N, Dobkin-Bekman M, Rotem R, Kalina M, Ramon J, Raziel A, Breitbart H, Seger R, & Naor Z (2008). Identification of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 MAPK as regulators of human sperm motility and acrosome reaction and as predictors of poor spermatozoan quality. *J Biol Chem* **283**, 14479-14489.

Almog T & Naor Z (2008). Mitogen activated protein kinases (MAPKs) as regulators of spermatogenesis and spermatozoa functions. *Mol Cell Endocrinol* **282**, 39-44.

Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, & Mustelin T (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711.

Amann RP (2008). The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* **29**, 469-487.

Aparicio IM, Bragado MJ, Gil MC, Garcia-Herreros M, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, & Garcia-Marin LJ (2007b). Porcine sperm motility is regulated by serine phosphorylation of the glycogen synthase kinase-3 α . *Reproduction* **134**, 435-444.

Aparicio IM, Bragado MJ, Gil MC, Garcia-Herreros M, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, & Garcia-Marin LJ (2007a). Phosphatidylinositol 3-kinase pathway regulates sperm viability but not capacitation on boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **74**, 1035-1042.

Aparicio IM, Gil MC, Garcia-Herreros M, Peña FJ, & Garcia-Marin LJ (2005). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase modifies boar sperm motion parameters. *Reproduction* **129**, 283-289.

Aplin AE, Howe AK, & Juliano RL (1999). Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 737-744.

Arnoult C, Zeng Y, & Florman HM (1996). ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J Cell Biol* **134**, 637-645.

Ashizawa K, Hashimoto K, Higashio M, & Tsuzuki Y (1997). The addition of mitogen-activated protein kinase and p34cdc2 kinase substrate peptides inhibits the flagellar motility of demembrated fowl spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 116-121.

Ashizawa K, Wishart GJ, Katayama S, Takano D, Ranasinghe AR, Narumi K, & Tsuzuki Y (2006). Regulation of acrosome reaction of fowl spermatozoa: evidence for the involvement of protein kinase C and protein phosphatase-type 1 and/or -type 2A. *Reproduction* **131**, 1017-1024.

Aurich C (2008). Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci* **107**, 268-275.

Austin CR (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res (B)* **4**, 581-596.

Bailey JL, Bilodeau JF, & Cormier N (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* **21**, 1-7.

Bailey JL, Tardif S, Dube C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Lefievre L, & Leclerc P (2005). Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm. Kinase activity and capacitation. *Theriogenology* **63**, 599-614.

Bajpai M, Asin S, & Doncel GF (2003). Effect of tyrosine kinase inhibitors on tyrosine phosphorylation and motility parameters in human sperm. *Arch Androl* **49**, 229-246.

Bajpai M & Doncel GF (2003). Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction* **126**, 183-195.

Baker MA, Hetherington L, & Aitken RJ (2006). Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J Cell Sci* **119**, 3182-3192.

Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, & Aitken RJ (2004). Analysis of the mechanism by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *J Cell Sci* **117**, 211-222.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, & Forti G (2002). Signal transduction pathways in human spermatozoa. *J Reprod Immunol* **53**, 121-131.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, & Forti G (2000b). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* **5**:E110-23., E110-E123.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, & Forti G (2000a). Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci* **5**, E110-E123.

- Bleil JD & Wassarman PM (1980). Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**, 873-882.
- Blobe GC, Stribling S, Obeid LM, & Hannun YA (1996). Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv* **27**, 213-248.
- Boerke A, Tsai PS, Garcia-Gil N, Brewis IA, & Gadella BM (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**, 1188-1196.
- Botelho LH, Rothermel JD, Coombs RV, & Jastorff B (1988). cAMP analog antagonists of cAMP action. *Methods Enzymol* **159**, 159-172.
- Bou-Haila A & Tulsiani DR (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* **379**, 173-182.
- Bou-Haila A & Tulsiani DR (2009). Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* **485**, 72-81.
- Bouaziz A, Romera-Castillo C, Salido S, Linares-Palomino PJ, Altarejos J, Bartegi A, Rosado JA, & Salido GM (2007). Cinnamtannin B-1 from bay wood exhibits antiapoptotic effects in human platelets. *Apoptosis* **12**, 489-498.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bravo MM, Aparicio IM, Garcia-Herreros M, Gil MC, Peña FJ, & Garcia-Marin LJ (2005). Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **71**, 88-96.
- Breitbart H (2002). Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Mol Cell Endocrinol* **187**, 139-144.
- Breitbart H (2003). Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* **49**, 321-327.

- Breitbart H & Naor Z (1999). Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod* **4**, 151-159.
- Breitbart H, Rotman T, Rubinstein S, & Etkovitz N (2009). Role and Regulation of PI3K in Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction. *Mol Cell Endocrinol*.
- Breitbart H & Spungin B (1997). The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* **3**, 195-202.
- Brewis IA & Wong CH (1999). Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Rev Reprod* **4**, 135-142.
- Brokaw CJ (1989). Direct measurements of sliding between outer doublet microtubules in swimming sperm flagella. *Science* **243**, 1593-1596.
- Brokaw CJ (1972). Flagellar movement: a sliding filament model. *Science* **178**, 455-462.
- Brucker C & Lipford GB (1995). The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update. *Hum Reprod Update* **1**, 51-62.
- Burnette WN (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Bwanga CO, de Braganca MM, Einarsson S, & Rodriguez-Martinez H (1990). Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *Zentralbl Veterinarmed A* **37**, 651-658.
- Carrell DT, Bradshaw WS, Jones KP, Middleton RG, Peterson CM, & Urry RL (1992). An evaluation of various treatments to increase sperm penetration capacity for potential use in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* **57**, 134-138.
- Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, & Moss SB (1996). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor

proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* **180**, 284-296.

Chakrabarti R, Cheng L, Puri P, Soler D, & Vijayaraghavan S (2007). Protein phosphatase PP1 gamma 2 in sperm morphogenesis and epididymal initiation of sperm motility. *Asian J Androl* **9**, 445-452.

Chan G, Kalaitzidis D, & Neel BG (2008). The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 179-192.

Chang MC (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**, 697-698.

Chen CY, Willard D, & Rudolph J (2009). Redox Regulation of SH2-Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatases by Two Backdoor Cysteines. *Biochemistry*.

Chen L, Sung SS, Yip ML, Lawrence HR, Ren Y, Guida WC, Sebt SM, Lawrence NJ, & Wu J (2006). Discovery of a novel shp2 protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Mol Pharmacol* **70**, 562-570.

Chieffi P, Barchi M, Di Agostino S, Rossi P, Tramontano D, & Geremia R (2003). Prolin-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) expression and localization in mouse testis. *Mol Reprod Dev* **65**, 330-335.

Chuderland D & Seger R (2005). Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol* **29**, 57-74.

Coffer PJ, Jin J, & Woodgett JR (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335** (Pt 1), 1-13.

Cohen PT (2002). Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J Cell Sci* **115**, 241-256.

Cornwall GA (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* **15**, 213-227.

Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Hado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, & Publicover S (2009). Ca²⁺ stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction*.

Cotton L, Gibbs GM, Sanchez-Partida LG, Morrison JR, de Kretser DM, & O'Bryan MK (2006). FGFR-1 [corrected] signaling is involved in spermiogenesis and sperm capacitation. *J Cell Sci* **119**, 75-84.

Cross NL (1996). Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness. *Mol Reprod Dev* **45**, 212-217.

Cross NL & Razy-Faulkner P (1997). Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol Reprod* **56**, 1169-1174.

Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, & Hartmann PE (1991). A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* **12**, 98-103.

Cuncic C, Detich N, Ethier D, Tracey AS, Gresser MJ, & Ramachandran C (1999). Vanadate inhibition of protein tyrosine phosphatases in Jurkat cells: modulation by redox state. *J Biol Inorg Chem* **4**, 354-359.

Darszon A, Nishigaki T, Wood C, Trevino CL, Felix R, & Beltran C (2005). Calcium channels and Ca²⁺ fluctuations in sperm physiology. *Int Rev Cytol* **243**, 79-172.

Darszon A, Trevino CL, Wood C, Galindo B, Rodriguez-Miranda E, Acevedo JJ, Hernandez-Gonzalez EO, Beltran C, Martinez-Lopez P, & Nishigaki T (2007). Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**, 229-244.

De Jonge CJ, Han HL, Lawrie H, Mack SR, & Zaneveld LJ (1991). Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway. *J Exp Zool* **258**, 113-125.

de Lamirande E & Gagnon C (1993a). A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* **16**, 21-25.

de Lamirande E & Gagnon C (1993b). Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* **59**, 1291-1295.

de Lamirande E & Gagnon C (1995). Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* **18**, 487-495.

de Lamirande E & Gagnon C (2003). Redox control of changes in protein sulfhydryl levels during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* **35**, 1271-1285.

de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, & Gagnon C (1997a). Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* **2**, 48-54.

de Lamirande E, Leclerc P, & Gagnon C (1997b). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* **3**, 175-194.

de Lamirande E & O'Flaherty C (2008). Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta* **1784**, 106-115.

de Lamirande E, Tsai C, Harakat A, & Gagnon C (1998). Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* **19**, 585-594.

De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, & Enders GC (1993). Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* **133**, 389-396.

Devi KU, Jha K, & Shivaji S (1999). Plasma membrane-associated protein tyrosine phosphatase activity in hamster spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **53**, 42-50.

Dow MP & Bavister BD (1989). Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. *Gamete Res* **23**, 171-180.

Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47-95.

du Plessis SS, Page C, & Franken DR (2002). Extracellular signal-regulated kinase activation involved in human sperm-zona pellucida binding. *Andrologia* **34**, 55-59.

Dube C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, & Bailey JL (2004). Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* **62**, 874-886.

Dube C, Leclerc P, Baba T, Reyes-Moreno C, & Bailey JL (2005). The proacrosin binding protein, sp32, is tyrosine phosphorylated during capacitation of pig sperm. *J Androl* **26**, 519-528.

Dube C, Tardif S, Leclerc P, & Bailey JL (2003). The importance of calcium in the appearance of p32, a boar sperm tyrosine phosphoprotein, during in vitro capacitation. *J Androl* **24**, 727-733.

Embree-Ku M, Venturini D, & Boekelheide K (2002). Fas is involved in the p53-dependent apoptotic response to ionizing radiation in mouse testis. *Biol Reprod* **66**, 1456-1461.

Emiliozzi C, Cordonier H, Guerin JF, Ciapa B, Benchaib M, & Fenichel P (1996). Effects of progesterone on human spermatozoa prepared for in-vitro fertilization. *Int J Androl* **19**, 39-47.

Eriksson BM & Rodriguez-Martinez H (2000). Deep-freezing of boar semen in plastic film 'cochettes'. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **47**, 89-97.

Escalier D (2006). Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum Reprod Update* **12**, 449-461.

Fantus IG, Kadota S, Deragon G, Foster B, & Posner BI (1989). Pervanadate [peroxide(s) of vanadate] mimics insulin action in rat adipocytes via activation of the insulin receptor tyrosine kinase. *Biochemistry* **28**, 8864-8871.

Feng GS (1999). Shp-2 tyrosine phosphatase: signaling one cell or many. *Exp Cell Res* **253**, 47-54.

Feng H, Sandlow JI, & Sandra A (1998). The c-kit receptor and its possible signaling transduction pathway in mouse spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **49**, 317-326.

Fernandez-Sanchez M, del Castillo-Vaquero A, Salido GM, & Gonzalez A (2009). Ethanol exerts dual effects on calcium homeostasis in CCK-8-stimulated mouse pancreatic acinar cells. *BMC Cell Biol* **10:77.**, 77.

Filomeni G, Rotilio G, & Ciriolo MR (2005). Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ* **12**, 1555-1563.

Fisher HM, Brewis IA, Barratt CL, Cooke ID, & Moore HD (1998). Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* **4**, 849-855.

Flesch FM, Brouwers JF, Nievelstein PF, Verkleij AJ, van Golde LM, Colenbrander B, & Gadella BM (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci* **114**, 3543-3555.

Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM, & Gadella BM (1999). Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 787-792.

Franca LR, Avelar GF, & Almeida FF (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* **63**, 300-318.

Fraser LR (1994). Na⁺ requirements for capacitation and acrosomal exocytosis in mammalian sperm. *Int Rev Cytol* **149**, 1-46.

Fraser LR, Abeydeera LR, & Niwa K (1995). Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* **40**, 233-241.

Furuya S, Endo Y, Oba M, Suzuki S, & Nozawa S (1993). Effect of epidermal growth factor on human sperm capacitation. *Fertil Steril* **60**, 905-910.

Gadella BM & Harrison RA (2002). Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* **67**, 340-350.

Gadella BM, Tsai PS, Boerke A, & Brewis IA (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int J Dev Biol* **52**, 473-480.

Gadella BM & Van Gestel RA (2004). Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim Reprod Sci* **82-83**, 307-319.

Garde J & Roldan ER (2000). Stimulation of Ca(2+)-dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A2. *J Reprod Fertil* **118**, 57-68.

Gonzalez-Fernandez L & Tapia JA (2007). Isoform identification and subcellular distribution of protein kinase D (PKD) in boar sperm. *Reprod Domest Anim* **42**, 94-99.

Goto N & Harayama H (2009). Calyculin A-Sensitive Protein Phosphatases are Involved in Maintenance of Progressive Movement in Mouse Spermatozoa In Vitro by Suppression of Autophosphorylation of Protein Kinase A. *J Reprod Dev*.

Gross MK, Toscano DG, & Toscano W.A. Jr (1987). Calmodulin-mediated adenylate cyclase from mammalian sperm. *J Biol Chem* **262**, 8672-8676.

Gutkind JS (1998). The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* **273**, 1839-1842.

Han Y, Haines CJ, & Feng HL (2007). Role(s) of the serine/threonine protein phosphatase 1 on mammalian sperm motility. *Arch Androl* **53**, 169-177.

Harayama H & Miyake M (2006). A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase C activation is involved in the hyperactivation of boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **73**, 1169-1178.

Harayama H, Miyake M, & Kato S (2000). Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and serum albumin in head-to-head agglutination of boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* **12**, 307-318.

Harayama H, Murase T, & Miyake M (2005). A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate stimulates phospholipase C γ 1-calcium signaling via the activation of tyrosine kinase in boar spermatozoa. *J Androl* **26**, 732-740.

- Harayama H, Muroga M, & Miyake M (2004a). A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced tyrosine phosphorylation of Syk protein tyrosine kinase in the flagella of boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **69**, 436-447.
- Harayama H & Nakamura K (2008). Changes of PKA and PDK1 in the principal piece of boar spermatozoa treated with a cell-permeable cAMP analog to induce flagellar hyperactivation. *Mol Reprod Dev* **75**, 1396-1407.
- Harayama H, Sasaki K, & Miyake M (2004b). A unique mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced increase of 32-kDa tyrosine-phosphorylated protein in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* **69**, 194-204.
- Harrison RA & Gadella BM (2005). Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology* **63**, 342-351.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, & Schaper F (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20.
- Heninger NL, Staub C, Blanchard TL, Johnson L, Varner DD, & Forrest DW (2004). Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology* **62**, 283-297.
- Herrero MB, de Lamirande E, & Gagnon C (1999). Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro. *Biol Reprod* **61**, 575-581.
- Herrero MB, de Lamirande E, & Gagnon C (2003). Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. *Curr Pharm Des* **9**, 419-425.
- Hibi M & Hirano T (2000). Gab-family adapter molecules in signal transduction of cytokine and growth factor receptors, and T and B cell antigen receptors. *Leuk Lymphoma* **37**, 299-307.
- Ho HC & Suarez SS (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction* **122**, 519-526.
- Holt WV & Harrison RA (2002). Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl* **23**, 557-565.

- Howard M. Shapiro (2003). Practical Flow Cytometry.
- Hubbard SR & Till JH (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* **69**, 373-398.
- Hunter T (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell* **28**, 730-738.
- Hunter T (2000). Signaling--2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127.
- Hunter T (1989b). Protein modification: phosphorylation on tyrosine residues. *Curr Opin Cell Biol* **1**, 1168-1181.
- Hunter T (1989a). Protein-tyrosine phosphatases: the other side of the coin. *Cell* **58**, 1013-1016.
- Hunter T (2009). Tyrosine phosphorylation: thirty years and counting. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 140-146.
- Huo LJ, Ma XH, & Yang ZM (2002). Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* **58**, 1349-1360.
- Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsapralis G, Gresser MJ, & Ramachandran C (1997). Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem* **272**, 843-851.
- Hyne RV & Garbers DL (1979). Calcium-dependent increase in adenosine 3',5'-monophosphate and induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5699-5703.
- Ignatz GG & Suarez SS (2005). Calcium/calmodulin and calmodulin kinase II stimulate hyperactivation in demembrated bovine sperm. *Biol Reprod* **73**, 519-526.
- Inaba K (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci* **20**, 1043-1056.
- Inaba K (2007). Molecular basis of sperm flagellar axonemes: structural and evolutionary aspects. *Ann N Y Acad Sci* **1101**, 506-526.

Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, & Soder O (2004). Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol Reprod* **70**, 290-296.

Jarvis LA, Toering SJ, Simon MA, Krasnow MA, & Smith-Bolton RK (2006). Sprouty proteins are in vivo targets of Corkscrew/SHP-2 tyrosine phosphatases. *Development* **133**, 1133-1142.

Jha KN & Shivaji S (2002). Identification of the major tyrosine phosphorylated protein of capacitated hamster spermatozoa as a homologue of mammalian sperm a kinase anchoring protein. *Mol Reprod Dev* **61**, 258-270.

Jimenez-Gonzalez C, Michelangeli F, Harper CV, Barratt CL, & Publicover SJ (2006). Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. *Hum Reprod Update* **12**, 253-267.

Johnson L, Thompson D.L. Jr, & Varner DD (2008). Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci* **105**, 23-51.

Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, & Florman HM (2001). Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nat Cell Biol* **3**, 499-502.

Kalab P, Peknicova J, Geussova G, & Moos J (1998). Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev* **51**, 304-314.

Kaneko Y, Takano S, Okumura K, Takenawa J, Higashitaji H, Fukumoto M, Nakayama H, & Fujita J (1993). Identification of protein tyrosine phosphatases expressed in murine male germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 625-631.

Katz DF & Vanagimachi R (1980). Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol Reprod* **22**, 759-764.

Kawano N, Ito J, Kashiwazaki N, & Yoshida M (2008). Phosphorylation of the MAPK Pathway has an Essential Role in the Acrosome Reaction in Miniature Pig Sperm. *Reprod Domest Anim*.

Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, & Tsukamoto T (2003). Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl* **24**, 185-191.

Knobil & Neill's (2006). *Physiology of Reproduction*.

Koji T, Hishikawa Y, Ando H, Nakanishi Y, & Kobayashi N (2001). Expression of Fas and Fas ligand in normal and ischemia-reperfusion testes: involvement of the Fas system in the induction of germ cell apoptosis in the damaged mouse testis. *Biol Reprod* **64**, 946-954.

Kulanand J & Shivaji S (2001). Capacitation-associated changes in protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and acrosome reaction in hamster spermatozoa. *Andrologia* **33**, 95-104.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lalancette C, Faure RL, & Leclerc P (2006). Identification of the proteins present in the bull sperm cytosolic fraction enriched in tyrosine kinase activity: a proteomic approach. *Proteomics* **6**, 4523-4540.

Lax Y, Rubinstein S, & Breitbart H (1997). Subcellular distribution of protein kinase C alpha and beta1 in bovine spermatozoa, and their regulation by calcium and phorbol esters. *Biol Reprod* **56**, 454-459.

Leclerc P, de Lamirande E, & Gagnon C (1998). Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl* **19**, 434-443.

Leclerc P, de Lamirande E, & Gagnon C (1996). Cyclic adenosine 3',5' monophosphate-dependent regulation of protein tyrosine phosphorylation in relation to human sperm capacitation and motility. *Biol Reprod* **55**, 684-692.

Leclerc P, de Lamirande E, & Gagnon C (1997). Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* **22**, 643-656.

Leclerc P & Goupil S (2002). Regulation of the human sperm tyrosine kinase c-yes. Activation by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inhibition by Ca(2+). *Biol Reprod* **67**, 301-307.

Lemoine M, Dupont J, Guillory V, Tesseraud S, & Blesbois E (2009). Potential Involvement of Several Signaling Pathways in Initiation of the Chicken Acrosome Reaction. *Biol Reprod*.

Lenzi A, Picardo M, Gandini L, & Dondero F (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* **2**, 246-256.

Levy R & Seifer-Aknin I (2001). Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin (Paris)* **59**, 531-545.

Lewis B & Aitken RJ (2001). Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. *Biol Reprod* **64**, 1545-1556.

Leyton L & Saling P (1989). 95 kd sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* **57**, 1123-1130.

Liu JP (1996). Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol* **116**, 1-29.

Liu Y & Rohrschneider LR (2002). The gift of Gab. *FEBS Lett* **515**, 1-7.

Lopez JJ, Jardin I, Salido GM, & Rosado JA (2008). Cinnamtannin B-1 as an antioxidant and platelet aggregation inhibitor. *Life Sci* **82**, 977-982.

Lu Q, Sun QY, Breitbart H, & Chen DY (1999). Expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases during spermatogenesis and epididymal sperm maturation in mice. *Arch Androl* **43**, 55-66.

Luconi M, Barni T, Vannelli GB, Krausz C, Marra F, Benedetti PA, Evangelista V, Francavilla S, Properzi G, Forti G, & Baldi E (1998a). Extracellular signal-regulated kinases modulate capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* **58**, 1476-1489.

Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Gervasi G, Forti G, & Baldi E (1995). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by platelet-activating factor and progesterone in human spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol* **108**, 35-42.

Luconi M, Krausz C, Barni T, Vannelli GB, Forti G, & Baldi E (1998b). Progesterone stimulates p42 extracellular signal-regulated kinase (p42erk) in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **4**, 251-258.

Luconi M, Krausz C, Forti G, & Baldi E (1996). Extracellular calcium negatively modulates tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity during capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* **55**, 207-216.

Luconi M, Marra F, Gandini L, Filimberti E, Lenzi A, Forti G, & Baldi E (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition enhances human sperm motility. *Hum Reprod* **16**, 1931-1937.

Luconi M, Porazzi I, Ferruzzi P, Marchiani S, Forti G, & Baldi E (2005). Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylylase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biol Reprod* **72**, 22-32.

Mahony MC & Gwathmey T (1999). Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod* **60**, 1239-1243.

Marin S, Chiang K, Bassilian S, Lee WN, Boros LG, Fernandez-Novell JM, Centelles JJ, Medrano A, Rodriguez-Gil JE, & Cascante M (2003). Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Lett* **554**, 342-346.

Marin-Briggiler CI, Jha KN, Chertihin O, Buffone MG, Herr JC, Vazquez-Levin MH, & Visconti PE (2005). Evidence of the presence of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in human sperm and its involvement in motility regulation. *J Cell Sci* **118**, 2013-2022.

Mathews, Van Holde, & Ahern (2002). *Bioquímica* 3^a.

Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, & Rodrigues JL (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* **57**, 327-344.

- Mikalsen SO & Kaalhus O (1998). Properties of pervanadate and permolybdate. Connexin43, phosphatase inhibition, and thiol reactivity as model systems. *J Biol Chem* **273**, 10036-10045.
- Miller D, Ostermeier GC, & Krawetz SA (2005). The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* **11**, 156-163.
- Miura M, Sasagawa I, Suzuki Y, Nakada T, & Fujii J (2002). Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in the mouse testis following heat exposure. *Fertil Steril* **77**, 787-793.
- Montalibet J, Skorey KI, & Kennedy BP (2005). Protein tyrosine phosphatase: enzymatic assays. *Methods* **35**, 2-8.
- Mora A, Komander D, van Aalten DM, & Alessi DR (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 161-170.
- Morte C, Iborra A, & Martinez P (1998). Phosphorylation of Shc proteins in human sperm in response to capacitation and progesterone treatment. *Mol Reprod Dev* **50**, 113-120.
- Mortimer ST (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* **3**, 403-439.
- Mukai C & Okuno M (2004). Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* **71**, 540-547.
- Murphy LO & Blenis J (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* **31**, 268-275.
- Musashi M, Ota S, & Shiroshita N (2000). The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol* **72**, 12-19.
- Naaby-Hansen S, Mandal A, Wolkowicz MJ, Sen B, Westbrook VA, Shetty J, Coonrod SA, Klotz KL, Kim YH, Bush LA, Flickinger CJ, & Herr JC (2002). CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation. *Dev Biol* **242**, 236-254.

Nagdas SK, Winfrey VP, & Olson GE (2005). Tyrosine phosphorylation generates multiple isoforms of the mitochondrial capsule protein, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), during hamster sperm capacitation. *Biol Reprod* **72**, 164-171.

Nagdas SK, Winfrey VP, & Olson GE (2006). Identification of a hamster sperm 26-kilodalton dehydrogenase/reductase that is exclusively localized to the mitochondria of the flagellum. *Biol Reprod* **75**, 197-202.

Nagdas SK, Winfrey VP, & Olson GE (2002). Identification of ras and its downstream signaling elements and their potential role in hamster sperm motility. *Biol Reprod* **67**, 1058-1066.

Nakamura K, Shima H, Watanabe M, Haneji T, & Kikuchi K (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual-specificity protein phosphatase possibly involved in spermatogenesis. *Biochem J* **344 Pt 3**, 819-825.

Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR, Griswold MD, & Lee JT (2006). Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr Biol* **16**, 660-667.

Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, & Oehninger S (1999). Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril* **71**, 919-923.

Nauc V, de Lamirande E, Leclerc P, & Gagnon C (2004). Inhibitors of phosphoinositide 3-kinase, LY294002 and wortmannin, affect sperm capacitation and associated phosphorylation of proteins differently: Ca²⁺-dependent divergences. *J Androl* **25**, 573-585.

Navarro B, Kirichok Y, Chung JJ, & Clapham DE (2008). Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa. *Int J Dev Biol* **52**, 607-613.

Naz RK, Ahmad K, & Kaplan P (1992). Expression and function of ras proto-oncogene proteins in human sperm cells. *J Cell Sci* **102 (Pt 3)**, 487-494.

Naz RK, Ahmad K, & Kumar R (1991). Role of membrane phosphotyrosine proteins in human spermatozoal function. *J Cell Sci* **99 (Pt 1)**, 157-165.

Naz RK & Rajesh PB (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol* **2**, 75.

Neel BG, Gu H, & Pao L (2003). The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* **28**, 284-293.

Newton AC (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* **270**, 28495-28498.

Newton AC (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 161-167.

Nishimoto S & Nishida E (2006). MAPK signalling: ERK5 versus ERK1/2. *EMBO Rep* **7**, 782-786.

Núñez-Martínez I, Moran JM, & Peña FJ (2007). Identification of sperm morphometric subpopulations in the canine ejaculate: do they reflect different subpopulations in sperm chromatin integrity? *Zygote* **15**, 257-266.

O'Flaherty C, de Lamirande E, & Gagnon C (2004a). Phosphorylation of the Arginine-X-X-(Serine/Threonine) motif in human sperm proteins during capacitation: modulation and protein kinase A dependency. *Mol Hum Reprod* **10**, 355-363.

O'Flaherty C, de Lamirande E, & Gagnon C (2006b). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* **41**, 528-540.

O'Flaherty C, de Lamirande E, & Gagnon C (2006a). Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free Radic Biol Med* **40**, 1045-1055.

O'Flaherty C, de Lamirande E, & Gagnon C (2005). Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation. *Biol Reprod* **73**, 94-105.

O'Flaherty C, Rodriguez P, & Srivastava S (2004b). L-arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* **1674**, 215-221.

- O'Flaherty CM, Beorlegui NB, & Beconi MT (1999). Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* **52**, 289-301.
- O'Toole CM, Roldan ER, Hampton P, & Fraser LR (1996). A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis. *Mol Hum Reprod* **2**, 317-326.
- Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galan Y, Varela-Fernandez E, Gallardo-Bolanos JM, Muriel A, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, & Peña FJ (2008). Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl* **29**, 213-221.
- Osheroff JE, Visconti PE, Valenzuela JP, Travis AJ, Alvarez J, & Kopf GS (1999). Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* **5**, 1017-1026.
- Pareek TK, Joshi AR, Sanyal A, & Dighe RR (2007). Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis* **12**, 1085-1100.
- Pawson T (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**, 191-203.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, & Cobb MH (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183.
- Pena FJ, Johannisson A, Wallgren M, & Rodriguez MH (2004). Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote* **12**, 117-124.
- Peña FJ, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Ortega-Ferrusola C, Gonzalez-Fernandez L, & Macias-Garcia B (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Domest Anim* **44**, 345-349.
- Peña FJ, Saravia F, Johannisson A, Wallgren M, & Rodriguez-Martinez H (2007). Detection of early changes in sperm membrane integrity pre-freezing

can estimate post-thaw quality of boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **97**, 74-83.

Petrunkina AM, Simon K, Gunzel-Apel AR, & Topfer-Petersen E (2003). Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *J Androl* **24**, 423-437.

Pommer AC, Rutllant J, & Meyers SA (2003). Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod* **68**, 1208-1214.

Pons-Rejraji H, Bailey JL, & Leclerc P (2009). Modulation of bovine sperm signalling pathways: correlation between intracellular parameters and sperm capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod Fertil Dev* **21**, 511-524.

Pulido R & Hooft van Huijsduijnen R (2008). Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease. *FEBS J* **275**, 848-866.

Rameh LE & Cantley LC (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**, 8347-8350.

Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, & Clapham DE (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603-609.

Rodriguez-Gil JE (2006). Mammalian sperm energy resources management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod Domest Anim* **41 Suppl 2**, 11-20.

Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, Kalina M, Lax J, Breitbart H, & Naor Z (1992). Ca(2+)-independent induction of acrosome reaction by protein kinase C in human sperm. *Endocrinology* **131**, 2235-2243.

Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, Kalina M, & Naor Z (1990). Protein kinase C is present in human sperm: possible role in flagellar motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7305-7308.

Ruiz-Pesini E, Díez-Sánchez C, Lopez-Perez MJ, & Enriquez JA (2007). The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative

phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr Top Dev Biol* **77**, 3-19.

Ruwanpura SM, McLachlan RI, Matthiesson KL, & Meachem SJ (2008). Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod* **23**, 403-411.

Salicioni AM, Platt MD, Wertheimer EV, Arcelay E, Allaire A, Sosnik J, & Visconti PE (2007). Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Soc Reprod Fertil Suppl* **65**, 245-259.

Salmeen A & Barford D (2005). Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid Redox Signal* **7**, 560-577.

Satir P (1968). Studies on cilia. 3. Further studies on the cilium tip and a "sliding filament" model of ciliary motility. *J Cell Biol* **39**, 77-94.

Scheid MP & Woodgett JR (2001). PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 760-768.

Schlaepfer DD, Hauck CR, & Sieg DJ (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* **71**, 435-478.

Seger R & Krebs EG (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J* **9**, 726-735.

Seligman J, Zipser Y, & Kosower NS (2004). Tyrosine phosphorylation, thiol status, and protein tyrosine phosphatase in rat epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* **71**, 1009-1015.

Sen CK (2000). Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* **36**, 1-30.

Shaha C (2007). Modulators of spermatogenic cell survival. *Soc Reprod Fertil Suppl* **63**, 173-186.

Shi ZQ, Lu W, & Feng GS (1998). The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **273**, 4904-4908.

Shima JE, McLean DJ, McCarrey JR, & Griswold MD (2004). The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod* **71**, 319-330.

Shingyoji C, Murakami A, & Takahashi K (1977). Local reactivation of Triton-extracted flagella by iontophoretic application of ATP. *Nature* **265**, 269-270.

Si Y & Okuno M (1999). Role of tyrosine phosphorylation of flagellar proteins in hamster sperm hyperactivation. *Biol Reprod* **61**, 240-246.

Silva PF & Gadella BM (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* **65**, 958-978.

Singer SJ & Nicolson GL (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.

Sloss CM, Cadalbert L, Finn SG, Fuller SJ, & Plevin R (2005). Disruption of two putative nuclear localization sequences is required for cytosolic localization of mitogen-activated protein kinase phosphatase-2. *Cell Signal* **17**, 709-716.

Smith GD, Wolf DP, Trautman KC, da Cruz e Silva E, Greengard P, & Vijayaraghavan S (1996). Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biol Reprod* **54**, 719-727.

Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, & Pardalidis N (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **109**, 323-330.

Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.

Spungin B & Breitbart H (1996). Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci* **109** (Pt 7), 1947-1955.

Spungin B, Margalit I, & Breitbart H (1995). A 70 kDa protein is transferred from the outer acrosomal to the plasma membrane during capacitation. *FEBS Lett* **357**, 98-102.

Stauss CR, Votta TJ, & Suarez SS (1995). Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* **53**, 1280-1285.

Storey BT (2008). Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol* **52**, 427-437.

Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, & Powell RL (1991). Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod* **44**, 375-381.

Suarez SS & Osman RA (1987). Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biol Reprod* **36**, 1191-1198.

Summers KE & Gibbons IR (1971). Adenosine triphosphate-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 3092-3096.

Sun H & Tonks NK (1994). The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem Sci* **19**, 480-485.

Suzuki F (1988). Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes during epididymal maturation of golden hamster spermatozoa. *J Ultrastruct Mol Struct Res* **100**, 39-54.

Tardif S, Dube C, & Bailey JL (2003). Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol Reprod* **68**, 207-213.

Tardif S, Dube C, Chevalier S, & Bailey JL (2001). Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod* **65**, 784-792.

Tardif S, Lefievre L, Gagnon C, & Bailey JL (2004). Implication of cAMP during porcine sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation. *Mol Reprod Dev* **69**, 428-435.

Tash JS (1989). Protein phosphorylation: the second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motil Cytoskeleton* **14**, 332-339.

- Tash JS, Krinks M, Patel J, Means RL, Klee CB, & Means AR (1988). Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J Cell Biol* **106**, 1625-1633.
- Teng YN, Chung CL, Lin YM, Pan HA, Liao RW, & Kuo PL (2007). Expression of various CDC25B isoforms in human spermatozoa. *Fertil Steril* **88**, 379-382.
- Toker A & Cantley LC (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**, 673-676.
- Tomes CN, Roggero CM, De Blas G, Saling PM, & Mayorga LS (2004). Requirement of protein tyrosine kinase and phosphatase activities for human sperm exocytosis. *Dev Biol* **265**, 399-415.
- Tonks NK (2005). Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell* **121**, 667-670.
- Topfer-Petersen E, Petrounkina AM, & Ekhlasi-Hundrieser M (2000). Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 653-662.
- Toshimori K (1998). Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. *Cell Tissue Res* **293**, 177-187.
- Towbin H, Staehelin T, & Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tulsiani DR (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: an overview of their potential role in sperm maturation. *Mol Cell Endocrinol* **250**, 58-65.
- Tulsiani DR, Bou-Haila A, Loeser CR, & Pereira BM (1998). The biological and functional significance of the sperm acrosome and acrosomal enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res* **240**, 151-164.
- Tulsiani DR, Zeng HT, & Bou-Haila A (2007). Biology of sperm capacitation: evidence for multiple signalling pathways. *Soc Reprod Fertil Suppl* **63**, 257-272.

Turner RM (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *J Androl* **24**, 790-803.

Turner RM (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* **18**, 25-38.

Turner RM, Eriksson RL, Gerton GL, & Moss SB (1999). Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Mol Hum Reprod* **5**, 816-824.

Uma DK, Jha K, Patil SB, Padma P, & Shivaji S (2000). Inhibition of motility of hamster spermatozoa by protein tyrosine kinase inhibitors. *Andrologia* **32**, 95-106.

Urner F, Leppens-Luisier G, & Sakkas D (2001). Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod* **64**, 1350-1357.

Urner F & Sakkas D (2003). Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* **125**, 17-26.

Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, Smith GD, Khatra B, da Cruz e Silva E, & Greengard P (1996). Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biol Reprod* **54**, 709-718.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, & Kopf GS (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**, 1129-1137.

Visconti PE, Johnson LR, Oyaski M, Fornes M, Moss SB, Gerton GL, & Kopf GS (1997). Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* **192**, 351-363.

Visconti PE & Kopf GS (1998). Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* **59**, 1-6.

Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, & Kopf GS (1995b). Capacitation of mouse spermatozoa. II.

Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**, 1139-1150.

Visconti PE, Ning X, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, & Kopf GS (1999). Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* **214**, 429-443.

Wang RA, Nakane PK, & Koji T (1998). Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* **58**, 1250-1256.

Watson PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* **60-61**, 481-492.

Weidinger S, Mayerhofer A, Kunz L, Albrecht M, Sbornik M, Wunn E, Hollweck R, Ring J, & Kohn FM (2005). Tryptase inhibits motility of human spermatozoa mainly by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Hum Reprod* **20**, 456-461.

White DR & Aitken RJ (1989). Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Res* **22**, 163-177.

Wymann MP & Pirola L (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* **1436**, 127-150.

Yan W, Suominen J, Samson M, Jegou B, & Toppari J (2000). Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **165**, 115-129.

Yanagimachi R (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *J Reprod Fertil* **23**, 193-196.

Yoon S & Seger R (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44.

Zarelli VE, Ruete MC, Roggero CM, Mayorga LS, & Tomes CN (2009). PTP1B dephosphorylates N-ethylmaleimide-sensitive factor and elicits

SNARE complex disassembly during human sperm exocytosis. *J Biol Chem* **284**, 10491-10503.

Zeng Y, Oberdorf JA, & Florman HM (1996). pH regulation in mouse sperm: identification of Na(+)-, Cl(-), and HCO₃(-)-dependent and arylaminobenzoate-dependent regulatory mechanisms and characterization of their roles in sperm capacitation. *Dev Biol* **173**, 510-520.

Zhang H & Zheng RL (1996). Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion. *Free Radic Res* **24**, 261-268.

Zhang SQ, Tsiaras WG, Araki T, Wen G, Minichiello L, Klein R, & Neel BG (2002). Receptor-specific regulation of phosphatidylinositol 3'-kinase activation by the protein tyrosine phosphatase Shp2. *Mol Cell Biol* **22**, 4062-4072.

Zhang SQ, Yang W, Kontaridis MI, Bivona TG, Wen G, Araki T, Luo J, Thompson JA, Schraven BL, Philips MR, & Neel BG (2004). Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* **13**, 341-355.

Zhao Z, Tan Z, Diltz CD, You M, & Fischer EH (1996). Activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway by pervanadate, a potent inhibitor of tyrosine phosphatases. *J Biol Chem* **271**, 22251-22255.