

ESTUDIOS POR MICROSCOPIA CONFOCAL “DOBLE MARCAJE” E INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE WASp CON PROTEÍNAS QUE REGULAN LA DINÁMICA DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN ESPERMATOZOIDES DE COBAYO DURANTE LA CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL.

Delgado-Buenrostro N.L.^{1*}, Cruz Rojas C^{1.}, Cruz-Cobián L^{1.}, Chiquete-Felix N^{2.}, Mújica A^{2.}

1. Unidad de Biomedicina UBIMED FES-Iztacala UNAM, Microscopia Confocal. Av. De los Barrios No.1. Col. Los Reyes Iztacala Tlalnepantla 54090, Edo. de México. FES-Cuautitlán C-1. 2. Departamento de Biología Celular CINVESTAV-IPN México D.F. [*nldb1@hotmail.com](mailto:nldb1@hotmail.com)
nldelgado@campus.iztacala.unam.mx

INTRODUCCIÓN

La reacción acrosomal (RA) es un proceso de exocitosis regulada que prepara al espermatozoide, para adquirir la habilidad fertilizante, solamente espermatozoides con RA se unen y fusionan con la MP del óvulo [1]. La RA forma un nuevo dominio en la MP de la región ecuatorial del acrosoma, que es reconocida por la MP del óvulo. La actina que es polimerizada durante la capacitación y/o RA en las regiones ecuatorial y postacrosomal de los espermatozoides del cerdo [2,3] del cobayo [4] y del bovino [5]. Para identificar el mecanismo por el cual ocurre la polimerización de actina en la región postacrosomal de los espermatozoides del cobayo con RA, investigamos la presencia de proteínas que se relacionan con la actina y su participación en un modelo muy conservado de polimerización de actina, que se presenta en muchos tipos celulares. El modelo general explica las vías de transducción de señales que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina a través de las proteínas G. Estos estudios, han mostrado que la familia de GTPasas Rho; ejemplo; Cdc42 recluta y activa a proteínas de la familia WASp (ejemplo WASp.), WASp activada expone sitios de unión para proteínas relacionadas con la polimerización de actina: dominio (A) para el complejo Arp2/3, que nuclea filamentos de actina, el sitio (P) para la profilina y la región (W) para la actina monomérica [6].

Recientemente se ha sugerido que el mecanismo por el cual ocurre la polimerización de actina en la región postacrosomal de los espermatozoides del cobayo con RA, se da por el mecanismo previamente descrito. ya que por IFI en espermatozoides no capacitados, capacitados y con RA se localizó a WASp, Arp2/3, profilinas I y II, y tres GTPasas (Cdc42, RhoB y RhoA) y su presencia fue corroborada por Western blotting. Además, en espermatozoides capacitados durante incubación prolongada y en células con RA, WASp y profilina II fueron translocadas a la región postacrosomal, (Arp2/3 ya estaban presentes en la región); así, todas estaban presentes en el tiempo en que ocurre la polimerización de actina. Estos eventos fueron inhibidos por GDP- β -S y promovidos por el LPA y el GTP- γ -S, un inhibidor y dos activadores de GTPasas respectivamente. La asociación de Cdc42-WASp se identificó por inmunoprecipitación, en espermatozoides capacitados y esta casi ausente en gametos no capacitados [7].

OBJETIVOS

1.- Determinar si alguna de las proteínas que participan en la dinámica del citoesqueleto de actina como (Arp2/3, profilinas I y II y las tres GTPasas (RhoA, RhoB y Cdc42), coexisten o colocalizan con WASp en la región acrosomal y postacrosomal de los espermatozoides del cobayo durante la capacitación y/o con RA.

2.- Valorar si alguna de las proteínas que participan en la dinámica del citoesqueleto de actina, coprecipitan “forman complejo con WASp” en los espermatozoides del cobayo con RA.

METODOLOGÍA

Obtención de la muestra espermática

Los espermatozoides fueron obtenidos del conducto deferente y lavados dos veces mediante centrifugación/ resuspensión a 3000 rpm durante 3 min. en NaCl 0.154 M. Enseguida se fijaron durante 1 h. con formaldehído al 3% en PBS (NaCl 0.14 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, pH 7.4). Al término de la fijación, las muestras fueron neutralizadas en NH₄Cl-PBS 50mM por 10 min. Finalmente las muestras se lavaron en PBS y luego dos veces con H₂O bidestilada para ser montadas en portaobjetos limpios.

Capacitación y Reacción acrosomal.

Los espermatozoides obtenidos del conducto deferente fueron lavados dos veces mediante centrifugación resuspensión en NaCl 0.154 M y se ajustó la concentración a 1×10^6 espermatozoides/ml como lo describe [8]. Para su capacitación, las células se incubaron a 37°C durante 3 h., en un medio mínimo de cultivo suplementado con (NaCl, 119.4 mM; KCL, 4.8 mM; CaCl₂, 1.0mM; MgSO₄, 1.2 mM; KH₂PO₄, 1.2mM; NaHCO₃, 25mM; dextrosa 5mM; ácido láctico, 21 mM; ácido pirúvico, 0.25 mM; pH 7.4). Muestras alícuotas fueron valoradas al microscopio por intervalos de 15 min. para observar la motilidad hiperactivada (Indicador de capacitación). Al término del tiempo de incubación correspondiente, las muestras alícuotas fueron fijadas en formaldehído al 3% en PBS por 1 h. Las células capacitadas y no capacitadas, se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación/ resuspensión. Enseguida se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1ml de NH₄Cl (50 mM en PBS) durante 10 min. Posteriormente fueron lavados nuevamente por centrifugación / resuspensión en PBS y por último con agua bidestilada. Con esta última suspensión se prepararon frotis de las diferentes muestras. Las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente para valorar el doble marcaje las células se permeabilizaron con acetona absoluta por 8 min a -20°C y se lavaron (3 veces) en PBS durante 7 min cada vez. Para la detección de las proteínas WASp con las proteínas que regulan citoesqueleto de actina se trataron con el Ac anti-WASp (diluido 1:1000) en PBS-BSA al 1% con su fluoróforo correspondiente y las otras proteínas diluidas 1:1000 también con su respectivo fluorocromo acoplado. Se dejaron actuar en la obscuridad durante 1.5h a 37°C, en cámara húmeda. Después de tres lavados en PBS, las muestras fueron montadas con glicerol:PBS entre porta y cubreobjetos y selladas con barniz de uñas. Las muestras fueron observadas al microscopio Confocal.

Inmunoprecipitación de Arp2/Arp3, Profilinas I y II, RhoA, RhoB y Cdc42 con WASp.

Las muestras no capacitadas y capacitadas en medio MCM-PL fueron incubadas con la proteína A/G agarosa (para las proteínas mencionadas) y procesadas para PAGE y Western Blotting, este último se reveló con el anticuerpo anti-WASp.

RESULTADOS

En este trabajo mostramos; 1) La colocalización de proteínas que regulan el citoesqueleto de actina con WASp en la región acrosomal y postacrosomal en los espermatozoides no capacitados, capacitados y en células con RA a través de microscopía confocal y 2) Por inmunoprecipitación la asociación de RhoB-WASp, Cdc42-WASp, Arp2/Arp3-WASp, Profilina I-WASp y Profilina II-WASp.

CONCLUSIONES

- 1.- La presencia de WASp con Arp2, Arp3, profilina I y II, RhoB y Cdc42 en la región postacrosomal en células capacitadas y en gametos con RA sugieren su participación en el proceso de polimerización de actina en dicha región. Además forman complejo con WASp.
- 2.- se corrobora que uno de los mecanismos que promueve la polimerización de actina es a través de la activación de proteínas G pequeñas ya que la exoenzima C-3 inhibe de manera temprana y coordinada la migración de WASp y la polimerización de actina en la región postacrosomal en espermatozoides no capacitados y capacitados.

REFERENCIAS

- [1] Yanagimachi R. Mammalian fertilization 1(1994)190-302.
- [2] Castellani-Ceresa L, Brivio MF., Radaelli G., F-Actin acrosome-reacted boar spermatozoa. 33(1992)99-107.
- [3] Castellani-Ceresa L, Mattili M, Radaelli G., Barboni B., Brivio MF., Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin-D. 36(1993)203-211.
- [4] Moreno Fierros L, Hernández EO, Salgado ZO, Mújica A. F-Actin in guinea pig spermatozoa: its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. 33(2)(1992)172-181.
- [5] Howes EA, Hurst SM, Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction 22(2001)62-72.
- [6] Mullins RD., How WASp-Family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. 12(2000)91-96.
- [7] Delgado-Buenrostro NL., Hernandez EO, Segura M, Mújica A. Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. 70(2005)198-210.
- [8] Trejo R, Mújica A. changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa 26(4)(1990)366-376.

DATOS

TEMA DEL TRABAJO:

II.- CIENCIAS BIOLÓGICAS, MEDICINA Y FORENSE
II.1. BIOLOGIA CELULAR

DATOS DEL RESPONSABLE:

Dra. NORMA LAURA DELGADO BUENROSTRO.

GRADO ACADÉMICO: DOCTORADO EN CIENCIAS “BIOLOGIA CELULAR”.

INSTITUCIÓN: FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA. UNAM

DIRECCIÓN: Av. de los barrios 1 Los Reyes Iztacala Tlalnepantla 54090 México D.F.

TELÉFONO Y CORREO ELECTRÓNICO: Tel. 56231294 Ext. 160. Fax.

56231138. nldb1@hotmail.com nldelgado@campus.iztacala.unam.mx

PLAZA DE CARRERA. **TÉCNICO-ACADÉMICO TITULAR B**

Dra. ADELA MÚJICA MIRANDA.

GRADO ACADÉMICO: DOCTORADO EN CIENCIAS “BIOLOGIA CELULAR”.

INSTITUCIÓN: CENTRO DE ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN AVANZADOS
DEL IPN. CINVESTAV.

DIRECCIÓN: Av. Politécnico Ticomán. 54090 México D.F.

TELÉFONO Y CORREO ELECTRÓNICO: Tel. 57473992.

PLAZA DE CARRERA. **INVESTIGADOR TITULAR D**

QUIMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA. LILIANA CRUZ COBIÁN.

GRADO ACADÉMICO: LICENCIATURA.

INSTITUCIÓN: FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNAM

DIRECCIÓN: Cuautitlán Izcalli s/número Edo de México L-502.

TELÉFONO Y CORREO ELECTRÓNICO: Tel. 11131101. E-mail:

tiggerlili85@hotmail.com

PROFESOR DE ASIGNATURA.

MARIA DEL CARMEN CRUZ ROJAS.

GRADO ACADÉMICO: PASANTE DE QFB. .

INSTITUCIÓN: FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNAM

DIRECCIÓN: Cuautitlán Izcalli s/número Edo de México L-502.

TELÉFONO Y CORREO ELECTRÓNICO:

M en C. NATALIA CHIQUETE FELIX.

GRADO ACADÉMICO: MAESTRIA EN CIENCIAS “BIOLOGIA CELULAR”.

INSTITUCIÓN: CENTRO DE ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN AVANZADOS
DEL IPN. CINVESTAV.

DIRECCIÓN: Av. Politécnico Ticomán. 54090 México D.F.

TELÉFONO Y CORREO ELECTRÓNICO: Tel. 57473992.

Preferencia para presentación: **ORAL.**

