



TESIS DOCTORAL

**Identificación, regulación y estudio
funcional de la proteína quinasa
N-terminal de c-Jun (JNK)
en espermatozoides de mamíferos**

ÁLVARO MIRÓ MORÁN

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

2013



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, y **Dña. Inés María Aparicio Donoso**, Doctora por la Universidad de Extremadura e Investigadora contratada en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

CERTIFICAN

Que la presente memoria presentada por **D. Álvaro Miró Morán**, con el título *Identificación, regulación y estudio funcional de la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) en espermatozoides de mamíferos*, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Extremadura, y entendiendo que se halla finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Cáceres, a 25 de Febrero de 2013.

Dr. José A. Tapia García

Dra. Inés M.Aparicio Donoso



Este trabajo ha sido realizado con cargo a los Proyectos de Investigación BFU2007-62423, BFU2011-30261, PCE1002 y GR10010. Además he disfrutado una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) de referencia BES-2008-002106 asociada al proyecto BFU2007-62423 y una Ayuda Puente para becarios predoctorales, ACCIÓN III. Los organismos y entidades financiadores de esos proyectos y ayudas han sido el Ministerio de Ciencia e Innovación-FEDER, la Junta de Extremadura-FEDER y la Universidad de Extremadura-Banco de Santander.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis José Antonio Tapia e Inés M^a Aparicio por la oportunidad de permitirme realizar esta tesis doctoral, así como por todo el apoyo mostrado durante todos estos años. Además del apoyo quiero agradecer la ayuda y sobre todo la paciencia mostrada, virtud indispensable para poder finalizar esta “carrera de fondo”.

Agradecer al Dr. Fernando Peña del departamento de Reproducción Animal, por la ayuda y por hacerme un hueco en sus laboratorios (pese al *overbooking* que hay siempre) cuando era necesario para desarrollar mis experimentos, así como por todo el material y equipamiento prestado casi a diario y sin el cual hubiera sido imposible realizar este trabajo.

Al Departamento de Fisiología por poner a mi disposición todo lo necesario para la realización de la tesis. A todos los profesores del departamento: Ginés, Rosado Antonio, Pedro Cosme, Pedro Camello y Cristina por toda la ayuda prestada.

A Lauro por ayudarme en los inicios de la tesis e introducirme en el mundo de los espermatozoides y al resto de becarios del departamento: Isaac, Natalia, Letizia, Esther, Patri, Bea, Sara, JJ, Alejandro con los que he compartido el día a día y sin los cuales hubiera sido todo mucho más aburrido.

Como no, agradecer a Merche, por tenernos todo el material perfectamente preparado para que el resto podamos trabajar y por pasarse todo el día cantando por los laboratorios del departamento, convirtiéndose a veces y a partir de ciertas horas en algo cercano a una verbena de pueblo.

Por su puesto a Carmen por su disposición a ayudar en todo momento y por algo crucial como es librarnos de Merche un rato al día llevándosela lejos, permitiéndonos al resto trabajar.

Agradecer también de forma muy especial al resto de investigadores que trabajan en el Departamento de Reproducción, en especial a Juanma,

Carol, Bea y Antolín, parte indispensable en esta tesis y gracias a los cuales he tenido “material” para trabajar a diario.

A todos los demás que están o han ido pasando por el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria: Lourdes, Ángel, Ana Belén, Miriam, Hanene.

Agradecer a todos mis amigos, que aunque a día de hoy, creo que ninguno (o quizás solo uno, Felipe) se ha enterado que he estado haciendo estos años en la Universidad, porque siempre han mostrado un apoyo incondicional y han estado ahí para lo bueno y lo no tan bueno.

Por último, aunque no por eso menos importante, quiero agradecer a mis padres y a mi hermano la ayuda, el apoyo y la confianza mostrada desde que tengo uso de razón.

A mi familia

ABREVIATURAS

- AC: adenilato ciclasa.
- ADP: adenosín difosfato
- Akt: ver PKB.
- AI: Inseminación artificial
- AR : Reacción acrosómmica
- ASK: quinasa reguladora de la señal de apoptosis.
- ATF: factor activador de transcripción.
- ATP: adenosín trifosfato.
- Bcl-2: célula B del linfoma 2.
- BI78-D3: inhibidor específico de JNK.
- BWW: medio de incubación Biggers-Whitten-Whittingham
- CAMK: proteína quinasa dependiente de Ca^{++2} /Calmodulina.
- cAMP: adenosín monofosfato cíclico.
- CASA: sistema de análisis seminal computerizado.
- CNB: proteína de unión a ciclina (*cyclic-nucleotide-binding*)
- DAG: diacilglicerol.
- DLK: proteína quinasa dual de cremallera de leucina
- DUSP: fosfatasa de especificidad dual.
- DNA: ácido desoxirribonucleico.
- Epac: proteína de intercambio activada por cAMP.
- ERK: quinasa regulada por señales extracelulares.
- FSH: hormona foliculoestimulante.
- GDP: guanosín difosfato.
- GTP: guanosina-5'-trifosfato.
- IAPs: proteínas inhibidora de apoptosis
- IL-1: interleucina 1.
- INRA96: diluyente de conservación comercial para semen de caballo.
- IP3: inositol 1, 4, 5-trifosfato.
- IPR: receptor del IP.
- JIP: proteína andamio (*scaffold*) específica de JNK.
- JLP: proteína andamio (*scaffold*) de la ruta de las MAPK.

Abreviaturas

- JNK: quinasa N-terminal de c-Jun (también denominada proteína quinasa activada por estrés o SAPK).
- KMT: diluyente de conservación de semen (*kenney extender*)
- LH: hormona leutinizante.
- LZK: proteína quinasa de cremallera de leucina
- MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos.
- MEK: MAPK/ERK quinasa.
- MKK7: proteína quinasa dual (SEK1/JNKK1)
- MKP: proteína fosfatasa activada por mitógeno.
- MMK4: proteína quinasa dual (SEK2/JNKK2)
- NO: óxido nítrico
- NOS: óxido nítrico sintetasa.
- p38: proteína de la familia de las MAPK con peso molecular de 38 kDa.
- PBS. tampón fosfato salino.
- PDK: proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos.
- PIP3: fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato.
- PIP2: fosfatidilinositol 4, 5-difosfato.
- PKA: proteína quinasa A.
- PKB: proteína quinasa B.
- PKC: proteína quinasa C.
- PKD: proteína quinasa D.
- PLC: fosfolipasa C.
- PLD: fosfolipasa D.
- PTP: proteína tirosina fosfatasa.
- RA: reacción acrosómica
- Rac: proteína G monomérica de la familia Rho
- Ras: proteína G específica de GTPasa
- RNA: ácido ribonucleico.
- ROS: especies reactivas de oxígeno.
- SAPK: ver JNK

Abreviaturas

- SEM: error estándar de la media
- SH2: dominios con homología Src 2.
- TAK1: proteína quinasa de la familia de MLK
- TBM: medio basal de Tyrode.
- TCM: medio completo de Tyrode.
- TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa
- ZP: zona pelúcida.

PREÁMBULO

Para que el espermatozoide pueda llevar a cabo su función es necesario que sufra una serie de transformaciones a través del tracto genital femenino para adquirir su capacidad fecundante. El conjunto de estos cambios recibe el nombre de *capacitación* espermática. Una vez que el espermatozoide llega al óvulo experimenta otro proceso denominado *reacción acrosómica*, que se inicia cuando las proteínas de la membrana del espermatozoide interactúan con los receptores específicos de la zona pelúcida del óvulo, permitiendo a la cabeza del espermatozoide introducirse en su interior y produciéndose, de este modo, la fecundación.

Los cambios de tipo capacitante han sido asociados con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el óxido nítrico (NO^{\bullet}). Se ha demostrado que un nivel adecuado de ROS juega un papel fundamental en la biología del espermatozoide actuando como segundo mensajero, sin embargo cuando el balance entre la producción de ROS y su eliminación por los antioxidantes biológicos está descompensado, se produce un estrés oxidativo y se activan procesos de tipo apoptóticos que comprometen la funcionalidad y la viabilidad espermática. En este sentido, se ha descrito que las ROS afectan a la fertilidad en los humanos debido alteraciones que afectan a procesos funcionales básicos como la capacitación, la movilidad y la morfología. Parte del origen de estas ROS se ha asociado en los últimos años a los malos hábitos de vida de la población mundial, como son el tabaquismo, el sedentarismo, la mala alimentación o el consumo de alcohol y drogas. De igual forma cuando el espermatozoide es sometido a diversos procesos biotecnológicos, como la refrigeración o la criopreservación, se ve sometido a otros tipos agresiones que causan estrés celular de tipo oxidativo, térmico, osmótico y el daño genómico.

En esta tesis hemos estudiado los cambios a nivel molecular que experimentan los espermatozoides de mamíferos sometidos a estrés de

diferentes orígenes valorando la posible implicación de la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK), una proteína de la familia de las MAPK que se activa en respuesta a diversos estímulos, incluyendo el estrés celular, pero que aún no ha sido descrita en espermatozoides. Por lo tanto hemos investigado la presencia y la regulación de esta proteína en espermatozoides, tanto sometidos a estrés como en condiciones fisiológicas, estudiando el papel que esta quinasa podría jugar en la respuesta al daño celular y la regulación de la apoptosis en los espermatozoides de diversas especies de mamíferos.

I. INTRODUCCIÓN	1
1. EL ESPERMATOZOIDE: DESARROLLO Y ESTRUCTURA. _____	3
1.1 LA ESPERMATOGÉNESIS.	3
1.2 MADURACIÓN EN EL EPIDÍDIMO	7
1.3 ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE.....	7
1.4 LA MEMBRANA PLASMÁTICA	12
2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DEL ESPERMATOZOIDE.____	13
2.1 MOVILIDAD.....	14
2.2 CAPACITACIÓN	16
2.3 REACCIÓN ACROSÓMICA.....	18
3. EL ESTRÉS ESPERMÁTICO _____	20
3.1 EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	21
3.2 EL ESTRÉS TÉRMICO.....	24
3.3 ESTRÉS OSMÓTICO	26
4. LA APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES_____	29
4.1 LA APOPTOSIS DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS.....	30
4.2 APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES MADUROS EYACULADOS.....	31
5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA CAPACITACIÓN, REACCIÓN ACROSÓMICA Y MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES _____	32
5.1 VÍA cAMP/PKA	34

Índice

5.2	VÍA cAMP / EPAC	37
5.3	VÍA DAG /PKC	38
5.4	VÍA DE LAS MAPK.....	40
5.5	MAPK EN ESPERMATOZOIDES.....	42
6.	LA QUINASA N-TERMINAL DE c-JUN (JNK) _____	44
6.1	ORGANIZACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE JNK.....	45
6.2	PROTEÍNAS DE ANCLAJE JIP (JNK interacting protein).....	47
6.3	SUSTRATOS DE JNK.....	50
6.4	IMPLICACIÓN DE JNK EN LA APOPTOSIS Y SUPERVIVENCIA CELULAR.....	51
II.	OBJETIVOS	55
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	59
1.	LISTA DE REACTIVOS _____	61
2.	OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS _____	65
3.	MEDIOS DE INCUBACIÓN _____	66
4.	WESTERN BLOTTING _____	69
4.1	OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES TOTALES	70
4.2	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.	72
4.3	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	73
4.4	ELECTROTRANSFERENCIA.....	75
4.5	INMUNOBLOTTING Y DETECCIÓN DE LA SEÑAL	76

5.	CITOMETRIA DE FLUJO _____	79
6.	MEDIDA DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA _____	83
7.	INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA CONFOCAL _____	84
8.	TÉCNOLOGÍA DE CONSERVACIÓN EN LOS ESPERMATOOZIDES DE MAMÍFEROS _____	86
9.	ÁNALISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS _____	88
IV.	RESULTADOS	89
1.	Identificación de la proteína quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) en espermatozoides de mamíferos _____	91
2.	Localización subcelular de la proteína JNK en espermatozoides de caballo. _____	94
3.	Localización subcelular de la proteína JNK en espermatozoides de hombre _____	96
4.	Estudio de la fosforilación de JNK en diferentes condiciones de estrés _____	98
5.	Localización subcelular de la fracción activa (fosforilada) de JNK en espermatozoides de mamíferos. _____	100
6.	Localización subcelular de la fosfatasa la fosfatasa DUSP4 (MKP2) en espermatozoides de mamíferos _____	102
7.	Efecto de la activación de PKA en la fosforilación de JNK ____	103
8.	Localización subcelular de la fracción activa de JNK en espermatozoides incubados con 8-Br-cAMP _____	106

Índice

9.	Efecto de la inhibición de la PKA en la fosforilación de JNK	108
10.	Efecto de la activación de la vía cAMP/Epac en la fosforilación de JNK	110
11.	Estudio del efecto del inhibidor BI-78D3 en la regulación de JNK en los espermatozoides de caballo	113
12.	Efecto de la JNK en la viabilidad espermática a tiempos cortos	116
13.	Estudio del papel de JNK en la regulación de la actividad caspasa en espermatozoides de caballo	118
14.	Papel de JNK en el mantenimiento de los potenciales de membrana mitocondrial	120
15.	Implicación de JNK en la movilidad espermática.	122
16.	Efecto de la refrigeración en la actividad de JNK en semen equino	124
17.	Papel de JNK en la viabilidad de los espermatozoides de caballos a tiempos largos de incubación	126
18.	Papel de JNK en la regulación de la actividad caspasa en espermatozoides de caballos mantenidos en refrigeración	128
19.	Efecto del TNF α en la fosforilación de JNK	130
20.	Estudio de los cambios en la fosforilación de JNK en semen procesado mediante centrifugación en capa simple	134
21.	Estudio de los cambios en la fosforilación de JNK en semen criopreservado	137

22.	Efecto del estrés osmótico en la activación de la JNK _____	139
23.	Estudio de la correlación entre la fosforilación de JNK y la viabilidad en espermatozoides equinos _____	143
24.	Estudio de la actividad de JNK en espermatozoides humanos en donantes fumadores _____	144
V.	DISCUSIÓN	147
VI.	CONCLUSIONES	- 165 -
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	- 169 -

I. INTRODUCCIÓN

1. EL ESPERMATOZOIDE: DESARROLLO Y ESTRUCTURA.

1.1 LA ESPERMATOGÉNESIS.

La espermatogénesis es un proceso ordenado y complejo de diferenciación de las células madres germinales primordiales (espermatogonias) hacia la formación de espermatozoides. Es decir, la espermatogénesis comienza con la división de las células madre y finaliza con la formación de los espermatozoides maduros. Ocurre en los testículos, concretamente en los túbulos seminíferos. Durante el desarrollo fetal, la creación de gametos está en reposo, pero tras el incremento de la concentración de hormonas gonadotróficas (FSH y LH) que generalmente se producen en la pubertad, las células de Leyding secretan testosterona y así da comienzo la espermatogénesis [1]. El proceso se mantiene activo durante toda la vida aunque en los individuos seniles se ha descrito un descenso en la producción de espermatozoides [2-3].

Las gónadas masculinas se componen de varias zonas llamadas lóbulos en las que podemos encontrar multitud de túbulos seminíferos donde se formarán los espermatozoides. La formación comienza en la zona más exterior del túbulo y conforme van madurando y ganando funcionalidad van acercándose al centro, donde una vez formados los espermatozoides viajarán hacia el epidídimo. Por tanto, las espermatogonias, que están situadas en la zona más alejada del centro del túbulo y junto a la membrana basal, tienen la función de dividirse de forma continuada (espermatogonias de tipo A), pero en determinados momentos, algunas de esas espermatogonias (de tipo B) no se dividirán más y formarán los espermatoцитos primarios, que presentan un tamaño mayor (Figura I-1) [1-2, 4].

Introducción

Estas células, van a dividirse mediante meiosis. Al completar la meiosis I [2] constituirán los espermatocitos secundarios, que ya son haploides y tienen un tamaño menor, pero todavía no son maduros. Al completar la meiosis II se formarán las espermatidas, que ya tienen la cantidad de DNA necesaria para la correcta fecundación y posterior desarrollo del nuevo individuo, aunque carecen de la morfología celular adecuada. Estas cuatro espermatidas haploides formadas a partir de la misma espermatogonia se diferenciarán hacia espermatozoides en el proceso conocido como espermiogénesis (Figura I-1). Este es el esquema básico que se produce en el hombre y en la mayoría de primates [1], pero en otras especies de mamíferos se aprecia algún estadio celular adicional, aunque esencialmente el proceso es idéntico [4-5].

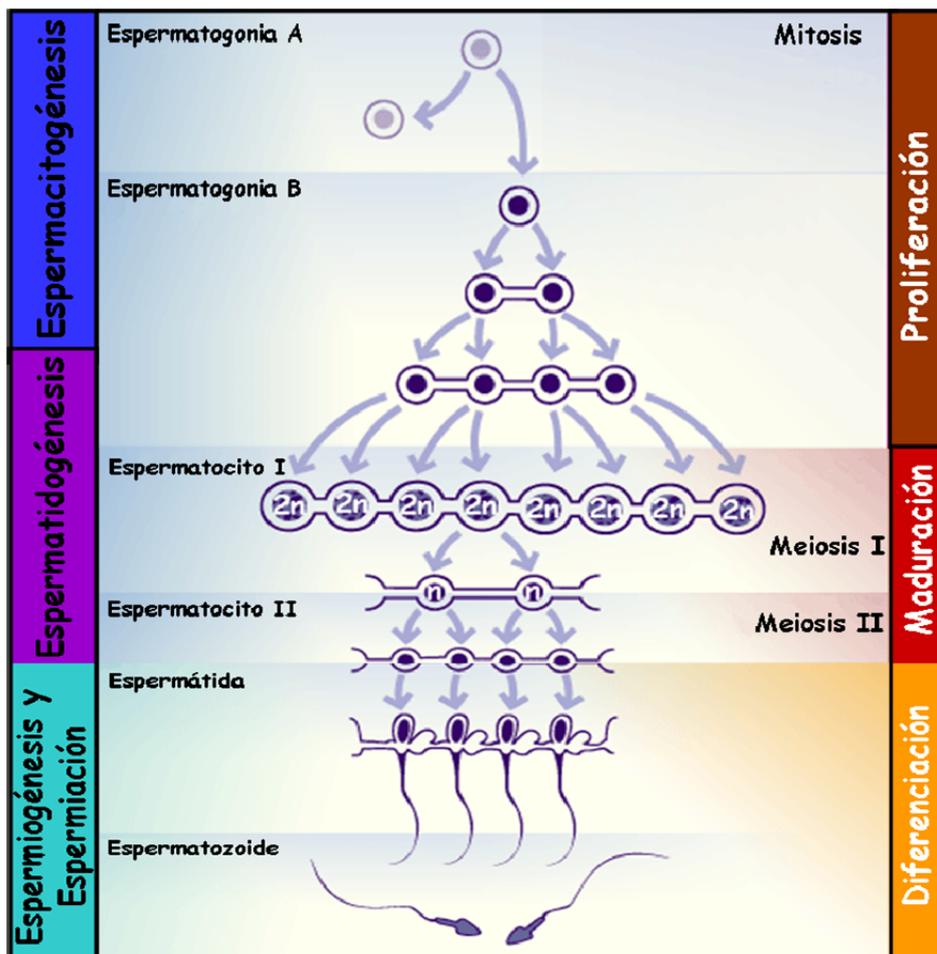


Figura I-1. Esquema de las diferentes fases de la espermatogénesis.

Situados en los túbulos seminíferos también se localizan las células de Sertoli (Figura I-2). Estas células sirven de sustrato trófico y estructural a los espermatozoides que están en proceso de diferenciación [1] desarrollando las siguientes funciones:

- Aportan nutrientes a los espermatozoides en diferenciación.
- Segregan hormonas para el correcto funcionamiento de la espermatogénesis.
- Forman la barrera hemato-espermática.

En el exterior de los túbulos seminíferos encontramos las células de Leydig, que son células productoras de testosterona, y que, por tanto, desde la pubertad aumentarán su secreción para favorecer la maduración de los espermatozoides [6].

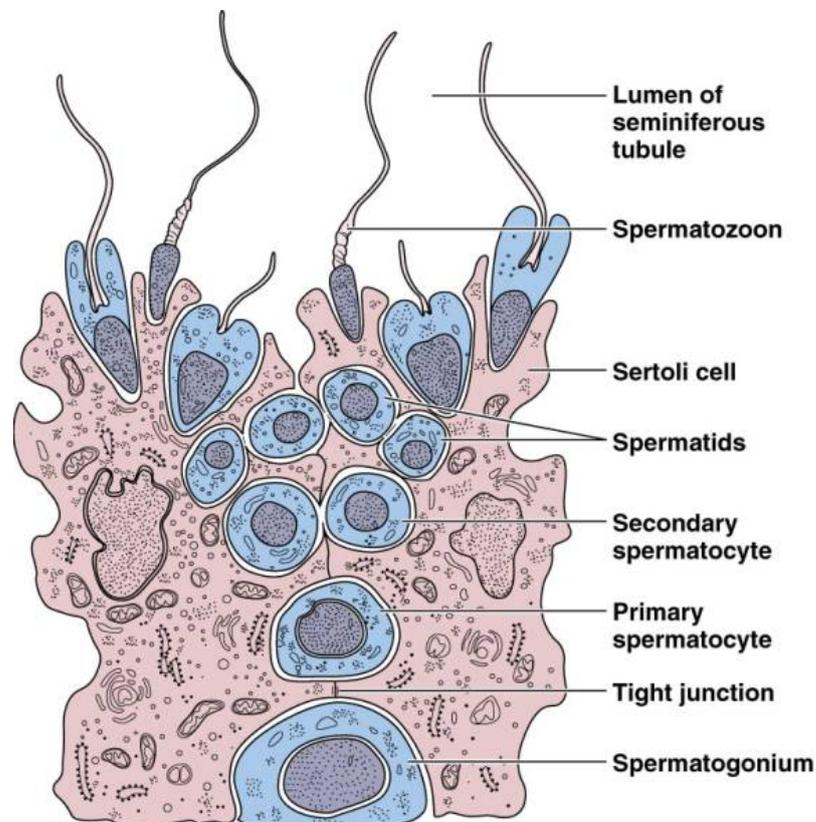


Figura I-2. Organización celular de un túbulo seminífero

Introducción

Durante el proceso de la espermiogénesis, las espermatidas, una vez formadas, van a sufrir una serie de cambios hasta convertirse en espermatozoides maduros [7], entre los que se incluyen:

- Formación del acrosoma, que se produce por la fusión de vesículas del aparato de Golgi, que se unirán entre sí formando una gran vesícula que contendrá enzimas hidrolíticas entre las que encontramos proteasas y las enzimas necesarias para poder penetrar en la zona pelúcida del óvulo.
- El centrosoma va a moverse hacia la cara opuesta del núcleo donde se ha formado el acrosoma. A partir de uno de los centriolos se formará el axonema del flagelo.
- Alrededor de ese axonema flagelar se van a formar una serie de fibras densas rígidas y alargadas que llegarán desde el cuello del espermatozoide hasta el tercio más distal del flagelo.
- Las mitocondrias también van a sufrir un proceso de migración y se colocarán rodeando a la parte proximal del axonema flagelar y las fibras densas.
- El tamaño nuclear se reducirá. Además se va a alargar y aumentar la condensación de la cromatina gracias a que las histonas, que son las proteínas principales encargadas de la condensación cromatínica, son sustituidas por protaminas, que permiten un empaquetamiento del DNA mucho mayor. La mayor parte del citoplasma se condensa y se agrupa formando la gota citoplasmática que será eliminada formando el cuerpo residual. La aparición de un alto porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática es indicativo de falta de maduración epididimaria y se corresponde con una pérdida de fertilidad [8].

1.2 MADURACIÓN EN EL EPIDÍDIMO

Las funciones del epidídimo son el transporte, la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides [8], los cuales, a través de su paso por los conductos eferentes y el epidídimo, adquieren la habilidad de tener movimiento progresivo lineal y la capacidad de fecundar. Durante este tránsito, ocurren cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos en la célula espermática [2, 8]. También se produce la reabsorción e intercambio de fluidos. Específicamente, en la cabeza del epidídimo ocurre la reabsorción de solutos y fluidos, en el cuerpo del epidídimo las etapas últimas de maduración espermática, y en la cola del epidídimo el almacenamiento de los espermatozoides fértiles [2].

En su origen, los espermatozoides son incapaces de moverse, de ahí que el transporte inicial a la *rete testis* es dependiente del fluido secretado por las células de Sertoli [2, 8].

1.3 ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

La función de los espermatozoides es llegar al óvulo y fecundarlo. Para conseguir ese objetivo, el espermatozoide cuenta con una morfología muy especializada. El espermatozoide se divide en dos partes principales: la cabeza, y la cola. La cabeza está unida a la cola por una estructura intermedia denominada pieza conectora. Rodeando a todas estas estructuras se encuentra la membrana plasmática (Figura I-3) [9].

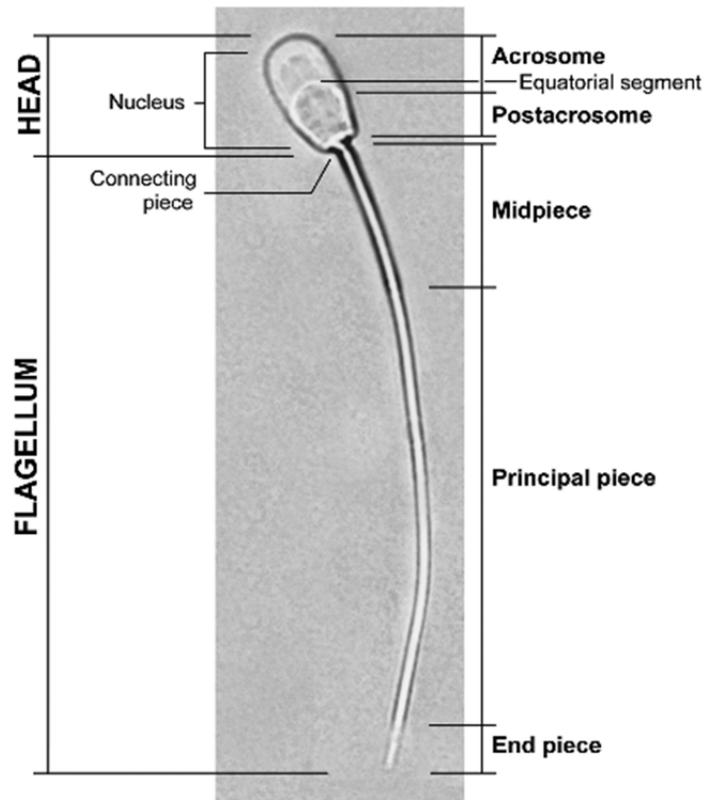


Figura I-3. Estructura del espermatozoide

1.3.1 CABEZA

Las estructuras más reseñables dentro de la cabeza son el acrosoma, el núcleo y el citoplasma (Figura I-4).

ACROSOMA

Es una estructura vesicular de gran tamaño derivada del aparato de Golgi que se forma en las últimas fases de la espermatogénesis y que está situada en la parte apical de la cabeza [10].

Está delimitado por una membrana denominada membrana acrómica o acrosomal. La región de la membrana que se encuentra justo debajo de la membrana plasmática se denomina membrana acrosómica externa y la

región de la membrana adyacente al núcleo se denomina membrana acrosómica interna [11].

El acrosoma contiene en su interior enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa, α -D-galactosidasa, la α -D-manosidasa o la β -D-glucuronidasa capaces de digerir la matriz extracelular del óvulo (zona pelúcida), permitiendo así la fecundación. Estas enzimas se liberarán mediante la exocitosis del acrosoma en un proceso conocido como reacción acrosómica [12].

NÚCLEO

Se sitúa en la parte de la cabeza que queda detrás del acrosoma, o zona post-acrosómica. En el núcleo espermático el DNA aparece muy condensado debido a que durante la espermatogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas. En el núcleo también aparece RNA que tiene funciones aún desconocidas [13].

CITOPLASMA

Los espermatozoides maduros tienen un citoplasma muy reducido. La mayor pérdida del citoplasma se produce cuando los espermatozoides se van a liberar hacia el epitelio de los túbulos seminíferos. Al fragmento de citoplasma que se pierde se denomina cuerpo residual, el cual contiene RNA empaquetado, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas y peroxisomas y son fagocitados por las células de Sertoli.

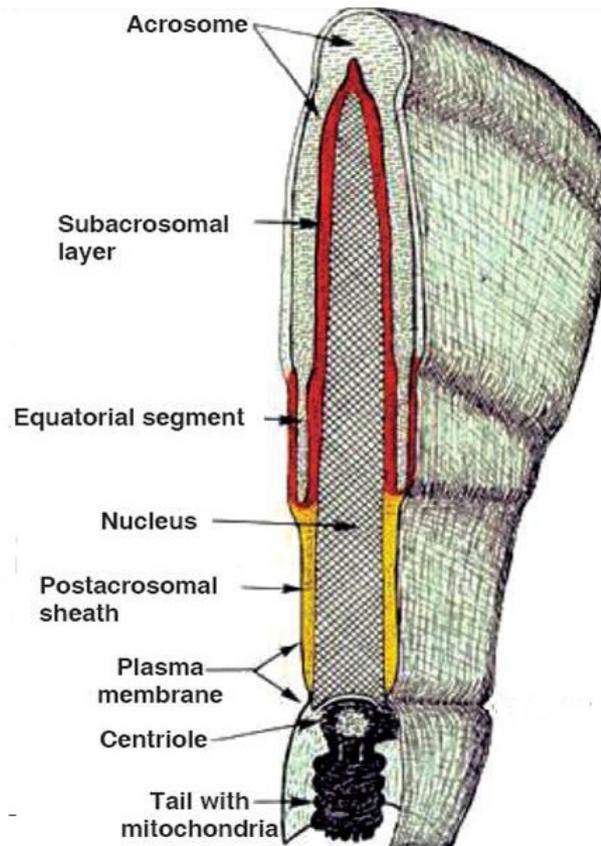


Figura I-4. Estructura de la cabeza del espermatozoide.

1.3.2 COLA O FLAGELO

La cola de los espermatozoides tiene una estructura compleja y especializada con el fin de proporcionar movimiento a la célula. Morfológicamente se divide en tres partes: pieza intermedia, pieza principal y pieza final (Figura I-5). Los espermatozoides utilizan el flagelo para moverse, gracias a una estructura denominada axonema, en un proceso que requiere energía. El axonema está formado por microtúbulos compuestos de tubulina- α y proteínas unidas a estos y, en el caso de los espermatozoides, su estructura se mantiene a lo largo de toda la cola. En un apartado posterior se analiza en más detalle los mecanismos moleculares que producen el movimiento [14].

PIEZA INTERMEDIA

Está formada por el axonema y alrededor de él encontramos 9 fibras densas externas. Alrededor de estas fibras hay un anillo de mitocondrias de gran tamaño y finalmente, rodeándolo todo, está la membrana plasmática. En esta pieza se crea la mayor parte de ATP necesario para el movimiento flagelar [14], aunque en el espermatozoides de mamíferos también se ha descrito producción de ATP independiente de la mitocondria [14-15].

PIEZA PRINCIPAL

Aquí también encontramos las fibras densas externas rodeando el axonema pero las fibras en posición 3ª y 8ª están sustituidas por dos columnas de fibras membranosas. Estas dos columnas se encuentran unidas. Finalmente, esta la membrana plasmática se encuentra rodeando toda esta estructura. En esta pieza también se crea ATP [14].

PIEZA TERMINAL

Esta parte está formada por el axonema y la membrana plasmática. (Figura I-5).

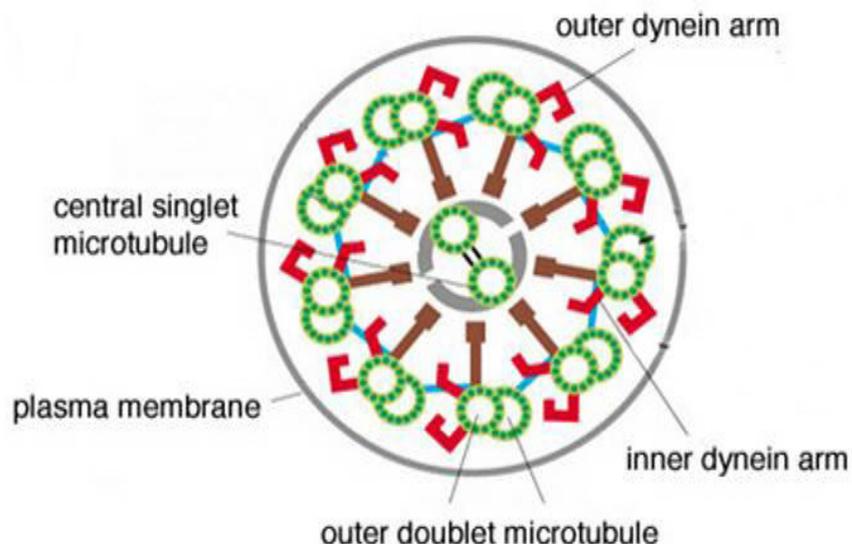


Figura I-5. Esquema de la estructura del axonema del espermatozoide.

1.4 LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Todo el espermatozoide está rodeado por la membrana plasmática, la cual se organiza en áreas especializadas y forma el componente más externo del espermatozoide. Permanece intacta durante todo el proceso de fecundación, excepto en la región del acrosoma previo a la fecundación, o como resultado de la muerte del espermatozoide [10, 16].

Estructuralmente se compone de tres capas o zonas: bicapa lipídica, interfase fosfolípidos-agua y glicocalix.

La bicapa lipídica esta subdividida en fosfolípidos polares, que se orientan de tal forma que los grupos de cabezas polares hidrofílicas están situadas externamente y las cadenas de ácidos grasos orientadas internamente unas a otras. La mayoría de los lípidos presentes son fosfolípidos y colesterol. La cantidad de colesterol, relativo al fosfolípido, determina la fluidez de la membrana. En general mientras más alta la concentración relativa de los fosfolípidos, más fluida es la membrana. El colesterol, por lo tanto, actúa junto con proteínas integrales como un estabilizador, asegurando una configuración laminar de los fosfolípidos y de la bicapa. Es sabido que la concentración de colesterol varía entre las zonas de la membrana [10, 16]. Además el ratio entre colesterol y fosfolípidos presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides varía entre las diferentes especies siendo de 0,26, 0,30, 0,30 o 0,45 en verraco, gallo, caballo y toro respectivamente [17].

Todos los lípidos pasan por una fase de transición, desde un estado fluido o líquido-cristalino, en el cual las cadenas de ácidos grasos están relativamente desordenadas, a un estado de gel, en el cual las cadenas de ácidos grasos están cada vez más rígidas y paralelas a medida que la temperatura disminuye [18]. El pico de temperatura de fase de transición para fosfolípidos en potros es 20,7 °C, comparado con 24 °C, 25,4 °C y 24,5 °C en verraco, toro y gallo respectivamente [17]. Es posible que estas

diferencias reflejen las distintas tolerancias de los espermatozoides de diferentes especies a las rápidas disminuciones de temperatura.

Las proteínas se encuentran también entre los lípidos y suponen hasta un 50% del peso de la membrana plasmática. Estas proteínas actúan como proteínas estructurales (integrales) y como puntos de unión para otras proteínas periféricas. Las estructurales pueden también actuar como canales o poros a través de los cuales pequeñas moléculas pueden pasar al citoplasma de los espermatozoides. Las proteínas de unión actúan como receptores de superficie para otras proteínas periféricas desde el medio que las rodea, por medio de sus cadenas laterales de carbono cargadas negativamente [18].

El siguiente área de la membrana es la interfase agua-fosfolípido, que es la unión entre los grupos de cabezas polares hidrofílicas de la capa lipídica y el medio circundante (principalmente agua) y en el cual se encuentra el glicocalix. El glicocalix es una capa externa de polisacáridos del espermatozoide. Su función exacta no es clara, pero se piensa que está involucrado en antigenicidad, adherencia celular y permeabilidad específica. Es sabido que dentro del glicocalix existen uniones para proteínas periféricas. Estas proteínas son provenientes del plasma seminal y actúan estabilizando al espermatozoide durante su paso por el tracto masculino y femenino. También pueden estar involucradas en la capacitación [18].

2. CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DEL ESPERMATOZOIDE.

Como se ha mencionado anteriormente, la función del espermatozoide es la de transportar el material genético paterno hasta el óvulo materno y fusionarse con él. Para que esto ocurra han de producirse una serie de modificaciones que en conjunto se denominan *capacitación*. Esta implica cambios en la concentración intracelular de iones,

Introducción

fundamentalmente calcio ($[Ca^{2+}]_i$) y bicarbonato (HCO_3^-), se produce también un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), 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 (S/T), como en residuos de tirosina (Y). Además, la capacitación se acompaña de un marcado incremento de la capacidad cinética del espermatozoide y se produce la activación selectiva de vías como la del cAMP/PKA. Todo esto permitirá al espermatozoide adquirir el movimiento flagelar necesario para llegar al óvulo y posteriormente experimentar la reacción acrosómica (RA).

2.1 MOVILIDAD

La movilidad podemos definirla como la capacidad de desplazamiento de los espermatozoides. Tras la espermatogénesis los espermatozoides son inmóviles, adquiriendo su movilidad a su paso por el epidídimo. La movilidad de los espermatozoides es fundamental para la fertilidad en los mamíferos [19]. Los espermatozoides móviles, dentro del plasma seminal, muestran trayectorias lineales que se correlacionan con las que fisiológicamente mostrarían al penetrar el moco cervical [14].

El conjunto de microtúbulos y de proteínas que forman el axonema van a ser los responsables del movimiento de la cola del espermatozoide. Cuando los brazos de dineína del axonema se fosforilan, se produce su activación, hidrolizando ATP y liberándose energía. La energía liberada permite que los brazos de dineína interactúen con el microtúbulo B del par de microtúbulos adyacente generando el deslizamiento de un par de microtúbulos sobre el otro. Debido a que el axonema está anclado en la base de la cabeza del espermatozoide esta fuerza deslizante se transforma en un movimiento ondulante en la cola. La defosforilación de la dineína por la calcineurina, una fosfatasa dependiente de calmodulina, permite la liberación del microtúbulo al que se había unido, de manera que el axonema vuelve a su posición de partida y comienza de nuevo a doblarse en dirección

contraria. Debido a que la dineína sólo produce la fuerza en una única dirección, la producción de un movimiento ondulatorio requiere que la fosforilación/defosforilación y por tanto la activación y la inactivación de la dineína sea de forma asincrónica a lo largo de todo el axonema [20].

2.1.1 FUENTES DE ENERGÍA IMPLICADAS EN LA MOVILIDAD

La estructura móvil del axonema necesita ATP para poder activarse y provocar el movimiento de la cola del espermatozoide. El ATP es producido en las mitocondrias mediante el proceso de la respiración mitocondrial, sin embargo, estos orgánulos sólo se encuentran en la pieza intermedia del espermatozoide, mientras que el axonema se extiende a lo largo de toda la cola del espermatozoide. Esto parece implicar que el ATP mitocondrial tendría que difundir a lo largo de la cola del espermatozoide para suministrar la energía necesaria para el movimiento del espermatozoide [21]. Sin embargo, simulaciones matemáticas han demostrado que el ATP producido en la pieza intermedia es insuficiente para permitir la motilidad del espermatozoide [21]. Además, en espermatozoides de ratón que presentaban anomalías en la respiración oxidativa mitocondrial, se ha observado que había una producción de ATP y un mantenimiento de la motilidad [21]. Por lo tanto, todos los estudios descritos indican que el ATP que permite el movimiento flagelar no procede sólo de la oxidación mitocondrial [21]. Diversos estudios indican que el ATP puede provenir del metabolismo no oxidativo de la glucosa, ya que se produce un aumento en la concentración de ATP en espermatozoides humanos cuando se añade tanto glucosa como fructosa al medio de incubación observándose una correlación significativa entre la concentración de ATP y el porcentaje de espermatozoides móviles [22]. Además, se ha observado que la gliceraldehído 3-fosfatasa deshidrogenasa, una enzima que interviene en la glucólisis, se encuentra unida covalentemente a la vaina fibrosa en la pieza principal del espermatozoide, indicando su posible papel en la regulación de la motilidad [23].

Introducción

La mayoría de los espermatozoides de mamíferos muestran dos tipos de movimientos dependiendo de las condiciones en las que se encuentren. En eyaculados frescos se produce una activación de la motilidad caracterizada por un movimiento simétrico de baja amplitud de onda y que conduce al espermatozoide en línea recta. Sin embargo, cuando los espermatozoides han capacitado se produce una hiperactivación de la motilidad, donde la cola del espermatozoide genera un movimiento asimétrico y de alta amplitud [20]. Yanagimachi en 1969 fue el primero que mostró el movimiento hiperactivado del espermatozoide, describiendo que la cola del espermatozoide de hamster comenzaba a batir vigorosamente cuando adquiría la capacidad de fecundación, siendo este movimiento mayor que el observado anteriormente [24]. Esto sugiere que el espermatozoide sufre primero una activación en la motilidad para poder atravesar el tracto genital de la hembra, y, posteriormente, una hiperactivación que le permitirá llegar al sitio de fecundación y penetrar la zona pelúcida del ovocito [20].

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** [25]. 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 [26]. 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 [27]. 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 [28]. 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 [26]. 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 esfingomieline cambian de posición dentro de la bicapa lipídica [13, 29-30].

Se ha sugerido que el movimiento transmembrana del bicarbonato podría ser el responsable del aumento intracelular de pH [31]. Esta alcalinización del citoplasma del espermatozoide provoca la apertura de canales de calcio y por tanto, la entrada masiva de este catión [32] 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* [33-34].

Estos iones van a ser los responsables de la activación de la adenilato ciclasa (AC) soluble que produce adenosín monofosfato cíclico (cAMP), el cual va iniciar la activación de numerosas cascadas de señalización a través de la activación de la proteína quinasa A (PKA). Esta vía del cAMP/PKA se activa en los espermatozoides de diferentes especies de mamíferos durante la capacitación y como veremos más adelante, tiene

Introducción

un papel fundamental en la regulación de este proceso [35-37]. La activación de la vía del cAMP/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 [38-39].

Como todas las células que viven bajo condiciones aeróbicas, los espermatozoides producen especies reactivas de oxígeno (ROS) originadas en su actividad metabólica. Los espermatozoides generan anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) el cual espontáneamente o enzimáticamente se transforma en peróxido de hidrógeno [30]. Debido a su baja reactividad y estabilidad, el $O_2^{\cdot-}$ no es muy tóxico pero cuando reacciona con sus dianas celulares puede producir especies más activas [30]. Se ha demostrado que, a pesar de la toxicidad que pueden representar las especies reactivas de oxígeno, son completamente necesarias para que se produzca un aumento en la capacitación [40]. La adición de bajas concentraciones de H_2O_2 acelera el desarrollo de la capacitación en espermatozoides humanos [41].

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 [42]. 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 [43-44]. 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 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 [45].

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 [46]. 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 [47]. 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 [47-48].

La PKC induce entrada de calcio a través de la activación de canales de calcio situados en la membrana plasmática [47]. Además, el vaciamiento de los depósitos de calcio provocado por el IP3 induce una entrada de calcio desde el exterior a través de canales (SOC) [38]. Este aumento de calcio citoplasmático es un paso crítico que regula la reacción acrosómica [49]. Tanto es así, que en los espermatozoides incubados en un medio libre de calcio no es posible inducir la AR [26].

3. EL ESTRÉS ESPERMÁTICO

Todas las células, aún en condiciones fisiológicas, se encuentran expuestas a agresiones que causan cierto nivel de estrés procedente de diferentes orígenes. En el caso del espermatozoide este esquema también es de aplicación puesto que este tipo celular está sometido a gran cantidad de estrés a lo largo de su ciclo vital, afectando a su integridad estructural y funcional, y, consecuentemente, provocando una pérdida de su capacidad fecundante. Por este motivo muchos grupos de investigación se han centrado en los últimos años en estudiar el estrés y los fenómenos derivados del mismo que sufren los espermatozoides, tanto en los procesos reproductivos fisiológicos o normales, como en los derivados de procesos biotecnológicos tales como la refrigeración o la criopreservación (entendida como congelación y descongelación del semen) [50].

En este sentido, en las últimas décadas la criopreservación de semen y la utilización del semen refrigerado en inseminación artificial han causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana [51]. Sin embargo, la fertilidad del semen en estos casos es inferior a la del semen fresco. La reducción de la fertilidad descrita está relacionada, obviamente, con la muerte de las células que no soportan la refrigeración o el proceso de congelación y descongelación, pero también con daños subletales instaurados en la población espermática que sobrevive a estos procesos [50, 52]. Este último fenómeno, es decir, la existencia de daños subletales en la población superviviente al proceso de criopreservación y una reducción concomitante de la capacidad fecundante, se conoce desde hace tiempo. Por ejemplo, Crister, ya en la década de los 80, describió que los espermatozoides descongelados móviles y con membranas (aparentemente) intactas, no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco [53]. A partir de las primeras descripciones, las causas que subyacen a esta pérdida de fertilidad han sido estudiadas por diversos grupos, que han abordado el estudio del

estrés oxidativo, el térmico y, sobre todo, el osmótico, como los principales factores responsables del daño espermático derivado de la criopreservación.

3.1 EL ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas de oxígeno, conocidas como ROS por sus siglas en inglés, son agentes oxidantes altamente reactivos que forman parte de una clase de moléculas conocidas como *radicales libres*. Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones desapareados, y, por tanto, pueden ser generados en procesos bioquímicos que impliquen transferencia de electrones [54]. Las ROS se producen continuamente en el organismo. Bajo ciertas condiciones el oxígeno inerte puede inicialmente reaccionar con moléculas orgánicas a través de procesos bioquímicos dando lugar a la formación de intermediarios moleculares que son altamente reactivos. Éstos se producen durante el metabolismo celular normal y reaccionan muy rápidamente con la mayoría de los compuestos orgánicos desencadenando una serie de reacciones que modifican la estructura de algunas moléculas biológicas, particularmente de aquellas que poseen un alto contenido de ácidos grasos polinsaturados [54-55].

Entre las ROS destacan fundamentalmente el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo (-OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [56-57]. El H_2O_2 no posee electrones libres y por lo tanto no es un radical libre, sin embargo, es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales -OH en presencia de metales de transición. Por su parte la interacción del radical -OH con el material genético modifica el DNA, pudiendo generar mutaciones y deleciones de la molécula [56-58].

Parece ser que el principal mecanismo de producción de ROS en los espermatozoides equinos es consecuencia de la acción de una NADH oxidasa específica (NOFX5), presente en la membrana plasmática de la cabeza de los espermatozoides y en las mitocondrias [59-60]. Aunque en un principio el anión superóxido (O_2^-), fue propuesto como el principal ROS

Introducción

generado en los espermatozoides equinos, se ha demostrado que la vida media de éste anión es muy corta ya que rápidamente es transformado en H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa (SOD), siendo ésta última molécula más perjudicial para los espermatozoides de caballo que el propio anión precursor [61-62].

En condiciones fisiológicas existe una pequeña generación de ROS promovida por Ca^{2+} y en la que participa NOFX5. Esta generación de ROS en los espermatozoides parece tener gran importancia en la inducción de la capacitación y en concomitante aumento de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina [62]. Además de la generación basal o fisiológica de ROS, se ha demostrado que la generación de ROS aumenta en algunas especies cuando hay daño asociado, por ejemplo, a procesos de criopreservación, o cuando existen anomalías morfológicas en el espermatozoide [61]. El hecho de que pequeñas concentraciones de ROS sean inductores, en parte, de la capacitación espermática en caballo y en otras especies, podría ser de gran importancia en las técnicas de preservación del semen, debido a que durante la criopreservación se produce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, aumentando las ROS y disminuyendo la capacidad antioxidante del semen, lo que, en conjunto, provocaría una inducción prematura de la capacitación [63], causando, por tanto, una disminución en la longevidad del semen criopreservado [64].

En cuanto a los efectos nocivos que producen las ROS en los parámetros funcionales de los espermatozoides, se ha demostrado que cuando los espermatozoides de caballo son expuestos a ROS provenientes de una fuente externa, se produce un aumento en la concentración de H_2O_2 , observándose una disminución en la movilidad espermática [58]. Este descenso en la movilidad se produce sin observarse un descenso en la viabilidad, la integridad de membrana mitocondrial o una pérdida de los potenciales de membrana mitocondrial. Por tanto, parece ser que la movilidad espermática podría ser uno de los primeros parámetros afectado

por el estrés oxidativo, pudiendo servir como indicador de este proceso en sus etapas iniciales [58].

Por otro lado está bien caracterizado como las ROS producen daños en el DNA en diversos tipos celulares, incluyendo el espermatozoide. De hecho, en el espermatozoide equino existe una correlación positiva entre el daño genómico y la concentración de ROS a la que son expuestas [65]. Además, el daño genómico inducido por estrés oxidativo puede ser bloqueado mediante la acción de catalasas, pero no de SOD, lo que apunta a que el H_2O_2 podría ser el principal responsable del daño en el DNA de espermatozoides de caballo. Durante el almacenamiento de semen de caballo se ha detectado un importante aumento en el daño del DNA, sin embargo la adición a los diluyentes de criopreservación de antioxidantes (ácido ascórbico, glutatión o α -tocoferol), ni de *scavengers* de radicales libres (catalasa, superóxido dismutasa), no parecen reducir la fragmentación del DNA derivada de los procesos de congelación/descongelación o de la refrigeración [65-67]. En contraposición, se ha demostrado que la adición de SOD a los diluyentes de criopreservación aumenta considerablemente la fragmentación del DNA de los espermatozoides, sugiriéndose de nuevo que el H_2O_2 parece ser la ROS que mayor daño genómico produce en espermatozoides de esta especie [68].

Por su parte, la membrana plasmática de los espermatozoides se caracteriza por contener gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que son susceptibles a sufrir daño por peroxidación [69]. El H_2O_2 y el O_2^- no poseen energía suficiente para comenzar la peroxidación lipídica per sé, sino que requieren el concurso de un metal de transición (como el Fe^{2+}) que actúe como catalizador de la reacción [69]. La peroxidación de los lípidos insaturados de la membrana plasmática del espermatozoide provocado por un exceso de H_2O_2 disminuye la fluidez de la membrana e incrementa su permeabilidad a iones de manera no específica afectando la funcionalidad del espermatozoide y por tanto a su fertilidad [40]. Aunque la peroxidación lipídica ha sido demostrada en los espermatozoides de caballo, parece que

Introducción

los espermatozoides de esta especie son más resistentes al proceso que los de otras especies [70]. Sin embargo, tanto en la criopreservación como durante la refrigeración (5 °C) de los espermatozoides equinos se ha observado un aumento en la susceptibilidad a la peroxidación lipídica, haciéndose especialmente pronunciado en la pieza intermedia [68, 70-71].

Por último, para paliar los efectos deletéreos provocados por las ROS en los espermatozoides, en el plasma seminal existen diversas moléculas conocidas como *scavengers* o neutralizadores de las ROS, algunas de las cuales ya han sido previamente enumeradas. Entre éstas, destacan la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD) o la glutatión peroxidasa (GPx), cuya concentración y actividad es variable en función de la especie [67]. Además de éstas enzimas se han identificado en el plasma seminal otros componentes que contrarrestarían la acción de las ROS como la albumina, la taurina, el ácido ascórbico, el tocoferol, el lactato o el piruvato [68, 72].

3.2 EL ESTRÉS TÉRMICO

Desde hace tiempo se sabe que el enfriamiento del semen de diferentes especies de 30 a 8 °C, provoca un estrés letal en las células proporcional a la velocidad de enfriamiento y al intervalo de temperatura, fenómeno conocido como estrés o choque por frío [73]. Los estudios bioquímicos realizados han demostrado que, debido a este fenómeno, se produce una pérdida de proteínas y lípidos, dando lugar a daños morfológicos que afectan principalmente a la membrana plasmática y al acrosoma [74].

En los espermatozoides de cerdo se ha demostrado como éste fenómeno sucede inmediatamente después de la eyaculación, y, a medida que pasa el tiempo, los espermatozoides se van haciendo menos sensibles a este daño, de hecho experimentos desarrollados con espermatozoides de esta especie incubados a temperatura ambiente en su propio plasma seminal, mostraron gran resistencia al choque por frío incluso 16 horas

después de la eyaculación, parece que debido a que las membranas se alteran de tal forma pasado un tiempo que hace a la célula más resistente [75]. Debido a esto se ha sugerido que para criopreservar semen porcino es conveniente que pase un tiempo de entre 18-24h tras la eyaculación para minimizar el daño [76]. Por otra parte, se ha determinado que los espermatozoides testiculares y epididimarios de la cabeza y cuerpo del epidídimo, parecen ser más resistentes al choque frío que los espermatozoides de la cola del epidídimo y del eyaculado [51].

La explicación del choque por frío aún no está esclarecida, pero se cree que está relacionada a la transición de fase de los lípidos de la membrana, resultando en una separación de fase y por consiguiente una pérdida de la permeabilidad selectiva de las membranas biológicas [77]. La composición de los ácidos grasos de la membrana plasmática juega un papel importante en la susceptibilidad al estrés térmico. Especies con un ratio de ácidos grasos poliinsaturados:saturados cercano a la unidad son más resistentes, mientras que las membranas más susceptibles tienen ratios superiores a 2.5, como es el caso del cerdo [78]. Además, la cantidad de colesterol presente en la membrana influye en el comportamiento térmico de la misma, ya que el colesterol interactúa con las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos [73] inhibiendo la cristalización de los hidrocarburos a bajas temperaturas. De forma que con altos niveles de colesterol en membrana se reduce o incluso se elimina la transición de fase de los fosfolípidos [79]. Darin-Bennet y White [78] observaron que existían diferencias en el ratio colesterol/fosfolípidos entre especies y que las especies con bajo ratio (menor de 0,6 como en cerdos, caballos, moruecos, toros o cabras) eran más susceptibles a la congelación que las especies con alto ratio (próximo a 1), como los conejos o el hombre [17, 73, 80]. Además se ha puesto de manifiesto que la adición de colesterol a la membrana de los espermatozoides que poseen bajo ratio colesterol/fosfolípidos aumenta su supervivencia al enfriamiento y a la congelación [81].

Introducción

El contenido en colesterol de las membranas puede ser modificado mediante el uso de ciclodextrinas [82] las cuales son capaces de transferir el colesterol o de extraer el colesterol, en función de las necesidades, de las membranas de muchos tipos de células, incluidos los espermatozoides. Esta transferencia se cree que se produce mediante gradiente de concentración. Diversos autores han demostrado que la incubación de los espermatozoides de algunas de las especies que presentan bajo ratio colesterol/fosfolípidos con ciclodextrinas saturadas de colesterol antes de la congelación, mejora la supervivencia de los espermatozoides a la crioconservación. Esta mejora se ha observado en diversas especies, incluido en los espermatozoides de caballos [83].

Las alteraciones relacionadas con la temperatura y que afectan a la organización de los componentes estructurales de la membrana plasmática tienen efectos negativo sobre los espermatozoides, reflejándose en cambios asociados a la permeabilidad de las membrana y por consiguiente, en una pérdida de la capacidad de experimentar la fusión, afectando a la AR [84].

Además, y sin lugar a dudas, la temperatura es uno de los factores más importantes que hace variar la motilidad espermática, así Holt y cols. (1988) observaron que al enfriar a 16°C espermatozoides de carnero, un 50% de las piezas intermedias del flagelo dibujaban un arco, y si la temperatura seguía descendiendo disminuía la motilidad progresiva de los espermatozoides perdiéndose todo el movimiento flagelar si se alcanzaba los 14°C [85-86].

3.3 ESTRÉS OSMÓTICO

Se define como volumen isoosmótico a aquel que presentan las células en una solución isotónica siendo de 300 mOsm a lo que al espermatozoide se refiere. En espermatozoides de humanos, otros primates, de cerdo y de toro el volumen isoosmótico puede variar en un rango que oscila entre los 20-28 μm^3 . En el caso del espermatozoide equino este

volumen se ha establecido en $24,4 \mu\text{m}^3$ [87]. Sin embargo, los espermatozoides de esta especie pueden alcanzar un volumen de 1,6 veces su volumen isotónico en soluciones de 75 mOsm [61] aunque se ha descrito que pueden tolerar variaciones de 100 mOsm, con respecto a la isoosmolaridad, sin experimentar cambios significativos e irreversibles en su motilidad y viabilidad. Esto es posible ya que los espermatozoides utilizan diferentes mecanismos que regulan el volumen, como son el transporte a través de la membrana plasmática y cambios en su metabolismo [68]. Sin embargo, la capacidad del espermatozoide para variar su volumen y adaptarse al medio depende de varios factores, como la especie, la composición de su membrana, la temperatura a la que se producen los cambios de fase en los lípidos de la membrana, la permeabilidad al agua, la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa, canales de agua como las aquaporinas y los canales iónicos presentes en la membrana [88].

Existe un considerable interés en estudiar el estrés osmótico como uno de los factores más importantes asociados al daño que se produce durante la criopreservación del semen. Este tipo de estrés se produce debido a un cambio en el volumen celular, derivado del movimiento de agua y de solutos a través de la membrana plasmática del espermatozoide, provocando daño en el mismo [61]. Actualmente existen dos hipótesis comúnmente aceptadas para explicar el daño derivado de la criopreservación en este sentido [89]. Por un lado, se ha establecido que, cuando el enfriamiento de los espermatozoides se produce demasiado rápido, se forman cristales de hielo intracelulares deletéreos para los mismos, por el contrario si el enfriamiento es demasiado lento las células pueden morir por la exposición prolongada a los solutos resultantes de la conversión de agua en hielo [90].

Aparte del shock osmótico producido en la congelación, durante la descongelación los espermatozoides están expuestos a un ambiente hipotónico, esto provoca un aumento en el volumen del espermatozoide debido al incremento de afluencia de agua en el interior de la célula, ya que,

Introducción

al igual que antes, los solutos de uno y otro lado de la membrana tienden a equilibrarse [90]. Por tanto, el estrés osmótico en espermatozoide se produce por un daño que podemos considerar como doble, por un lado el hiperósmotico al congelar las células, seguido de un estrés hiposmótico al descongelarlas. Estudios tanto en nuestro laboratorio [91], como en otros [87], han demostrado que ésta secuencia de pasos por estados aniosmolares, aún transitoria, es mucho más dañina para los espermatozoides que la exposición prolongada a un medio hiperosmolar. Resultados similares se obtuvieron en otras especies como monos Rhesus, ratón o toro, entre otras [92-93].

Sin embargo, la susceptibilidad de los espermatozoides a sufrir estrés osmótico es bastante variable en función de la especie y, como se ha indicado anteriormente, parece que la composición de los ácidos grasos de la membrana debe ser considerado un factor importante en la calidad del semen en general y en la capacidad de congelar en particular [94]. Actualmente, para reducir el estrés químico y físico derivado del enfriamiento, congelación y posterior descongelación, al diluyente de conservación se le añaden sustancias crioprotectoras como son el glicerol, etielenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenglicol o el propanodiol [95]. El problema que esto presenta es que a veces la concentración de crioprotectores empleada es muy alta, llegando a ser citotóxica, produciendo un choque osmótico muy importante en la célula. Por ello se deben añadir crioprotectores a concentraciones muy estudiadas para conseguir el efecto protector pero sin dañar los espermatozoides [96].

Cuando el espermatozoide está suspendido en un entorno hipertónico, se produce una pérdida de agua intracelular, la cual es dependiente de la velocidad de enfriamiento, de esta forma el espermatozoide va perdiendo agua hasta que las concentraciones de soluto intra y extracelulares se equilibran [97].

Además de todo lo expuesto anteriormente, se ha descrito como la exposición de espermatozoides de caballo a estrés hipo o hiperosmótico

provoca un aumento en la generación de ROS, más concretamente de O_2^- , lo que afecta a la viabilidad espermática, demostrándose así una estrecha relación entre los dos tipos de estrés [98]. Aunque este mecanismo de interacción no está bien caracterizado, estudios en otros tipos celulares sugieren que la activación de la fosfolipasa A2 asociada a la membrana (PLA2), con la consecuente activación de una NADH oxidasa, podría ser el principal mecanismo de generación del anión superóxido a partir de estrés osmótico [99]. Sin embargo, en espermatozoides de hombre se ha observado como productos de la PLA2, incluido el ácido araquidónico, promueven la activación moderada de la NADH oxidasa y, por tanto, la producción de O_2^- . Éste aumento de ROS en niveles fisiológicos podría estar implicado en los procesos de fosforilación en tirosina, que constituyen un importante mediador de la homeostasis celular [99].

4. LA APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDEOS

En células somáticas existen dos tipos generales de vías de señalización que permiten el inicio de la activación de caspasas iniciadoras de la muerte celular programada o apoptosis. La primera de ellas depende de la participación de la mitocondria (vía intrínseca) y la segunda implica a los receptores de muerte celular como el receptor 1 de TNF (TNFR-1) y Fas (CD95) (vía extrínseca). Al igual que en células somáticas, existen varias vías por las que las células germinales masculinas pueden sufrir apoptosis entre las que se incluyen vías mediadas por miembros de las proteínas de la familia Bcl-2; el ligando Fas, el tumor necrosis factor (TNF), TRAI [100] o mediante supresores de tumores, tales como p53.

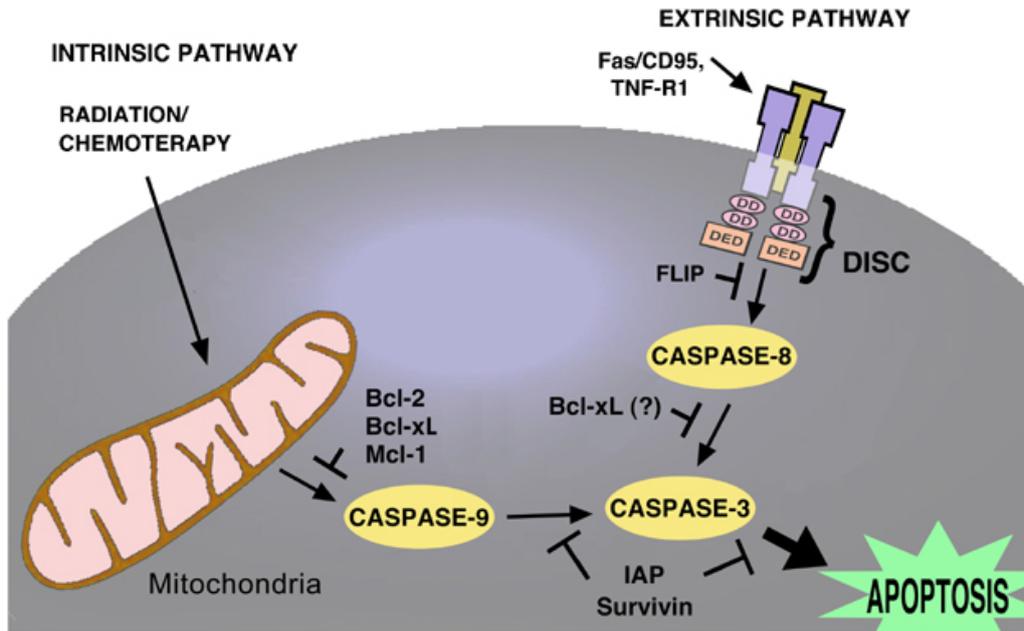


Figura I-6. Esquema general del proceso de apoptosis

4.1 LA APOPTOSIS DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS

Durante las últimas décadas, un gran número de investigaciones han evidenciado que la apoptosis desempeña un papel muy importante en la regulación tanto fisiológica como patológica durante la espermatogénesis de distintas especies [101-106] jugando un papel esencial en la determinación del número de espermatozoides totales que se producen y regulando la eficiencia del proceso debido a que si no se produjera la apoptosis en esta etapa, las células de Sertoli no podrían nutrir a todas las células en desarrollo [102].

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 [102, 107]. Así se ha estimado que para la mayoría de las especies de mamíferos, un alto porcentaje de las espermatogonias tipo A degeneran por mecanismos apoptóticos de forma fisiológica en los testículos de animales adultos [102].

4.2 APOPTOSIS EN ESPERMATOZOIDES MADUROS EYACULADOS

Los espermatozoides adultos maduros de muchas especies de mamíferos experimentan características típicas de la apoptosis como son: la condensación de la cromatina, la fragmentación de DNA, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la pérdida de integridad de la membrana plasmática, o la activación intracitoplasmática de caspasas [100].

Actualmente se barajan dos teorías para intentar explicar por qué los espermatozoides adultos muestran características típicas de este proceso. Por un lado se postula que durante la espermatogénesis las células defectuosas son marcadas para su eliminación y experimentan procesos de apoptosis, aunque algunas de esas células no llegan a completar el proceso y aparecerán en el eyaculado como espermatozoides con características apoptóticas [108-109]. La segunda teoría establece que los espermatozoides adultos eyaculados son capaces de iniciar y completar el proceso de apoptosis independientemente de la fase de espermatogénesis [110]. Por tanto y, aunque el papel de la apoptosis en células somáticas y durante la espermatogénesis está bien establecido, hay desacuerdos en lo que al espermatozoide eyaculado maduro se refiere, ya que no está claro si los marcadores apoptóticos que aparecen en el espermatozoide son residuos de etapas anteriores o si son el resultado de que la apoptosis se haya iniciado tras la eyaculación [108-109, 111-113].

Aunque inicialmente se sugirió que el espermatozoide carecía de la maquinaria necesaria para llevar a cabo una degradación del DNA, en los últimos años se ha visto que el espermatozoide maduro sí puede completar el proceso de apoptosis gracias a la presencia de topoisomerasas y nucleasas capaces de degradar el DNA en pequeños fragmentos [114]. Además se ha descrito que los procesos apoptóticos pueden ser desarrollados en los espermatozoides como respuesta al estrés de diferentes orígenes, como el térmico o el oxidativo, derivado de procesos

Introducción

biotecnológicos. Estos estímulos inducirían cambios de tipo apoptóticos así como la aparición de factores moduladores de la apoptosis, como las proteínas Bcl-2 o IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis), lo que estaría indicando que la apoptosis puede ser iniciada de forma autónoma en los espermatozoides [113, 115].

Por último, aún no se ha establecido si la apoptosis es un fenómeno perjudicial o si por el contrario son cambios necesarios para que el espermatozoide maduro adquiera la capacidad fecundante [100]. Existen estudios que apoyan que los cambios apoptóticos influyen negativamente en la fecundación de los espermatozoides y, por lo tanto, la selección de subpoblaciones no apoptóticas representaría un avance para mejorar la capacidad fecundante [111, 116]. Por el contrario, otros estudios han indicado que la presencia de caspasas activas en el espermatozoide no parece un factor letal que determine el destino de las células, sino que podría participar en procesos fisiológicos y estar relacionado con la adquisición de capacidad fecundante [100].

5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA CAPACITACIÓN, REACCIÓN ACROSÓMICA Y MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES

Está muy bien documentado que uno de los mecanismos más utilizados por las células eucariotas para regular diversas propiedades de las proteínas es la adición de grupos fosfatos a residuos de serina, tirosina o treonina (adición de un grupo γ -fosfato desde la molécula de ATP a un residuo susceptible de una proteína) o bien mediante la eliminación de dichos grupos fosfatos. La adición de grupos fosfatos depende de las quinasas, mientras que el efecto contrario depende de las fosfatasas. Estos mecanismos son conocidos como fosforilación y defosforilación y son responsables de inducir cambios conformacionales en la proteína

provocando la modificación de muchas de sus otras características incluyendo en muchos casos la activación o inhibición de la actividad enzimática [117] (Figura I-7).

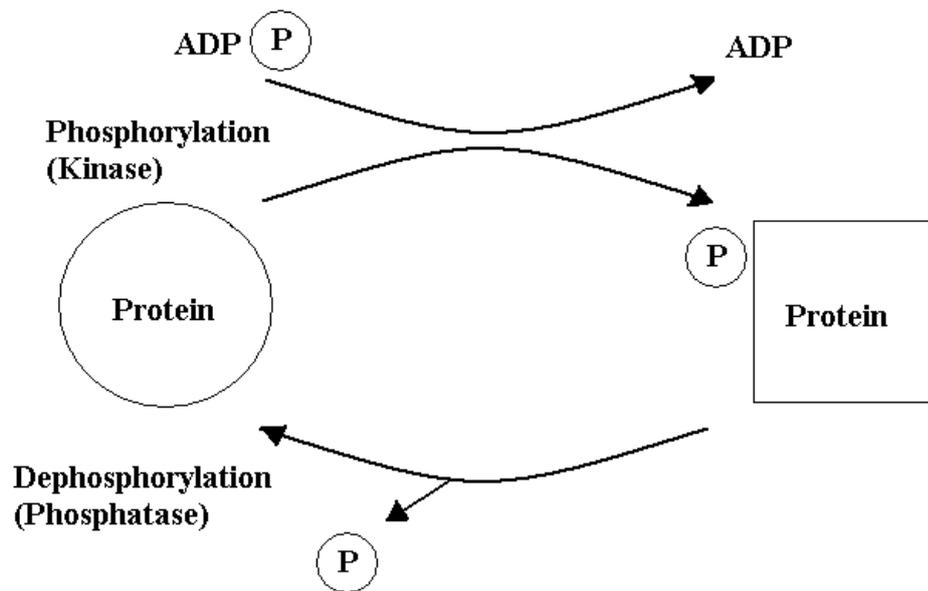


Figura I-7. Esquema del balance fosforilación/defosforilación de proteínas.

En espermatozoides se ha demostrado la participación de quinasas específicas de S/T, de Y o duales en la regulación de la movilidad, la capacitación, la reacción acrosómica y durante la maduración y el tránsito por el epidídimo de los espermatozoides [36, 38, 47, 118-120]. 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. A continuación detallaremos algunas de las vías más importantes identificadas y que regulan la señalización en espermatozoides, haciendo especial hincapié en la vía de la MAPK, dentro de la cual se encuentra la principal proteína objeto de estudio en esta tesis, la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK).

5.1 VÍA cAMP/PKA

La adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), el calcio y el bicarbonato son agentes esenciales en las cascadas de señalización intracelular que permiten adquirir capacidad de fecundar al espermatozoide. Numerosos estudios demuestran que durante el proceso de capacitación se incrementa la concentración intracelular del cAMP, asignándole a este segundo mensajero un papel esencial en la regulación de la fisiología espermática como veremos a continuación.

La producción de cAMP en espermatozoides, está mediada por una clase especial de adenilato ciclasa abundante en estas células, denominada adenilato ciclasa soluble (sAC) [121]. A diferencia de las clases de adenilato ciclasa presentes en la membrana de las células somáticas, la sAC se encuentra libre en el citosol y puede ser activada tanto por HCO_3^- como por Ca^{2+} [122]. Se ha descrito recientemente otra clase de adenilato ciclasa en espermatozoides humanos y de ratón que parece estar regulada por proteínas G, pero su modo de activación todavía no se ha establecido [123]. El cAMP media su acción por la activación de la proteína quinasa A (PKA) [124]. La PKA es una quinasa tetramérica compuesta por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas [124]. La unión del cAMP a la subunidad reguladora promueve la disociación y la activación de las subunidades catalíticas que fosforilan diferentes proteínas en residuos serina/treonina [124].

MOTILIDAD

El cAMP juega un papel crucial en la motilidad, ya que el pretratamiento de los espermatozoides de diferentes especies con análogos no hidrolizables del cAMP, han producido un aumento en la motilidad de estas células [125].

La PKA parece ser la responsable de la iniciación y del mantenimiento de la motilidad al fosforilar la dineína del axonema que, como hemos visto, es un punto crítico en el inicio de la motilidad [126-127]. La PKA está localizada en compartimentos específicos del espermatozoide por la unión de su unidad reguladora a proteínas de anclaje denominadas AKAP; estas proteínas de anclaje van a facilitar la fosforilación de las proteínas por parte de la PKA en los diferentes compartimentos de la célula [124]. En espermatozoides se han encontrado diferentes tipos de AKAPs: AKAP82 [128], FSP95 y AKAP110 [129] localizadas en la pieza principal, la S-AKAP84 localizada en la pieza intermedia asociada a mitocondrias [130] y la AKAP220 unida a estructuras del citoesqueleto [131]. La adición de HCO_3^- al medio de incubación produce un aumento en la motilidad de los espermatozoides [125] y se ha mostrado que este ión produce un aumento en la fosforilación en tirosina de la AKAP3, una proteína de anclaje a la PKA, por activación de la adenilato ciclasa soluble [132]. La fosforilación en tirosina de la AKAP3 está asociada con un incremento en la unión de la proteína a la PKA, resultando en el reclutamiento y en la activación del enzima en la cola del espermatozoide [133].

Todos estos estudios junto con el hecho de que inhibidores de la PKA, como el H89, redujeron la motilidad de los espermatozoides de verraco, de humano y de hamster, independientemente de la composición del medio de incubación, demuestran la importancia que tiene la vía de señalización cAMP/PKA en la motilidad del espermatozoide [127, 132].

CAPACITACIÓN

Cuando los espermatozoides son incubados en un medio capacitante se produce un aumento en la concentración intracelular de cAMP que precede a la capacitación propiamente dicha [35, 134] sugiriendo un importante papel de este segundo mensajero en el proceso de capacitación del espermatozoide. Este hallazgo se ha confirmado utilizando activadores, en espermatozoides de ratón [35] e inhibidores, en espermatozoides de

Introducción

verraco [134], de esta vía intracelular que inducen, respectivamente, un incremento o un descenso en la capacitación del espermatozoide.

Como se ha mencionado anteriormente, durante el proceso de capacitación, se produce un incremento intracelular tanto en la concentración de Ca^{2+} como de HCO_3^- y se ha demostrado que un aumento en la concentración de cAMP está relacionado con un aumento en la concentración de estos dos iones ya que ambos estimulan la actividad de la adenilato ciclasa [122]. La activación de la adenilato ciclasa va a regular los cambios en la distribución de los fosfolípidos de la membrana [135], así como los cambios en la fosforilación de proteínas [136] observados durante el proceso de capacitación.

Además, el incremento de cAMP durante la capacitación induciría la activación de la PKA, la cual fosforila sustratos en residuos de serina/treonina y además de inducir la fosforilación en tirosina de proteínas por su acción directa o indirecta en tirosinas quinasas o tirosinas fosfatasas [137-139] El aumento en la fosforilación de proteínas en tirosina o en serina /treonina producido cuando se incuban los espermatozoides en un medio capacitante puede revertirse mediante el uso de inhibidores específicos de la PKA como el H89 [140]. En contraposición, el uso de análogos del cAMP o de inhibidores de fosfodiesterasas como la cafeína, producen un incremento en la fosforilación de proteínas en espermatozoides de verraco [140-141]. Todos estos resultados demuestran el importante papel activador que tiene la vía de señalización cAMP/PKA en la fosforilación de proteínas durante el proceso de capacitación.

REACCION ACROSÓMICA

La estimulación de la reacción acrosómica con progesterona o con el ionóforo A23187 produce un incremento en la concentración intracelular de cAMP, sugiriendo un papel para la vía del cAMP/PKA durante este proceso [142]. Así, mediante el uso de análogos del cAMP en espermatozoides humanos y de carnero [143] de activadores de la adenilato ciclasa en

espermatozoides humanos [143] y de inhibidores de fosfodiesterasas en espermatozoides de hamster [144] se ha inducido un incremento en el porcentaje de los espermatozoides reaccionados acrosómicamente; por el contrario, la adición de inhibidores de la PKA produce un descenso en la reacción acrosómica en espermatozoides humanos [143]. El incremento observado en el cAMP durante este proceso es dependiente de la concentración de Ca^{2+} , indicando que durante la reacción acrosómica se produce primero un incremento en la concentración de Ca^{2+} el cual activaría a la adenilato ciclasa con la consiguiente producción de cAMP [142].

5.2 VÍA cAMP / EPAC

Hasta hace poco se creía que todos los efectos del aumento intracelular de cAMP eran mediados por la PKA. Sin embargo, recientemente se ha descubierto en espermatozoides otras proteínas que también son activadas mediante este segundo mensajero. Son las proteínas. Epac (del acrónimo exchange protein activated directly by cAMP). Existen dos isoformas de esta proteína denominadas Epac-1, que está localizada principalmente en cerebro, corazón, riñón, páncreas, ovario, tiroides y médula espinal, y Epac-2 que es menos abundante y se encuentra en algunas zonas del cerebro, en la médula adrenal y en los islotes de Langerhans [145]. En células somáticas estas proteínas se encuentran ubicadas en la membrana plasmática, en las regiones perinucleares, en la membrana nuclear y en la mitocondria. El aumento del cAMP que induce su activación puede ser mediado por la activación del receptor β -adrenérgico, los receptores de adenosina (A_2b) y de prostaglandinas [146]. Todos estos receptores se encuentran acoplados a proteínas Gs, que activarán la AC y está sintetizará cAMP, quien finalmente activará a Epac.

Las Epacs son factores de intercambio de nucleótidos de guanina que ejercen su función sobre las GTPasas, Rap1 y Rap2, pequeñas proteínas pertenecientes a la súper familia de las proteínas Ras. Una vez activada por el cAMP, son capaces de estimular la actividad de intercambio GDP/GTP

Introducción

sobre las proteínas Rap, activándolas y en consecuencia generando una respuesta biológica.

En espermatozoides Epac-1 ha sido recientemente identificada en eyaculados humanos y de caballo mediante *Western blotting* e Inmunofluorescencia [147]. Estos estudios han descrito la presencia de Epac en la región acrosomal de los espermatozoides, por lo que podría estar implicado en la reacción acrosómica. Otros trabajos desarrollados con espermatozoides de hámster han descrito que Epac-2 se localiza en el flagelo de los espermatozoides de hámster interviniendo en la regulación de la movilidad. Por otro lado en un estudio desarrollado en nuestro laboratorio hemos descrito como durante los procesos de capacitación y reacción acrosómica se produce un cambio en la localización de la proteína Epac en espermatozoides de verraco. Además la incubación de los espermatozoides con 8-Br-2'-O-Me-cAMP, un análogo del cAMP que solo activa a las Epac y no la PKA, promueve un aumento en la activación de Rap, necesario para que se lleve a cabo, la RA, la movilidad y la movilización de calcio, cuando los espermatozoides son incubados en un medio inductor de la reacción acrosómica. Finalmente la activación de la proteína Epac induce un cambio en la distribución de la E-cadherina, una glucoproteína transmembrana responsable de la unión célula-célula, lo que podría indicar que Epac juega un importante papel en el reconocimiento entre gametos y consecuentemente en la fecundación [148].

5.3 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 [149].

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 receptores 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 [149]. Además de este mecanismo de regulación se ha descrito la activación de la PKC mediante fosforilación por la PDK1 vía PI3K, activación dependiente de fosfolipasa A (PLA) [149] y activación de PKCs dependiente de fosfolipasa D (PLD)

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 [150]. 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 [46-48] y probablemente, la motilidad en algunas especies. 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 cAMP/PKA [151].

5.4 VÍA DE LAS MAPK

Las MAPK son una familia de enzimas conservadas evolutivamente, que se caracterizan por responder a estrés físico y químico de diferentes orígenes, controlando la supervivencia y la adaptación, y estando implicadas además en procesos como la diferenciación o el crecimiento celular. La regulación de la actividad de las MAPK se produce por fosforilación secuencial de distintas proteínas a través de una cascada de señalización. En mamíferos se han descrito hasta el momento la cascada de MAPK quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2), las quinasas del extremo amino terminal de c-Jun (JNK), p38 y ERK5 [152]. ERK1/2 y p38 están relacionados con MAPK encontradas en levaduras y poseen mecanismos de fosforilación duales T-Q-Y y T-G-Y respectivamente. Por su parte las proteínas de la familia de JNK se fosforilan en el motivo T-P-Y [153]. Estas a su vez son activadas por MAPKK específicas: MEK1/2 para ERK1/2, MKK3/6 para p38, MKK4/7 (JNKK1/2) para JNK y MEK5 para ERK5. Cada MAPKK puede ser activada por más de una MAPKKK, aumentando así la complejidad y la diversidad de las señales [154] (Figura I-8).

Se ha descrito que las MAPK participan en multitud de procesos celulares como son diferenciación celular, movilidad, proliferación y apoptosis. ERK1/2 se han relacionado preferentemente con proliferación y diferenciación, mientras que JNK y p38, parece estar más vinculado con respuestas a estrés como inflamación y apoptosis, aunque hay excepciones, y tanto JNK como p38 pueden mediar proliferación en algunos tipos celulares [155].

Por otro lado, es conocido que el tiempo de activación de las MAPK puede dar lugar a diferentes respuestas. Así se conoce que una activación sostenida de ERK, en células PC12, da lugar a diferenciación celular, mientras que una activación transitoria provoca crecimiento celular. En cambio, en fibroblastos NIH3T3, la activación prolongada de ERK induce

crecimiento y transformación celular. Por su parte JNK también parece responder de manera dependiente del tiempo de activación. En células T, frente a diversos estímulos como la ligación de CD28, ésteres de forbol, radiaciones o ionóforos, una activación sostenida provoca apoptosis, mientras que una activación transitoria induce proliferación celular [156]. El hecho de que la activación de MAPK sea transitoria o persistente depende tanto de la acción de fosfatasa como del estado de activación de moléculas anteriores de la vía. Así, la regulación por fosfatasa comprende fosfatasa duales y serina/treonina fosfatasa. Entre las primeras encontramos las fosfatasa 3 de las MAPK (MKP3), que inactivan selectivamente a ERK; MKP6, exclusiva de JNK; o MKP1 y MKP2 y MKP3 las cuales pueden defosforilar a ERK, JNK y p38 [157].

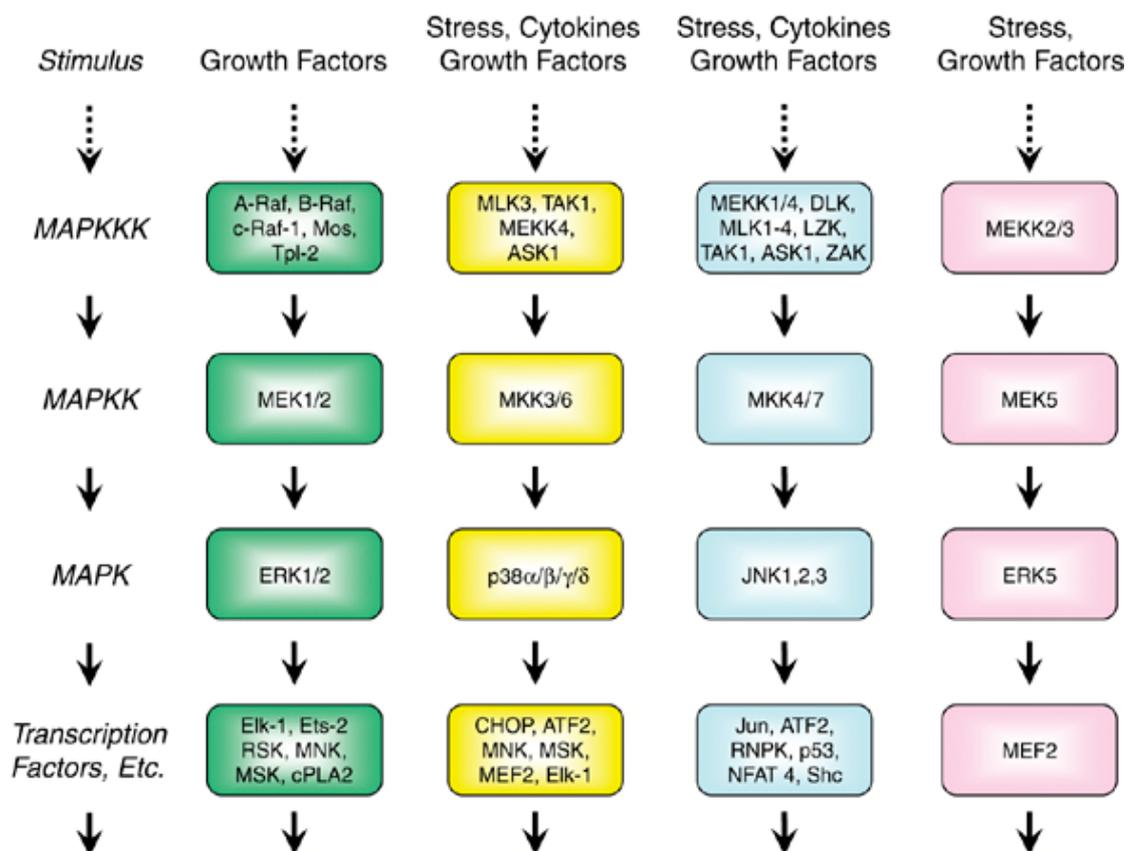


Figura I-8. Esquema de la vía de las MAPK en células eucariotas de mamíferos.

5.5 MAPK EN ESPERMATOZOIDES

Diversos estudios han mostrado que la función reproductiva está modulada, en parte, por la cascada de proteínas de las MAPK. Las MAPK están involucradas en muchas etapas del desarrollo de las células germinales, incluida la espermatogénesis, la apoptosis de células germinales, la adquisición de movilidad en el epidídimo, así como la capacitación y reacción acrosómica previa a la fecundación del óvulo [158].

5.5.1 MAPK EN LA ESPEMATOGÉNESIS

ERK1/2 se ha encontrado durante todas las etapas de la espermatogénesis de ratón y en células de Sertoli de rata [120, 159]. En éstas últimas ERK1/2 es fosforilada, aunque sus mecanismos de activación aun no son bien conocida [159]. Durante la espermatogénesis, hay activación de ERK1/2 en espermatogonias primarias de ratón. ERK1/2 se encuentra activada en espermátocitos en leptoteno y zigoteno, mientras que se observa un descenso en la actividad en espermátocitos primarios en paquiteno y en espermátidas de ratón [120]. Se ha demostrado expresión proteica de ERK1/2 y MEK en células germinales premeióticas y espermátocitos, mientras que MEK1 no se expresa en espermátocitos en paquiteno. Por otra parte, expresión de Mos, una MAPK, se ha encontrado al final de la profase meiótica en cultivos celulares de espermatogonias de rata de 14 días de vida [160]. Mos fue también hallada en espermatogonias primarias y secundarias de la rana *Rana esculenta*, sugiriendo que Mos podría estar implicado en la regulación de la proliferación de las espermatogonias [161].

Por otro lado recientes estudios han sugerido que la vía de las MAPK está implicada en el mantenimiento de la condensación de la cromatina para llevar a cabo una segunda fase de duplicación del DNA entre las dos divisiones meióticas [162].

5.5.2 MAPK EN ESPERMATOZOIDES MADUROS

Diversos estudios han puesto de manifiesto la presencia y el posible papel de la MAPK en los espermatozoides maduros. Así ERK 1/2 fue localizada en el espermatozoide humano en la región postacrosómica y en la pieza intermedia, concretamente, en las fibras exteriores densas, lo que indica que podría estar implicada tanto en la AR como en procesos de movilidad [119, 138]. La evidencia del papel de ERK1/2 en la movilidad espermática de aves fue estudiada también por Ashizawa demostrando que esta proteína está positivamente implicada en la movilidad de los espermatozoides [163]. Sin embargo otros estudios sugieren que ERK1/2 regula negativamente la movilidad del espermatozoide en respuesta a la estimulación por triptasa. La discrepancia en los efectos de estos dos estudios podría estar en las diferencias interespecíficas, pero también se puede explicar por las diferentes señales que pueden transducir ERK, que culminan en diferentes efectos [164].

Por otra parte, Almog y colaboradores localizaron la presencia de p38, distribuyéndose principalmente por la región postacrosómica y de forma más difusa en la cola, sugiriendo su posible participación en la movilidad espermática [119] Además mediante *Western blotting* se intento identificar a la **proteína quinasa N-terminal de c-Jun (JNK)** aunque sin éxito [119].

Por otro lado, estudios realizados por Luconi et al, demostraron que el inhibidor de ERK1/2 PD098059 no podía bloquear las reacciones acrosómicas inducidas por progesterona. Los autores encontraron que sólo los espermatozoides capacitados podría sufrir la reacción acrosómica en respuesta a la progesterona. Por lo tanto, concluyeron que la ERK1/2 está implicada en la regulación de la capacitación del espermatozoide [138].

Además utilizando otros inhibidores específicos de ERK1/2 y de p38 se ha demostrado que, mientras ERK1/2 estimula la movilidad, la p38 la inhibe. Sin embargo ambas proteínas estimulan la reacción acrosómica en

Introducción

un proceso no bien definido [119]. Sin embargo, otros autores han localizado la isoforma ERK2 [138], la proteína adaptadora Shc [165] y Ras [166] en la cabeza de espermatozoides humanos, indicando que esta vía podría ser importante para la regulación de proteínas en esta localización.

Por lo tanto existen varios estudios acerca de las MAPKs en los espermatozoides relacionando estas proteínas con diversas funciones, sin embargo no está claro como se regulan estas proteínas en estas células.

6. LA QUINASA N-TERMINAL DE c-JUN (JNK)

Esta familia está formada por tres miembros, JNK1, 2 y 3 (también denominadas MAPK8, 9 y 10, respectivamente). Fueron aisladas y caracterizadas inicialmente como proteínas que fosforilaban el factor de transcripción c-Jun en su extremo N-terminal en los residuos serina 63 y 73, el cual forma parte del complejo de transcripción AP1 (proteína activadora 1) y posteriormente se identificaron como proteínas activadas por estrés, por ello también son conocidas como SAPKs (*Stress-Activated Protein Kinase*). Existen tres genes en humanos que codifican para JNK1, 2 y 3 (también denominadas SAPK γ , α y β respectivamente). JNK1 y JNK2 se expresan de forma ubicua y JNK3 se expresa preferentemente en sistema nervioso central, corazón y testículos. Además, estos tres genes pueden sufrir un procesamiento alternativo del RNA dando lugar al menos a 10 isoformas diferentes [167].

Evolutivamente es una proteína muy conservada, constituida por un dominio común de anclaje (*common docking domain*) en el extremo C-terminal y un dominio quinasa con residuos de fosforilación y un dominio glutamato/aspartato cerca del extremo N-terminal (Figura I-9) [168].

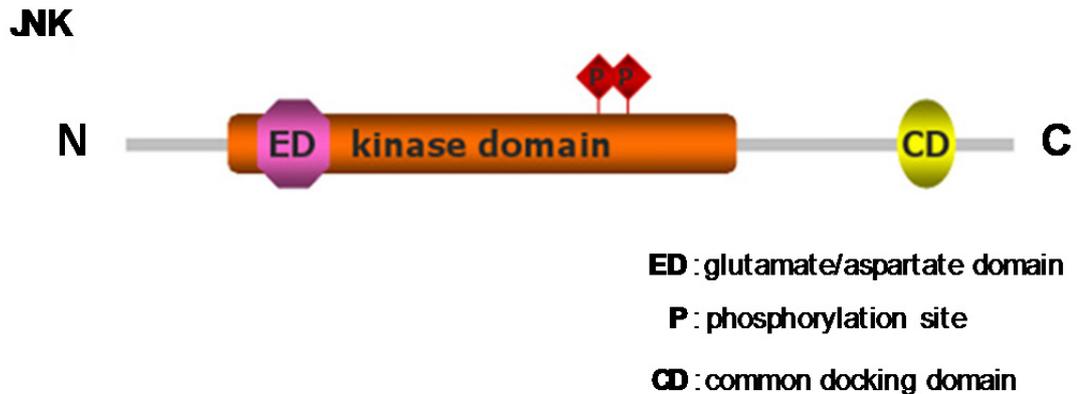


Figura I-9. Esquema de la estructura de JNK

6.1 ORGANIZACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE JNK

La vía de JNK (Figura I-10) es activada por diversos tipos de estímulos como: (1) factores de crecimiento, (2) citoquinas como el factor de necrosis tumoral $TNF\alpha$ o la interleuquina $IL-1\beta$, (3) choque osmótico o térmico, (4) radiación UV, (5) y lesiones isquémicas, anoxia o hipoxia a través de diferentes mecanismos. **MKK4** y **MKK7** (también conocidas como **SEK1/JNKK1** y **SEK2/JNKK2**) son las MKKs encargadas de activar JNK mediante fosforilación dual en los residuos treonina 183 (principalmente por MKK7) y tirosina 185 (principalmente por MKK4) [169-170]. Mientras que MKK7 se activa por estímulos como TNF o interleuquina 1, MKK4 se activa preferentemente por estrés ambiental. Sin embargo, para la completa activación de JNK es necesaria la cooperación de estas dos quinasas [168].

Por su parte MKK4 es activada por fosforilación dual en serina 257 y en treonina 265 y MKK7 es fosforilada en serina 271 y treonina 275 por quinasas activadoras que se encuentran por encima denominadas **MEKKs** o **MAP3Ks** (MAP quinasa quinasa quinasa). Dentro de la familia de las MAP3KS se encuentran las quinasas **MLKs**, compuesta por 7 miembros agrupados en tres subgrupos: MLKs (comprende MLK1-4), DLK (que

Introducción

comprende DLK (*dual leucine zipper kinase*) y LZK (*leucine zipper kinase*) y ZAP. Son activadores de la vía de señalización de JNK, aunque la sobreexpresión de algunos de los miembros de la familia también activan la vía de p38. MLK3, MLK2 y DLK activan a MKK4, mientras que MKK7 es fosforilada in vivo por MLK3, DLK y MLK2 [169, 171]. **MEKK1** activa preferentemente MKK4, pero también a MKK7 [169, 172] y responde a estímulos como el factor de necrosis tumoral (TNF) [173], drogas que desorganizan los microtúbulos [174], estrés oxidativo [175] a través de GTPasas de la familia Rho y Ras, y GCKs asociadas a complejos TNFR-TRAFs [176]. **MEKK2** activa MKK4 y MKK7 y está implicada en activación de células T [177]. **MEKK3** está implicada en angiogénesis y desarrollo del aparato cardiovascular [168]. Por último, **MKK4** responde a estrés genotóxico a través de Rac/Cdc42 aunque parece ser más específica para p38 [169, 178]. TAK1 responde a citoquinas como TGF- β , IL-1 β y TNF α [179]. ASK1 contribuye a la activación de JNK como respuesta a estimulación de larga duración por TNF, estrés oxidativo o Fas [180].

La actividad de JNK, al igual que la de otras MAPKs, puede ser regulada de forma negativa por una familia de proteínas fosfatasas denominadas MKPs (*mitogen-activated kinase protein phosphatases*). Se dividen en tres categorías según su actividad, entre las ellas las fosfatasas de actividad dual tirosina y serina-treonina (DSPs) son las que más contribuyen a la inactivación de estas vías [157]. Se ha descrito que M3/6, MKP5, MKP7, MKP1, MKP2 y MKP3 pueden defosforilar JNK [181-182]. Las serina-treonina proteína fosfatasas PP1 y PP2A también parecen estar implicadas en la inactivación de estas vías [181].

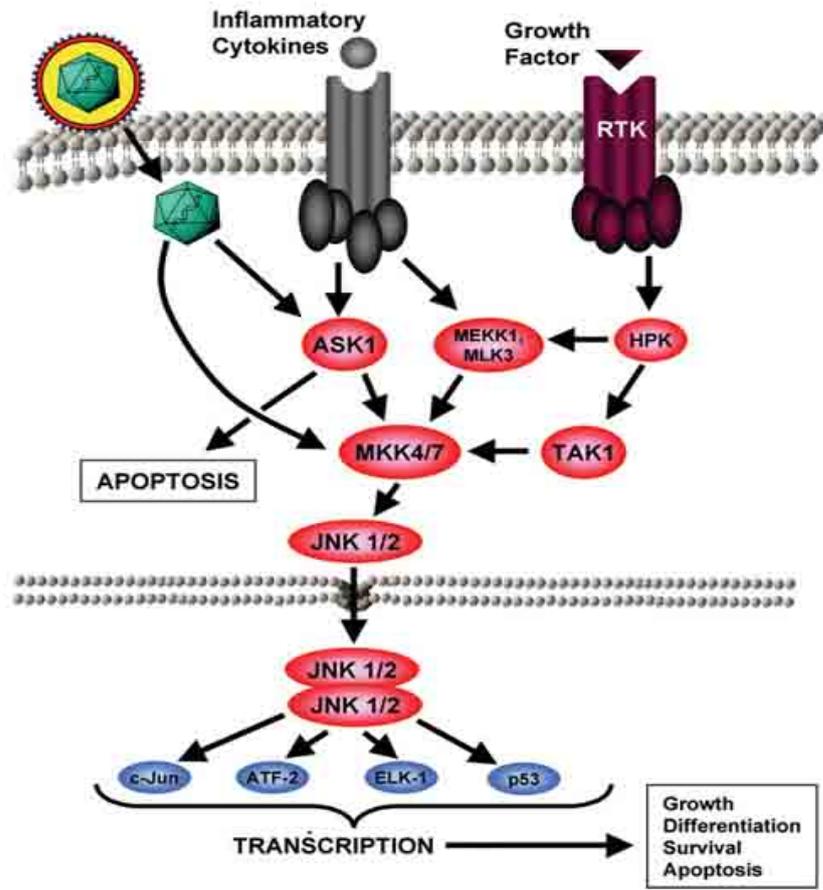


Figura I-10. Organización de la ruta de señalización de JNK

6.2 PROTEÍNAS DE ANCLAJE JIP (JNK interacting protein).

Los componentes de las vías de MAPKs se pueden modular básicamente de tres formas: mediante proteínas de anclaje (*scaffold*), mediante la localización de los complejos de señalización en la célula y mediante el control de la duración de las señales que pueden influir en la naturaleza de la respuesta biológica [183-184].

Las proteínas de anclaje reúnen distintos componentes de las vías de señalización en módulos funcionales. Normalmente carecen de actividad enzimática intrínseca, pero su estructura les permite ensamblar diferentes factores de una misma vía de señalización de forma simultánea, confiriendo de esta forma especificidad y eficiencia a la cascada de señalización.

Introducción

Entre las proteínas *scaffold* que pueden modular la señal de la ruta de JNK está la familia de JIP (*JNK-interacting protein*) (Figura I-11), la cual consta varios miembros: JIP1, JIP2, JIP3. **JIP1** fue la primera proteína de anclaje descrita que ensambla componentes de la vía de JNK. El gen que codifica para esta proteína, *jip1*, se expresa de forma ubicua aunque predomina en cerebro, testículo, riñón y pulmón [185] y mediante procesamiento alternativo genera dos isoformas JIP1 y JIP1b. **JIP2** es mucho más específica y se expresa casi exclusivamente en neuronas y células neuroendocrinas. JIP3 al igual que *jip2* se expresa principalmente en neuronas y células neuroendocrinas, pero también se detecta en niveles más bajos en corazón y testículos [186-187]. De todas ellas, en células somáticas JIP1 parece ser la que posee mayor afinidad por JNK, especialmente por JNK1, de hecho la afinidad de JIP1 por JNK es 100 veces mayor que la de ésta por su sustrato c-Jun. Consta en un dominio JBD (*JNK binding domain*), que comprende los aminoácidos 127 a 283 en el extremo N-terminal, por el cual se une a JNK, en el extremo C-terminal contiene un dominio SH3 (*Src-homology 3*) y un dominio PTB (*phosphotyrosine-binding*) (aminoácidos 291-660), y una región rica en prolinas (aminoácidos 281-448) [185].

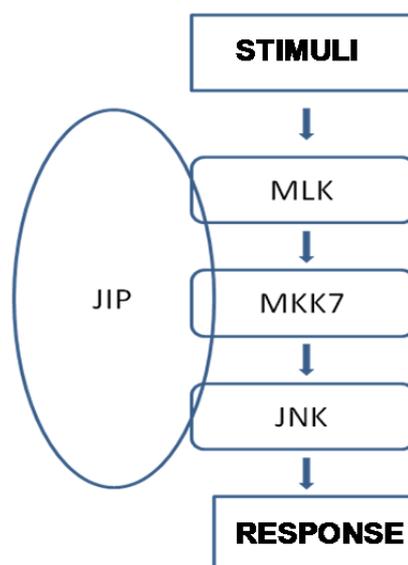


Figura I-11. Esquema de la organización de la vía de JNK mediada por JIP

Además de las isoformas indicadas anteriormente se ha caracterizado recientemente la expresión de **SPAG9**, una nueva proteína andamio de tipo JIP con una alta homología estructural y funcional con el resto de proteínas pertenecientes a la familia y se ha visto que se expresa en espermátidas redondas de macaco, babuino y humano, además de en testículos y en espermatozoides maduros de algunas especies de mamíferos. Por su alta homología estructural con JIP3, fue denominada previamente JIP3 γ , aunque últimamente ha sido clasificada como **JIP4** [188]

Estructuralmente consta de un motivo de cremallera de leucina (*LZ*), dos dominios doble alfa-hélice (*coiled-coil*, *cc*) y un dominio transmembrana (*T*), además de varios dominios de fosforilación de proteínas quinasas y el sitio de unión con la JNK (*JBD*) (Figura I-12).

JP4 (SPAG9)

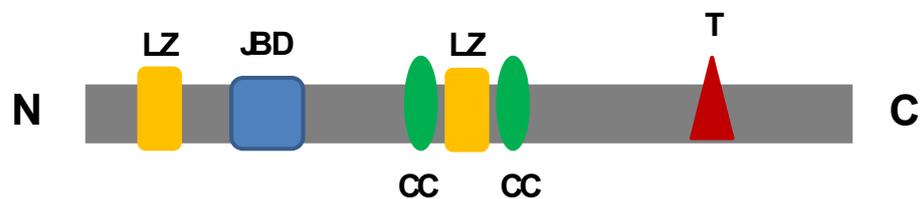


Figura I-12. Esquema de la estructura de JIP4

6.2.1 INHIBICIÓN DE JNK

Desde su descubrimiento en la década de los 90 y vista su implicación en el desarrollo de algunas enfermedades, diversos estudios se han centrado en la búsqueda de inhibidores químicos que bloquean la vía de señalización de JNK. Estas primeras aproximaciones estaban centradas en la investigación de moléculas que compitieran por el sitio de unión de JNK con el ATP, tales como el SP600125, el primer inhibidor desarrollado

Introducción

comercialmente [189], el AS601245 [190], así como otros pequeños péptidos inhibidores [191]. Sin embargo dado la poca especificidad de estos, ya que estarían implicados en la inhibición de gran cantidad de proteínas quinasa y no solo de la JNK [192-193], las últimas investigaciones están focalizando sus esfuerzos en la síntesis de péptidos inhibidores que bloquean el sitio de unión de JNK con JIP, evitando así la organización de los componentes de la cascada de señalización, un claro ejemplo de este tipo de inhibidores sería el BI-78D3, cuyo efecto como bloqueante del sitio de unión entre JNK y JIP ha sido puesto de manifiesto tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* [194].

Por otra parte JIP ha sido descrita también como un inhibidor de la JNK, ya que cuando está sobre-expresado está unido a JNK y lo retiene en el citoplasma, bloqueando su activación por estreses como por ejemplo la radiación ultravioleta [195-196]. Sin embargo cuando JIP es coexpresada con MLK3 o MKK7, se potencia su efecto inductor sobre la JNK.

6.3 SUSTRATOS DE JNK

Los sustratos más estudiados de JNK son los factores de transcripción inducibles que regulan la expresión de genes que solamente se utilizan en ciertos tipos celulares o en ciertos momentos de la vida de la célula, de los cuales **c-Jun** es el más conocido [197].

La proteína c-Jun puede formar homodímeros o estar en forma de heterodímeros con otras proteínas como el factor de transcripción ATF2 o componentes de la familia de c-Fos. Cuando esta última dimerización se lleva a cabo, se forma el factor de transcripción AP-1, el cual activa la transcripción diversos genes implicados en procesos relacionados con la proliferación y la diferenciación celular, contrarrestando además fenómenos de invasión y daño celular [198].

Otro activador transcripcional conocido y sustrato de la JNK es el supresor tumoral p53, que es fosforilado en el residuo de treonina 81 [53]. Tras la fosforilación por JNK, p53 induce apoptosis, lo que está en

concordancia con su importantísimo papel como factor antioncogénico. Otros factores de transcripción fosforilados por JNK son: Ets (*E twenty six*), Elk- 1 (*Ets-like gen 1*), NFAT4 (factor nuclear de las células T activadas) y receptores de glucocorticoides [153, 168, 199-200] JNK también puede translocar a la mitocondria donde fosforila las proteínas de la familia Bcl que regulan la supervivencia celular [201-202].

Además de los factores de transcripción descritos. Otras muchas proteínas pueden ser sustratos de JNK. Algunas de ellas son especificadas en el siguiente apartado en relación a la regulación de los procesos de apoptosis por parte de JNK.

6.4 IMPLICACIÓN DE JNK EN LA APOPTOSIS Y SUPERVIVENCIA CELULAR

Estudios recientes han centrado su interés en la capacidad de la JNK para modificar los procesos de apoptosis. Este efecto depende de su capacidad de activar y modular diferentes vías de señalización, relacionadas tanto con la vía extrínseca, como con la intrínseca de la apoptosis.

En primer lugar, JNK es capaz de inducir la apoptosis mediante la activación directa o indirecta de miembros de la familia Bcl2 (por ejemplo, Bax y BAD) implicados en este fenómeno. Se ha demostrado, por ejemplo, que JNK puede promover la apoptosis mediante la translocación de Bax a la mitocondria, bien mediante la fosforilación directa de Bax, o bien mediante la fosforilación de la proteína 14-3-3, que ancla Bax en el citoplasma. Además JNK puede fosforilar y activar el factor de transcripción p53, relacionado con el establecimiento de la apoptosis [201]. Del mismo modo, la translocación de JNK a la mitocondria puede inducir la liberación de citocromo c y SMAC desde el espacio intermembrana, desencadenando la apoptosis. Finalmente, se ha propuesto que la activación de JNK promueve apoptosis en respuesta a distintas citoquinas inflamatorias como TNF α [153], este efecto puede desarrollarse mediante el aumento de la transcripción del ligando de Fas

Introducción

[153]. El mecanismo por el cual JNK induce apoptosis por estímulos como la radiación ultravioleta, implica la disminución del potencial de membrana mitocondrial, proceso tardío en la inducción de apoptosis, que depende de la activación de caspasas. Así mismo, JNK media un proceso mitocondrial temprano en la respuesta frente al estrés posiblemente a través de la fosforilación de c-Jun. Por lo tanto, uno de los principales papeles de JNK es actuar como mediador de factores inductores de apoptosis, tales como el daño genómico, el choque térmico, ROS o la radiación ultravioleta, y parte de esta función, si no toda ella, depende de su capacidad de regular el potencial de membrana mitocondrial por diferentes mecanismos.

No obstante JNK también promueve supervivencia celular: En los ratones *jnk1^{-/-}jnk2^{-/-}* se produce un aumento de la apoptosis en el cerebro en el estadio E10.5 durante el desarrollo embrionario [203], mientras que los timocitos inmaduros y células T maduras deficientes en JNK1 son muy sensibles a la apoptosis inducida por Fas y CD3 [204]. No obstante la función anti-apoptótica de JNK parece depender del estado de activación de p53. Así la supresión de la actividad de JNK en ciertos tumores deficientes en p53 inhibe su crecimiento, probablemente porque JNK inhibe la parada de ciclo inducida por p53 y promueve la actividad apoptótica de p53 [205]. Además JNK también puede inducir supervivencia celular por la fosforilación e inactivación de la proteína proapoptótica BAD, impidiendo que BAD interaccione e inactive la proteína antiapoptótica Bcl-XL [206].

Finalmente en células somáticas la activación de JNK durante la apoptosis puede ser dual. En primer lugar puede producirse una respuesta temprana de protección frente a estrés, pero por otro lado también es capaz de mediar los procesos de apoptosis en respuesta a un estrés ya producido.. Por ejemplo, aunque TNF es un potente activador de JNK, en la mayoría de las ocasiones sólo produce apoptosis cuando las células han sido tratadas previamente con cicloheximida o actinomicina D. En otros estudios, la activación de JNK se ha descrito incluso como protectora frente a apoptosis. Tal es el caso de un estudio en timocitos, donde la activación de JNK

protege frente a la apoptosis mediada por CD3 y CD95 [207] y en cultivos primarios de fibroblastos, donde la vía de señalización de JNK está implicada en la supervivencia celular, [208].

El hecho de que JNK pueda producir una respuesta tanto proapoptótica como antiapoptótica, incluso en el mismo tipo celular, puede ser debido a que diferentes isoformas de esta quinasa tengan distintas funciones o a que los efectos biológicos inducidos por JNK dependan del estado de activación de otras rutas, siendo la acción de JNK más permisiva que inductora. También se ha propuesto que el tiempo de activación de JNK puede determinar el tipo de respuesta. Así, una activación sostenida está relacionada con apoptosis, mientras que una activación transitoria se relaciona con supervivencia [186].

II. OBJETIVOS

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

1. Identificar las isoformas de la JNK en los espermatozoides de mamíferos y caracterizar su distribución subcelular.
2. Caracterizar los estímulos capaces de regular la actividad de la JNK en los espermatozoides.
3. Determinar la función de esta quinasa en los espermatozoides maduros eyaculados.
4. Investigar el posible papel de la JNK en la regulación de la respuesta al estrés inducido por las técnicas de conservación de los gametos masculinos.
5. Investigar la posible relación entre el estado de activación de la JNK y la viabilidad espermática en espermatozoides de mamíferos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. LISTA DE REACTIVOS

A

- 8-Br-cAMP: 8-bromo-adenosina-3',5'-monofosfato cíclico. Sigma-Aldrich.
- 8-Br-2'-O-Me-cAMP: 8-bromo-2'-O-metiladenosina-3',5'-monofosfato cíclico. Sigma-Aldrich.
- Anticuerpo policlonal de conejo fosfoespecífico anti -JNK (T183/T185). Cell Signaling
- Anticuerpo policlonal de conejo fosfoespecífico anti - JNK (T183/T185). Thermo.
- Anticuerpo policlonal de ratón anti-JNK. Cell Signaling
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-JNK1/3. Santa Cruz-Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-JNK 2. Santa Cruz-Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti- α -Tubulina. Santa Cruz-Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-Cleaved-Caspase-3. Cell Signaling
- 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*. Invitrogen.
- APS: Persulfato amónico. Bio-Rad.
- Azul de bromofenol. Bio-Rad.

B

- BI78-D3: Inhibidor específico de JNK. Calbiochem
- BSA: Albúmina sérica bovina, Fracción V. Sigma-Aldrich.

Materiales y Métodos

C

- Comassie Azul brillante G-250. Bio-Rad.
- Cocktail de inhibidores de proteasas. Roche.

D

- DMSO: Dimetilsulfóxido. Sigma-Aldrich
- DTT: Ditiotreitól. 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.
- EthD-1: ver homodímero de etidio.

F

- FAM-VAD-FMK: Sonda de detección policaspasas. Invitrogen
- 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 (EthD-1). Invitrogen.

I

- INRA 96®. IMV8 Technologies.

J

- JC-1. Invitrogen.
- JNK inhibitor VIII: Inhibidor de JNK. Calbiochem

L

- Lactato de sodio. Fluka.
- 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.

O

- Ortovanadato sódico. Sigma-Aldrich.

P

- Película fotosensible. Amersham.
- Peróxido de Hidrógeno. Calbiochem.
- Piruvato de sodio. Fluka.
- Poli-L-lisina. Sigma-Aldrich.

R

- Reactivo de Bradford. Bio-Rad.

S

- SDS: Dodecil sulfato sódico. Sigma-Aldrich.
- SP 600125: Inhibidor de JNK. Sigma-Aldrich.
- Sustratos para la reacción de quimioluminiscencia: SuperSignal®West Pico Chemiluminiscent.

Materiales y Métodos

- Sustratos, SuperSignal® West Dura, Chemiluminiscent Substrate, Pierce Biotechnology.

T

- Tampón Tris/glicina (x 10). Bio-Rad.
- Tampón Tris/glicina/SDS (x 10). Bio-Rad.
- TEMED: N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina. Bio-Rad.
- Triton X-100. Bio-Rad.
- TRIZMA base: Tris [hidroximetil] aminometano. Sigma-Aldrich.
- TRIZMA HCl: Tris [hidroximetil] aminometano. Sigma-Aldrich.
- Tween 20. Bio-Rad.

Y

- YO-PRO-1. Invitrogen.

El resto de reactivo utilizados han sido de grado analítico.

2. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La obtención de las muestras dependió de la especie en estudio. El semen de cerdo de raza Ibérico o Duroc fue obtenido mediante dosis comerciales procedentes del centro de inseminación artificial “Semen Porcino Andalucía S.L.” (Aznalcollar, Sevilla). Cada dosis consiste en 80 ml de un diluyente comercial (MRA-A, Kubus, Madrid) conteniendo una concentración de 30×10^6 espermatozoides ml^{-1} .

Las dosis utilizadas de caballo provenían del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura (Cáceres). El semen fue extraído usando una vagina artificial modelo *Missouri* previamente lubricada y calentada a 45 °C. Inmediatamente después de la extracción, el semen fue llevado al laboratorio donde se analizó la concentración y su movilidad. A continuación el semen se mezcló con el diluyente comercial INRA 96® (IMV, L’Aigle, France) a una dilución 1:1 y se centrifugó durante 10 minutos a 600 g. Finalmente los espermatozoides fueron resuspendidos en INRA 96® hasta alcanzar una concentración final de 100×10^6 espermatozoides ml^{-1} .

Las muestras de perro se obtuvieron de perros mestizos de propiedad privada (entre 15-20 Kg de peso y entre 2-7 años de edad) mediante masturbación. La muestra se recogió en un tubo graduado previamente calentado a 37 °C.

Las muestras de hombre fueron obtenidas de donantes voluntarios sanos, tras 4-5 días de abstinencia sexual, los parámetros seminales fueron evaluados según los criterios de la Organización Mundial de la Salud.

3. MEDIOS DE INCUBACIÓN

Todos los medios utilizados en el presente trabajo fueron preparados con agua ultra-pura (*Purelab Classic*). Una vez elaborados se ajustó el pH a 7,4 y se comprobó que la osmolaridad era de 300-330 mOsm·Kg⁻¹. Los medios fueron preparados justo antes de realizar los experimentos y se calentaron a 37 °C antes de utilizarlos. En función de la especie usamos distintos medios de incubación cuya composición describiremos a continuación.

- **Tyrodé's basal medium (TBM):** Es un medio no capacitante para la incubación de los espermatozoides de cerdo (Tabla III-1) [39].

Tabla III-1. Composición del medio TBM.

Reactivos	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
EGTA	5 mM

- **Tyrode's complete medium (TCM):** Para inducir la capacitación en espermatozoides de cerdo se utilizó el medio capacitante *Tyrode's complete medium* (Tabla III-2). Antes de añadir el CaCl_2 se burbujeó el medio con carbógeno durante 10 minutos para equilibrar el pH [39].

Tabla III-2. Composición del medio TCM.

Reactivos	Concentración
HEPES	20 mM
NaH_2PO_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

Para la incubación de espermatozoides de caballos se utilizaron diferentes medios en función de los requerimientos de los experimentos.

- **Biggers Whitten and Whittingham's medium (BWW):** Este medio (Tabla III-3), suplementado con BSA (7 mg/ml) y NaHCO_3 (25 mM) hace que adquiera capacidades de medio capacitante para la especie equina [209].

Tabla III-3. Composición del medio BWW

Reactivos	Concentración
Hepes (pH 7.4)	20 mM
KH_2PO_4	1,2 mM
NaCl	96 mM
KCl	4,6 mM
MgSO_4	1,2 mM
CaCl_2	1,7 mM
Glucosa	5,6 mM
Piruvato de Sodio	0,27 mM
Lactato de Sodio	44 mM

- **INRA 96 Extender (IMV Technologies):** Es un medio de aspecto lechoso y estéril con un pH de 7,10 +/- 0,10 y una osmolaridad que oscila entre 330-360 mOSm·Kg⁻¹. A diferencia de otros diluyentes a base de leche existentes en el mercado, éste contiene únicamente la fracción pura de las proteínas micelarias de la leche convirtiéndolo en un medio altamente protector para los espermatozoides. Además contiene antibióticos (Penicilina y Gentamicina) y un fungicida (Amfotericina B). Este medio permite la conservación de los espermatozoides equinos a temperaturas de entre 4-14 °C en condiciones óptimas durante al menos 24 horas e incluso días en condiciones de refrigeración (5 °C).

4. WESTERN BLOTTING

El término “blotting” hace referencia a la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma. Este proceso es necesario ya que todas estas macromoléculas están embebidas dentro de la matriz que forma el gel, lo que imposibilita realizar su detección, mientras que en la membrana se encuentran accesibles al estar adheridas sobre la superficie de la misma.

El *Western blotting* fue desarrollado en el laboratorio de George Starke [210] en la Universidad de Stanford. El nombre (Western, occidental en inglés) le fue dado por W. Neal Burnette [211] y consiste en un juego de palabras con una técnica análoga pero que usa DNA, el Southern (sureño) blot, que en este caso debe su nombre a su descubridor, Edwin Southern. Otras técnicas que fueron nombradas siguiendo este criterio son el Northern blot (en el que se separa e identifica RNA), el Eastern blot, el South/Western blotting.

Ésta técnica nos permitirá identificar diferentes proteínas, además de discernir el estado de fosforilación de las mismas en diferentes residuos. A continuación detallaremos los pasos de dicha técnica tal y como se ha realizado en nuestro laboratorio (Ilustración III-I).

4.1 OBTENCIÓN DE LISADOS CELULARES TOTALES

Una vez tratadas las células, 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 III-4) mantenido a 4 °C. A continuación se procedió a lisar las células en una cantidad de tampón de (Tabla III-5) proporcional al número de células utilizadas, para extraer las proteínas. Para optimizar la extracción proteica, los lisados se sometieron a sonicación 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 rotación a 4 °C. Después de éste apartado los lisados se centrifugaron a 15.000 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, membranas y restos nucleares, se desechó.

Tabla III-4. Composición del Tampón fosfato salino (pH 7,4)

Reactivos	Concentración
NaCl	137 mM
KCl	2,70 mM
Na ₂ HPO ₄	5,62 mM
NaH ₂ PO ₄	1,09 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM

Tabla III-5. Composición del Tampón de Lisis (pH 7,4)

Reactivos	Concentración
Tris/HCl	50 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	1 %
Deoxicolato	1 %
EGTA	1 mM
EDTA	0,4 mM

4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo descrito por M. Bradford [212]. Este método se basa en la capacidad del colorante Coomassie® Brilliant Blue G-250 de unirse a residuos aromáticos de 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, en nuestro caso en el lector de microplacas Tecan Infinite 200, se puede cuantificar la cantidad de proteínas en relación a un patrón de concentración conocido de proteínas, dado que la intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de proteínas. Una vez determinada la concentración de proteínas añadimos tampón de carga 4X (Tabla III-6) y antes de la electroforesis se calientan las muestras durante 10 minutos a 75 °C para desnaturalizar las proteínas.

Tabla III-6. Composición del Tampón de Carga 4x

Reactivos	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 %

4.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

La electroforesis es un método analítico en el que se separan biomoléculas, en función de su carga eléctrica y bajo la acción de un campo eléctrico. Fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937 [213]. Raymond y Weintraub [214] emplearon como soporte para la electroforesis un gel de poliacrilamida (PAGE), La popularidad de este creció rápidamente y se logró un aumento de la resolución. El dodecil sulfato de sodio (SDS) se introdujo en esta técnica en 1970, y ya en 1972 se emplearon agentes reductores y SDS.

El SDS-PAGE es el método para separar proteínas en base a su peso molecular más ampliamente usado. Su nombre indica que la electroforesis en geles de poliacrilamida se realiza en presencia de SDS (*SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*). Fue descrito por Laemmli en 1970 y se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas en diferentes pesos moleculares.

La velocidad de migración (v) de las partículas en la electroforesis es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, es decir a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V = q E / f$$

Los geles de acrilamida que utilizamos en nuestro trabajo están compuestos de dos partes (Tabla III-7), uno superior denominado gel de

Materiales y Métodos

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 que las proteínas se separan en función de su peso molecular. 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 %. Los geles se prepararon en el interior de unos cartuchos de plástico de la compañía Invitrogen (California, USA).

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 III-8) para permitir la circulación de la corriente. Después se procedió a cargar las proteínas en los pocillos del gel en cantidad variable (entre 10 y 25 μg), dependiendo de la proteína en estudio. Además se incluyeron dos marcadores de peso molecular en función del experimento, compuestos de numerosas proteínas (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen y SeeBlue® Pre-Stained Standard) con tamaño conocido, teñidas de diferentes colores para visualizarlas. Esto nos permitirá posteriormente estimar 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 120 mV para el gel de separación con una fuente PowerPac300 de Bio-Rad. Las muestras migran al ánodo debido a su carga negativa que confiere el SDS. Una vez completada la electroforesis, las proteínas permanecen en el interior del gel separadas en función de su peso molecular.

Tabla III-7. Composición de los geles de poliacrilamida

Reactivos	Gel 4 %	Gel 10 %
Acrilamida/Bisacrilamida	4 %	10 %
Tris/HCl pH 8,8	375 mM	375 mM
TEMED	0,1 %	0,05 %
APS (persulfato amónico)	0,05 %	0,05 %

Tabla III-8. Tampón de electroforesis

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 8,3	2,5 mM
Glicina	19,2 mM
SDS	0,01 %

4.4 ELECTROTRANSFERENCIA

Terminada la electroforesis, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (tamaño del poro 0,45 μm o 0,20 μm) mediante una transferencia húmeda durante 3 horas a 380 mA, en tampón de transferencia (Tabla III-9), utilizando una cubeta de transferencia Mighty Small Transphor de Hoefer Pharmacia Biotech, y todo ello introducido en un baño de agua con hielo para evitar el sobrecalentamiento.

Previo a la realización de la transferencia se equilibra en tampón de transferencia tanto la membrana de nitrocelulosa (10 min) como el gel de acrilamida (5 min). 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) (Ilustración III-I). Una vez formado este *sandwich* se introduce en la cubeta donde se realizara la transferencia. De esta forma las proteínas que tendrán carga negativa migrarán del cátodo al ánodo transfiriéndose de esta forma las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa.

Tabla III-9. Tampón de Transferencia

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 8,3	2,5 mM
Glicina	19,2 mM
Metanol	20 %

4.5 INMUNOBLOTTING Y DETECCIÓN DE LA SEÑAL

En primer lugar para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se bloquea en agitación lenta pero constante durante 1 hora, a temperatura ambiente, o durante toda la noche a 4 °C sin agitación con tampón de bloqueo (Tabla III-10). Una vez completado el bloqueo incubamos la membrana con los anticuerpos y las condiciones indicadas (Tabla III-12). Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó 2 veces con tampón de bloqueo durante 4 minutos a temperatura ambiente. Una vez hechos los lavados, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante 45 minutos a temperatura ambiente. Éste está conjugado

con una peroxidasa de rábano para facilitar su detección. La dilución en tampón de bloqueo utilizada de anticuerpo secundario variará según el utilizado en cada caso (Tabla III-12). Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas fueron lavadas cuatro veces durante 4 minutos a temperatura ambiente, dos de ellas con tampón de bloqueo y dos más con tampón de lavado (Tabla III-11).

Para detectar las proteínas, primero se secaron las membranas con papeles de filtro y a continuación se incubaron con una mezcla del sustrato de la peroxidasa de rábano picante y de luminol, un potenciador de la señal, durante 5 minutos. De esta forma se produce una reacción de quimioluminiscencia y la luz generada impresiona una película fotosensible de forma proporcional a la cantidad de proteína. Una vez revelado el film éste se escaneó y se cuantificó la intensidad de la señal mediante densitometría utilizando el programa informático Gel Pro Analyzer 4.0.

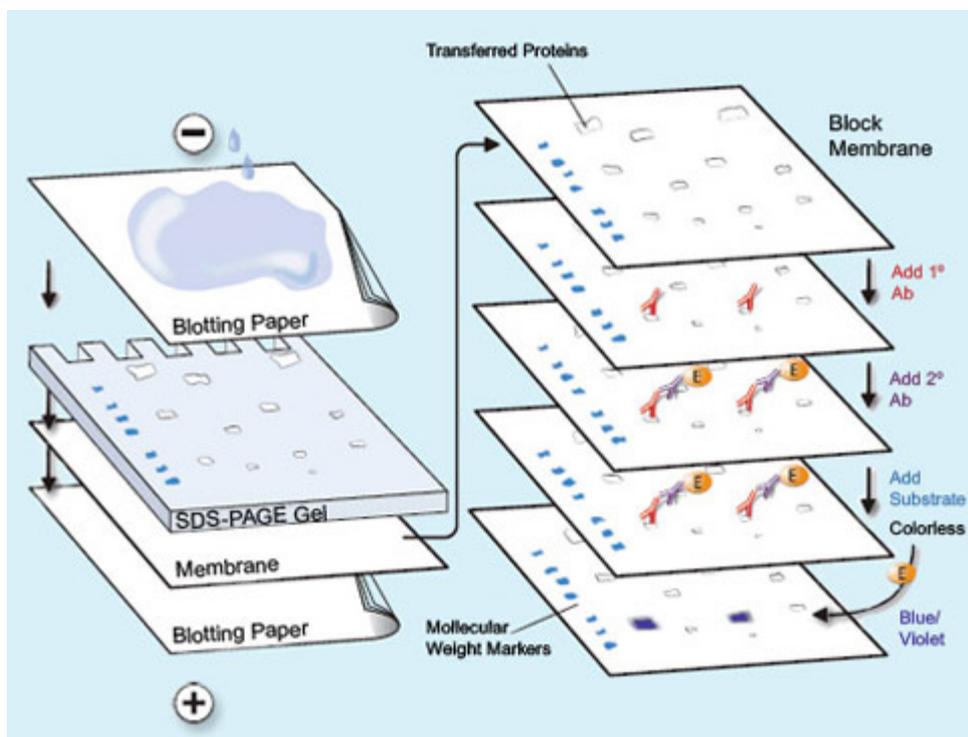


Ilustración III-I. Esquema completo del proceso de *Western blotting*

Tabla III-10. Solución de Bloqueo

Reactivos	Concentración
Tris-HCl pH 8.0	50 mM
CaCl ₂	2 mM
NaCl	80 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)
Leche desnatada en polvo	5 %
BSA	5%

Tabla III-11. Tampón de Lavado

Reactivos	Concentración
Tris/HCl pH 8,0	50 mM
CaCl ₂	2 mM
NaCl	80 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)

Tabla III-12. Listado de anticuerpos primarios usados en *Western blotting*

Proteína	Compañía	N° Catálogo	Especie	Concentración	Incubación
Phospho-JNK (Th183/Tyr185)	Cell Signaling	9251	Conejo	1:1000	12h/4 °C
Phospho-JNK (Th183/Tyr185)	Thermo	PA1-9593	Conejo	1:2000	12h/4 °C
JNK	Cell Signaling	9252	Ratón	1:1000	2h/T.A.
JNK 1/3	Santa Cruz	Sc-474	Conejo	1:500	2h/T.A.
JNK 2	Santa Cruz	Sc-827	Conejo	1:500	2h/T.A.
Tubulina- α	Santa Cruz	23948	Ratón	1:60000	1h/T.A.

5. CITOMETRIA DE FLUJO

El principio en el que se basa esta tecnología es en hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una delante de un haz luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por un software (Ilustración III-II).

Al atravesar el rayo de luz, las células interaccionan con este causando dispersión de la luz, basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan (parámetro denominado Forward Scatter) y al medir la reflexión de la luz de

manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de estas (parámetro denominado Side Scatter). Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de sondas fluorescentes, se pueden evaluar las características evaluadas por estas sondas, como integridad de membrana o actividad mitocondrial. El uso de moléculas fluorescentes distintas (distintos colores de fluorescencia) permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea.

Entre las características espermáticas más frecuentemente analizadas mediante citometría de flujo se incluyen el estudio de la viabilidad espermática, de la integridad acrosomal y de la funcionalidad mitocondrial, así como la investigación del estado de capacitación y la RA de los espermatozoides.

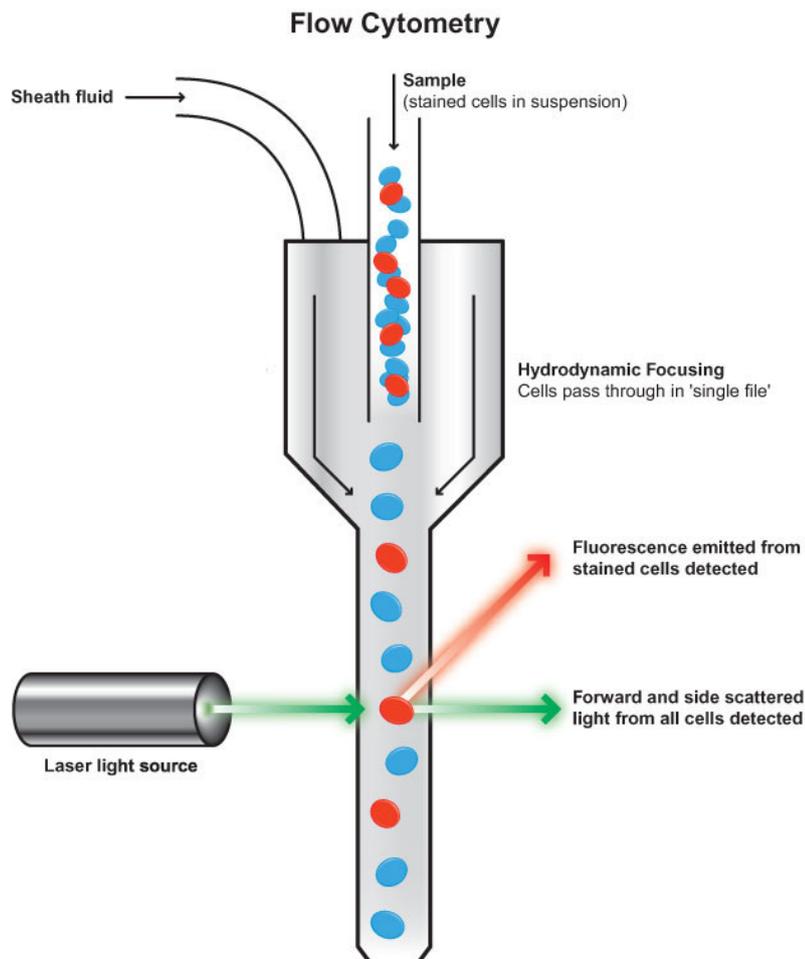


Ilustración III-II. Principio general de la citometría de flujo

A continuación se expondrá la forma de proceder experimentalmente en nuestro laboratorio en relación a la técnica de citometría de flujo.

Los espermatozoides de caballos recién eyaculados son diluidos 1:1 en un diluyente de conservación comercial (INRA 96®) y sometidos a una centrifugación para la eliminación del plasma seminal (10 min, 600 g). A continuación los espermatozoides son resuspendidos en el medio adecuado en función del experimento y llevados a una concentración de 5×10^6 /ml, para la incubación con los distintos tratamientos. Para las mediciones añadiremos 100 μ l de la suspensión de espermatozoides objeto de estudio, 900 μ l de PBS y la correspondiente sonda en función del estudio a realizar, (Tabla III-13) en tubos de 1 ml. Una vez pasado el tiempo de incubación con las sondas, las muestras se analizaron con un citómetro FAC Scan de Bekson Dickinson (BD) equipado con un láser de Argón (488 nm). Posteriormente analizamos la información obtenida durante la adquisición mediante el programa Cell-Quest (BD, Alemania).

Para estudiar la viabilidad celular usamos la combinación de dos sondas: homodímero de Etidio que emite a 617 nm y YO-PRO-1 iodide con una longitud de onda de emisión de 509 nm. Ambas son impermeables y penetran en la célula cuando hay daño en la membrana, uniéndose al DNA, permitiéndonos discriminar poblaciones de células vivas, muertas y poblaciones con distintos grados de daño en la membrana

Para evaluar la actividad caspasa utilizamos como sonda el fluoróforo Isotiocianato de fluoresceína (FITC) que se conjuga con un inhibidor general de las caspasas (VAD-FMK), siendo el FITC-VAD-FMK un marcador in situ que se une a las caspasas activas y fluoresce en verde; además utilizamos de forma combinada el homodímero de etidio, obteniendo así tres subpoblaciones. Por un lado tendremos el porcentaje de espermatozoides muertos, discriminado por el homodímero de etidio, y por otro, la población de espermatozoides con actividad caspasa, donde a su vez podemos distinguir entre los que poseen alta actividad caspasa y baja actividad caspasa. Además para medir apoptosis también hemos utilizado el kit

Materiales y Métodos

Cleaved Caspase 3/7 de Invitrogen, formado por un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD) conjugados con un colorante, que cuando detectan a la caspasa 3 activa, esta provoca un corte que libera el colorante que se unirá al DNA, emitiendo una señal que es recogida por el citómetro.

Por último, para el estudio del estado de potencial de membrana mitocondrial hemos usado la sonda JC-1. Cuando hay un alto potencial en las membranas mitocondriales el JC-1 forma agregados multiméricos emitiendo en naranja a una longitud de onda de 590 nm cuando es excitado a 488 nm. Sin embargo, el JC-1 forma monómeros en mitocondrias con bajos potenciales de membrana, emitiendo en el espectro verde a una longitud de entre 525 nm y 530 nm. Con esta sonda el citómetro discierne tres poblaciones: espermatozoides con alto potencial de membrana, espermatozoides con un potencial de membrana intermedio, y, por último, espermatozoides con bajo potencial de membrana [215].

Tabla III-13. Listado de Sondas usadas en citometría.

Sondas	Concentración	Condiciones
YO-PRO-1 iodide	50 nM	16 min / 37 °C
JC-1	1,5 µM	40 min / 37 °C
FITC-FMK-VAD	5 µM	30 min / 37 °C
Homodímero de Etidio	1,157 µM	10 min / 37 °C
Hoechst 33342	50 nM	16 min / 37 °C
Caspase 3-7 green	2 µM	30 min/ T.A.

6. MEDIDA DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Un sistema Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) consta de varias unidades: un microscopio de contraste de fases conectado a una cámara de vídeo, que envía la imagen desde el microscopio a un monitor. Posteriormente, esta imagen es enviada desde el monitor a un ordenador, donde un analizador digital de imagen captura varias fotografías de cada campo microscópico seleccionado. El software discrimina a los espermatozoides de otras partículas que puedan aparecer en la imagen por su tamaño, y analiza la trayectoria recorrida por cada espermatozoide individual durante esa fracción de segundo.

Para evaluar los parámetros relacionados con la movilidad espermática en nuestro laboratorio. Las células se incubaron con los tratamientos y tiempos indicados en las figuras a una concentración de $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ y la movilidad de los espermatozoides se midió utilizando unas cámaras de vidrio antiadherente y una profundidad de $20 \mu\text{m}$ (cámaras leja®). En estas cámaras, atemperadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, se añadieron $2 \mu\text{l}$ de la suspensión espermática y se procedió a medir los diferentes parámetros de la movilidad. Las fotografías fueron obtenidas cada 25 milisegundos en alta resolución y digitalizadas en un tiempo de procesamiento de 1 segundo utilizando un objetivo de contraste de fase negativo 10X. Los espermatozoides con una velocidad media menor de $10 \mu\text{m/s}$ eran considerados inmóviles, mientras que aquellos con velocidades superiores a $15 \mu\text{m/s}$ eran considerados móviles [216].

7. INMUNOCITOQUÍMICA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

La inmunocitoquímica es una técnica que nos permite analizar la distribución subcelular de diferentes proteínas. Al igual que en el *Western blotting*, se basa en la utilización de un anticuerpo específico frente a la proteína en estudio, y el anticuerpo secundario posee un componente fluorescente que nos permitirá la visualización mediante microscopía de fluorescencia o mediante microscopía confocal. El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores [217].

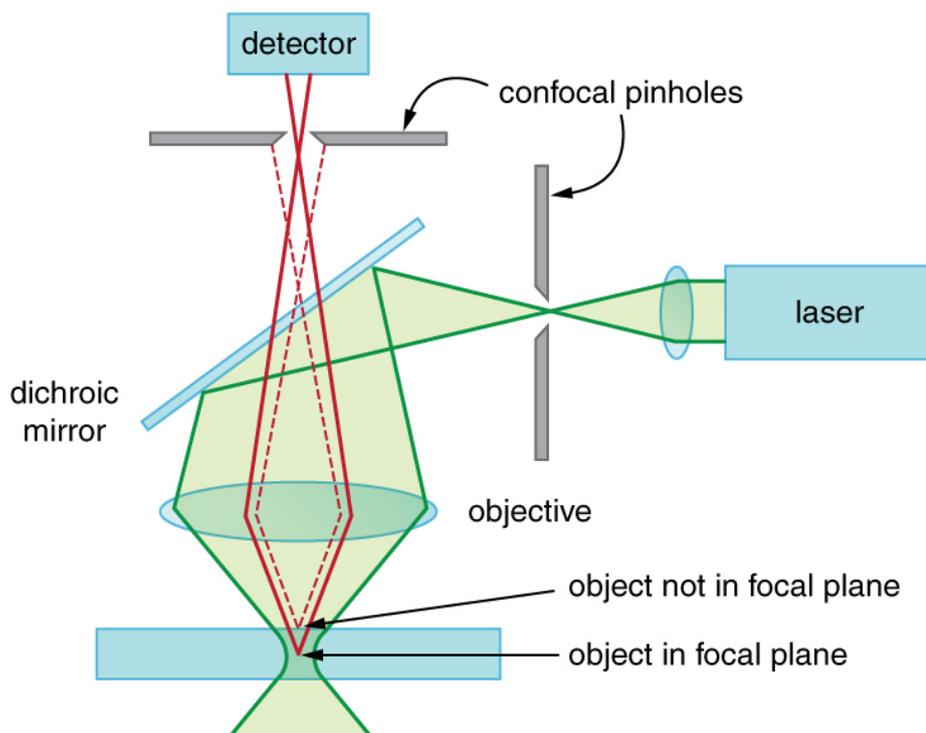


Ilustración III-III. Esquema del funcionamiento de un microscopio confocal

En nuestros experimentos las células se incubaron en placas pretratadas con 0,5 ml de poli-L-lisina diluida en agua Milli-Q en proporción 1:7,5. Una vez añadida la poli-L-lisina se espera 10 minutos y pasado este

tiempo se retira el líquido y se deja secar. Una vez completado el tratamiento los espermatozoides se lavaron con PBS y se diluyeron en este mismo tampón hasta alcanzar una concentración de $1 \times 10^7 \text{ml}^{-1}$. De esta suspensión celular se depositaron 15 μl en la placa pretratada y se esperó 10 minutos para permitir que los espermatozoides se adherieran al fondo. Posteriormente se incubaron con formaldehído al 4 % durante 15 minutos y después con Tritón 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. A continuación se volvieron a lavar con PBS 3 veces durante 10 minutos y se bloquearon las muestras con una solución de BSA al 5 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez completado el bloqueo, se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios en las condiciones indicadas en la tabla (Tabla III-14), toda la noche a 4 °C en una cámara húmeda. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron 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.

Tabla III-14. Listado de anticuerpos y condiciones utilizados en inmunocitoquímica.

Proteína	Compañía	Concentración	Especie	Secundario	Incubación
Phospho-JNK (Th183/Tyr185)	Cell Signaling	1:100	Conejo	Alexa Fluor 488	12h/4 °C
Phospho-JNK (Th183/Tyr185)	Thermo	1:100	Conejo	Alexa Fluor 488	12h/4 °C
Phospho-JNK (Th183/Tyr185)	Cell Signaling	1:400	Ratón	Alexa Fluor 488	12h/4 °C
JNK 1/3	Santa Cruz	1:100	Conejo	Alexa Fluor 488	12h/4 °C
JNK 2	Santa Cruz	1:100	Conejo	Alexa Fluor 488	2h/4 °C
JNK	Cell Signaling	1:50	Conejo	Alexa Fluor 488	12h/4 °C

8. TÉCNOLOGÍA DE CONSERVACIÓN EN LOS ESPERMATOOZIDES DE MAMÍFEROS

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la utilización de varios procesos biotecnológicos en el manejo de espermatozoides con el fin de garantizar la bioseguridad y la trazabilidad reproductiva, así como incrementar el rendimiento y facilitar la reproducción asistida.

Para el presente trabajo hemos utilizado la refrigeración, la centrifugación en capa simple y la criopreservación, de las cuales detallaremos a continuación su modo de proceder.

REFRIGERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Esta técnica consiste en preservar los espermatozoides en un diluyente de conservación durante unos días a una temperatura constante (5 °C en caballo y 18 °C en cerdo).

Los espermatozoides de caballos fueron extraídos y procesados según se indica en el apartado 2 de este capítulo. Una vez que se probaron varios diluyentes de conservación tanto comerciales como realizados en nuestro laboratorio, decidimos conservarlo para la realización de nuestros experimentos en el diluyente comercial INRA96, ya que fue con el que mejores resultados obtuvimos. Los espermatozoides diluidos en INRA96, fueron mantenidos en refrigeración constante (5 °C) durante el tiempo que estimamos para la realización de nuestros estudios (1-5 días).

CENTRIFUGACIÓN EN CAPA SIMPLE O *SINGLE LAYER CENTRIFUGATION*(SLC)

El proceso ha sido descrito anteriormente por Morrell [218]. En resumen los espermatozoides una vez extraídos y lavados de forma rutinaria son sometidos a una centrifugación por densidad, usando para dicha separación una capa de Androcoll TM como único coloide, recuperando una población de espermatozoides con características morfo-funcionales-mejoradas.

CRIOPRESERVACIÓN

Los eyaculados fueron lavados y resuspendidos en un volumen 1:1 en INRA96, posteriormente fueron centrifugados 10 minutos a 600 g. El pellet resultante fue resuspendido en un medio de congelación protector que contiene glicerol. Los espermatozoides fueron lentamente enfriados a 4 °C y cargados en unas pajuelas de plástico de 0,5 ml, donde son posteriormente congeladas en nitrógeno líquido (LN₂) durante 10 minutos, y siendo finalmente conservadas en tanques con LN₂. Tras un mes, las pajuelas son descongeladas en un baño de agua a 37 °C durante 10 segundos.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos obtenidos se expresaron como media \pm el error estándar de la media (SEM). Para la comparación estadística entre dos grupos se utilizó la prueba de T de Student. Se consideraron resultados estadísticamente significativos cuando los valores de p eran menores de 0,05.

Para estudiar las posibles correlaciones entre los resultados obtenidos mediante *Western blotting* y los de los diferentes parámetros seminales obtenidos, nos ayudamos del programa estadístico IBM Spss Statistics 19. En primer lugar evaluamos la normalidad del conjunto de datos mediante el Test de Kolmogorov-Smirnov. Una vez conocida la distribución de los datos, estudiamos la correlación estadística entre los conjuntos de datos. Utilizamos dos tipos de coeficientes de correlación dependiendo de los conjuntos de datos a estudiar: coeficiente de Pearson (distribución paramétrica). La prueba de significación fue bilateral para ambos coeficientes. Se consideró que existía una correlación significativa cuando p era menor que 0,05.

IV. RESULTADOS

1. Identificación de la proteína quinasa N-terminal de c-Jun (JNK) en espermatozoides de mamíferos

Para la identificación de la proteína quinasa de JNK en espermatozoides de mamíferos utilizamos la técnica *Western blotting* descrita en la sección de materiales y métodos. En este estudio hemos utilizado lisados de espermatozoides de cerdo, caballo, perro y hombre. Además, para asegurarnos de la especificidad de los anticuerpos usados, paralelamente se utilizaron controles positivos de diferentes tejidos de rata. Estos controles nos han permitido evaluar si los anticuerpos utilizados eran capaces de reconocer la proteína diana en especies no testadas, y comparar estos resultados con los obtenidos en especies previamente estudiadas por la compañía fabricante del anticuerpo.

En primer lugar hemos identificado la JNK utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-JNK que reconoce las tres isoformas diferentes, JNK1, 2 y 3 (Cell Signaling) (Figura IV-1). Para confirmar estos resultados, utilizamos otro anticuerpo comercial policlonal de conejo anti-JNK de una compañía diferente (Biolegend), que reconoce un epítipo distinto del anticuerpo probado anteriormente. Los resultados obtenidos muestran dos bandas con pesos moleculares que oscilan entre 48 kDa (JNK1) y 55 kDa (JNK2 y JNK3) (Figura IV-1), equivalentes a los pesos descritos para las tres isoformas de JNK en la bibliografía [153, 168].

A continuación hemos tratado de corroborar cuales son las isoformas presentes en los espermatozoides. Para ello y también mediante *Western blotting*, hemos usado un anticuerpo comercial que reconoce las isoformas 1 y 3 (Santa Cruz (sc-473)). Los resultados vuelven a mostrar 2 bandas, una de peso aproximado de 55 kDa y otra de 48 kDa correspondientes a JNK 3 y JNK1 respectivamente (Figura IV-2), y que coinciden con los pesos descritos en la bibliografía para ambas isoformas [219]. Para identificar JNK2

Resultados

utilizamos un anticuerpo policlonal de conejo anti-JNK de la compañía Santa Cruz que reconoce solo la isoforma 2 de esta proteína [220-221]. Los lisados utilizados para este experimento han sido de espermatozoides de cerdo, hombre, perro y caballo, además, como controles positivos, se añadieron lisados de páncreas y riñón de rata. Los resultados obtenidos mostraron claramente una sola banda con un peso molecular de unos 55 kDa, lo cual se corresponde con el peso molecular aparente descrito en la bibliografía [153, 222]. Con estos resultados se confirma que las tres isoformas de JNK están presentes en los espermatozoides de los distintos mamíferos utilizados en este estudio.

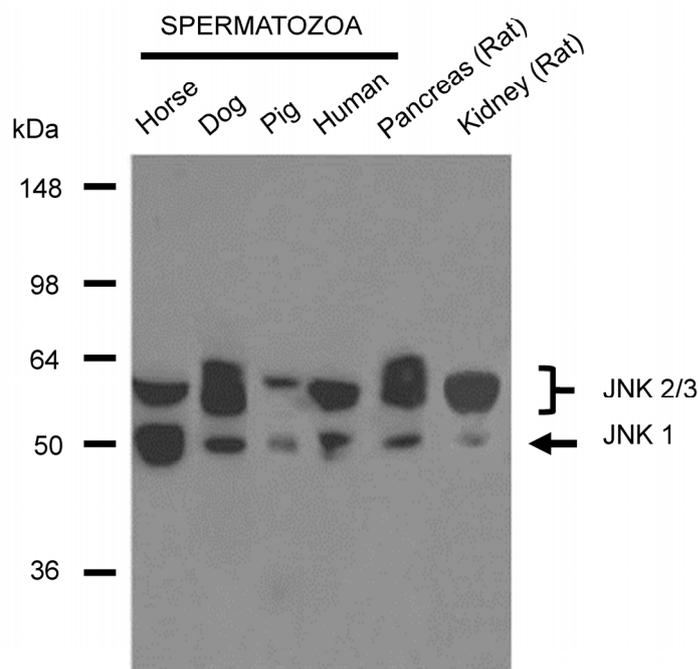


Figura IV-1. Identificación de JNK en espermatozoides de mamíferos. La identificación se realizó mediante *Western blotting* utilizando un anticuerpo anti-JNK (CS-9252). En la figura mostramos los resultados obtenidos de lisados de espermatozoides de cuatro especies distintas de mamíferos. En las dos últimas calles incluimos como control positivo células acinares de páncreas y riñón, ambos tejidos de rata. El resultado es representativo de otros 4 experimentos independientes.

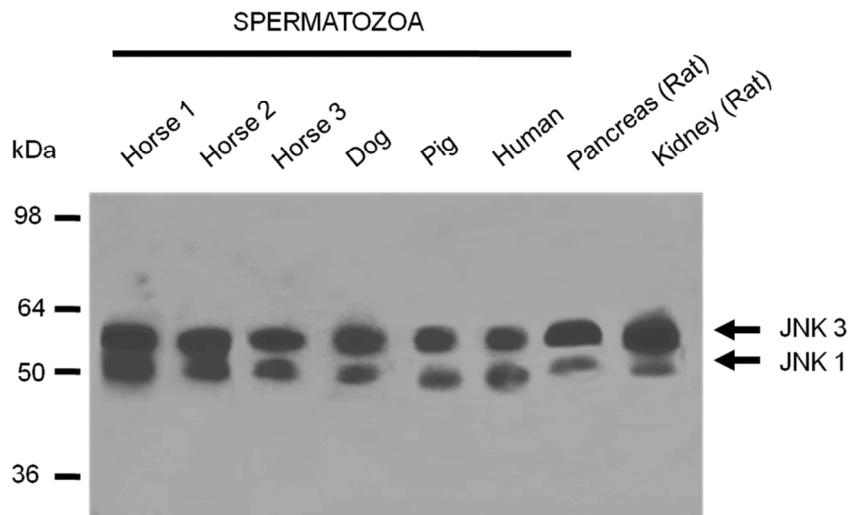


Figura IV-2. Identificación de JNK 1 y 3 en espermatozoides de caballos. La identificación se realizó mediante *Western blotting* utilizando un anticuerpo de Santa Cruz Biotechnology (sc-474). Se muestran los resultados obtenidos de lisados de los espermatozoides de caballo (3 individuos), perro, cerdo y hombre, además de controles positivos de tejido de rata (páncreas, riñón). El resultado es representativo de otros 3 experimentos independientes.

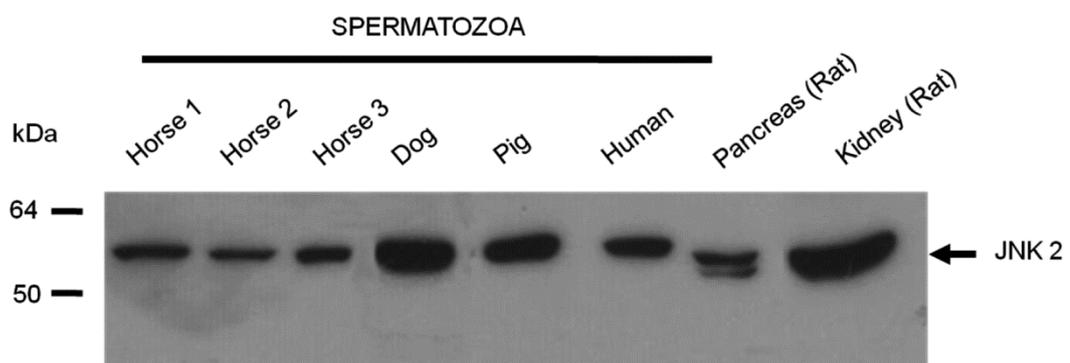


Figura IV-3. Identificación de JNK 2 en espermatozoides de mamíferos. La identificación se realizó mediante *Western blotting* utilizando un anticuerpo de Santa Cruz Biotechnology (sc-827). El peso molecular de la banda fue estimado mediante un programa informático (GelPro Analyzer). En la figura 3 mostramos los resultados obtenidos de lisados de espermatozoides de caballo (3 individuos), perro, cerdo y hombre además de los controles positivos de tejido de rata (páncreas, riñón). El resultado es representativo de otros 4 experimentos independientes.

2. Localización subcelular de la proteína JNK en espermatozoides de caballo.

Una vez identificadas las 3 isoformas de JNK en espermatozoides de mamíferos mediante *Western blotting*, estudiamos su distribución subcelular mediante inmunocitoquímica y microscopia confocal. Para ello utilizamos los anticuerpos comerciales anti-JNK que han demostrado inmunoreactividad en *Western blotting* para las distintas isoformas (JNK total, JNK 1/3 y JNK 2), combinados con un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo *Alexa Flúor 488*, en células previamente fijadas y permeabilizadas (véase apartado de metodología).

Los resultados muestran una distribución uniforme de la proteína por prácticamente todo el espermatozoide en condiciones basales no estimuladas, haciéndose más evidente la presencia de la JNK en la cola y en la región postacrosómica. Este patrón de distribución es común para todas las isoformas (Figura IV-4).

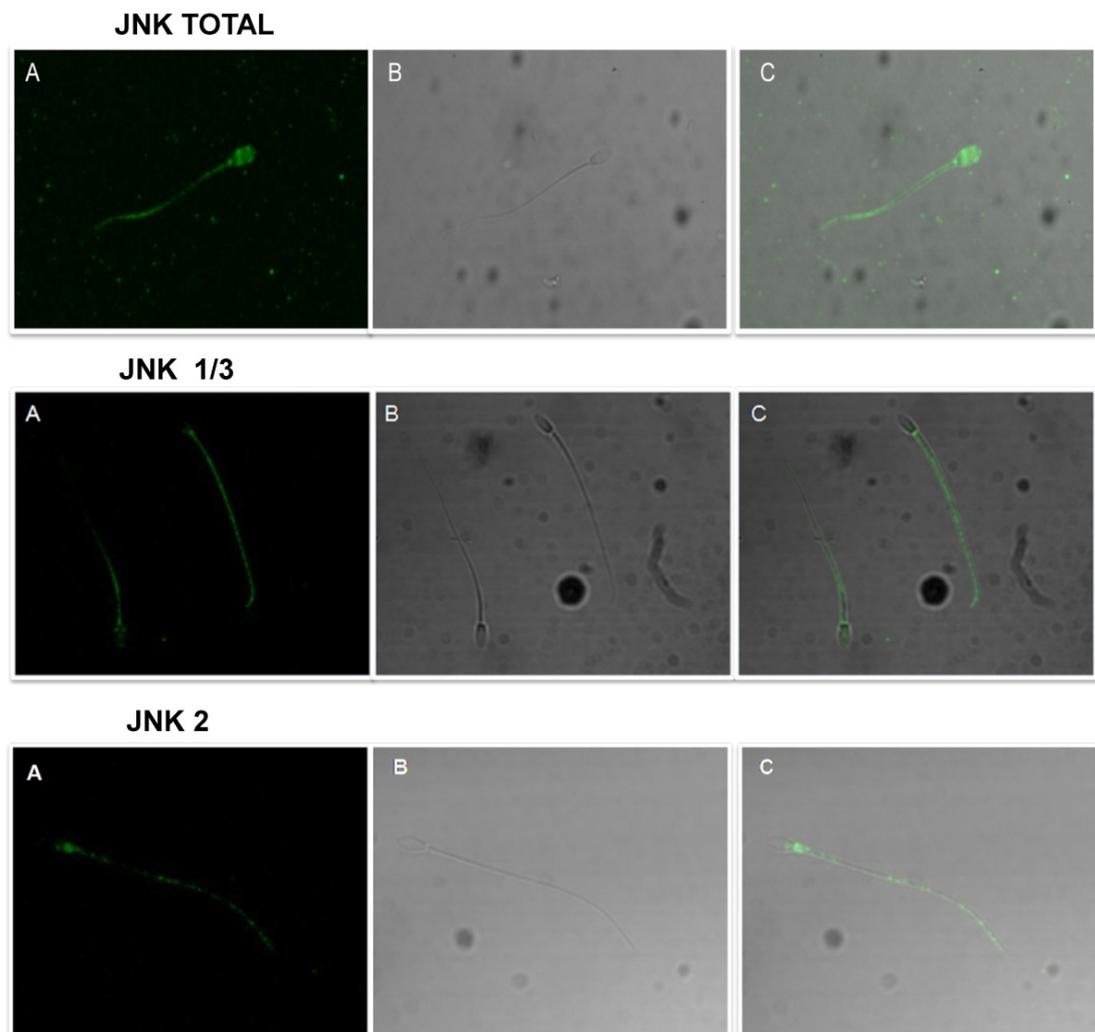


Figura IV-4. Inmunolocalización de las distintas isoformas de JNK en espermatozoides de caballos. Las imágenes mostradas en los paneles fueron obtenidas con un microscopio láser confocal (Bio-Rad MRC1024). En los **paneles A** muestra las imágenes de fluorescencia obtenidas excitando las muestras con un láser de Argón de 488 nm utilizando un filtro de absorción de 515 nm. Los **paneles B** muestran las imágenes obtenidas con luz transmitida y los **paneles C** son una superposición de ambas imágenes. En la línea superior se muestra la localización subcelular de JNK total, en la intermedia y en la inferior vemos la distribución correspondiente a las isoformas 1/3 y 2 de JNK, respectivamente.

3. Localización subcelular de la proteína JNK en espermatozoides de hombre

Una vez caracterizada la localización subcelular de JNK en espermatozoides de caballo, nos propusimos realizar un estudio similar en espermatozoides humanos para determinar la distribución subcelular de la JNK en esta especie. Hemos utilizado, al igual que en el estudio anterior, anticuerpos anti-JNK específicos de la JNK para las distintas isoformas identificadas en *Western blotting* (JNK total, JNK1/3 y JNK2) combinados con un anticuerpo secundario conjugado con el fluoróforo *Alexa Fluor 488*, en células previamente fijadas y permeabilizadas (véase apartado de metodología).

Los resultados muestran una distribución similar a la obtenida en caballo, localizándose con más acentuación en la región postacrosómica y en la cola (Figura IV-5).

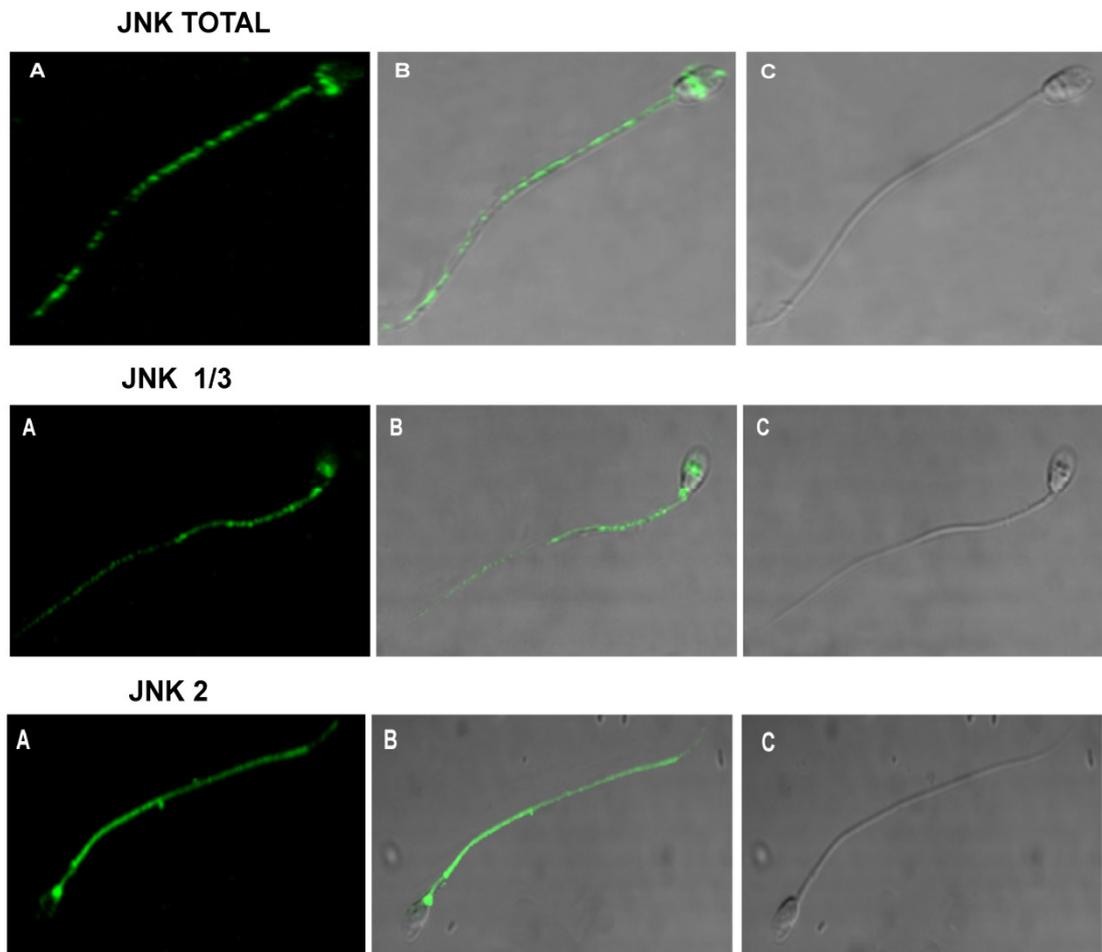


Figura IV-5. Inmunolocalización de las distintas isoformas de JNK en espermatozoides de hombres. Las imágenes mostradas en los paneles fueron obtenidas con un microscopio láser confocal (Bio-Rad MRC1024). En los **paneles A** muestra las imágenes de fluorescencia obtenidas excitando las muestras con un láser de Argón de 488 nm utilizando un filtro de absorción de 515 nm. Los **paneles B** muestran las imágenes obtenidas con luz transmitida y los **paneles C** son una superposición de ambas imágenes. En la primera imagen vemos la localización subcelular de JNK total, en la segunda y tercera vemos la distribución correspondiente a las isoformas 1/3 y 2 de JNK respectivamente

4. Estudio de la fosforilación de JNK en diferentes condiciones de estrés

Como ya se ha expuesto en la introducción, la JNK es una proteína de la familia de las MAPK que responde a estímulos de estrés de diferentes orígenes en células somáticas [223]. Debido a esto hemos evaluado los cambios producidos en la fosforilación de la JNK, cuando los espermatozoides son incubados bajo diferentes condiciones inductoras de estrés celular. Los cambios producidos se evaluaron mediante *Western blotting* con anticuerpos fosfoespecíficos anti-JNK (T183/Y185), que reconocen la fracción activa (fosforilada) de la proteína. Debido a que la fosforilación en los residuos estudiados (T183/Y185) es requerida por la proteína para adquirir actividad catalítica, el estudio del estado de fosforilación de estos residuos puede considerarse equivalente a su nivel de activación [156, 201, 224-228].

Los resultados muestran como en los espermatozoides que han sido incubados en condiciones de estrés oxidativo, por la adición de peróxido de hidrógeno, o en los que se ha inducido daño genómico, mediante la exposición a luz ultravioleta, se detecta un incremento en la fosforilación de JNK respecto a la fosforilación existente en las células que no han sido estimuladas (muestras control) (Figura IV-6). El efecto más acusado se consigue con el estrés oxidativo, alcanzando un incremento neto de fosforilación de $2,12 \pm 0,5$, con respecto al valor control, tras una hora de incubación. El efecto obtenido con la radiación ultravioleta fue más modesto ($1,33 \pm 0,21$) aunque significativo.

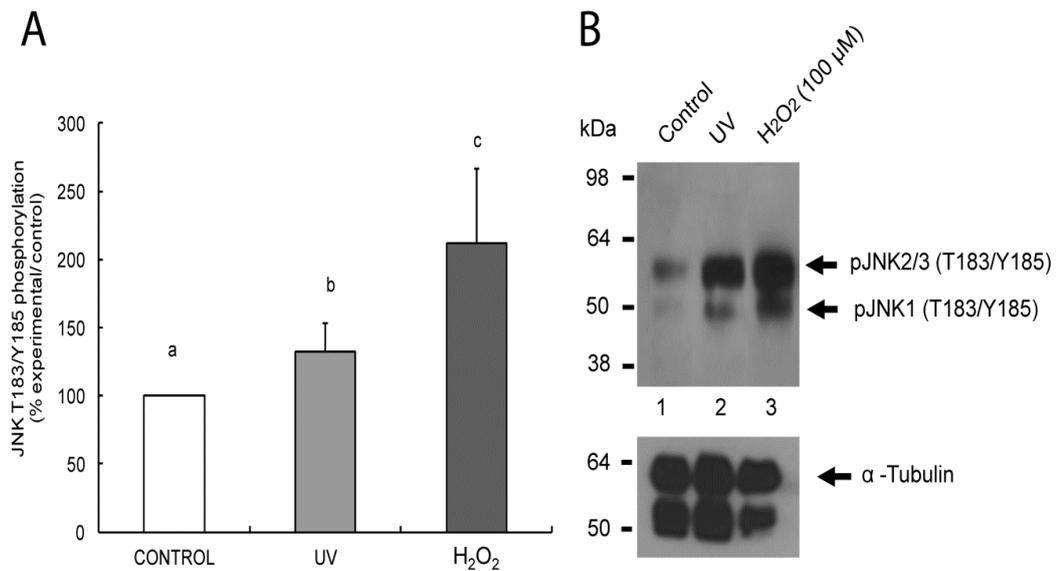


Figura IV-6. Regulación de JNK en espermatozoides de caballo mediada por diferentes condiciones de estrés. Los espermatozoides fueron incubados en condiciones de estrés celular. Las diferentes condiciones de incubación fueron: Control (calle 1), irradiación ultravioleta (100 J/m²) (calle 2) y estrés oxidativo (H₂O₂, 100 μM) (calle 3). Las muestras fueron lisadas y analizadas por *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico-anti-JNK de Cell Signaling (1:1000). **(A)** Se muestran los resultados expresados como porcentaje del incremento de los estímulos respecto al control (condiciones fisiológicas). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas, hallada mediante una t de Student para muestras desapareadas (p<0.05). **(B)** Mostramos un *Western blotting* representativo de los resultados obtenidos con su control de carga correspondiente. El experimento es una muestra representativa de otros 10 experimentos independientes.

5. Localización subcelular de la fracción activa (fosforilada) de JNK en espermatozoides de mamíferos.

Mediante inmunocitoquímica y microscopia confocal hemos estudiado la localización subcelular de la fracción fosforilada de JNK en espermatozoides de mamíferos, sometidos a diferentes estreses (H_2O_2 100 μM ; UV 100 J/m^2). Una vez estimuladas, la preparación de las células para el experimento se realizó de forma similar a como detallamos en el apartado de metodología, usando esta vez como anticuerpo primario un fosfo-anti-JNK (T183/Y185) de Cell Signaling y un anticuerpo secundario marcado con *Alexa Fluor 488*.

Los resultados muestran como los espermatozoides que han sido previamente sometidos a estrés poseen una mayor intensidad de fluorescencia comparado con el control (Figura IV-7), esta diferencia está directamente relacionada con el grado de fosforilación de la proteína. La fracción activa de la proteína se distribuye de forma equivalente a la proteína total mostrando una distribución homogénea en los espermatozoides, con mayor intensidad en la cola y la región postacrosómica. Es decir, una vez la proteína ha sido activada aparentemente no experimenta una redistribución subcelular.

Phospho-JNK (T183/Y185)

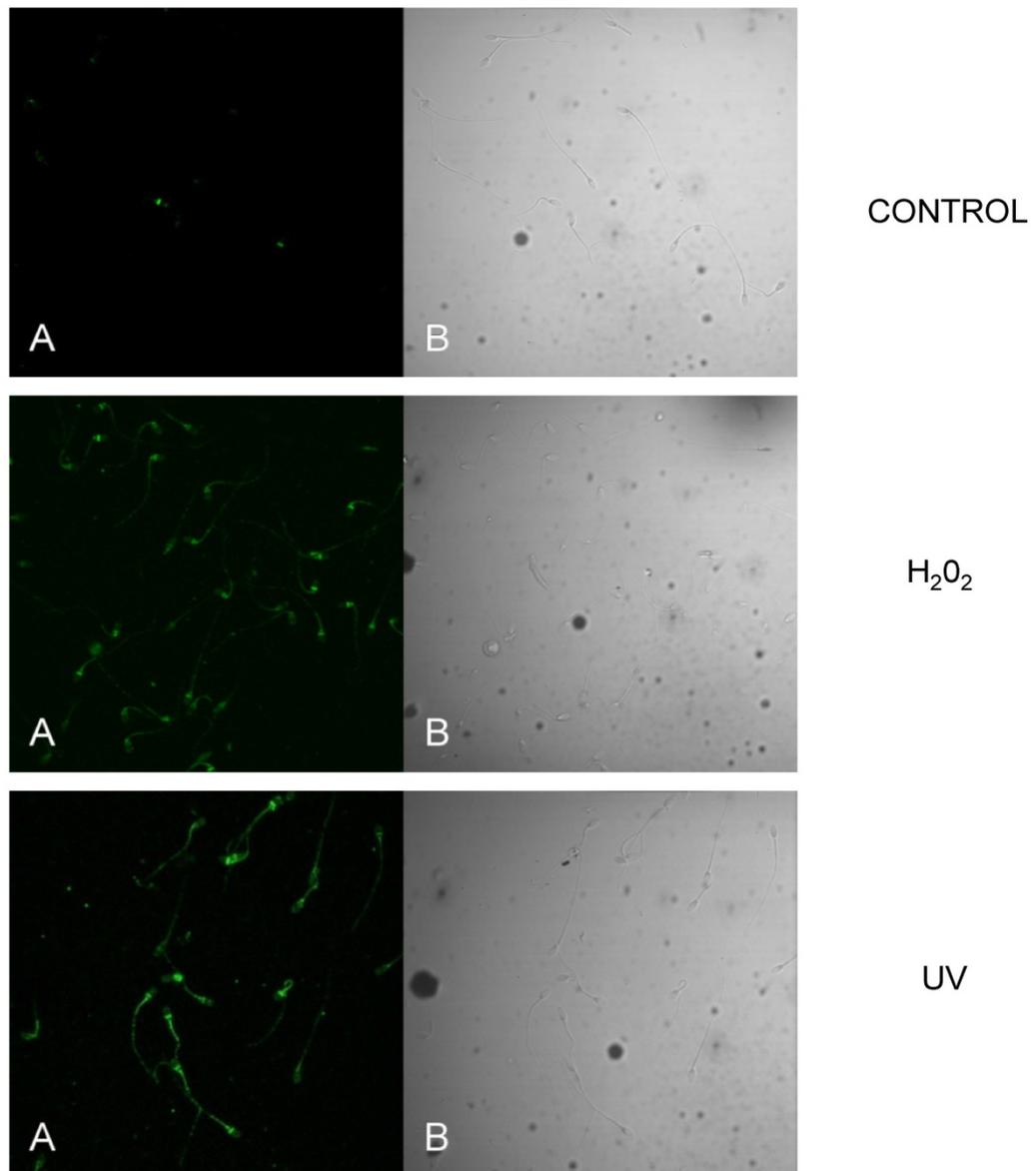


Figura IV-7. Inmunolocalización de la proteína JNK fosforilada en espermatozoides de caballos. Las imágenes mostradas en los paneles fueron obtenidas con un microscopio láser confocal (Bio-Rad MRC1024). El **panel A** muestra la imagen de fluorescencia obtenida excitando la muestra con un láser de Argón de 488 nm utilizando un filtro de absorción de 515 nm. El **panel B** muestra la imagen obtenida con luz transmitida.

6. Localización subcelular de la fosfatasa la fosfatasa DUSP4 (MKP2) en espermatozoides de mamíferos

Una vez estudiada la localización subcelular de JNK tanto en condiciones fisiológicas (sin estimular) como en condiciones de estrés, estudiamos la distribución de la fosfatasa **DUSP4** (*dual specificity phosphatase 4*) en espermatozoides de mamíferos, una enzima que ejerce su acción sobre miembros de la familia de las MAPK incluyendo la JNK, revirtiendo su fosforilación y, por tanto, inhibiendo su actividad.

Los resultados muestran como DUSP4 está localizada, al igual que JNK, a lo largo de toda la cola, siendo la pieza conectora la zona de mayor fluorescencia. Respecto a la cabeza, también se detecta la señal específica de forma difusa por toda su estructura, aunque en menor grado que en la cola (Figura IV-8). Por lo tanto, como era esperable la distribución de la fosfatasa coincide con la de su sustrato.

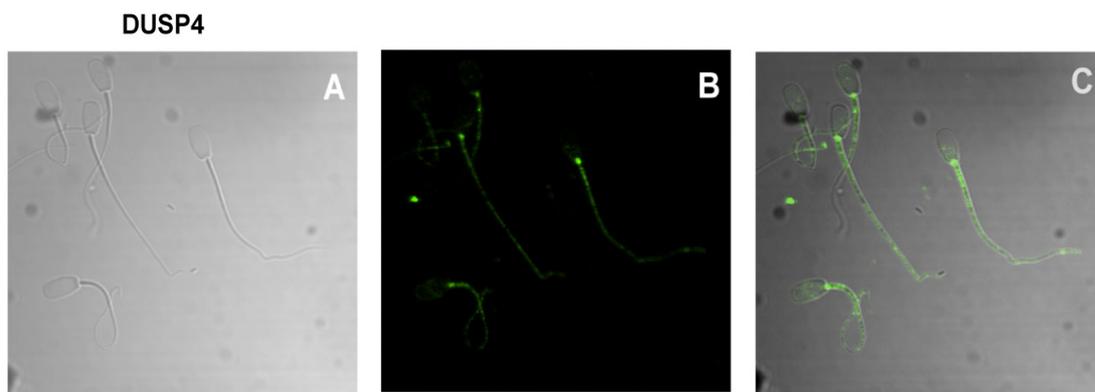


Figura IV-8 Inmunolocalización de DUSP4 en los espermatozoides mamíferos. Los espermatozoides se trataron como se describe en Materiales y métodos (ver Inmunocitoquímica) y posteriormente se incubaron con un anticuerpo anti-DUSP4. El **panel A** muestra la imagen obtenida con luz transmitida. El **panel B** muestra la imagen de fluorescencia y el **panel C** muestra la superposición de ambas imágenes.

7. Efecto de la activación de PKA en la fosforilación de JNK

Se ha descrito que gran parte de los cambios de tipo capacitante que experimentan los espermatozoides pueden ser mimetizados por el empleo de análogos del cAMP permeables por la membrana plasmática, como el 8-Br-cAMP. Respecto a la diana molecular del cAMP, al igual que ocurre en las células somáticas, este segundo mensajero media su acción en los espermatozoides principalmente a través de la activación de la PKA [229-230]. Por tanto, debido a que esta quinasa es una de las principales reguladoras de la actividad espermática quisimos cuantificar el estado de actividad de JNK tras la activación fisiológica de la PKA en espermatozoides. Para ello incubamos las células en presencia de 8-Br-cAMP, un análogo no hidrolizable del cAMP, a distintos tiempos y concentraciones.

En primer lugar y utilizando como aproximación inicial resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio sobre las curvas de concentración del cAMP en la función espermática, realizamos una curva dosis-efecto y otra de tiempo en los que los espermatozoides de caballos fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de 8-Br-cAMP (0-1000 μ M) (Figura IV-10) y con distintos tiempos (0-180 min) (Figura IV-9) con el fin de discernir si la activación selectiva de la PKA pudiera modificar la fosforilación de JNK.

Sorprendentemente los resultados indican que la activación selectiva de la vía cAMP/PKA induce un aumento significativo en la activación de la JNK en ausencia de estrés celular, obteniendo la respuesta más elevada a 90 minutos de incubación (37 °C) y a una concentración de 500 μ M de 8-Br-cAMP.

Resultados

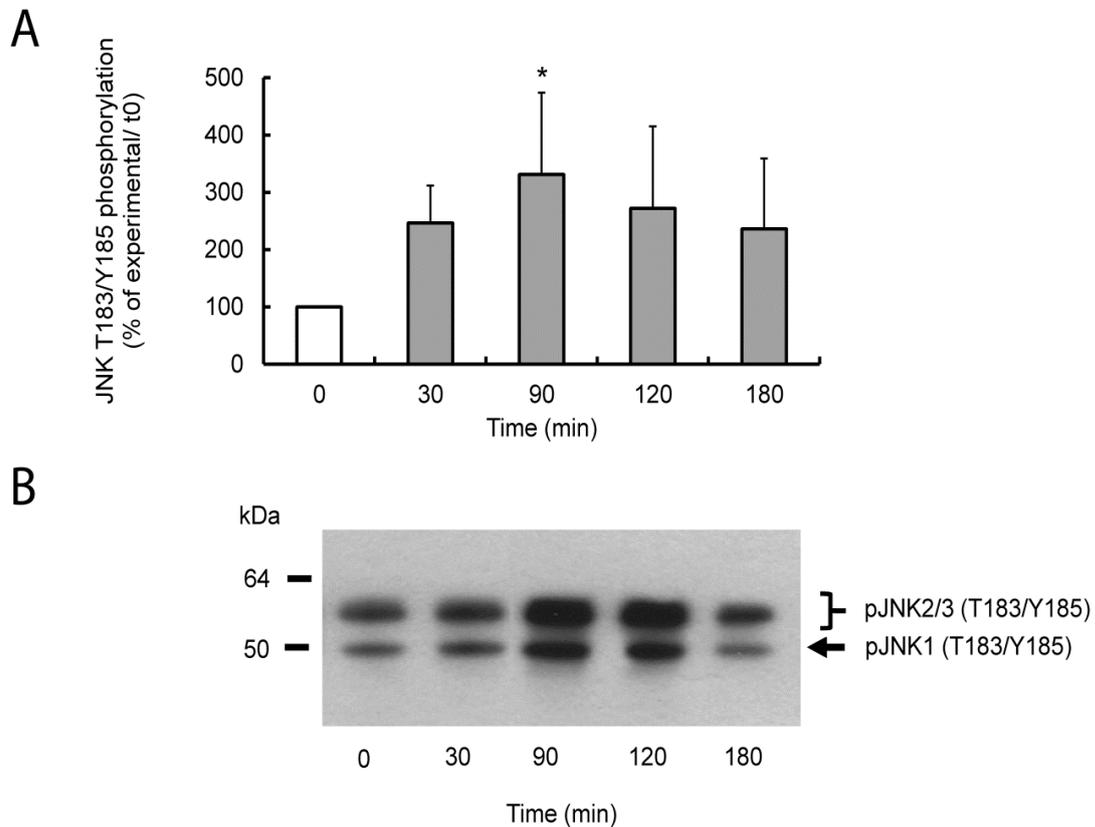


Figura IV-9. Curva de tiempo en la fosforilación de JNK en espermatozoides de caballos incubados con 8-Br-cAMP. Los espermatozoides de caballo fueron incubados durante los tiempos indicados a una temperatura de 37 °C en presencia de 8-Br-cAMP (500 μ M), posteriormente fueron lisados y el estado de fosforilación fue analizado mediante *Western blotting*. En el **panel A** se muestra la media \pm SEM de 8 experimentos independientes expresados como porcentaje del incremento respecto al control (tiempo 0). El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas, hallada mediante una t de Student para muestras desapareadas ($p < 0.05$). En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo.

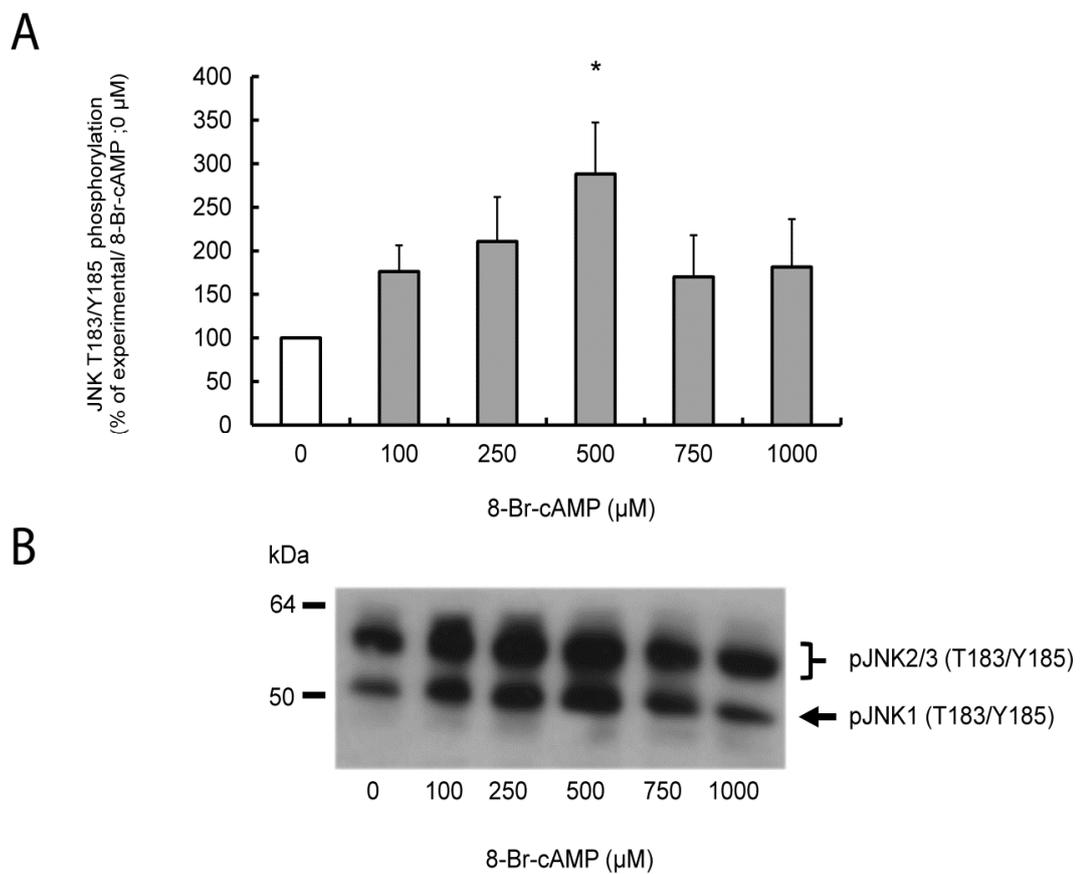


Figura IV-10. Efecto de la concentración de 8-Br-cAMP en la fosforilación de JNK en espermatozoides de caballos. Los espermatozoides fueron incubados a distintas concentraciones de 8-Br-cAMP a 37 °C durante 90 minutos. Posteriormente fueron lisados y el estado de fosforilación de JNK fue analizado mediante *Western blotting*. En el **panel A** se muestra la media \pm SEM de 8 experimentos independientes expresado como porcentaje del incremento respecto al control (sin 8-Br-cAMP). El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas, hallada mediante una t de Student para muestras desapareadas ($p < 0.05$). En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo

8. Localización subcelular de la fracción activa de JNK en espermatozoides incubados con 8-Br-cAMP

Después de determinar mediante *Western blotting* que JNK puede ser activada en los espermatozoides en respuesta a un estímulo fisiológico como la activación de la vía de la cAMP/PKA quisimos caracterizar la localización subcelular de la fracción activa de la proteína cuando los espermatozoides son estimulados mediante un análogo del cAMP, y tratar de establecer si existen diferencias en relación a los espermatozoides sometidos a estrés. Los espermatozoides de caballo recién eyaculados fueron incubados a 37 °C durante 90 min en presencia de una concentración de 500 μ M de 8-Br-cAMP. Una vez pasado el tiempo de incubación las muestras fueron estudiadas mediante inmunocitoquímica y microscopia confocal según se detalla en el apartado de Metodología utilizando un anticuerpo primario fosfoespecífico anti-JNK (T183/Y185) de Cell Signaling.

Los resultados (Figura IV-11) muestran como la fracción fosforilada se distribuye de forma similar tanto en los espermatozoides estimulados como en los controles por todo el espermatozoide, haciéndose más evidente la fluorescencia en la cola y sobre todo en la región postacrosómica en los espermatozoides incubados con 8-Br-cAMP. Estos resultados junto con los obtenidos mediante *Western blotting* parecen indicar que la proteína JNK se fosforila cuando se activa la vía del cAMP/PKA, lo que nos podría indicar un posible papel en la capacitación espermática, sin embargo no encontramos diferencias respecto a las células sometidas a estrés celular.

Phospho-JNK (T183/Y185)

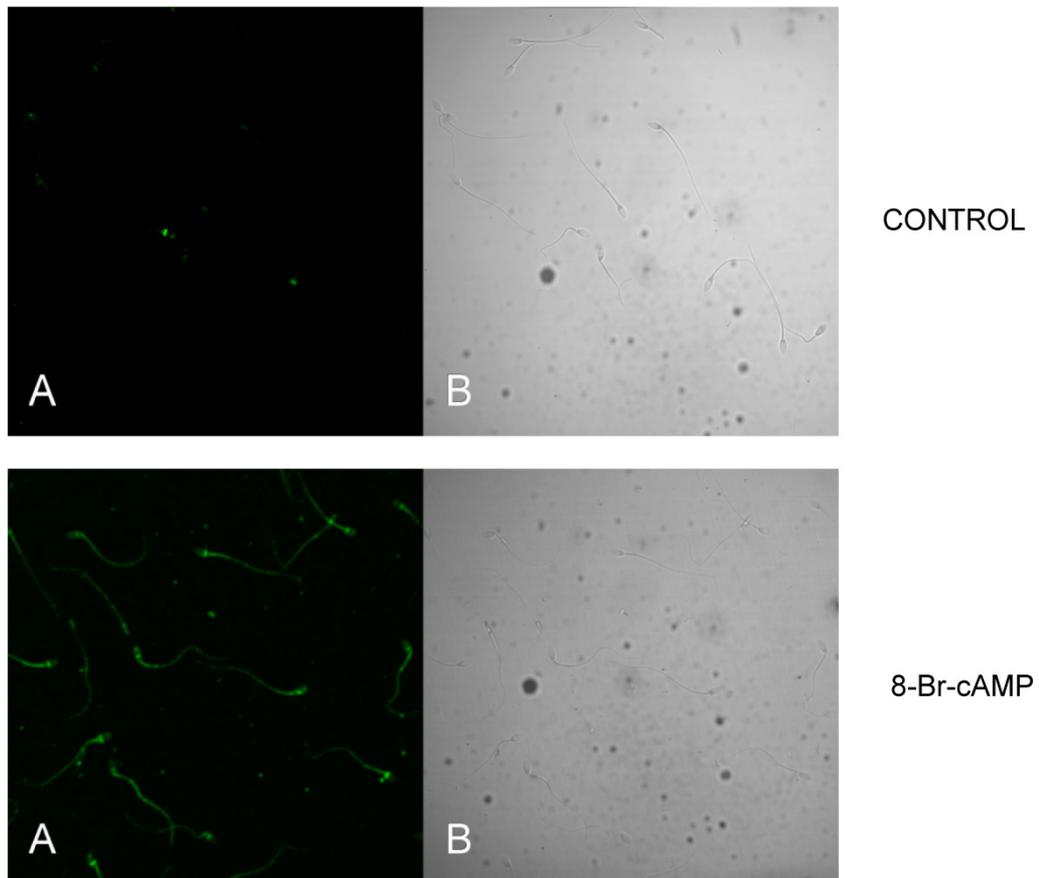


Figura IV-11. Inmunolocalización de la proteína JNK fosforilada por la activación de la PKA en espermatozoides de caballos. Las imágenes mostradas fueron obtenidas con un microscopio láser confocal (Bio-Rad MRC1024). El **panel A** muestra la imagen de fluorescencia obtenida excitando la muestra con un láser de Argón de 488 nm utilizando un filtro de absorción de 515 nm. El **panel B** muestra la imagen obtenida con luz transmitida. La imagen superior es el control de células no estimuladas, el panel inferior muestra espermatozoides representativos de la población estimulada con 8-Br-cAMP (500 μ M) durante 90 minutos.

9. Efecto de la inhibición de la PKA en la fosforilación de JNK

Para corroborar los resultados obtenidos en los experimentos anteriores en los que hemos evaluado la implicación de PKA en la regulación de JNK en espermatozoides de caballos, hemos estudiado el efecto que podría tener la inhibición de esta quinasa en la fosforilación de nuestra proteína de estudio. Para ello hemos utilizado el H89, un inhibidor específico de la proteína quinasa A, que actúa como inhibidor competitivo bloqueando el sitio de unión de la PKA con el ATP [231]. Como era de esperar en los espermatozoides incubados con 8-Br-cAMP (500 μ M) volvió a producirse un aumento significativo en la fosforilación de JNK con respecto a la muestra control (Figura IV-12). Por el contrario, en los espermatozoides incubados en presencia de 8-Br-cAMP y del inhibidor de PKA (H89; 60 μ M), observamos una fosforilación de JNK significativamente menor respecto a los espermatozoides en los que ha sido activado la PKA sin presencia del inhibidor (Figura IV-12). Estos resultados vuelven a confirmar que la vía del cAMP/PKA podría estar implicada en la regulación de la JNK en espermatozoides de caballos.

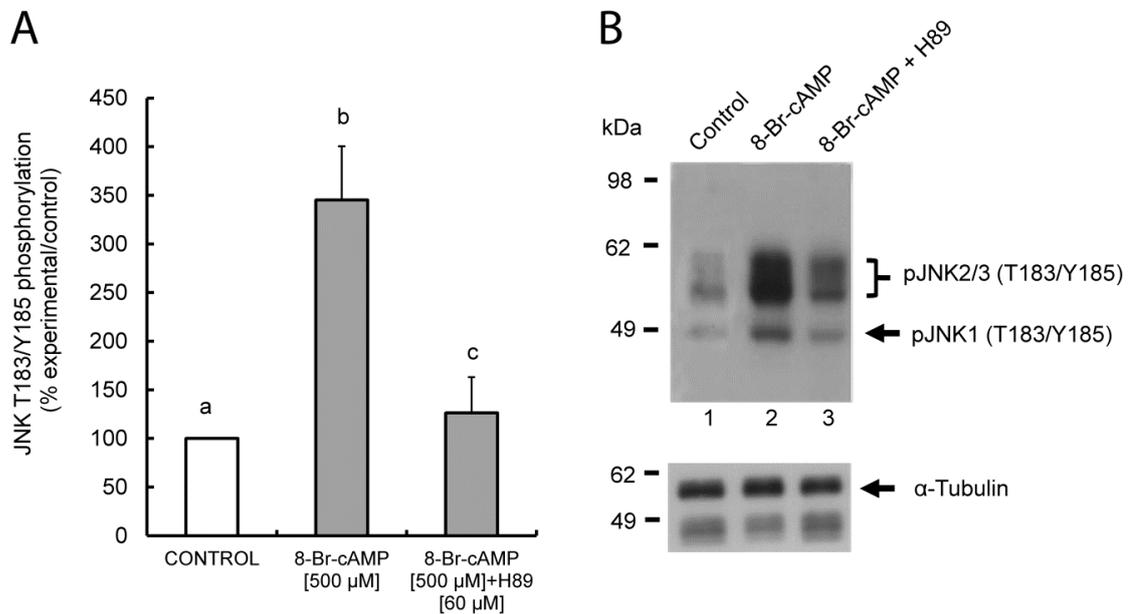


Figura IV-12. Efecto de la inhibición de PKA, en la fosforilación de JNK en espermatozoides de caballos. Los espermatozoides fueron incubados en distintas condiciones: calle 1 (muestra control), calle 2 (8-Br-cAMP 500 μM) y calle 3 (8-Br-cAMP; H89 (60 μM)) a 37 °C durante 90 minutos. Posteriormente fueron lisados y analizados mediante *Western blotting* con anticuerpos fosfoespecífico anti-JNK. En el **panel A** mostramos la media ± SEM de 4 experimentos independientes expresados como porcentaje de incremento de los tratamientos respecto al control (100 %). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas, halladas mediante una t de Student para muestras desapareadas ($p < 0.05$). En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo y un control de carga del mismo, usando para ello un anticuerpo anti-α-Tubulina.

10. Efecto de la activación de la vía cAMP/Epac en la fosforilación de JNK

Además de la PKA, otra de las dianas intracelulares del cAMP en los espermatozoides de mamíferos son las proteínas Epac, que parecen intervenir sobre todo en la regulación de la reacción acrosómica [147, 232-233].

Por tanto, hemos estudiado si la activación de la vía cAMP/Epac produce cambios en la fosforilación de JNK o si todo el efecto del cAMP viene determinado solo por la activación de PKA. Para ello incubamos tanto espermatozoides de cerdo como de caballo con un análogo del cAMP, el 8-Br-2'-O-Me-cAMP, que activa selectivamente las proteínas Epac pero no la PKA y mediante Western blotting determinamos el estado de activación de la JNK. Los resultados indican tanto en cerdo (Figura IV-13) como en caballo (Figura IV-14), se produce un aumento significativo en la fosforilación de JNK cuando es activada la vía del cAMP/Epac, por lo que esta vía, junto con la PKA, también parece mediar los efectos del cAMP en la regulación de JNK en espermatozoides de mamíferos.

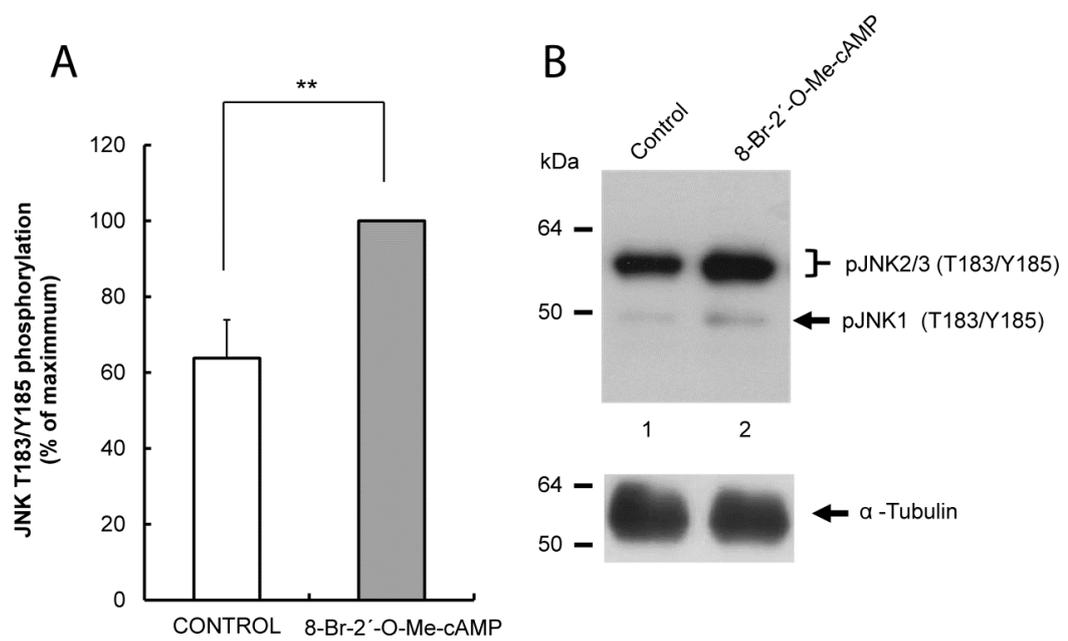


Figura IV-13. Efecto de la activación de Epac en la fosforilación de JNK en espermatozoides de cerdo. Los espermatozoides fueron incubados en distintas condiciones: calle 1 (muestra control), calle 2 (8-Br-2'-O-Me-cAMP; 50 μ M) a 37 °C durante 90 minutos. Posteriormente fueron lisados y analizados mediante *Western blotting* con el anticuerpo fosfoespecífico de JNK. En el **panel A** mostramos la media \pm SEM de 6 experimentos independientes expresada como porcentaje de la respuesta máxima. Los asteriscos (**) indican diferencias significativas ($p < 0.01$) comparando el tratamiento con el valor control mediante una t de Student para muestras desapareadas. En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo de los resultados obtenidos, mostrando además un control de carga para el que hemos utilizado un anticuerpo anti- α -Tubulina.

Resultados

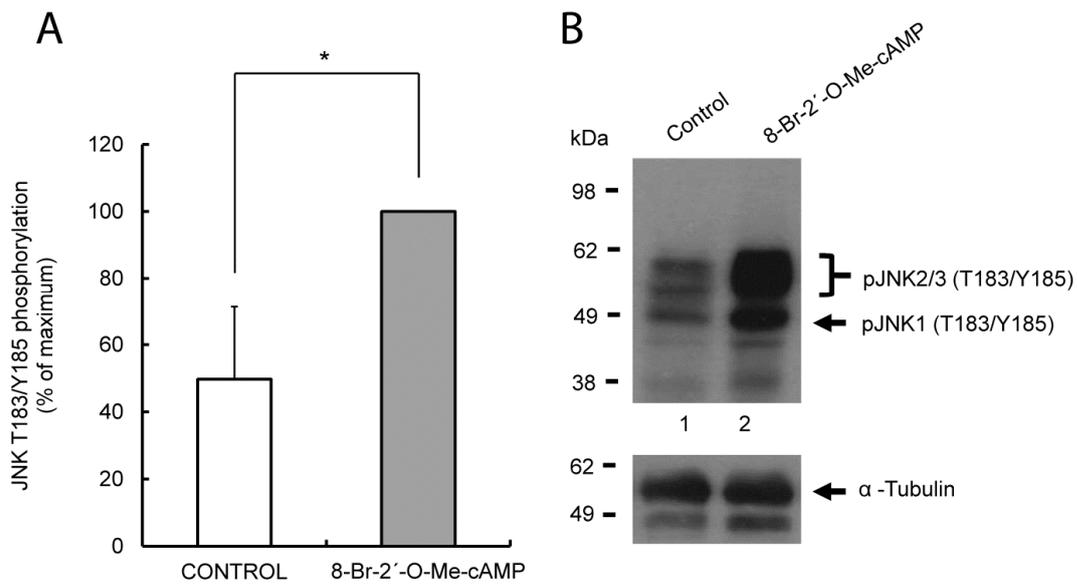


Figura IV-14. Efecto de la activación de Epac en la fosforilación de JNK en espermatozoides de caballos. Los espermatozoides de caballos fueron incubados en distintas condiciones: calle 1 (muestra control), calle 2 (8-Br-2'-O-Me-cAMP; 50 μ M) a 37 °C durante 90 minutos. Posteriormente fueron lisados y analizados mediante *Western blotting* con el anticuerpo fosfoespecífico de JNK. En el **panel A** mostramos la media \pm SEM de 7 experimentos independientes expresados como porcentaje de respuesta máxima respecto al control. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) comparando el tratamiento con el valor control, mediante una t de Student para muestras desapareadas. En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo de los resultados obtenidos, mostrando además un control de carga para el que hemos utilizado un anticuerpo anti- α -Tubulina.

11. Estudio del efecto del inhibidor BI-78D3 en la regulación de JNK en los espermatozoides de caballo

Para estudiar la función de JNK en los espermatozoides de mamíferos utilizamos una aproximación farmacológica mediante el uso de inhibidores químicos disponibles comercialmente, más o menos específicos. Sin embargo, con carácter previo al estudio de su efecto en la función espermática, y debido a que no existe ningún estudio previo que haya utilizado estos inhibidores en los espermatozoides, valoramos la capacidad de estos compuestos para inhibir la actividad de JNK en este tipo celular

Uno de los inhibidores específicos de la JNK que demuestra gran potencia y especificidad en diversos estudios en células somáticas es el BI-78D3 (CAS 883065-90-5) [194, 234-235], un péptido que bloquea el sitio de unión de JNK con la proteína *scaffold* JIP (*JNK interacting protein*) impidiendo interactuar con ella y por tanto evitando la activación secuencial de los componentes de la cascada de la JNK. En esta tesis hemos probado distintas concentraciones de este compuesto y hemos caracterizado el efecto en el estado de fosforilación (activación) de la JNK, tanto en células sometidas a estrés como en células no estimuladas.

En primer lugar, los espermatozoides fueron incubados en condiciones de estrés celular (H_2O_2 y UV) en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones del péptido inhibidor BI-78D3 (25, 50, 100 μM). Los lisados se analizaron mediante *Western blotting* usando anticuerpos fosfoespecíficos anti-JNK (Cell Singaling) observándose que en presencia de todas las concentraciones probadas del inhibidor la fosforilación provocada por los estímulos se ve disminuida de manera significativa (Figura IV-15) con una concentración de 100 μM , sugiriendo que este inhibidor podría ser útil para caracterizar la función de JNK en espermatozoides. Además en experimentos complementarios hemos estudiado el efecto del inhibidor en la

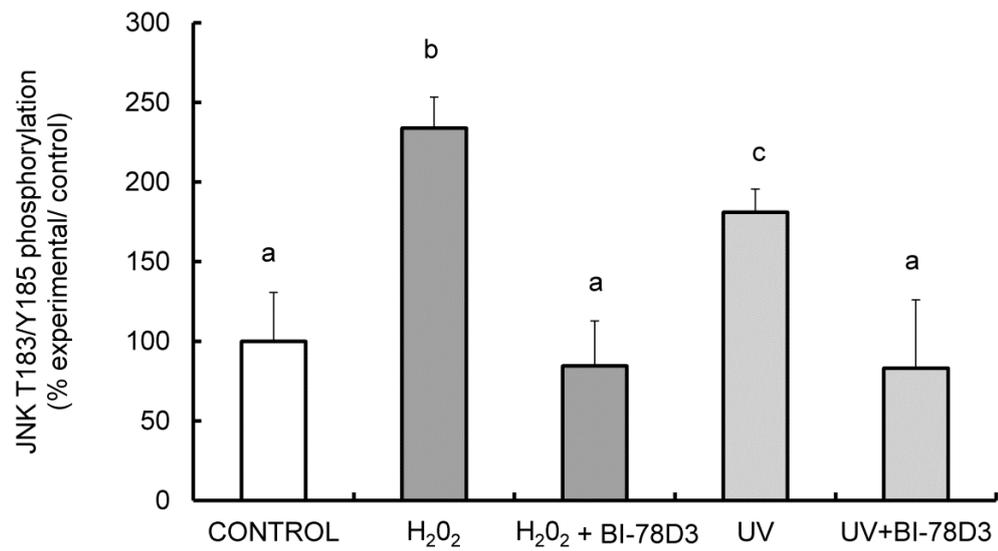
Resultados

fosforilación basal de JNK (células no estimuladas), encontrando que ésta también se ve significativamente inhibida en presencia de este inhibidor, aunque para ello hace falta sobreexponer la membrana porque en la mayoría de las ocasiones la fosforilación de JNK es muy baja (resultados no mostrados)

Obtuvimos resultados equivalentes utilizando otros inhibidores químicos de JNK, tanto en relación a la actividad de JNK basal, como a la inducida en condiciones de estrés celular. En concreto, el *JNK inhibitor VIII* y el *JNK inhibitor II* (SP600125), ambos inhibidores competitivos del sitio de unión de ATP, demostraron una inhibición en la fosforilación de la JNK equivalente a la mostrada por el BI-78D3 en los espermatozoides de caballo. Sin embargo, a pesar de que todos los inhibidores probados demostraron similar efectividad y a pesar de que tanto *JNK inhibitor VII* como el *JNK inhibitor II* eran más asequibles comercialmente, en todos los estudios funcionales realizados a continuación utilizamos el péptido inhibidor BI-78D3 debido a su mayor especificidad por JNK, en detrimento de los otros que, según se ha descrito, pueden inhibir proteínas adicionales de las vías de las MAPK, siendo, por tanto, menos específicos [192-193].

Figura IV-15. Efecto del inhibidor BI-78D3 en la actividad JNK en espermatozoides de caballo. Los espermatozoides fueron incubados en condiciones de estrés celular en presencia (calles 3 y 5) o en ausencia (calles 1, 2 y 4) de BI-78D3 (100 μ M), un inhibidor potente y específico de JNK. Las diferentes condiciones de incubación fueron: Control (calle 1), estrés oxidativo (calles 2 y 3) irradiación ultravioleta (calles 4 y 5). Las muestras fueron lisadas y analizadas por *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK. En el **panel A** representa la media \pm SEM de 9 experimentos independientes, expresado como porcentaje de respuesta máxima. Las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) hallada mediante una t de Student para muestras desapareadas. En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo de los resultados obtenidos, en el que se aprecia la diferencia en el grado de fosforilación entre las muestras que han sido incubadas en presencia del inhibidor de JNK y las que no.

A



B

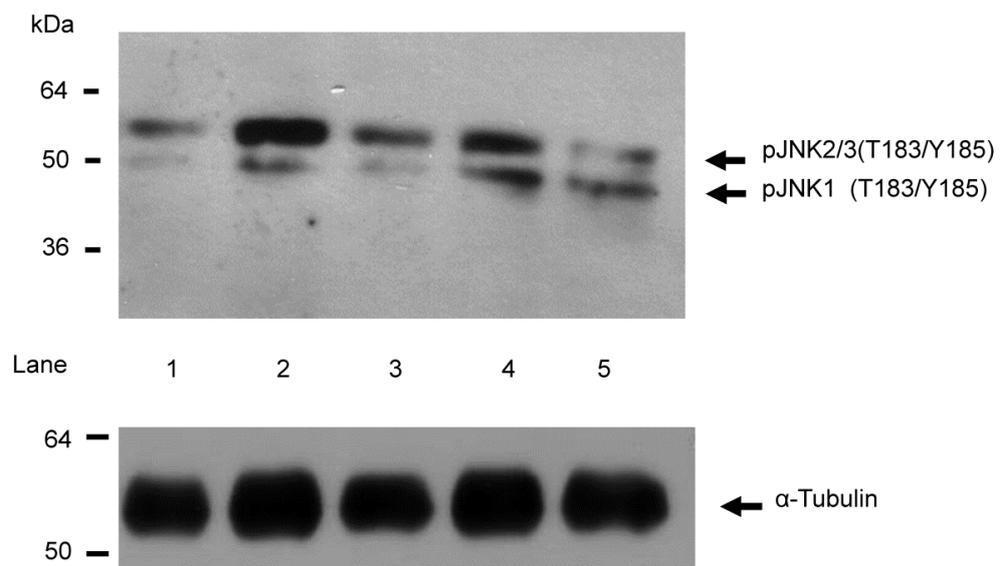


Figura IV-15. (Véase pie de figura en la página anterior)

12. Efecto de la JNK en la viabilidad espermática a tiempos cortos

Una vez comprobado que los diferentes inhibidores químicos eran capaces de inhibir la actividad de JNK en nuestras condiciones experimentales, usamos el BI-78D3 para estudiar la posible función de esta quinasa en los espermatozoides de mamíferos. Debido a que en células somáticas la JNK está implicada en la regulación de la viabilidad celular, hemos estudiado con este inhibidor el papel que JNK pudiera tener en el mantenimiento de la viabilidad espermática a tiempos cortos de incubación. Para caracterizar este efecto se cuantificó viabilidad mediante citometría de flujo en células incubadas con YO-PRO-1 y homodímero de etidio [236], en presencia y ausencia de concentraciones crecientes del inhibidor (BI-78D3) a lo largo del tiempo (Figura IV-16). Los resultados muestran que en los espermatozoides incubados con el inhibidor de JNK no se detecta un descenso significativo de viabilidad comparado con el control, hasta tres horas de incubación.

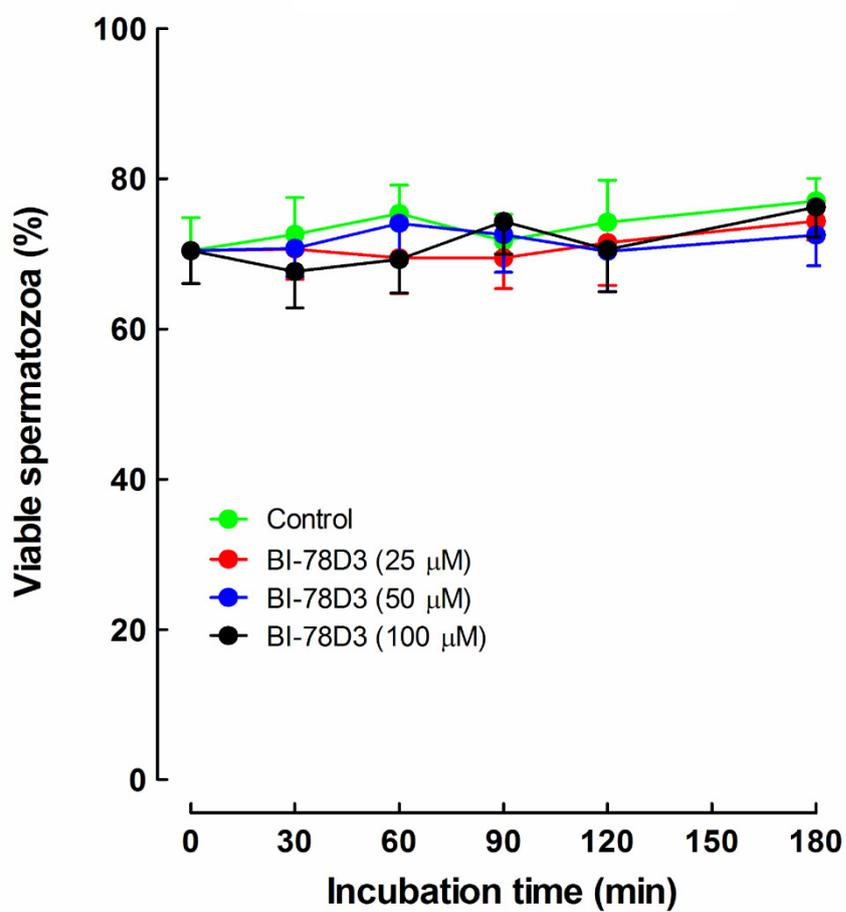


Figura IV-16. Papel de la JNK en el mantenimiento de la viabilidad espermática en espermatozoides de caballo. En la gráfica mostramos el porcentaje de espermatozoides vivos incubados a distintos tiempos y con diferentes concentraciones de inhibidor (25 μ M, 50 μ M y 100 μ M). Se muestran los resultados \pm SEM de 5 experimentos independientes.

13. Estudio del papel de JNK en la regulación de la actividad caspasa en espermatozoides de caballo

En algunas células somáticas la JNK participa en la regulación de los procesos apoptóticos [156]. Para comprobar si está quinasa regula la apoptosis en los espermatozoides a tiempos cortos de incubación, realizamos un ensayo de actividad caspasa utilizando la sonda FITC-VAD-FMK (ver Métodos) [237]. Los resultados (Figura IV-17) indican que respecto a la actividad caspasa no hay variaciones significativas entre los espermatozoides incubados en presencia del inhibidor BI-78D3 y el control, al menos en las concentraciones y tiempos usados en estos ensayos. Estos resultados parecen descartar el concurso de la JNK en la regulación de la apoptosis en los espermatozoides eyaculados de caballo en tiempos cortos de incubación.

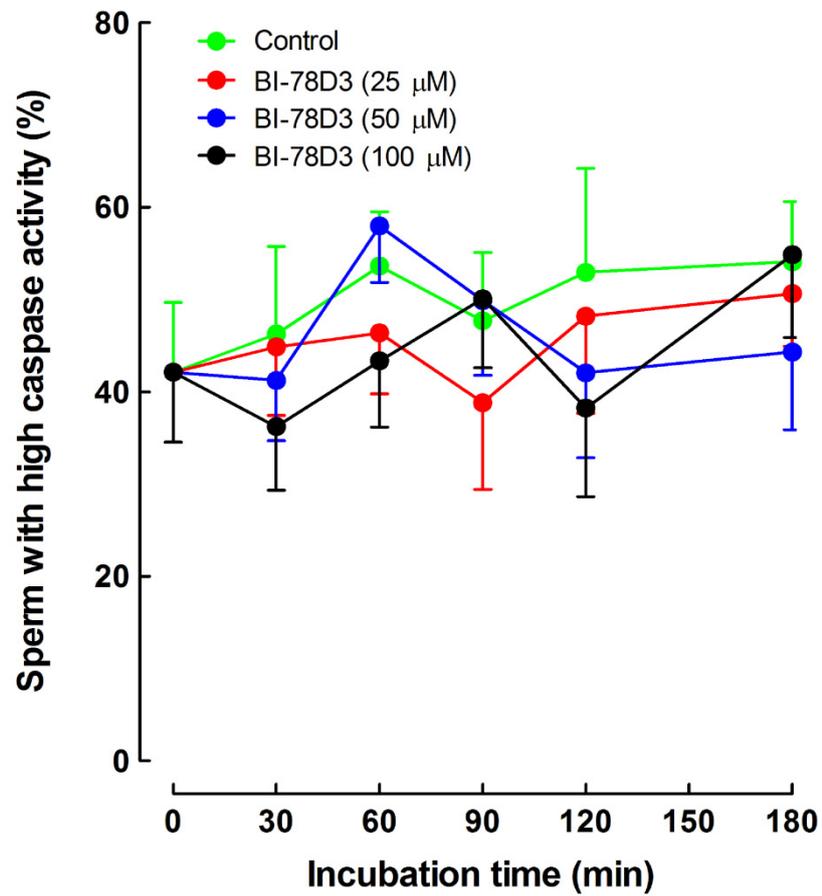


Figura IV-17. Estudio de la actividad caspasa en los espermatozoides de caballo en presencia de un inhibidor de la JNK. En la gráfica mostramos el porcentaje de espermatozoides con alta actividad caspasa correspondientes a la media \pm SEM de 10 experimentos independientes.

14. Papel de JNK en el mantenimiento de los potenciales de membrana mitocondrial

Para determinar el potencial de membrana mitocondrial (MMP) hemos utilizado citometría de flujo con la sonda JC-1 (ver apartado de Metodología) en espermatozoides de caballo incubados en presencia o ausencia del inhibidor de JNK. Los resultados indican que la incubación con BI-78D3 100 μM induce un desacople de la membrana mitocondrial a partir de los 60 min de incubación, produciéndose una bajada pronunciada y significativa en el MMP en un elevado porcentaje de células. Este efecto fue también obtenido con concentraciones menores del inhibidor (25 μM y 50 μM) pero necesitan más tiempo de incubación (180 min) para lograr una respuesta equivalente (Figura IV-18).

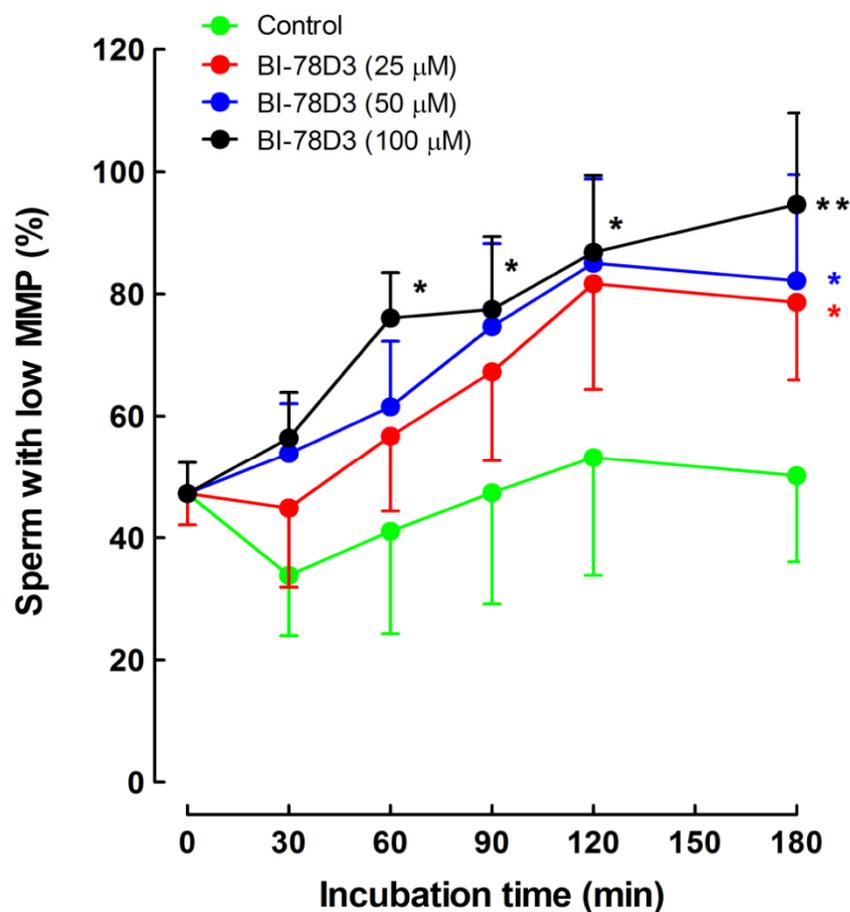


Figura IV-18. Papel de la JNK en el mantenimiento de los potenciales de membrana mitocondrial (MMP). Los espermatozoides de caballo se incubaron con distintas concentraciones de inhibidor BI-78D3 (25 μ M, 50 μ M y 100 μ M) y distintos tiempos (0-180 min) y se evaluaron los MMP con JC-1. Mostramos el porcentaje de células con bajo MMP correspondiente a la media \pm SEM (mediante t de Student) de 6 experimentos independientes. El valor del potencial de membrana mitocondrial en las muestras tratadas está expresado respecto a las muestras control para cada tiempo de incubación. Los asteriscos indican diferencias significativas: (*) ($p < 0.05$) y (**) ($p < 0.01$)

15. Implicación de JNK en la movilidad espermática.

Una de las características funcionales más importantes de los espermatozoides es la adquisición de movilidad. Está documentado que alguna de las proteínas de la familia de las MAPK (p38 o ERK1/2) están implicadas en mayor o menor grado en la regulación de este fenómeno [119]. Para valorar el papel que la JNK podría jugar en la regulación de la movilidad espermática incubamos los espermatozoides en presencia BI-78D3 a distintas concentraciones estimando la movilidad objetiva a lo largo del tiempo con un sistema CASA (ver apartado de Métodos). Los resultados indican que la inhibición de JNK induce un descenso en el porcentaje de espermatozoides móviles a partir de 60 min de incubación con concentraciones de inhibidor iguales o mayores a 25 μ M (Figura IV-19).

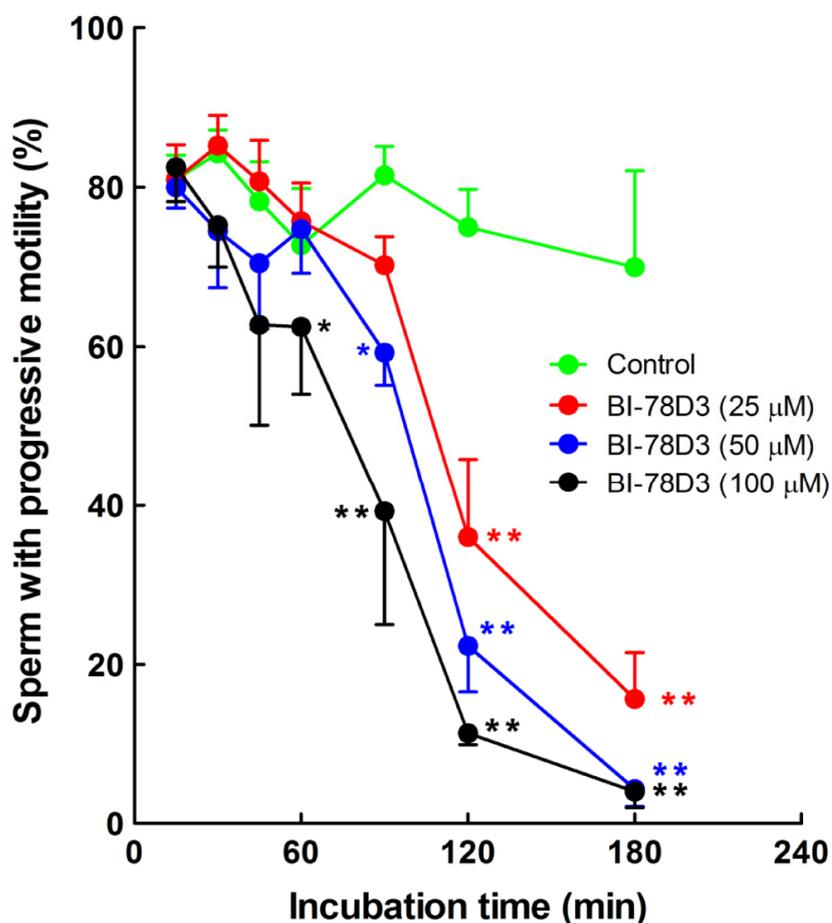


Figura IV-19. Efecto de la inhibición de JNK en la movilidad espermática. Los espermatozoides de caballo se incubaron con el inhibidor de JNK, BI-78D3, en las condiciones indicadas en la Figura. Para cuantificar objetivamente la movilidad en los espermatozoides, hemos utilizado un sistema CASA. La gráfica muestra el porcentaje de espermatozoides móviles a distintos tiempos y concentraciones de inhibidor, considerando móviles aquellos con un desplazamiento mayor o igual a $15 \mu\text{m/s}$. Se muestran los resultados \pm SEM de 3 experimentos independientes (t de Student). El porcentaje de espermatozoides móviles en las muestras tratadas está expresado respecto a las muestras control para cada tiempo de incubación. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

16. Efecto de la refrigeración en la actividad de JNK en semen equino

Con los avances de la biotecnología es cada vez es más frecuente el uso de semen refrigerado ya que permite la inseminación con semen de reproductores de alta calidad genética en localizaciones geográficas distantes sin necesidad de transportarlos. Por este motivo decidimos estudiar los cambios en la actividad de JNK en semen de caballo refrigerado durante 5 días manteniéndolo a una temperatura constante de 5 °C en el diluyente comercial INRA96. Mediante lisis celular se extrajeron las proteínas al primer y quinto día de incubación y fueron analizados mediante *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK.

Los resultados obtenidos (Figura IV-20) muestran un claro descenso en la fosforilación de JNK, directamente relacionado con la actividad de la proteína, el último día de incubación si lo comparamos con la fosforilación de JNK detectado primer día, indicando que la JNK podría intervenir en el mantenimiento de la función espermática a tiempos largos de incubación.

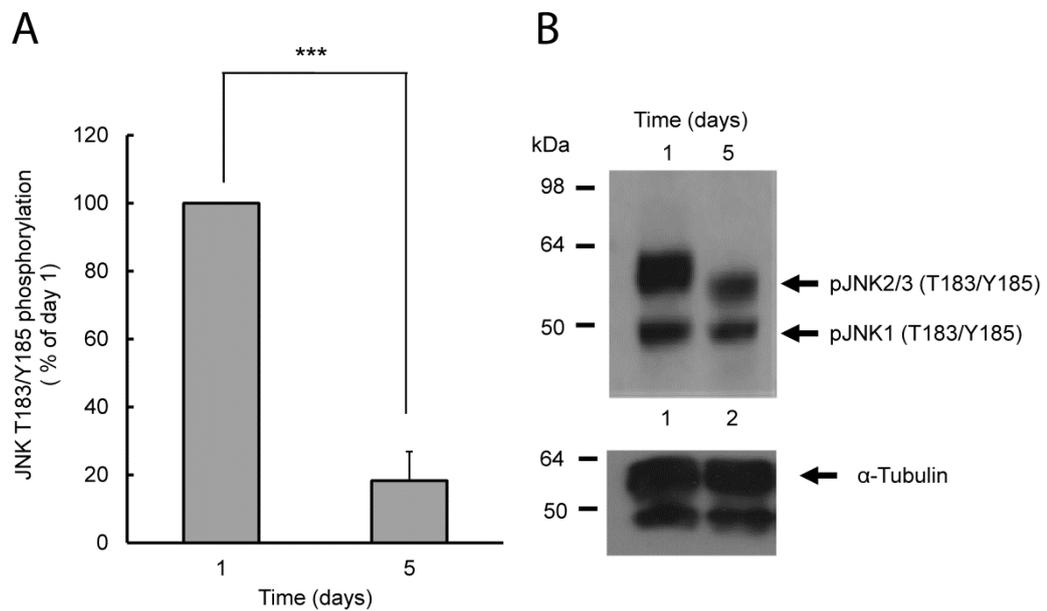


Figura IV-20. Cambios en la actividad de JNK en semen refrigerado. Los espermatozoides de caballo fueron incubados a 5 °C en el medio de conservación INRA96 durante 5 días. Los lisados obtenidos el primer y último día fueron analizados mediante *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK. La gráfica muestra la media \pm SEM de 8 experimentos independientes. Los asteriscos (***) indican diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los dos grupos experimentales mediante una *t* de Student.

17. Papel de JNK en la viabilidad de los espermatozoides de caballos a tiempos largos de incubación

Como se ha descrito previamente, JNK no interviene en el mantenimiento de la viabilidad espermática a tiempos cortos de incubación (3 horas), sin embargo la actividad de JNK se reduce en semen mantenido en refrigeración durante varios días. Por lo tanto hemos estudiado la posible implicación de JNK en la regulación de la viabilidad a tiempos largos de incubación. Para ello incubamos en INRA96 durante 5 días y a 5 °C los espermatozoides de caballo en ausencia y presencia del inhibidor de JNK, BI-78D3 y mediante citometría de flujo con las sondas YO-PRO-1 y homodímero de etidio cuantificamos la viabilidad espermática en estas condiciones [236].

Los resultados muestran, en primer lugar, como existe una pérdida progresiva de viabilidad a lo largo del tiempo en las muestras control, asociadas entre otros factores al descenso en la temperatura al que se someten las células y por tanto a los daños producidos derivados de este descenso [238]. Además produce un descenso mucho más pronunciado en la viabilidad de los espermatozoides en las células incubadas con el péptido inhibidor, siendo significativo a partir de las 48 horas de incubación con respecto a las muestras en la que la JNK no ha sido inhibida farmacológicamente. Lo que indica que JNK podría estar implicado en la regulación de la supervivencia de los espermatozoides a tiempos largos (Figura IV-21).

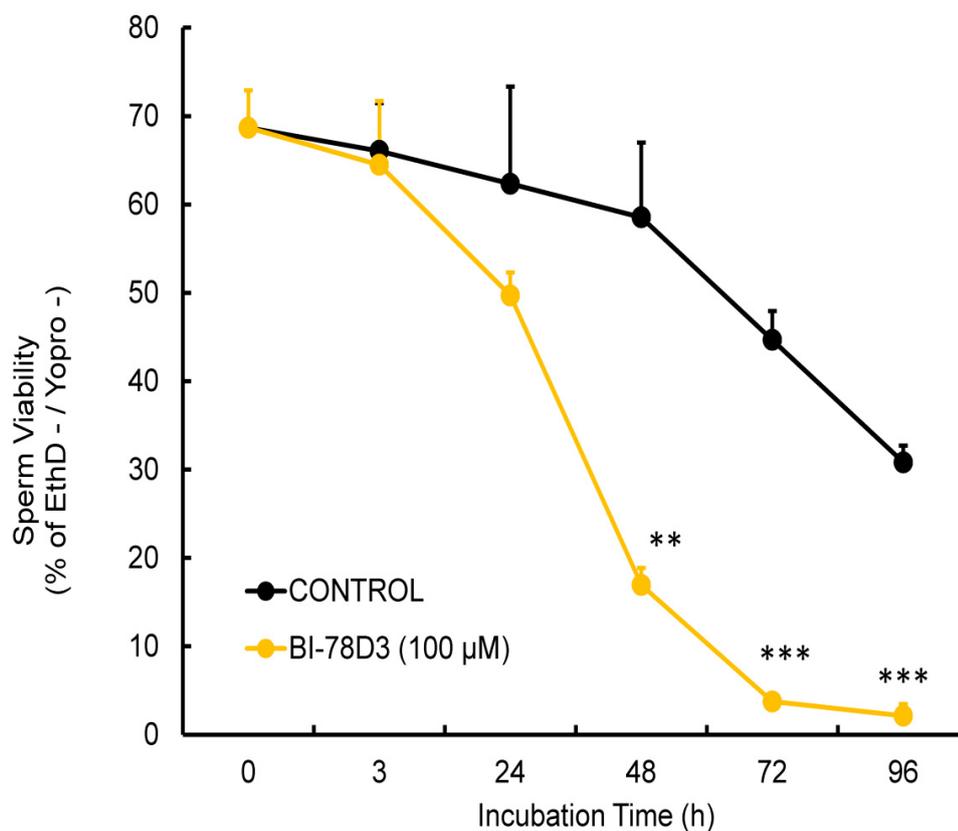


Figura IV-21. Papel de JNK en el mantenimiento de la viabilidad espermática a largo plazo. Los espermatozoides de caballos fueron incubados a 5 °C en el medio comercial de conservación INRA96 en ausencia y en presencia del inhibidor de JNK BI-78D3 (100 µM). Las muestras se fueron obteniendo secuencialmente en los tiempos indicados en el gráfico y fueron analizadas mediante citometría de flujo. En la gráfica mostramos el porcentaje de espermatozoides vivos. Los asteriscos indican diferencias significativas (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$ comparado cada tratamiento con el control para cada tiempo de incubación mediante una t de Student.

18. Papel de JNK en la regulación de la actividad caspasa en espermatozoides de caballos mantenidos en refrigeración

Una vez establecido que la JKN podría estar implicada en la regulación de la viabilidad de los espermatozoides a tiempos largos de incubación (en refrigeración) quisimos evaluar cuál era el posible mecanismo de muerte en estas condiciones. Para ello y aunque a tiempos cortos de incubación parece que la actividad caspasa no parece estar implicada (Figura IV-17), hemos estudiado si hay diferencias en la actividad caspasa en espermatozoides refrigerados durante varios días, incubando dichos espermatozoides tanto en presencia como en ausencia de BI-78D3 (100 μ M). En este caso la medida de actividad caspasa se realizó mediante citometría de flujo con el kit green caspase 3/7 de Molecular Probes (Figura IV-22)

Los resultados indican que a partir de las 48h de incubación existen diferencias significativas entre los espermatozoides incubados en presencia de BI-78D3 y la muestra control, produciéndose un aumento en la actividad caspasa en los espermatozoides en los que la JNK ha sido inhibida (Figura IV-22). Esto parece indicar que la vía de la apoptosis está implicada, al menos en parte, en el descenso de viabilidad asociada a la inhibición de JNK cuando los espermatozoides son mantenidos en refrigeración durante varios días y que la JNK ejerce un efecto pro-supervivencia en este particular tipo celular.

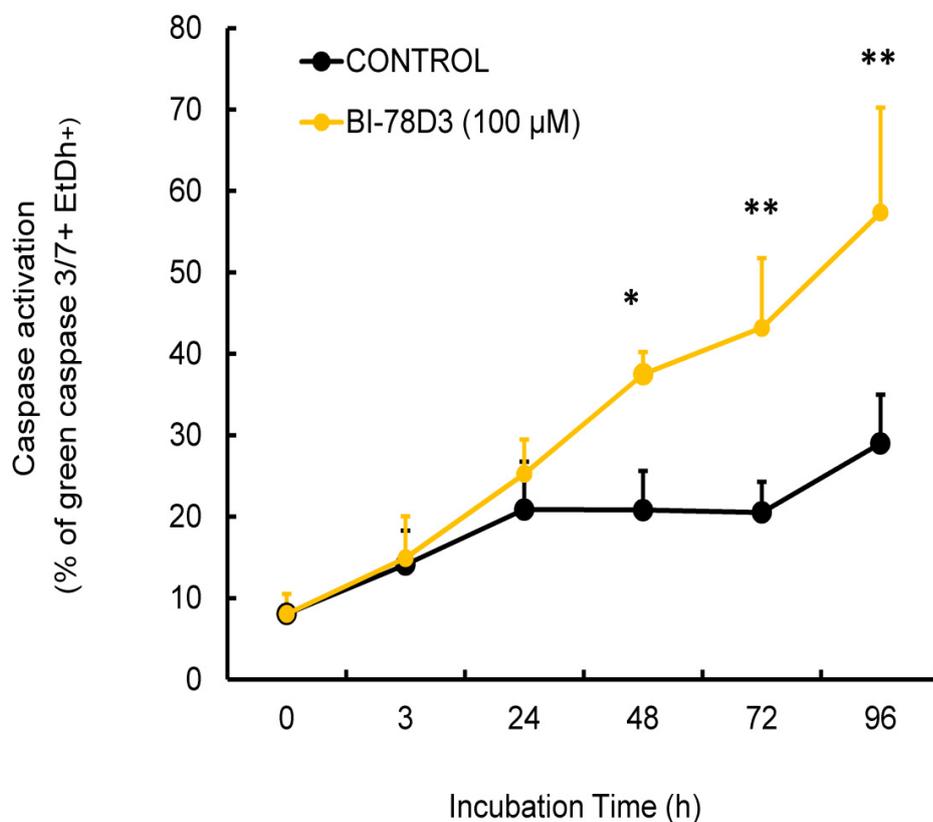


Figura IV-22. Implicación de JNK en la regulación de la actividad caspasa en espermatozoides de caballo mantenidos en refrigeración. Los espermatozoides de caballos fueron incubados a 5 °C en el medio de conservación INRA96 en ausencia y en presencia del inhibidor de JNK BI-78D3 (100 μM). Las muestras se fueron obteniendo secuencialmente en los tiempos indicados en el gráfico y fueron analizadas mediante citometría de flujo. En la gráfica mostramos el porcentaje de espermatozoides con actividad caspasa y etidio positivos. Los asteriscos muestran diferencias significativas (*) $p < 0.05$ (**) $p < 0.01$ comparando cada tiempo de incubación con y sin inhibidor mediante una t de Student para muestras desapareadas.

19. Efecto del TNF α en la fosforilación de JNK

Además de los resultados obtenidos hasta ahora, que parecen indicar que la JNK podría desempeñar un papel en la regulación de la viabilidad de los espermatozoides en respuesta al estrés mediante su participación en el control de las vías intrínsecas de la apoptosis, hemos estudiado los posibles cambios en la actividad de JNK mediados por el efecto de TNF- α en espermatozoides de caballos, debido a que en células somáticas TNF- α es uno de los principales iniciadores de la vía extrínseca de la apoptosis a través de sus receptores de membrana y un activador de la cascada de señalización de JNK [173, 239]. Para nuestros experimentos, hemos incubado los espermatozoides equinos en presencia de TNF α recombinante equino con distintas concentraciones (0;0,5;10 y 100 ng/ml) y durante distintos tiempos (1-6 horas) a 37 °C en medio BWW, obteniendo así curvas tanto dosis-dependiente como tiempo-dependientes de TNF α ..

Los resultados indican que se produce un aumento significativo en la fosforilación de JNK en presencia de TNF α a partir de 10 ng/ml, obteniéndose una respuesta máxima de fosforilación cuando los espermatozoides de caballos son incubados a una concentración de 100 ng/ml de TNF α (Figura IV-23). Por otra parte la fosforilación de JNK, es bifásica, aumentando tras 1 hora de incubación en presencia de TNF α y con una respuesta máxima a las 2 horas y un descenso en la fosforilación a partir de las 4 horas de incubación que es significativa a las 6 horas (Figura IV-24).

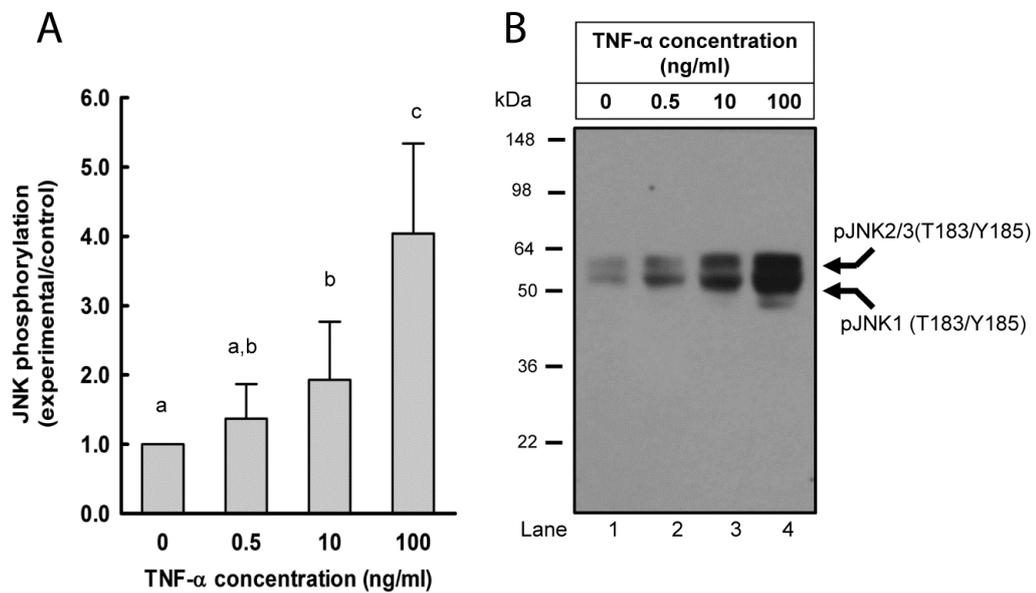


Figura IV-23. Efecto de la concentración de TNF α en la fosforilación de JNK en espermatozoides de caballos. Los espermatozoides fueron incubados durante 2 horas en las condiciones indicadas en la figura. Las muestras fueron analizadas mediante *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK. En el **panel A** se muestran los valores medios \pm SEM de 7 experimentos realizados de forma independiente. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las columnas, estimadas mediante una t de Student para muestras desapareadas ($p < 0.05$). En el panel B mostramos un *Western blotting* representativo.

Resultados

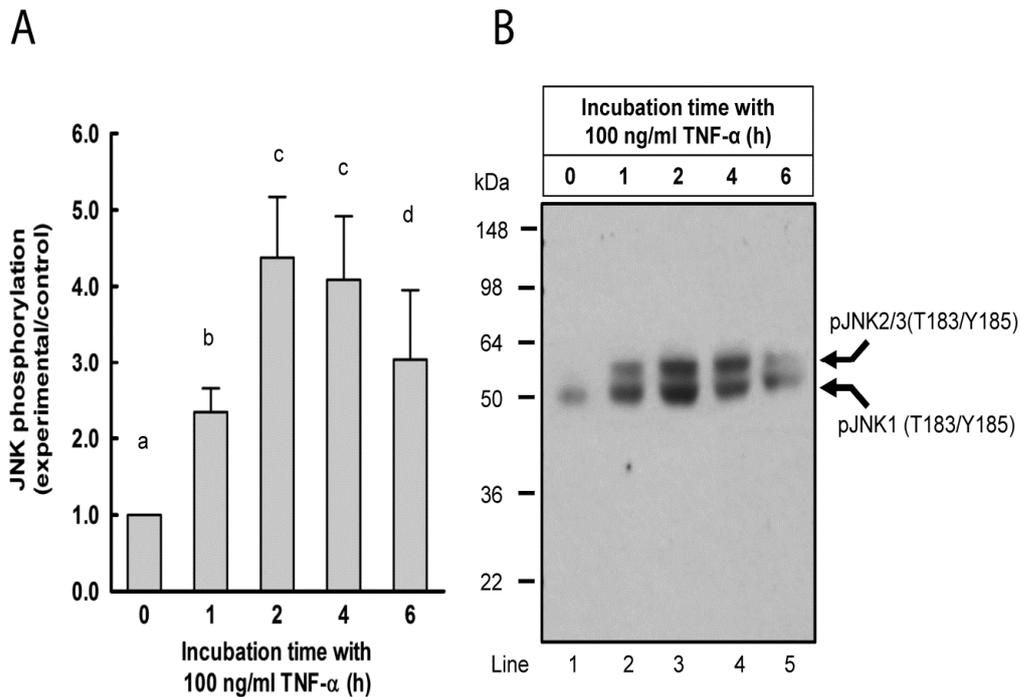


Figura IV-24. Efecto del tiempo de incubación con TNF α en la fosforilación de JNK en espermatozoides de caballos Los espermatozoides fueron incubados en las condiciones indicadas en la figura. Las muestras fueron analizadas mediante *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK. En el **panel A** se muestran los valores medios \pm SEM de 7 experimentos realizados de forma independiente. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las columnas, estimadas mediante una t de Student para muestras desapareadas ($p < 0.05$). En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo.

Además de los resultados mostrados en referente a la activación de JNK inducida por TNF α , hemos estudiado el posible efecto de esta citoquina en algunos parámetros funcionales como la viabilidad o la motilidad en espermatozoides de caballo. Nuestros resultados indican que no existen cambios significativos ni en la viabilidad (Figura IV-25) ni en la motilidad (no mostrado) cuando los espermatozoides son incubados con TNF α (10 ng/ml; y 100 ng/ml; 6 h incubación), al menos en nuestras condiciones experimentales. Además también investigamos el efecto en estas mismas células de otras interleuquinas, como la IL- α , IL-3, IL-6, IL-15 o IL-17, sin

encontrar, de nuevo, efectos en la viabilidad o la motilidad (no mostrado). Es destacable, sin embargo, que estas otras citoquinas tampoco demostraron efecto en la activación de JNK, al contrario del efecto demostrado por el TNF α . Esto puede indicar que, el TNF α y el resto de citoquinas ensayadas estén acoplados a distintas vías de señalización, o, lo que es más probable, que los espermatozoides de caballo no expresen los receptores de cada una de las citoquinas indicadas que no demostraron efecto en la activación de la JNK. Por el contrario, en un trabajo previamente publicado por nuestro grupo de investigación hemos descrito la presencia del receptor del TNF α en la membrana de los espermatozoides de caballo [240].

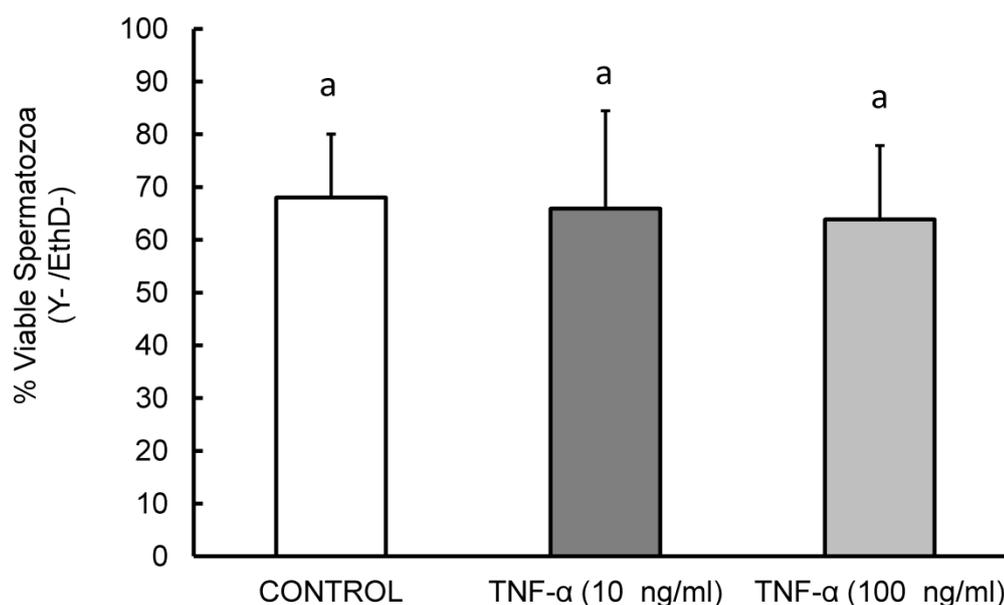


Figura IV-25 Efecto del TNF- α en la viabilidad de los espermatozoides de caballos a 6 horas. Los espermatozoides de caballos recién eyaculados fueron incubados en un medio BWW durante 6 horas a 37 °C a dos concentraciones de TNF- α (10 ng/ml; 100 ng/ml). Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo al tiempo indicado. En la gráfica mostramos el porcentaje de espermatozoides vivos. Las letras iguales significan que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las columnas.

20. Estudio de los cambios en la fosforilación de JNK en semen procesado mediante centrifugación en capa simple

Como ya hemos indicado en la introducción, el mantenimiento de los espermatozoides en refrigeración reduce la movilidad, se asocia con un incremento de ROS y causa una pérdida de la integridad de la membrana entre otros efectos, lo que se traduce en una pérdida de la capacidad fecundante del eyaculado [241-244]. Para paliar estos efectos se han desarrollado en los últimos años diferentes procedimientos que permiten seleccionar los espermatozoides con mejores características morfofuncionales para su posterior procesamiento. Una de éstas técnicas consiste en someter al eyaculado a un procedimiento denominado centrifugación en capa simple o *simple layer centrifugation* (SLC) [241, 245]. Esta técnica consiste en una centrifugación de densidad del eyaculado equino, usando para dicha separación una capa de Androcoll™ como único coloide que permite recuperar una subpoblación espermática de mayor calidad

Para determinar si las características de la población espermática seleccionada mediante SLC podrían estar relacionadas con el estado de activación de la JNK, hemos estudiado la posible diferencia en la fosforilación de JNK en espermatozoides de caballos sometidos a este proceso, comparándolos con el control no procesado. Además, hemos valorado el estado de fosforilación de la JNK en semen refrigerado a 5 °C durante 5 días que ha sido procesado mediante SLC, con respecto al que no ha sido filtrado con el coloide. Finalmente teniendo en cuenta que la inhibición de JNK reduce la viabilidad espermática, hemos intentado correlacionar el estado de activación de la JNK con los cambios en la viabilidad entre ambas sub-poblaciones.

Con este objetivo, una vez filtrados los espermatozoide, éstos fueron resuspendidos en el diluyente INRA96 e incubados a 5 °C durante 5 días. Para determinar el estado de fosforilación de la JNK obtuvimos lisados de estos espermatozoides el día 1 y 5 de incubación, tanto en las muestras que han sido procesadas mediante SLC como en las que no, que serán muestras control. El grado de fosforilación de JNK fue analizado mediante *Western blotting* con anticuerpos fosfoespecíficos anti-JNK. La viabilidad espermática fue determinada en las cuatro poblaciones mediante citometría de flujo con las sondas YO-PRO-1 y homodímero de etidio.

Los resultados indican que el estado de fosforilación de la JNK en las muestras procesadas mediante SLC es significativamente mayor que el detectado en las muestras no procesadas (Figura IV-26). Sin embargo, tras cinco días de incubación, tanto las muestras procesadas mediante SLC, como las no procesadas, demuestran un estado de fosforilación de JNK significativamente inferior comparado con las muestras no refrigeradas (Figura IV-26). Es más, a pesar de que tras el almacenamiento en refrigeración durante 5 días las muestras procesadas mediante SLC demuestran un estado de fosforilación de JNK aparentemente mayor que la son procesadas, este no fue significativo (Figura IV-26).

Los resultados indican que las poblaciones espermáticas con mejores características morfo-funcionales se corresponden con poblaciones que demuestran una mayor actividad de JNK cuando se compara con la población total. Estos resultados confirman, además, que la refrigeración de los espermatozoides se acompaña de un marcado descenso en la actividad de JNK, que no puede ser completamente revertido por la selección espermática mediante SLC.

Resultados

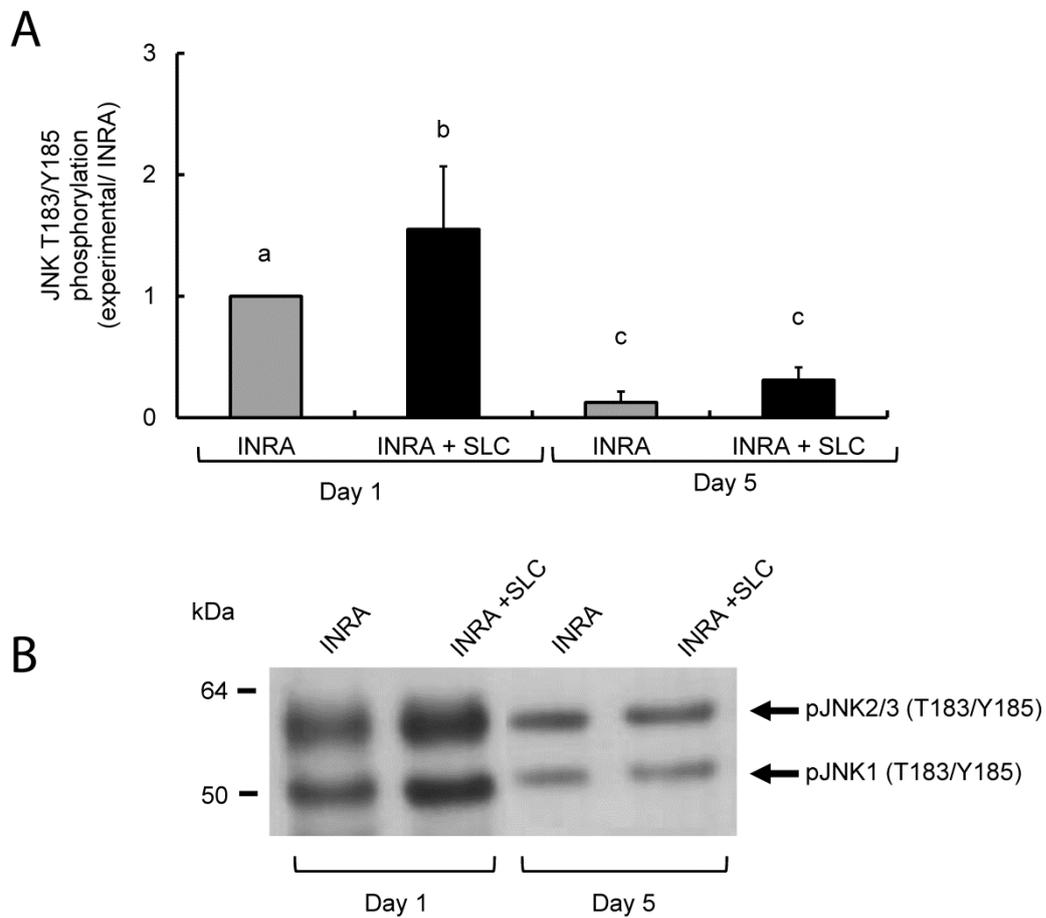


Figura IV-26. Estudio de JNK en espermatozoides procesados mediante SLC. Los espermatozoides de caballo obtenidos del eyaculado fueron divididos en dos volúmenes iguales. Una parte fue lavada y resuspendida en el medio de conservación INRA96 y la otra parte fue procesada mediante SLC y posteriormente resuspendida en INRA96. Las dos fracciones fueron almacenadas a 5 °C durante 5 días. Se obtuvieron lisados de las muestras el primer y último día de incubación. Las proteínas extraídas fueron estudiadas mediante *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK. Las distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las columnas, comparando mediante una t de Student para muestras desapareadas ($p < 0.01$).

21. Estudio de los cambios en la fosforilación de JNK en semen criopreservado

Al igual que la refrigeración, la criopreservación del semen permite la amplia difusión del potencial genético de los animales de alta producción con la ventaja adicional de que el tiempo de almacenamiento es virtualmente indefinido. El procedimiento, sin embargo, es complejo y requiere el empleo de medios de congelación conteniendo crioprotectores que tratan de proteger a los espermatozoides a lo largo de las diferentes fases del proceso. A pesar de esto, durante la criopreservación, el espermatozoide sufre estrés celular, fundamentalmente estrés osmótico que compromete tanto la funcionalidad como la viabilidad.

Para determinar si la JNK podía jugar un papel en la respuesta al estrés en semen criopreservado decidimos estudiar la actividad de esta quinasa en muestras criopreservadas (-196 °C) mediante un procedimiento rutinario usado en nuestro laboratorio [215, 246-247]. Los resultados muestran un descenso significativo en la actividad de JNK en semen que ha sido sometido a congelación/ descongelación comparado con esas mismas muestras antes de la congelación (Figura IV-27).

Resultados

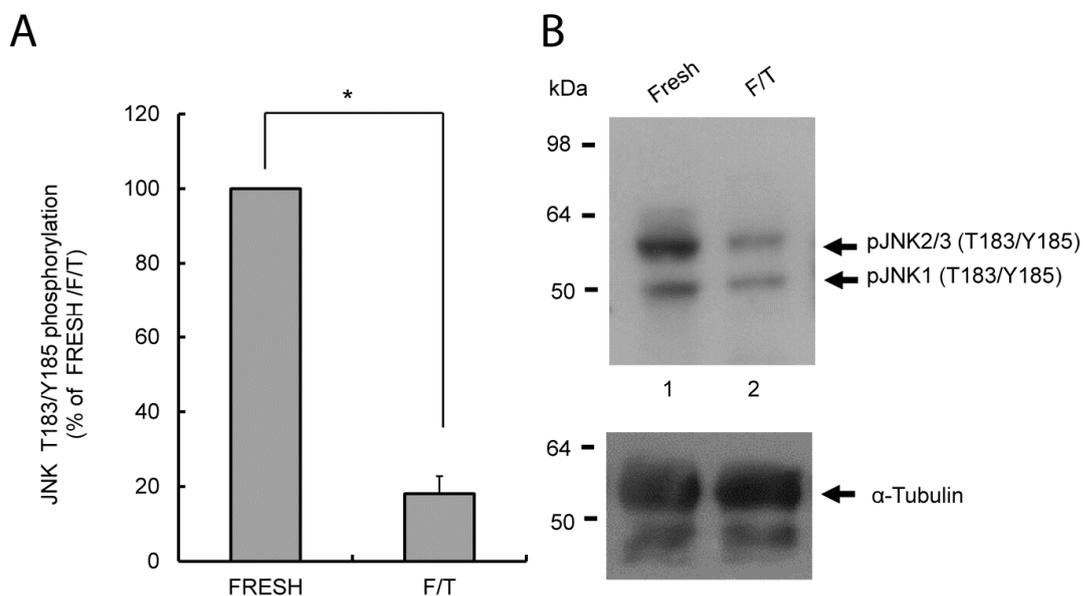


Figura IV-27. Estudio de la fosforilación de JNK en espermatozoides de caballo sometidos a criopreservación. Los eyaculados fueron lavados y resuspendidos en un volumen 1:1 en INRA96 y centrifugados 10 minutos a 600 g. El pellet resultante fue dividido. La mitad de las células se lisaron (muestras frescas) y la otra mitad fueron resuspendidas y procesadas para su criopreservación en LN2 según se indica en el apartado *Materiales y métodos*. Pasado un mes, las pajuelas fueron descongeladas en un baño de agua a 37 °C durante 10 segundos. Posteriormente las muestras fueron lisadas y analizadas en paralelo con las muestras frescas mediante *Western blotting*. En el **panel A** se muestran los valores medios \pm SEM de 10 experimentos realizados de forma independiente. El asterisco (*) indica diferencias significativas $p < 0.05$ comparado con las muestras criopreservadas y no criopreservadas, mediante una t de Student para muestras desapareadas. En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo.

22. Efecto del estrés osmótico en la activación de la JNK

Los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación causan una reducción en el porcentaje de espermatozoides vivos, y se asocian con una menor capacidad funcional de los espermatozoides que sobreviven [50, 216]. Estos efectos se han atribuido a cambios en la temperatura, que conduce a cambios de fase en la bicapa lipídica de la membrana plasmática, a la formación de cristales de hielo, a daño oxidativo, a alteraciones en la membrana del espermatozoide, a daño genómico, a la toxicidad de los crioprotectores, a un envejecimiento acelerado, y finalmente al estrés osmótico [50, 216]. Parece ser que el choque osmótico, especialmente en la descongelación, es el factor que causa la mayor parte del daño durante la crioconservación. Además, recientemente se ha descrito que el daño subletal experimentado por los espermatozoides de los sementales que sobreviven a la congelación y descongelación parece depender de un mecanismo apoptótico, principalmente por la vía intrínseca [215-216].

Hemos estudiado los posibles cambios en la actividad de JNK en espermatozoides que han sido sometidos a choque osmótico, para lo cual incubamos los espermatozoides en un medio Biggers Whitten and Whittigham (BWW) hipo-osmótico (150 mOm) manteniendo el pH constante a 7,4 durante 10 minutos. Los resultados muestran un descenso en la fosforilación de JNK (Figura IV-28) con respecto a las células incubadas a 300 mOsm (Control) estudiado mediante *Western blotting*.

Por tanto, y al contrario que ocurre con el resto de estreses, la incubación en condiciones de estrés osmótico de los espermatozoides, se acompaña de una marcada inhibición de la JNK, sin embargo esta no fue significativa (Figura IV-28). No obstante, debido a que la mayor parte de los

Resultados

efectos negativos derivados del estrés osmótico se deben a los cambios secuenciales de un medio isosmolar a otros anisomolares y viceversa, decidimos caracterizar mejor el efecto dependiente del estrés osmótico. Para ello, los espermatozoides de caballo fueron sometidos a cambios osmóticos seriados en un medio Biggers Whitten and Whittigham (BWW) con una presión osmótica de 75, 150, 300, 600, 900 y 1500 mOsm/Kg y manteniendo constante el pH (7,4) y la temperatura y posteriormente devuelto a un medio isosmolar. Los resultados demostraron que tanto el estrés hipo-osmótico (75-150 mOsm/Kg) como el hiper-osmótico (900-1500 mOsm/Kg) inducen inactivación de la JNK estimada por *Western blotting* con anticuerpos fosfoespecíficos (Figura IV-29). Este efecto es dependiente de la concentración (calles 1-6) y se ve potenciado por la reposición de las células a medios isosmóticos tras su incubación en condiciones de *anisomolaridad* (calles 7-12).

Los resultados indican que las condiciones de anisomolaridad similares a los que se producen durante la criopreservación inducen un acusado descenso en la actividad de JNK en los espermatozoides de mamíferos, indicando que esta quinasa podría estar implicada en los efectos deletéreos que se detectan en los espermatozoides tras la criopreservación

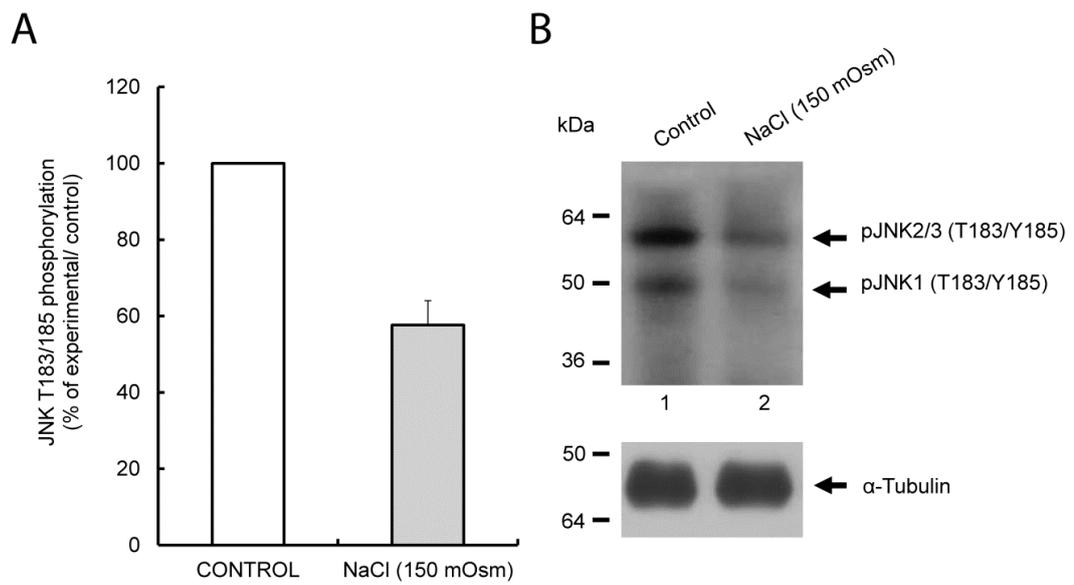
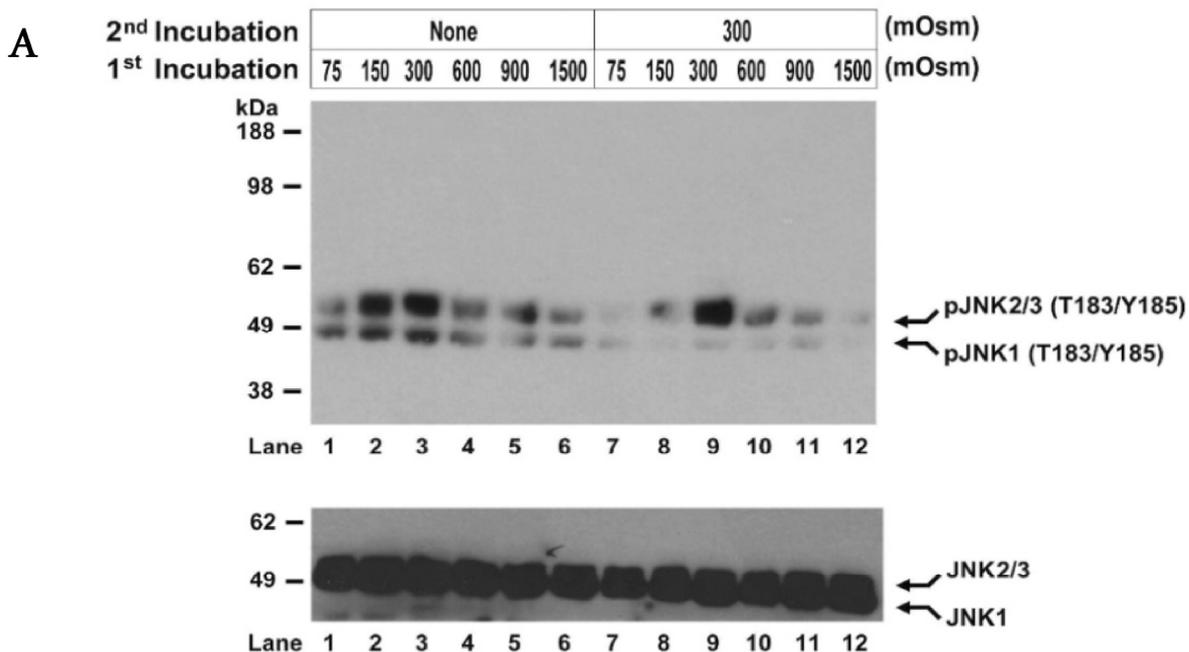


Figura IV-28. Fosforilación de JNK en espermatozoides sometidos a estrés osmótico. Los espermatozoides recién eyaculados fueron incubados durante 10 min en un medio BWW a una presión osmótica de 150 mOsm y a 37 °C. Posteriormente fueron lisados y analizados mediante *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK. En el **panel A** se muestran los valores medios \pm SEM de 8 experimentos realizados de forma independiente. En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo.

Resultados



B

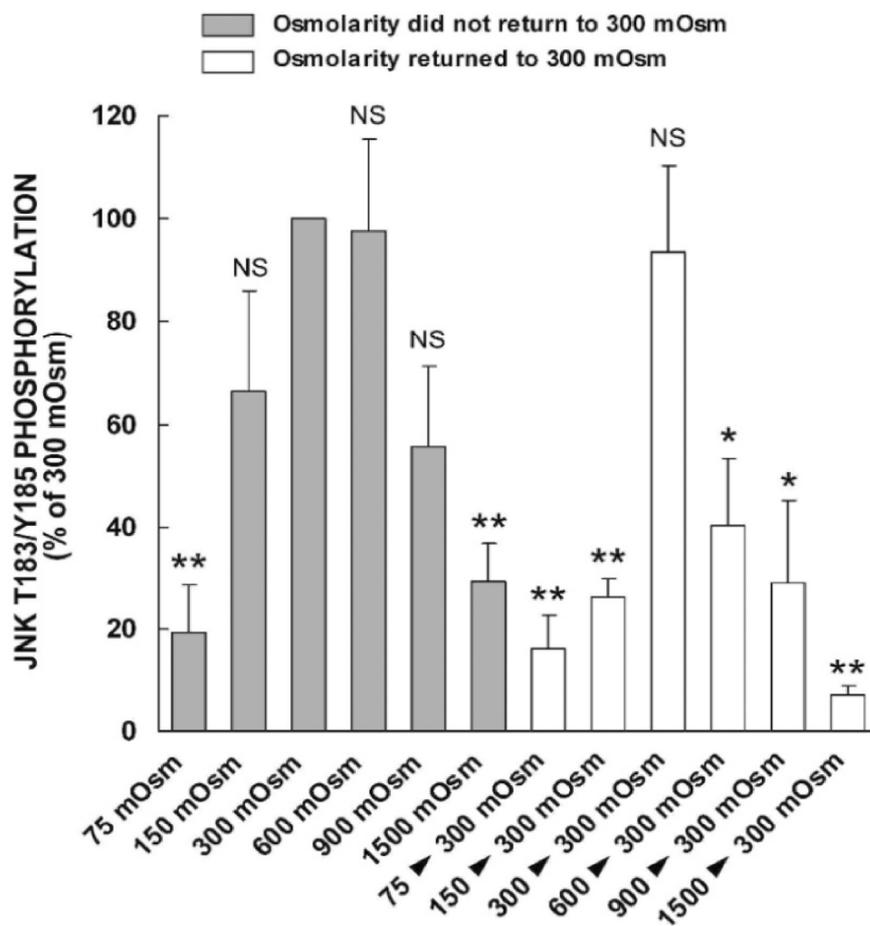


Figura IV-29. (Véase pie de figura en la página siguiente)

◀ **Figura IV-29. Estado de fosforilación de JNK en espermatozoides de caballo sometidos a estrés osmótico. Panel A:** Los espermatozoides de caballo se incubaron durante 10 min en las condiciones indicadas en la figura, posteriormente se lisaron y se evaluó la actividad de JNK mediante *Western blotting* con anticuerpos fosfoespecíficos. El experimento es representativo de otros cinco experimentos independientes. **Panel B:** Se muestran los valores medios \pm SEM de seis experimentos realizados de forma independiente valorando la actividad de JNK, expresada como porcentaje de respuesta obtenida comparada con el control (espermatozoides incubados a 300 mOsm durante 10 minutos). 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.

23. Estudio de la correlación entre la fosforilación de JNK y la viabilidad en espermatozoides equinos

Tras los resultados obtenidos en relación al estado de activación de JNK en diferentes situaciones biológicas, donde esta quinasa parece comportarse como un posible mediador de la viabilidad espermática, al menos en condiciones de incubación prolongadas, hemos estudiado la existencia de una hipotética correlación entre la actividad de JNK y la viabilidad espermática en los espermatozoides de caballos en diferentes condiciones experimentales. Para ello realizamos un estudio estadístico intentando correlacionar el porcentaje de espermatozoides vivos con el grado de fosforilación de JNK. Los resultados muestran que existe una elevada y significativa correlación positiva entre los dos parámetros (Tabla IV-1).

Pearson's Correlation	% Sperm Viability
JNK activity	0,69 ($p = 0.013$)*

Tabla IV-1 Estudio estadístico mediante la correlación de Pearson entre la fosforilación de JNK y la viabilidad de espermatozoides de caballos ($p < 0.05$).

24. Estudio de la actividad de JNK en espermatozoides humanos en donantes fumadores

Los cigarrillos contienen más de 4.000 compuestos químicos [248], muchos de los cuales se pueden encontrar en el semen del fumador [249-250], Muchos de estos compuestos pueden afectar a la calidad del seminal, al ser capaces de inducir estrés oxidativo en los espermatozoides, ya sea por un aumento de las ROS, o por la disminución de la capacidad antioxidante del semen [251]. Además, el tabaquismo ha sido relacionado con toxinas que provocan daño genómico en el espermatozoide y también parece ser capaz de inducir un choque hipo-osmótico que compromete la integridad de la membrana espermática, dañando las colas de los espermatozoides y reduciendo así la viabilidad [252].

Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando que el estrés oxidativo y el daño genómico inducen un aumento en la fosforilación de JNK en los espermatozoides de caballos, hemos evaluado el posible efecto del tabaco en la fosforilación de JNK, tratando a continuación de correlacionar el estado de actividad de esta quinasa con parámetros de calidad seminal en el hombre.

Las muestras fueron obtenidas de varones tras 4-5 días de abstinencia y sometidas a licuefacción durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los distintos parámetros seminales fueron evaluados según los criterios de la organización mundial de la salud. Las muestras fueron lavadas en PBS y a continuación lisadas y analizadas mediante *Western blotting* utilizando un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK, para caracterizar el grado de fosforilación de esta quinasa. Los resultados muestran que existe un significativo descenso en la actividad de JNK en los espermatozoides de individuos fumadores respecto a los no fumadores (Figura IV-30).

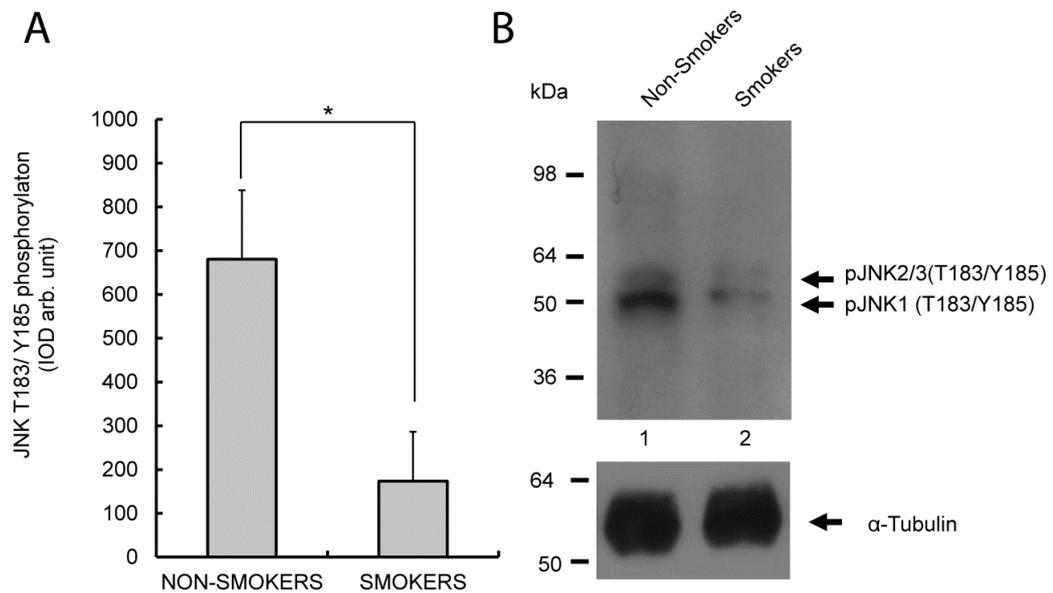


Figura IV-30. Diferencias en la fosforilación de JNK entre fumadores y no fumadores. Los espermatozoides de hombre fueron obtenidos mediante eyaculación y sometidos a licuefacción a temperatura ambiente 30 minutos. Las proteínas extraídas fueron estudiadas mediante *Western blotting* con un anticuerpo fosfoespecífico anti-JNK específico. En el **panel A** se muestran los valores medios \pm SEM de 20 donante realizados de forma independiente. El asterisco (*) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) comparando los valores de fosforilación de individuos fumadores e individuos no fumadores mediante una t de Student para muestras desapareadas. En el **panel B** mostramos un *Western blotting* representativo.

V. DISCUSIÓN

En esta Tesis doctoral demostramos por primera vez la presencia de la serina treonina quinasa JNK en lisados de espermatozoides de mamíferos. Mediante la utilización de anticuerpos específicos hemos estudiado además la regulación de la actividad de esta quinasa en los espermatozoides, tanto en situaciones de estrés celular, como frente a estímulos fisiológicos relacionados con los cambios de tipo capacitante y la reacción acrosómica, ambos requeridos por el espermatozoide para adquirir capacidad fecundante [13, 25, 253]. Finalmente, hemos valorado la participación de esta quinasa en diversas funciones de los espermatozoides maduros eyaculados de caballo y de hombre, tratando de correlacionar su activación con la regulación de mecanismos moleculares relacionados con la supervivencia espermática.

La participación de las vías de las MAPK en la espermatogénesis ha sido puesta de manifiesto por diversos grupos de investigación en los últimos años [120, 158-159, 254-255]. En las células precursoras de los gametos masculinos las distintas cascadas de las MAPK parecen estar implicadas en el control de la progresión de las sucesivas divisiones celulares que acontecen en el proceso y también participan en la supervivencia de las células precursoras de los gametos masculinos [120, 158-159, 254-255]. Las MAPK, además, parecen tener un perfil de expresión variable en función del tipo celular de que se trate durante la espermatogénesis [158], sugiriendo funciones diferenciadas en cada tipo celular y etapa de desarrollo.

Además de en las células precursoras, en los últimos años también se han identificado diversos componentes de las cascadas de señalización de las MAPK en los espermatozoides maduros eyaculados. Así, diferentes componentes de la cascada de las ERK, como c-Ras [256-257], Raf, Grb2 [258] y Shc [165] han sido detectados en espermatozoides humanos mediante Western blotting. En varios estudios independientes se ha investigado la localización subcelular en los espermatozoides de hombre, tanto de las ERK [138, 158, 257], como de la p38 [119]. Aunque hay ligeras discrepancias, esos estudios indican que ambas quinasas están localizadas

Discusión

mayoritariamente en la región postacrosomal y en la pieza principal de la cola, lo que sugiere su posible implicación en la regulación de la reacción acrosómica y la movilidad espermática. El estudio funcional de ERK y p38 con diversas aproximaciones metodológicas ha corroborado que ambas quinasas están implicadas en la regulación de la movilidad y la reacción acrosómica [259]. Como complemento, y quizá como requisito de las funciones descritas, se ha demostrado inequívocamente la implicación de la ruta de las ERK en la regulación de los cambios asociados con la capacitación, especialmente en respuesta a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) [72, 260].

Por otra parte, los componentes de las diferentes rutas de las MAPK descritas se asocian en muchas ocasiones con proteínas adaptadoras que permiten regular la intensidad y la localización de las cascadas de señalización, facilitando, por lo tanto, la especificidad de la señal [195]. De entre las distintas asociaciones intermoleculares posibles de las MAPK, quizá las más importantes sean las que se establecen con las proteínas *scaffold* o andamio. Estas proteínas relacionan distintos componentes de la vía de las MAPK (activadores, inhibidores y efectores), dirigen su localización subcelular, y también participan en la regulación de la actividad de esas proteínas [153, 261]. En células somáticas de mamíferos se han descrito distintas isoformas de las proteínas tipo JIP que actúan como proteínas andamio, capaces de regular la actividad de la JNK [188, 262]. Estas proteínas JIP actúan uniendo de forma específica varios componentes de la ruta de las MAPK como por ejemplo MLK3, MKK7 y JNK, haciendo posible que MLK3 active a MKK7 por fosforilación. Ésta última, a su vez, activará a la JNK. Además de estas isoformas clásicas de las proteínas JIP (JIP1, JIP2 y JIP3), se ha caracterizado recientemente la expresión de SPAG9, una nueva proteína andamio de tipo JIP con una alta homología estructural y funcional con el resto de proteínas pertenecientes a la familia [188, 262]. Esta proteína SPAG9 tiene como particularidad que se expresa específicamente en los testículos [188, 262] y también en los espermatozoides maduros de algunas especies de mamíferos [188, 262]

incluido el hombre [188, 262]. Posteriormente SPAG9 fue denominada como JIP3 γ y actualmente es denominada JIP4 [188, 262].

Además de los trabajos que evidencian la participación de las cascadas de las MAPK conducentes a la activación de ERK y p38 en los espermatozoides de mamíferos, la presencia de la JNK también ha sido investigada previamente por Almog et al. [119, 255] en espermatozoides eyaculados de hombre utilizando *Western blotting* e inmunocitoquímica. En estos trabajos, sin embargo, no se ha obtenido la señal específica de la JNK en los espermatozoides. En nuestro caso, utilizando Western blotting con dos anticuerpos comerciales distintos, hemos identificado inequívocamente las bandas correspondientes con las isoformas JNK1 y JNK2/3, tanto en los espermatozoides humanos, como en lisados de espermatozoides de tres especies de mamíferos adicionales. Los resultados conseguidos utilizando esos dos anticuerpos comerciales no relacionados fueron equivalentes, obteniendo exclusivamente bandas con pesos moleculares equivalentes a las detectadas en los controles positivos y compatibles con los descritos en la literatura para esta proteína [153, 168]. Estos resultados fueron contrastados con los resultados obtenidos con los anticuerpos específicos de las diferentes isoformas de la JNK, confirmando los resultados previos obtenidos con los anticuerpos que reconocen JNK independientemente de la isoforma. De igual forma, los anticuerpos fosfoespecíficos utilizados corroboran los resultados obtenidos puesto que reconocen las mismas bandas que los anticuerpos generales y las de isoformas, aunque solamente se unen a la fracción activa de la proteína [263]. Por lo tanto, a pesar de existir estudios previos que descartaban la presencia de JNK en espermatozoides maduros, nuestros resultados indican categóricamente que esta quinasa se expresa (y fosforila) en los espermatozoides. La aparente discrepancia entre nuestros resultados y los resultados obtenidos previamente por otros grupos de investigación [119, 255] puede atribuirse al empleo de anticuerpos diferentes en ambos laboratorios.

Discusión

Durante el desarrollo de esta Tesis también hemos investigado la distribución subcelular de JNK en los espermatozoides mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal. Los resultados obtenidos indican que la JNK tiene una distribución difusa por todo el espermatozoide, siendo más intensa la señal en la cola, sobre todo en la pieza intermedia. La distribución de la JNK en el espermatozoide maduro, que indudablemente está poco restringida hacia regiones concreta, nos permite especular que esta quinasa podría estar implicada en la regulación de más de una función en este tipo celular. Como hemos mencionado anteriormente, en un estudio previo no se detectó esta proteína en espermatozoides humanos mediante inmunocitoquímica con anticuerpos específicos [119]. A nuestro entender, no hay estudios adicionales que hayan abordado la distribución subcelular de la JNK en los espermatozoides, por lo que no podemos contextualizar nuestros resultados con los de otros grupos. Existen trabajos previos, sin embargo, que han abordado la distribución subcelular en los espermatozoides de mamíferos de las fosfatasa de especificidad dual que desactivan las JNK (y también otras MAPK) [264]. La distribución de al menos dos de estas fosfatasa es coincidente con la obtenida en el presente trabajo para sus sustratos, puesto que se encuentran en la cabeza, sobre todo en el acrosoma y postacrosoma, (VHR), y en la cola, sobre todo en la pieza intermedia y la pieza principal (VHR y MKP2) [265]. La distribución de esta última fosfatasa también ha sido estudiada en esta Tesis doctoral, habiendo corroborado los estudios anteriores, es decir, hemos detectado una distribución difusa de la señal específica de MKP2 por toda la cola y, aunque más escasa, también en la cabeza. Por último, la distribución en los espermatozoides de las proteínas adaptadoras de tipo JIP implicadas en la señalización de las cascadas MAPK es también equivalente a la descrita en este trabajo, puesto que se ha descrito que se localizan en la cola [262], aunque también se ha descrito su presencia en el acrosoma [188, 262].

Los espermatozoides son células muy diferenciadas y especializadas, sin capacidad de transcripción activa del genoma. No obstante, la mitocondria posee cierta capacidad de síntesis de proteínas (existe

maquinaria de traducción), pero ésta capacidad es residual y aparentemente está restringida a unos pocos mRNA [266]. Por lo tanto, aun conociendo que este es un tema actualmente sujeto a debate, es razonable indicar que la expresión de las JNK detectada en el espermatozoide maduro debe ocurrir durante la espermatogénesis y, por lo tanto, la actividad de la proteína, más que por el nivel proteína, se regula fundamentalmente por su fosforilación en residuos específicos, al igual que en otras cascadas de las MAPK. Y esto es así porque los componentes de las diferentes rutas de las MAPK se activan secuencialmente mediante fosforilaciones consecutivas hasta culminar con la activación de una serina/treonina quinasa efectora, como la JNK [153, 267]. Mientras que las quinasas que se encuentran por encima de JNK en la ruta son activadas mediante fosforilaciones en residuos de serina y treonina, la activación de JNK (y de las otras MAPK) depende de una doble fosforilación mediada fundamentalmente por la acción de dos enzimas, la MKK4 (también MAP2K2 o JNKK) y la MKK7 (MAP2K7, JNKK2) en residuos de treonina y tirosina [168]. El descubrimiento de la estructura tridimensional de JNK3 ha permitido colegir que la fosforilación en tirosina de JNK estabiliza el lugar de unión con el sustrato, mientras que la fosforilación en treonina provoca el cierre del dominio catalítico, manteniendo la quinasa en conformación activa [254]. A efectos prácticos, este mecanismo de activación por fosforilación dual, que insistimos es general para todas las MAPK, permite correlacionar de forma directa el aumento en el estado de fosforilación de JNK con un incremento en su actividad [268].

Entre los activadores de JNK en células somáticas se incluyen citoquinas, ROS, radiación ultravioleta (UV) o choque osmótico, entre otros. La mayoría de estos estímulos actúa induciendo la actividad de una MAPKKK, como la proteína ASK, que inicia la cascada de señalización [226, 269-270]. Sin embargo, un aumento de ROS y la UV pueden inducir la activación directa de la quinasa sin la activación previa de ASK1, mediante la disociación de la JNK y GSTPi [271]. La JNK activada (directa o indirectamente) puede translocar a la mitocondria o al núcleo y fosforilar así diferentes sustratos en estas localizaciones [272-273]. En nuestros

Discusión

experimentos el estrés celular de diversos orígenes, induce en los espermatozoides de caballo y de hombre cambios muy acusados en el estado de activación de la JNK (estimada mediante la cuantificación del grado de fosforilación de residuos relacionados con la actividad quinasa). Es muy destacable, además, que según nuestros resultados no todos los tipos de estrés celular inducen los mismos efectos en la activación de la JNK en los espermatozoides, sino que los efectos son variables y en algunos casos antagónicos. Así, mientras el estrés oxidativo y la luz ultravioleta inducen un marcado incremento en la actividad de la JNK, el estrés osmótico inhibe el estado de activación de la JNK.

El hecho de que diversos tipos de estrés induzcan efectos antagónicos en el estado de activación de la JNK tiene una explicación que no es, en principio, muy evidente, más aún cuando en el tipo celular que nos ocupa esos tipos de estrés pueden estar íntimamente relacionados [274]. Sin embargo, los estímulos utilizados en el presente trabajo parecen capaces de inducir un estrés celular en los espermatozoides en grados muy diferentes. Así, mientras se ha descrito que el nivel de estrés celular causado por los cambios osmóticos utilizados en el presente trabajo inducen, entre otros efectos, una acusada pérdida de movilidad y viabilidad en los espermatozoides de caballo [98] y de otras especies [275], el nivel de UV utilizado y el estrés oxidativo inducido son, por el contrario, muy moderados, con efectos muy reducidos en los espermatozoides [276]. Además, teniendo en cuenta que la UV induce mayoritariamente un incremento moderado en el estrés oxidativo (más que daño genómico) en los espermatozoides [274], ambos estímulos pueden considerarse equivalentes. No obstante, aún no hemos demostrado experimentalmente si, al igual que ocurre en los espermatozoides de hombre [274], en los espermatozoides de otras especies la radiación UV podría inducir también un incremento de ROS responsable, en último término, de los fenómenos biológicos causados. Abundando en la idea de que el efecto de ambos tipos de estrés pudiesen considerarse equivalentes, creemos conveniente destacar que el incremento del cAMP, un estímulo fisiológico típico responsable en los espermatozoides

del inicio y progresión de la movilidad, la capacitación y la reacción acrosómica [143, 229, 253, 277], es también un importante inductor de la activación de la JNK. Es más, muchos de los efectos de las ROS en los espermatozoides parecen estar mediados por un incremento intracelular de cAMP. Este aumento puede ser dependiente de la activación de las adenilato ciclasas, de la inhibición de las fosfodiesterasas o de ambos [72, 259-260]. Por lo tanto, al igual que en las células somáticas, en los espermatozoides de mamíferos el estrés moderado inducido por las ROS podría considerarse un estímulo fisiológico en la regulación de la función espermática, cuyos efectos están, al menos parcialmente, mediados por la producción de cAMP y la subsiguiente activación de la PKA [143, 277]. Además, uno de los mediadores moleculares más importantes activados por las ROS en los espermatozoides son las ERK [259] y, según se infiere del presente trabajo, probablemente también la JNK.

El papel mediador de JNK en procesos fisiológicos, ante estímulos también fisiológicos, puede extenderse al efecto activador de esta quinasa por el TNF α , puesto que esta citoquina, al menos en espermatozoides humanos, parece desempeñar un papel regulador de la función espermática modulando la concentración intracelular de calcio que no estaría relacionada directamente con la supervivencia celular pero sí con el estrés oxidativo [278]. De hecho, aunque estos resultados no han sido incluidos en la presente Tesis Doctoral, la incubación de espermatozoides de caballo en presencia de TNF α no modifica ni el nivel de apoptosis, ni la viabilidad, ni los parámetros de motilidad en comparación con la población control, al menos hasta seis horas de incubación. Desconocemos, no obstante, si al igual que ocurre con los espermatozoides de hombre, el TNF α modifica la concentración intracelular de calcio y de ROS en los espermatozoides de caballo y si la JNK podría jugar un papel en este proceso.

La inactivación de las MAPK depende de la defosforilación por parte de fosfatasas de especificidad dual [264], de las que ya hemos indicado se han caracterizado varias en los espermatozoides maduros de diferentes

Discusión

especies de mamíferos, algunas de las cuales se han identificado nuevamente en esta tesis, presentando una distribución similar a la de JNK, ERK y p38 [265]. Algunos de los resultados de esta tesis doctoral parecen indicar que, aparte de colocalizar con su sustrato, las fosfatasa también podrían desarrollar una función esencial en la regulación de JNK en los espermatozoides. En este sentido es destacable que algunas de las curvas de activación de JNK obtenidas tras la incubación con determinados agentes (cAMP, $TNF\alpha$), muestran una tendencia claramente bifásica, fundamentalmente en relación al tiempo de incubación, con un incremento máximo inicial que se ve reducido al prolongar la incubación. Ésta caída en la fosforilación de JNK necesariamente debe estar asociada a actividad fosfatasa, puesto que el nivel de proteína se mantiene constante. Pero la regulación de la actividad de JNK por parte de las fosfatasa no solamente debe asociarse con una reducción de la fosforilación, sino que parte del incremento en la actividad JNK ante determinados estímulos también puede relacionarse con un descenso de la actividad fosfatasa. En este sentido se ha descrito que un estrés oxidativo moderado es capaz de inactivar de forma reversible las fosfatasa [279-280], incluyendo las de especificidad dual, produciendo con ello un incremento (permisivo) en la fosforilación de determinados sustratos que se asocia con la regulación de funciones biológicas específicas [279-280]. Resultados previos de nuestro grupo de investigación parecen indicar que este mismo mecanismo de regulación, o uno equivalente, también se desarrolla en los espermatozoides, puesto que hemos demostrado que la inhibición específica de la actividad fosfatasa con compuestos que causan estrés oxidativo moderado es completamente reversible, al igual que su función biológica que se recupera rápida y completamente tras la retirada del inhibidor del medio de incubación [265]. Si se tiene en cuenta que un estrés oxidativo moderado es necesario para desarrollar algunos aspectos esenciales de la biología de los espermatozoide, por ejemplo la capacitación [37, 52, 69, 281], es fácil especular que la inactivación reversible de las fosfatasa por oxidación estaría implicada en este mecanismo y, probablemente, también en el

incremento de actividad de JNK detectado en respuesta al estrés oxidativo o la radiación UV.

Una vez establecido que la JNK está presente en los espermatozoides de mamíferos y que participa en la señalización que se establece en estas células en respuesta a estímulos tanto fisiológicos como dependiente del estrés celular (moderado o intenso), decidimos estudiar a continuación la posible función de esta quinasa en los espermatozoides de caballo y de hombre. Para explorar las funciones biológicas de la JNK se han utilizado generalmente inhibidores químicos consistentes en pequeñas moléculas difusibles a través de la membrana que inhiben competitivamente la unión con el ATP [282]. Sin embargo, a pesar de demostrar ciertos efectos potencialmente beneficiosos *in vivo*, la especificidad *in vitro* de la mayor parte de estos inhibidores ha sido cuestionada recientemente [192-193, 282]. Por lo tanto, utilizamos una aproximación diferente que consiste en la utilización de pequeños péptidos que son diseñados y sintetizados a partir de la estructura molecular de las proteínas de andamio tipo JIP [194] y son capaces de bloquear la actividad de la JNK. Estos inhibidores se unen directamente al sitio de anclaje del sustrato y actúan bloqueando competitivamente la unión con el mismo [194]. Además, debido a que el péptido también bloquea la asociación de la JNK con las proteínas de anclaje, el péptido puede también reducir la activación de la JNK al impedir su acceso a las MKKs activadoras [194]. En nuestras condiciones, la incubación de los espermatozoides de caballo en presencia del péptido inhibidor BI-78D3 bloquea claramente el nivel de fosforilación de la JNK en respuesta a ROS, UV, cAMP y, también, la actividad basal de la JNK en tiempos de incubación prolongados. Atendiendo al mecanismo de acción del inhibidor, este último hallazgo es, en principio, sorprendente. Sin embargo, al considerar que las proteínas andamio de tipo JIP nucleas la asociación de JNK con sus activadores [195], es posible que impidan el acceso de la JNK a estas quinasas activadoras también en condiciones basales, de forma que se detecta un descenso progresivo en la fosforilación de los residuos específicos en presencia del inhibidor, aún en ausencia de estímulo. En

Discusión

cualquier caso, los resultados obtenidos indican en su conjunto que la aproximación farmacológica es potencialmente útil para caracterizar el papel que JNK podría desempeñar en los espermatozoides.

Decidimos, por tanto, utilizar esta aproximación para tratar de caracterizar la función de JNK en primer lugar respecto a la regulación de los procesos apoptóticos, puesto que, al contrario de lo que ocurre en las células somáticas, donde la maquinaria molecular que desencadena la muerte celular por apoptosis está, en general, bien caracterizada [283-286], en el contexto de los espermatozoides maduros los mecanismos moleculares equivalentes y, sobre todo, sus procedimientos de activación distan mucho de estar completamente definidos [287]. En particular se desconoce cómo y cuándo se activan los procesos de tipo apoptótico en los gametos masculinos y, especialmente, cuáles son las consecuencias fisiológicas de dicha activación [287]. Teniendo en cuenta la capacidad de JNK de regular la apoptosis en las células somáticas, especialmente en respuesta al estrés [288], decidimos investigar el papel de la JNK en la regulación de procesos de tipo apoptótico en los espermatozoides eyaculados de caballo. Nuestros resultados indican que la JNK no modifica el porcentaje de espermatozoides con rasgos de tipo apoptótico en ausencia de estrés celular en periodos cortos de incubación. Sin embargo, cuando los espermatozoides son incubados durante varios días en refrigeración en presencia de un inhibidor químico específico de la JNK, el porcentaje de células apoptóticas se incrementa significativamente en relación a la población control. Este incremento se acompaña, como era esperable, de una reducción significativa del número de células viables. Además, en experimentos desarrollados en espermatozoides de caballo hemos detectado una correlación positiva entre el estado de fosforilación (activación) de la JNK y la viabilidad espermática. Finalmente, aunque este tema es controvertido y existen estudios contradictorios [289-290] en los espermatozoides de individuos fumadores, que probablemente muestran menor supervivencia y pobres características funcionales [289, 291], hemos detectado un valor de fosforilación de la JNK significativamente inferior que

la detectada en individuos no fumadores. Por tanto, los resultados descritos indican en su conjunto que JNK se comporta en los espermatozoides como un modulador positivo de la supervivencia, es decir, es una molécula *prosurvival*.

La capacidad de la JNK para modificar los procesos de tipo apoptótico y la supervivencia en células somáticas depende de su capacidad de regular diferentes vías de señalización íntimamente interconectadas [223, 227, 282, 292]. En primer lugar, la JNK es capaz de activar directa o indirectamente a miembros de la familia Bcl2 (por ejemplo, Bax y Bcl-XL) implicados en el fenómeno de apoptosis. También es capaz de incrementar la fosforilación y la consiguiente activación del factor de transcripción p53 [293]. Se ha demostrado, además, que la JNK puede promover la apoptosis mediante la translocación de Bax a la mitocondria, proceso que está mediado por la fosforilación directa de Bax [294], o bien por la fosforilación de la proteína 14-3-3 que ancla Bax en el citoplasma [295]. Sin embargo, en otros estudios la activación de la JNK está implicada en la activación de señales antiapoptóticas [288]. En este sentido, JNK puede inducir supervivencia celular mediante la fosforilación e inactivación de la proteína proapoptótica BAD, impidiendo que BAD interaccione e inactive la proteína antiapoptótica BclXL [206]. En otros casos el papel que la JNK juega en la regulación de la apoptosis depende del contexto celular en que se expresa, estando implicada tanto en vías de tipo apoptótico como en vías antiapoptóticas [204]. Esto puede deberse en parte a que la ruta de señalización de la que depende JNK para participar en la apoptosis puede estar bloqueada por mecanismos de supervivencia [296]. Ejemplos de estas vías de supervivencia son NFkB, AKT/PKB y las ERK. Otros estudios han sugerido que la respuesta proapoptótica tras la activación de JNK parece depender de una activación sostenida a lo largo del tiempo de JNK y no de una activación transitoria. En este último caso, la JNK parece estar implicada en la regulación de vías de supervivencia [186, 292, 297].

Discusión

En resumen, el hecho de que JNK pueda regular respuestas tanto proapoptóticas como antiapoptóticas, incluso en el mismo tipo celular, puede ser debido: (1) a la activación selectiva de vías particulares pro- o antiapoptóticas; (2) a que los efectos biológicos inducidos por JNK puedan estar condicionados por el estado de activación de otras rutas, siendo la acción de JNK más permisiva que inductora; y (3) a la duración de la estimulación de la JNK, que puede determinar el tipo de respuesta. En esta Tesis no hemos estudiado cuál(es) de esos mecanismos podrían estar implicados en la respuesta marcadamente antiapoptótica (y prosupervivencia) que demuestra JNK en los espermatozoides, aunque el hecho de que el efecto en la apoptosis (y la supervivencia) requiera largos tiempos de incubación con el inhibidor, es decir, implica la actividad sostenida de JNK, podría estar indicando una función permisiva de la JNK en la supervivencia más que una regulación directa del proceso. Aunque algunos mecanismos moleculares equivalentes ya han sido propuestos en células somáticas [186, 292, 297], aún no disponemos de información experimental para determinar si esta hipótesis es cierta o no en los espermatozoides.

Para ejercer algunas de sus funciones la JNK puede translocar a la mitocondria donde es capaz de fosforilar diversos sustratos, fundamentalmente proteínas de la membrana externa mitocondrial [298]. Los efectos directos de actividad de la JNK en la mitocondria se han estudiado en ensayos libres de células, donde la adición de JNK purificado causa la liberación de citocromo c procedente de mitocondrias aisladas [299]. Además, mutantes dominantes negativos de JNK2 previenen la liberación del citocromo c, así como eventos situados más distales en la cascada como la activación de la caspasa 3 y la poli (ADP)-ribosa [300]. Por lo tanto, en las células somáticas la fosforilación de sustratos a nivel mitocondrial parece estar relacionada con procesos de tipo proapoptótico [299]. Además de estos sustratos relacionados con la apoptosis, la JNK puede fosforilar otros componentes mitocondriales que serían importantes en la regulación de funciones metabólicas, como por ejemplo la piruvato deshidrogenasa (PDH)

[301-302]. Esta fosforilación causa la inhibición de la PDH y, consecuentemente, un acusado descenso en el contenido en el ATP celular en células somáticas [301]. Finalmente, la fosforilación por la JNK de distintos sustratos a nivel de mitocondria generalmente se acompaña de un descenso en el potencial de membrana mitocondrial [299]. Teniendo en cuenta estos antecedentes es particularmente destacable el resultado obtenido en nuestro laboratorio en relación al papel de la JNK en el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial, puesto que hemos encontrado, una modesta pero significativa pérdida de actividad mitocondrial, en los espermatozoides de caballo incubados en presencia del inhibidor de la JNK, que fue dependiente del tiempo y de la concentración del inhibidor empleado. Estos resultados parecen indicar que, en los gametos masculinos, la JNK no solo no participa en la regulación de los fenómenos apoptóticos ni en la regulación de la viabilidad celular, sino que, al contrario de lo que ocurre en células somáticas [299], contribuye al mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial por algún mecanismo aún no determinado.

Además de la regulación de la supervivencia o la muerte celular por apoptosis, parte de los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis apuntan hacia la implicación de la JNK en la regulación de vías de señalización implicadas en la función metabólica y en las respuestas fisiológicas al estrés moderado (ROS) y otros activadores de la función espermática (cAMP/PKA y cAMP/EPAC). Ante estímulos similares se ha descrito la participación de las cascadas de las ERK y la p38 en la regulación de la movilidad espermática [119]. Sin embargo, el papel de las quinasas ERK en la regulación de la movilidad es aún controvertido puesto que existen artículos que sugieren un papel positivo en la movilidad de los espermatozoides de gallo [303], ratón [120] y hombre [119] mientras que otros estudios le atribuyen un papel negativo en la regulación de la movilidad de los espermatozoides de hombre [304] y cerdo [265]. Por el contrario, el papel atribuido a la p38 en la regulación de la movilidad espermática en mamíferos es siempre negativo, puesto que su inhibición incrementa la

Discusión

movilidad [98] mientras que la activación selectiva de esta vía la inhibe [119]. En nuestros experimentos la supresión de la actividad de la JNK con el inhibidor específico se acompaña de un marcado efecto inhibitorio de la movilidad de los espermatozoides de caballo. Este efecto fue dosis-dependiente y muy rápido, con aproximadamente un 50% de inhibición en la movilidad tras 90 min de incubación y el 100% de células inmóviles tras 180 min. Nuestros resultados indican que, al contrario que ocurre con la p38 [119], la JNK ejerce un papel positivo en la regulación de la movilidad espermática. Aún no conocemos cuáles son los mediadores moleculares de este efecto, pero, al igual que ocurre con las cascadas de las ERK, podrían estar relacionados con la fosforilación de componentes del axonema [255] o bien con la polimerización de los filamentos de actina, que, en relación con las ERK, parece ser un efecto mediado por la activación de ARHGAP6 (un GAP de Rho A) [119]. La regulación de la polimerización de actina, por lo tanto, parece ser el mecanismo más plausible por el que las ERK regulan la movilidad espermática. Además, en células somáticas se ha descrito una relación directa entre la polimerización de actina dependiente de JNK y la movilidad celular [305], lo que sugiere que este mecanismo también podría ser utilizado por las JNK para regular la movilidad en los espermatozoides. Finalmente, creemos oportuno mencionar en este contexto que el efecto negativo en la movilidad inducido por el inhibidor de la JNK no parece estar mediado por su capacidad de reducir significativamente el potencial de membrana mitocondrial, primero porque la inhibición de la movilidad es previa a la pérdida de funcionalidad mitocondrial y por lo tanto no debe considerarse una consecuencia de esta, y segundo porque estudios previos han demostrado que la producción de ATP mitocondrial no es imprescindible para el mantenimiento de la movilidad en presencia de glucosa [306].

En resumen, en este trabajo hemos descrito por primera vez en los espermatozoides de diferentes especies de mamíferos la presencia de la JNK y hemos estudiado el posible papel que esta quinasa juega en este tipo celular. En relación a la supervivencia espermática la JNK muestra un marcado efecto protector, que podría ser dependiente de su capacidad de

inhibir la apoptosis en estas células. Sin embargo, el efecto en relación a la respuesta al estrés es dual. Por un lado el estrés oxidativo moderado activa la JNK en los espermatozoides de caballo. Éste ha sido propuesto como un mecanismo de señalización implicado en la regulación fisiológica de la capacitación espermática, en la regulación de la movilidad y en el establecimiento de la reacción acrosómica [72, 259]. Por el contrario, el estrés osmótico es un claro inhibidor de la actividad de la JNK en estas células. El hecho de que el estrés osmótico induce un incremento de los niveles de ROS en los espermatozoides de algunas especies [98] complica necesariamente el esquema de la regulación de JNK en los espermatozoides. Un análisis similar puede ejercerse respecto al nivel de activación de JNK en individuos fumadores, puesto que, aunque se detecta un acusado descenso en la fosforilación de JNK, se ha descrito que el tabaquismo induce un marcado estrés oxidativo en los espermatozoides [290]. Es posible, no obstante, que la JNK, al igual que ocurre en las células somáticas [204], pueda tener un efecto dual en los espermatozoides, pudiendo desempeñar papeles diferentes e incluso antagónicos, en función del contexto celular y del tipo, intensidad y duración de la señal activadora. En cualquier caso, la identificación de las dianas y mecanismos moleculares regulados por la JNK en los espermatozoides obviamente redundará en una mejor comprensión de los procesos implicados la supervivencia espermática y, probablemente, permitirá establecer puntos de intervención adecuados para mantener la fertilidad del eyaculado, particularmente en aquellos procedimientos biotecnológicos que requieran largas incubaciones o que causen un estrés celular muy acusado.

VI. CONCLUSIONES

1. La proteína c-Jun N-terminal quinasa (JNK) está presente en los espermatozoides de mamíferos.
2. La participación de JNK en los espermatozoides de mamíferos en respuesta al estrés celular de diferentes orígenes, tales como el estrés oxidativo, el daño genómico y los choques hipo- e hiperosmóticos, es diferente en función del origen de este estrés y de la duración del mismo.
3. La JNK también juega un papel en la regulación de la función espermática en respuesta a estímulos fisiológicos y en el control de la movilidad.
4. La JNK parece intervenir en el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides de mamíferos, probablemente mediante la regulación del potencial de membrana mitocondrial y/o la inhibición de los procesos apoptóticos
5. La estimación del estado de fosforilación de la JNK podría ser un indicador adecuado para estimar el potencial fértil de una población de espermatozoides, incluyendo los de origen humano.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

1. Amann, R.P., *The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?* J Androl, 2008. **29**(5): p. 469-87.
2. Amann, R.P. and B.D. Schanbacher, *Physiology of male reproduction*. J Anim Sci, 1983. **57 Suppl 2**: p. 380-403.
3. Marina, F. and S. Marina, *Comments on oocyte cryopreservation*. Reprod Biomed Online, 2003. **6**(4): p. 401-2.
4. Johnson, L., D.L. Thompson, Jr., and D.D. Varner, *Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis*. Anim Reprod Sci, 2008. **105**(1-2): p. 23-51.
5. Johnson, C., et al., *Role of caspase 2 in apoptotic signaling in primate and murine germ cells*. Biol Reprod, 2008. **79**(5): p. 806-14.
6. Ge, R., G. Chen, and M.P. Hardy, *The role of the Leydig cell in spermatogenic function*. Adv Exp Med Biol, 2008. **636**: p. 255-69.
7. Gilbert, S.F., *The morphogenesis of evolutionary developmental biology*. Int J Dev Biol, 2003. **47**(7-8): p. 467-77.
8. Chenoweth, P.J., *Bull libido/serving capacity*. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1997. **13**(2): p. 331-44.
9. Knobil, E. and J.D. Neill, *Encyclopedia of reproduction*. 1998, San Diego: Academic Press.
10. Abou-Haila, A. and D.R. Tulsiani, *Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function*. Arch Biochem Biophys, 2000. **379**(2): p. 173-82.
11. Silva, P.F. and B.M. Gadella, *Detection of damage in mammalian sperm cells*. Theriogenology, 2006. **65**(5): p. 958-78.
12. Tulsiani, D.R., M.C. Orgebin-Crist, and M.D. Skudlarek, *Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation*. J Reprod Fertil Suppl, 1998. **53**: p. 85-97.
13. Gadella, B.M., et al., *Sperm head membrane reorganisation during capacitation*. Int J Dev Biol, 2008. **52**(5-6): p. 473-80.
14. Mortimer, S.T., *A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals*. Hum Reprod Update, 1997. **3**(5): p. 403-39.
15. Schuel, H. and L.J. Burkman, *A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm*. Biol Reprod, 2005. **73**(6): p. 1078-86.
16. Tapia, J.A., et al., *The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope*. Reprod Domest Anim, 2012. **47 Suppl 3**: p. 65-75.
17. Parks, J.E. and D.V. Lynch, *Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes*. Cryobiology, 1992. **29**(2): p. 255-66.
18. McKinnon, L.A. and N.M. Nathanson, *Tissue-specific regulation of muscarinic acetylcholine receptor expression during embryonic development*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20636-42.
19. Wang, D., et al., *A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(12): p. 1117-22.
20. Turner, R.M., *Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation*. Reprod Fertil Dev, 2006. **18**(1-2): p. 25-38.
21. Alvarez, J.G. and B.T. Storey, *Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa*. Biol Reprod, 1984. **30**(2): p. 323-31.
22. Williams, A.C. and W.C. Ford, *The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa*. J Androl, 2001. **22**(4): p. 680-95.

23. Westhoff, D. and G. Kamp, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 15)**: p. 1821-9.
24. Yanagimachi, R., *The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation*. J Reprod Fertil, 1970. **23(1)**: p. 193-6.
25. Austin, C.R., *Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg*. Aust J Sci Res B, 1951. **4(4)**: p. 581-96.
26. Abou-haila, A. and D.R. Tulsiani, *Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction*. Arch Biochem Biophys, 2009. **485(1)**: p. 72-81.
27. Boerke, A., et al., *Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction*. Theriogenology, 2008. **70(8)**: p. 1188-96.
28. Suzuki, F., *Changes in the distribution of intramembranous particles and filipin-sterol complexes during epididymal maturation of golden hamster spermatozoa*. J Ultrastruct Mol Struct Res, 1988. **100(1)**: p. 39-54.
29. Gadella, B.M. and R.A. Harrison, *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, 2002. **67(1)**: p. 340-50.
30. Flesch, F.M. and B.M. Gadella, *Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1469(3)**: p. 197-235.
31. Cross, N.L. and P. Razy-Faulkner, *Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone*. Biol Reprod, 1997. **56(5)**: p. 1169-74.
32. Topfer-Petersen, E., A.M. Petrounina, and M. Ekhlesi-Hundrieser, *Oocyte-sperm interactions*. Anim Reprod Sci, 2000. **60-61**: p. 653-62.
33. Tardif, S., C. Dube, and J.L. Bailey, *Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium*. Biol Reprod, 2003. **68(1)**: p. 207-13.
34. Tardif, S., et al., *Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins*. Biol Reprod, 2001. **65(3)**: p. 784-92.
35. Visconti, P.E., et al., *Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation*. Development, 1995. **121(4)**: p. 1129-37.
36. Visconti, P.E., et al., *Regulation, localization, and anchoring of protein kinase A subunits during mouse sperm capacitation*. Dev Biol, 1997. **192(2)**: p. 351-63.
37. Aitken, R.J., et al., *A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 5)**: p. 645-56.
38. Breitbart, H., *Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003. **49(3)**: p. 321-7.
39. Bravo, M.M., et al., *Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa*. Mol Reprod Dev, 2005. **71(1)**: p. 88-96.
40. Sanocka, D. and M. Kurpisz, *Reactive oxygen species and sperm cells*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 12.
41. Griveau, J.F., P. Renard, and D. Le Lannou, *An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation*. Int J Androl, 1994. **17(6)**: p. 300-7.

Bibliografia

42. Fraser, L.R., *Cellular biology of capacitation and the acrosome reaction*. Hum Reprod, 1995. **10 Suppl 1**: p. 22-30.
43. Fraser, L.R., L.R. Abeydeera, and K. Niwa, *Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis*. Mol Reprod Dev, 1995. **40**(2): p. 233-41.
44. Aitken, R.J., et al., *Analysis of sperm function in globozoospermia: implications for the mechanism of sperm-zona interaction*. Fertil Steril, 1990. **54**(4): p. 701-7.
45. Brewis, I.A. and C.H. Wong, *Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida*. Rev Reprod, 1999. **4**(3): p. 135-42.
46. Brucker, C. and G.B. Lipford, *The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. An update*. Hum Reprod Update, 1995. **1**(1): p. 51-62.
47. Breitbart, H. and B. Spungin, *The biochemistry of the acrosome reaction*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(3): p. 195-202.
48. O'Toole, C.M., et al., *A role for diacylglycerol in human sperm acrosomal exocytosis*. Mol Hum Reprod, 1996. **2**(5): p. 317-26.
49. Jimenez-Gonzalez, C., et al., *Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(3): p. 253-67.
50. Watson, P.F., *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. Anim Reprod Sci, 2000. **60-61**: p. 481-92.
51. Watson, P.F., *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function*. Reprod Fertil Dev, 1995. **7**(4): p. 871-91.
52. Bansal, A.K. and G.S. Bilaspuri, *Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions*. Vet Med Int, 2010. **2010**.
53. Critser, J.K., et al., *Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction*. Fertil Steril, 1987. **47**(4): p. 656-63.
54. Sheweita, S.A., A.M. Tilmisany, and H. Al-Sawaf, *Mechanisms of male infertility: role of antioxidants*. Curr Drug Metab, 2005. **6**(5): p. 495-501.
55. Fraczek, M. and M. Kurpisz, *[The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa]*. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2005. **59**: p. 523-34.
56. Beckman, K.B. and B.N. Ames, *The free radical theory of aging matures*. Physiol Rev, 1998. **78**(2): p. 547-81.
57. Sommer, D., et al., *Modulation of the phosphatase activity of calcineurin by oxidants and antioxidants in vitro*. Eur J Biochem, 2000. **267**(8): p. 2312-22.
58. Baumber, J., et al., *The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation*. J Androl, 2000. **21**(6): p. 895-902.
59. Sabeur, K. and B.A. Ball, *Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa*. Reproduction, 2007. **134**(2): p. 263-70.
60. Sabeur, K. and B.A. Ball, *Characterization of galactose-binding proteins in equine testis and spermatozoa*. Anim Reprod Sci, 2007. **101**(1-2): p. 74-84.
61. Ball, B.A. and A. Vo, *Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential*. J Androl, 2001. **22**(6): p. 1061-9.
62. Baumber, J., et al., *Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa*. Theriogenology, 2002. **57**(3): p. 1025-33.
63. Neild, D.M., et al., *Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation*. Theriogenology, 2003. **59**(8): p. 1693-705.

64. Thomas, A.D., S.A. Meyers, and B.A. Ball, *Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation*. Theriogenology, 2006. **65**(8): p. 1531-50.
65. Baumber, J., et al., *Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa*. J Androl, 2003. **24**(4): p. 621-8.
66. Baumber, J., B.A. Ball, and J.J. Linfor, *Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants*. Am J Vet Res, 2005. **66**(5): p. 772-9.
67. Baumber, J. and B.A. Ball, *Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues*. Am J Vet Res, 2005. **66**(8): p. 1415-9.
68. Ball, B.A., *Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse*. Anim Reprod Sci, 2008. **107**(3-4): p. 257-67.
69. Aitken, R.J., *Free radicals, lipid peroxidation and sperm function*. Reprod Fertil Dev, 1995. **7**(4): p. 659-68.
70. Neild, D.N., et al., *Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm*. Anim Reprod Sci, 2005. **89**(1-4): p. 47-56.
71. Ball, B.A. and A. Vo, *Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591*. J Androl, 2002. **23**(2): p. 259-69.
72. de Lamirande, E., et al., *Reactive oxygen species and sperm physiology*. Rev Reprod, 1997. **2**(1): p. 48-54.
73. Watson, P.F., *The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein*. J Reprod Fertil, 1981. **62**(2): p. 483-92.
74. Dobrins EZ, C.L., Berger T, Anchoroguy T, Oversteet JW, Crowe JH., 1993. J Exp Zool., Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **265**: p. 432-437.
75. Pursel, V.G., L.L. Schulman, and L.A. Johnson, *Distribution and morphology of fresh and frozen-thawed sperm in the reproductive tract of gilts after artificial insemination*. Biol Reprod, 1978. **19**(1): p. 69-76.
76. Tamuli, M.K. and P.F. Watson, *Cold resistance of live boar spermatozoa during incubation after ejaculation*. Vet Rec, 1994. **135**(7): p. 160-2.
77. Watson, P.F. and A.E. Duncan, *Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa*. Cryobiology, 1988. **25**(2): p. 131-42.
78. Darin-Bennett, A. and I.G. White, *Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock*. Cryobiology, 1977. **14**(4): p. 466-70.
79. Purdy, P.H., *The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 degrees C prior to cryopreservation*. Anim Reprod Sci, 2006. **93**(1-2): p. 114-23.
80. Ladbroke, B.D. and D. Chapman, *Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies*. Chem Phys Lipids, 1969. **3**(4): p. 304-56.
81. Purdy, P.H., M.H. Fox, and J.K. Graham, *The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition*. Cryobiology, 2005. **51**(1): p. 102-12.
82. Christian, A.E., et al., *Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content*. J Lipid Res, 1997. **38**(11): p. 2264-72.
83. Combes, G.B., et al., *Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing*. J Reprod Fertil Suppl, 2000(56): p. 127-32.
84. Holt, W.V. and R.D. North, *Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa*. J Reprod Fertil, 1986. **78**(2): p. 447-57.

Bibliografía

85. Holt, W.V. and R.D. North, *The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage*. Gamete Res, 1988. **19**(1): p. 77-89.
86. Yaniz, J., et al., *Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15 degrees C on their survival and penetrating capacity*. Theriogenology, 2005. **64**(8): p. 1844-51.
87. Pommer, A.C., J. Rutllant, and S.A. Meyers, *The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function*. Theriogenology, 2002. **58**(7): p. 1373-84.
88. Meyers, S.A., *Spermatozoal response to osmotic stress*. Anim Reprod Sci, 2005. **89**(1-4): p. 57-64.
89. Mazur, P., *Cryobiology: the freezing of biological systems*. Science, 1970. **168**(3934): p. 939-49.
90. Pena, F.J., et al., *Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols?* Theriogenology, 2011. **76**(7): p. 1177-86.
91. Garcia, B.M., et al., *The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway*. J Androl, 2012. **33**(1): p. 105-13.
92. Rutllant, J., A.C. Pommer, and S.A. Meyers, *Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (Macaca mulatta) spermatozoa*. J Androl, 2003. **24**(4): p. 534-41.
93. Guthrie, H.D., J. Liu, and J.K. Critser, *Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa*. Biol Reprod, 2002. **67**(6): p. 1811-6.
94. Garcia, B.M., et al., *Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation*. Reprod Domest Anim, 2011. **46**(1): p. 141-8.
95. Barbas, J.P. and R.D. Mascarenhas, *Cryopreservation of domestic animal sperm cells*. Cell Tissue Bank, 2009. **10**(1): p. 49-62.
96. Pegg, D.E., *The history and principles of cryopreservation*. Semin Reprod Med, 2002. **20**(1): p. 5-13.
97. Mazur, P., *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. Am J Physiol, 1984. **247**(3 Pt 1): p. C125-42.
98. Burnaugh, L., et al., *Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses*. Anim Reprod Sci, 2010. **117**(3-4): p. 249-60.
99. Lambert, I.H., S.F. Pedersen, and K.A. Poulsen, *Activation of PLA2 isoforms by cell swelling and ischaemia/hypoxia*. Acta Physiol (Oxf), 2006. **187**(1-2): p. 75-85.
100. Tapia, J.A. and F.J. Peña, *Apoptotic Events in Male Germ Cells and in Mature Mammalian Spermatozoa*. Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress an Intracellular Ca²⁺ Homeostasis, 2009: p. 165-199.
101. Pareek, T.K., et al., *Insights into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists*. Apoptosis, 2007. **12**(6): p. 1085-100.
102. Franca, L.R., G.F. Avelar, and F.F. Almeida, *Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs*. Theriogenology, 2005. **63**(2): p. 300-18.
103. Heninger, N.L., et al., *Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions*. Theriogenology, 2004. **62**(1-2): p. 283-97.
104. Embree-Ku, M., D. Venturini, and K. Boekelheide, *Fas is involved in the p53-dependent apoptotic response to ionizing radiation in mouse testis*. Biol Reprod, 2002. **66**(5): p. 1456-61.
105. Jahnukainen, K., et al., *Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis*. Biol Reprod, 2004. **70**(2): p. 290-6.

106. Tirado, O.M., et al., *Increased expression of estrogen receptor beta in pachytene spermatocytes after short-term methoxyacetic acid administration*. J Androl, 2004. **25**(1): p. 84-94.
107. Sofikitis, N., et al., *Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(3): p. 229-59.
108. Sakkas, D., G.C. Manicardi, and D. Bizzaro, *Sperm nuclear DNA damage in the human*. Adv Exp Med Biol, 2003. **518**: p. 73-84.
109. Sakkas, D., E. Mariethoz, and J.C. St John, *Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway*. Exp Cell Res, 1999. **251**(2): p. 350-5.
110. Brum, A.M., K. Sabeur, and B.A. Ball, *Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation*. Theriogenology, 2008. **69**(9): p. 1041-55.
111. Said, T.M., et al., *Role of caspases in male infertility*. Hum Reprod Update, 2004. **10**(1): p. 39-51.
112. Bejarano, I., et al., *Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone*. Fertil Steril, 2008. **90**(4 Suppl): p. 1340-7.
113. Aquila, S., et al., *Human sperm express a functional androgen receptor: effects on PI3K/AKT pathway*. Hum Reprod, 2007. **22**(10): p. 2594-605.
114. Shaman, J.A., R. Prisztoka, and W.S. Ward, *Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner*. Biol Reprod, 2006. **75**(5): p. 741-8.
115. Choi, Y.J., et al., *Cytochrome c upregulation during capacitation and spontaneous acrosome reaction determines the fate of pig sperm cells: linking proteome analysis*. J Reprod Dev, 2008. **54**(1): p. 68-83.
116. Aziz, N., et al., *The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index*. Hum Reprod, 2007. **22**(5): p. 1413-9.
117. Mathews, V.H., & Ahern, *Bioquímica 3ª* 2002.
118. Aparicio, I.M., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase modifies boar sperm motion parameters*. Reproduction, 2005. **129**(3): p. 283-9.
119. Almog, T., et al., *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, 2008. **283**(21): p. 14479-89.
120. Lu, Q., et al., *Expression and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases during spermatogenesis and epididymal sperm maturation in mice*. Arch Androl, 1999. **43**(1): p. 55-66.
121. Buck, J., et al., *Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 79-84.
122. Wuttke, M.S., J. Buck, and L.R. Levin, *Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase*. JOP, 2001. **2**(4 Suppl): p. 154-8.
123. Baxendale, R.W. and L.R. Fraser, *Evidence for multiple distinctly localized adenylyl cyclase isoforms in mammalian spermatozoa*. Mol Reprod Dev, 2003. **66**(2): p. 181-9.
124. Fimia, G.M. and P. Sassone-Corsi, *Cyclic AMP signalling*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 11): p. 1971-2.
125. Holt, W.V. and R.A. Harrison, *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, 2002. **23**(4): p. 557-65.

Bibliografia

126. Bardelli, A., et al., *Gab1 coupling to the HGF/Met receptor multifunctional docking site requires binding of Grb2 and correlates with the transforming potential*. *Oncogene*, 1997. **15**(25): p. 3103-11.
127. Warzecha, Z., et al., *Hepatocyte growth factor attenuates pancreatic damage in caerulein-induced pancreatitis in rats*. *Eur J Pharmacol*, 2001. **430**(1): p. 113-21.
128. Carrera, A.C., et al., *Tyrosine kinase specific motif at subdomain VIII does not confer specificity for tyrosine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **205**(2): p. 1114-20.
129. Vijayaraghavan, S., et al., *Isolation and molecular characterization of AKAP110, a novel, sperm-specific protein kinase A-anchoring protein*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(5): p. 705-17.
130. Lin, R.Y., S.B. Moss, and C.S. Rubin, *Characterization of S-AKAP84, a novel developmentally regulated A kinase anchor protein of male germ cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(46): p. 27804-11.
131. Reinton, N., et al., *Localization of a novel human A-kinase-anchoring protein, hAKAP220, during spermatogenesis*. *Dev Biol*, 2000. **223**(1): p. 194-204.
132. Baldi, E., et al., *Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction*. *Front Biosci*, 2000. **5**: p. E110-23.
133. Luconi, M., et al., *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*, 2005. **72**(1): p. 22-32.
134. Tardif, S., et al., *Implication of cAMP during porcine sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation*. *Mol Reprod Dev*, 2004. **69**(4): p. 428-35.
135. Flesch, F.M., et al., *Capacitation dependent activation of tyrosine phosphorylation generates two sperm head plasma membrane proteins with high primary binding affinity for the zona pellucida*. *Mol Reprod Dev*, 2001. **60**(1): p. 107-15.
136. Visconti, P.E., et al., *Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway*. *Development*, 1995. **121**(4): p. 1139-50.
137. Leclerc, P., E. de Lamirande, and C. Gagnon, *Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **22**(4): p. 643-56.
138. Luconi, M., et al., *Extracellular signal-regulated kinases modulate capacitation of human spermatozoa*. *Biol Reprod*, 1998. **58**(6): p. 1476-89.
139. Pommer, A.C., J. Rutllant, and S.A. Meyers, *Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions*. *Biol Reprod*, 2003. **68**(4): p. 1208-14.
140. Harayama, H., K. Sasaki, and M. Miyake, *A unique mechanism for cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-induced increase of 32-kDa tyrosine-phosphorylated protein in boar spermatozoa*. *Mol Reprod Dev*, 2004. **69**(2): p. 194-204.
141. Kalab, P., et al., *Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway*. *Mol Reprod Dev*, 1998. **51**(3): p. 304-14.
142. Parinaud, J. and P. Milhet, *Progesterone induces Ca⁺⁺-dependent 3',5'-cyclic adenosine monophosphate increase in human sperm*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996. **81**(4): p. 1357-60.
143. De Jonge, C.J., et al., *Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylylase/cyclic AMP second-messenger pathway*. *J Exp Zool*, 1991. **258**(1): p. 113-25.
144. Mrsny, R.J. and S. Meizel, *Evidence suggesting a role for cyclic nucleotides in acrosome reactions of hamster sperm in vitro*. *J Exp Zool*, 1980. **211**(2): p. 153-7.

145. Holz, G.G., et al., *Cell physiology of cAMP sensor Epac*. J Physiol, 2006. **577**(Pt 1): p. 5-15.
146. Tang, C.M. and P.A. Insel, *GPCR expression in the heart; "new" receptors in myocytes and fibroblasts*. Trends Cardiovasc Med, 2004. **14**(3): p. 94-9.
147. Branham, M.T., et al., *Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 24825-39.
148. Miro-Moran, A., et al., *Identification and function of exchange proteins activated directly by cyclic AMP (Epac) in mammalian spermatozoa*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37713.
149. Newton, A.C., *Protein kinase C: structure, function, and regulation*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28495-8.
150. Blobe, G.C., et al., *Protein kinase C isoenzymes: regulation and function*. Cancer Surv, 1996. **27**: p. 213-48.
151. Harayama, H. and M. Miyake, *A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase C activation is involved in the hyperactivation of boar spermatozoa*. Mol Reprod Dev, 2006. **73**(9): p. 1169-78.
152. Nishitani, J., et al., *Recruitment of the retinoblastoma protein to c-Jun enhances transcription activity mediated through the AP-1 binding site*. J Biol Chem, 1999. **274**(9): p. 5454-61.
153. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases*. Cell, 2000. **103**(2): p. 239-52.
154. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 37-40.
155. Smith, A., et al., *A role for JNK/SAPK in proliferation, but not apoptosis, of IL-3-dependent cells*. Curr Biol, 1997. **7**(11): p. 893-6.
156. Chen, Y.R., et al., *The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation*. J Biol Chem, 1996. **271**(50): p. 31929-36.
157. Camps, M., A. Nichols, and S. Arkininstall, *Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function*. FASEB J, 2000. **14**(1): p. 6-16.
158. Almog, T. and Z. Naor, *Mitogen activated protein kinases (MAPKs) as regulators of spermatogenesis and spermatozoa functions*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **282**(1-2): p. 39-44.
159. Crepieux, P., et al., *The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation*. Oncogene, 2001. **20**(34): p. 4696-709.
160. Nagao, Y., *Definitive expression of c-mos in late meiotic prophase leads to phosphorylation of a 34 kda protein in cultured rat spermatocytes*. Cell Biol Int, 2002. **26**(2): p. 193-201.
161. Ferrara, D., et al., *Testicular activity of Mos in the frog, Rana esculenta: a new role in spermatogonial proliferation*. Biol Reprod, 2004. **70**(6): p. 1782-9.
162. Sette, C.e.a., *Activation of the mitogen-activated protein kinases ERK1 during meiotic progression of mouse pachytene spermatocytes*. J. Biol. Chem., 1999. **274**: p. 33571-33579.
163. Ashizawa, K., et al., *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, 2006. **131**(6): p. 1017-24.
164. Chuderland, D. and R. Seger, *Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase*. Mol Biotechnol, 2005. **29**(1): p. 57-74.
165. Morte, C., A. Iborra, and P. Martinez, *Phosphorylation of Shc proteins in human sperm in response to capacitation and progesterone treatment*. Mol Reprod Dev, 1998. **50**(1): p. 113-20.

Bibliografia

166. Naz, R.K., K. Ahmad, and P. Kaplan, *Expression and function of ras proto-oncogene proteins in human sperm cells*. J Cell Sci, 1992. **102 (Pt 3)**: p. 487-94.
167. Gupta, S., et al., *Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors*. EMBO J, 1996. **15(11)**: p. 2760-70.
168. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*. Physiol Rev, 2001. **81(2)**: p. 807-69.
169. Tournier, C., et al., *The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases*. Mol Cell Biol, 1999. **19(2)**: p. 1569-81.
170. Lawler, S., et al., *Synergistic activation of SAPK1/JNK1 by two MAP kinase kinases in vitro*. Curr Biol, 1998. **8(25)**: p. 1387-90.
171. Gallo, K.A. and G.L. Johnson, *Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3(9)**: p. 663-72.
172. Yan, M., et al., *Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1*. Nature, 1994. **372(6508)**: p. 798-800.
173. Baud, V., et al., *Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain*. Genes Dev, 1999. **13(10)**: p. 1297-308.
174. Rouse, J., et al., *A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins*. Cell, 1994. **78(6)**: p. 1027-37.
175. Minamino, T., et al., *MEKK1 suppresses oxidative stress-induced apoptosis of embryonic stem cell-derived cardiac myocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96(26)**: p. 15127-32.
176. Fanger, G.R., N.L. Johnson, and G.L. Johnson, *MEK kinases are regulated by EGF and selectively interact with Rac/Cdc42*. EMBO J, 1997. **16(16)**: p. 4961-72.
177. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12(1)**: p. 14-21.
178. Takekawa, M., F. Posas, and H. Saito, *A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways*. EMBO J, 1997. **16(16)**: p. 4973-82.
179. Moriguchi, T., et al., *A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3*. J Biol Chem, 1996. **271(23)**: p. 13675-9.
180. Wang, X.S., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase*. J Biol Chem, 1996. **271(49)**: p. 31607-11.
181. Cowan, K.J. and K.B. Storey, *Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress*. J Exp Biol, 2003. **206(Pt 7)**: p. 1107-15.
182. Willoughby, E.A., et al., *The JNK-interacting protein-1 scaffold protein targets MAPK phosphatase-7 to dephosphorylate JNK*. J Biol Chem, 2003. **278(12)**: p. 10731-6.
183. Pawson, T., *Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems*. Cell, 2004. **116(2)**: p. 191-203.
184. Johnson, G.L., H.G. Dohlman, and L.M. Graves, *MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression*. Curr Opin Chem Biol, 2005. **9(3)**: p. 325-31.
185. Dickens, M., et al., *A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway*. Science, 1997. **277(5326)**: p. 693-6.
186. Kelkar, N., et al., *Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3*. Mol Cell Biol, 2000. **20(3)**: p. 1030-43.

187. Ito, M., et al., *JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7539-48.
188. Jagadish, N., et al., *Sperm associated antigen 9 (SPAG9): a new member of c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) interacting protein exclusively expressed in testis*. Keio J Med, 2005. **54**(2): p. 66-71.
189. Bennett, B.L., et al., *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13681-6.
190. Carboni, S., et al., *AS601245 (1,3-benzothiazol-2-yl (2-[[2-(3-pyridinyl) ethyl] amino]-4 pyrimidinyl) acetonitrile): a c-Jun NH2-terminal protein kinase inhibitor with neuroprotective properties*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(1): p. 25-32.
191. Szczepankiewicz, B.G., et al., *Aminopyridine-based c-Jun N-terminal kinase inhibitors with cellular activity and minimal cross-kinase activity*. J Med Chem, 2006. **49**(12): p. 3563-80.
192. Bain, J., et al., *The specificities of protein kinase inhibitors: an update*. Biochem J, 2003. **371**(Pt 1): p. 199-204.
193. Bain, J., et al., *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. Biochem J, 2007. **408**(3): p. 297-315.
194. Stebbins, J.L., et al., *Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(43): p. 16809-13.
195. Whitmarsh, A.J. and R.J. Davis, *Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(12): p. 481-5.
196. Yasuda, J., et al., *The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7245-54.
197. Dunn, C., et al., *Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor*. Cell Signal, 2002. **14**(7): p. 585-93.
198. Ubeda, M., M. Vallejo, and J.F. Habener, *CHOP enhancement of gene transcription by interactions with Jun/Fos AP-1 complex proteins*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7589-99.
199. Itoh, M., et al., *Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(10): p. 2382-92.
200. Aplin, A.E., et al., *Cell adhesion differentially regulates the nucleocytoplasmic distribution of active MAP kinases*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 13): p. 2781-90.
201. Donovan, N., et al., *JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40944-9.
202. Deng, X., et al., *Novel role for JNK as a stress-activated Bcl2 kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23681-8.
203. Kuan, C.Y., et al., *The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development*. Neuron, 1999. **22**(4): p. 667-76.
204. Ip, Y.T. and R.J. Davis, *Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 205-19.
205. Potapova, O., et al., *Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(5): p. 1713-22.
206. Yu, C., et al., *JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD*. Mol Cell, 2004. **13**(3): p. 329-40.

Bibliografía

207. Miller, W.E., et al., *Identification of a motif in the carboxyl terminus of beta -arrestin2 responsible for activation of JNK3*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 27770-7.
208. McDonald, P.H., et al., *Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3*. Science, 2000. **290**(5496): p. 1574-7.
209. McPartlin, L.A., et al., *A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis*. Theriogenology, 2008. **69**(5): p. 639-50.
210. Renart, J., J. Reiser, and G.R. Stark, *Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(7): p. 3116-20.
211. Burnette, W.N., *"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, 1981. **112**(2): p. 195-203.
212. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
213. Tiselius, A., *Electrophoresis of Purified Antibody Preparations*. J Exp Med, 1937. **65**(5): p. 641-6.
214. Raymond, S. and L. Weintraub, *Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis*. Science, 1959. **130**(3377): p. 711.
215. Ortega Ferrusola, C., et al., *Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces "apoptosis like" changes during cryopreservation of stallion spermatozoa*. Theriogenology, 2010. **74**(3): p. 458-65.
216. Ortega Ferrusola, C., et al., *Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa*. Biol Reprod, 2009. **81**(6): p. 1106-11.
217. Boyde, A., et al., *Basis of the structure and development of mammalian enamel as seen by scanning electron microscopy*. Scanning Microsc, 1988. **2**(3): p. 1479-90.
218. Morrell, J.M., et al., *Processing stored stallion semen doses by Single Layer Centrifugation*. Theriogenology, 2011. **76**(8): p. 1424-32.
219. Lin, K.L., et al., *Antimetastatic potential of cardiotoxin III involves inactivation of PI3K/Akt and p38 MAPK signaling pathways in human breast cancer MDA-MB-231 cells*. Life Sci, 2012. **90**(1-2): p. 54-65.
220. Ren, B., et al., *A double hit to kill tumor and endothelial cells by TRAIL and antiangiogenic 3TSR*. Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3856-65.
221. Levin-Salomon, V., et al., *When expressed in yeast, mammalian mitogen-activated protein kinases lose proper regulation and become spontaneously phosphorylated*. Biochem J, 2009. **417**(1): p. 331-40.
222. Rivas, M.A., et al., *Transactivation of ErbB-2 induced by tumor necrosis factor alpha promotes NF-kappaB activation and breast cancer cell proliferation*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(1): p. 111-24.
223. Barr, R.K. and M.A. Bogoyevitch, *The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs)*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(11): p. 1047-63.
224. Derijard, B., et al., *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain*. Cell, 1994. **76**(6): p. 1025-37.
225. Cuadrado, A., et al., *JNK activation is critical for Aplidin-induced apoptosis*. Oncogene, 2004. **23**(27): p. 4673-80.

226. Lo, Y.Y., J.M. Wong, and T.F. Cruz, *Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15703-7.
227. Aoki, H., et al., *Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10244-50.
228. Minden, A., et al., *c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6683-8.
229. Gadella, B.M. and R.A. Van Gestel, *Bicarbonate and its role in mammalian sperm function*. Anim Reprod Sci, 2004. **82-83**: p. 307-19.
230. Harrison, R.A. and B.M. Gadella, *Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation*. Theriogenology, 2005. **63**(2): p. 342-51.
231. Murray, A.J., *Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems*. Sci Signal, 2008. **1**(22): p. re4.
232. Branham, M.T., L.S. Mayorga, and C.N. Tomes, *Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway*. J Biol Chem, 2006. **281**(13): p. 8656-66.
233. Amano, R., et al., *Evidence for existence of cAMP-Epac signaling in the heads of mouse epididymal spermatozoa*. J Reprod Dev, 2007. **53**(1): p. 127-33.
234. Posthumadeboer, J., et al., *Targeting JNK-interacting-protein-1 (JIP1) sensitises osteosarcoma to doxorubicin*. Oncotarget, 2012. **3**(10): p. 1169-81.
235. Strittmatter, F., et al., *Inhibition of adrenergic human prostate smooth muscle contraction by the inhibitors of c-Jun N-terminal kinase, SP600125 and BI-78D3*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(6): p. 1926-35.
236. Nunez-Martinez, I., J.M. Moran, and F.J. Pena, *Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm*. Int J Androl, 2007. **30**(3): p. 182-9.
237. Sokolowska, A., et al., *Activated caspases are present in frozen-thawed canine sperm and may be related to post thaw sperm quality*. Zygote, 2009. **17**(4): p. 297-305.
238. Drobnis, E.Z., et al., *Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model*. J Exp Zool, 1993. **265**(4): p. 432-7.
239. Kim, W.H., et al., *Synergistic activation of JNK/SAPK induced by TNF-alpha and IFN-gamma: apoptosis of pancreatic beta-cells via the p53 and ROS pathway*. Cell Signal, 2005. **17**(12): p. 1516-32.
240. Gallardo Bolanos, J.M., et al., *Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30688.
241. Macias Garcia, B., et al., *Single-layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm subpopulation structure of frozen-thawed stallion spermatozoa*. Reprod Domest Anim, 2009. **44**(3): p. 523-6.
242. Aurich, J.E., et al., *Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen*. Theriogenology, 1997. **48**(2): p. 185-92.
243. Pena, A. and C. Linde-Forsberg, *Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa*. Theriogenology, 2000. **54**(6): p. 859-75.
244. Maxwell, W.M. and T. Stojanov, *Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants*. Reprod Fertil Dev, 1996. **8**(6): p. 1013-20.
245. Macias Garcia, B., et al., *Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen*. Anim Reprod Sci, 2009. **114**(1-3): p. 193-202.

Bibliografía

246. Ortega-Ferrusola, C., et al., *Identification of sperm subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics*. *Reprod Domest Anim*, 2009. **44**(3): p. 419-23.
247. Rodriguez, A.M., et al., *Freezing stallion semen with the new Caceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability*. *Anim Reprod Sci*, 2011. **127**(1-2): p. 78-83.
248. Pasupathi P., S.G., Farook J., *Oxidative stress biomarkers and antioxidant status in cigarette smokers compared to nonsmokers*. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*, 2009. **1**: p. 55-62.
249. Gornig, V.M. and C. Schirren, [*Effect of exogenous toxins on fertility*]. *Fortschr Med*, 1996. **114**(14): p. 169-71.
250. Zenzes, M.T., R. Bielecki, and T.E. Reed, *Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke*. *Fertil Steril*, 1999. **72**(2): p. 330-5.
251. Fraga, C.G., et al., *Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA*. *Mutat Res*, 1996. **351**(2): p. 199-203.
252. Hossain, A., et al., *Spontaneously developed tail swellings (SDTS) influence the accuracy of the hypo-osmotic swelling test (HOS-test) in determining membrane integrity and viability of human spermatozoa*. *J Assist Reprod Genet*, 2010. **27**(2-3): p. 83-6.
253. Breitbart, H. and Z. Naor, *Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction*. *Rev Reprod*, 1999. **4**(3): p. 151-9.
254. Xie, X., et al., *Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis*. *Structure*, 1998. **6**(8): p. 983-91.
255. Almog, T. and Z. Naor, *The role of Mitogen activated protein kinase (MAPK) in sperm functions*. *Mol Cell Endocrinol*, 2010. **314**(2): p. 239-43.
256. Naz, R.K. and S.C. Chauhan, *Human sperm-specific peptide vaccine that causes long-term reversible contraception*. *Biol Reprod*, 2002. **67**(2): p. 674-80.
257. Naz, R.K., *Molecular and immunological characteristics of sperm antigens involved in egg binding*. *J Reprod Immunol*, 2002. **53**(1-2): p. 13-23.
258. de Lamirande, E. and C. Gagnon, *The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion*. *Mol Hum Reprod*, 2002. **8**(2): p. 124-35.
259. de Lamirande, E. and C. O'Flaherty, *Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1784**(1): p. 106-15.
260. de Lamirande, E. and C. Gagnon, *Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa*. *Free Radic Biol Med*, 1995. **18**(3): p. 487-95.
261. Morrison, D.K., *KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway?* *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 9): p. 1609-12.
262. Jagadish, N., et al., *Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein*. *Biochem J*, 2005. **389**(Pt 1): p. 73-82.
263. Nadruz, W., Jr., et al., *c-Jun is regulated by combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(2): p. H760-7.
264. Alonso, A., et al., *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. *Cell*, 2004. **117**(6): p. 699-711.
265. Gonzalez-Fernandez, L., et al., *Identification of protein tyrosine phosphatases and dual-specificity phosphatases in mammalian spermatozoa and their role in sperm motility and protein tyrosine phosphorylation*. *Biol Reprod*, 2009. **80**(6): p. 1239-52.
266. Das, M., et al., *Suppression of p53-dependent senescence by the JNK signal transduction pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(40): p. 15759-64.

267. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 153-83.
268. Fosbrink, M., et al., *Visualization of JNK activity dynamics with a genetically encoded fluorescent biosensor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(12): p. 5459-64.
269. Matsuzawa, A., et al., *Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice*. *Antioxid Redox Signal*, 2002. **4**(3): p. 415-25.
270. Nishitoh, H., et al., *ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats*. *Genes Dev*, 2002. **16**(11): p. 1345-55.
271. Adler, V., et al., *Regulation of JNK signaling by GSTp*. *EMBO J*, 1999. **18**(5): p. 1321-34.
272. Iles, K.E. and H.J. Forman, *Macrophage signaling and respiratory burst*. *Immunol Res*, 2002. **26**(1-3): p. 95-105.
273. Wilmer, W.A., et al., *Interleukin-1beta induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10877-81.
274. Torres, E.R., et al., *Effect of ultraviolet C irradiation on human sperm motility and lipid peroxidation*. *Int J Radiat Biol*, 2010. **86**(3): p. 187-93.
275. Fraser, L., K. Gorszczaruk, and J. Strzezek, *Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality*. *Reprod Domest Anim*, 2001. **36**(6): p. 325-9.
276. Rivlin, J., et al., *Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction*. *Biol Reprod*, 2004. **70**(2): p. 518-22.
277. Garde, J. and E.R. Roldan, *Stimulation of Ca(2+)-dependent exocytosis of the sperm acrosome by cAMP acting downstream of phospholipase A2*. *J Reprod Fertil*, 2000. **118**(1): p. 57-68.
278. Carrasquel, G., et al., *Effect of Tumor Necrosis Factor-alpha on the Intracellular Ca Homeostasis in Human Sperm*. *Am J Reprod Immunol*, 2013.
279. Boivin, B., M. Yang, and N.K. Tonks, *Targeting the reversibly oxidized protein tyrosine phosphatase superfamily*. *Sci Signal*, 2010. **3**(137): p. p12.
280. Tonks, N.K., *Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling*. *Cell*, 2005. **121**(5): p. 667-70.
281. Aitken, R.J., K.T. Jones, and S.A. Robertson, *Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health*. *J Androl*, 2012. **33**(6): p. 1096-106.
282. Bogoyevitch, M.A. and P.G. Arthur, *Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JuNK no more?* *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1784**(1): p. 76-93.
283. Norberg, E., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **396**(1): p. 95-100.
284. Fang, Y., et al., *Modulation of apoptosis: new opportunities for drug discovery to treat autoimmune thyroiditis*. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2010. **4**(3): p. 255-60.
285. Gonzalez, F. and A. Ashkenazi, *New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL*. *Oncogene*, 2010. **29**(34): p. 4752-65.
286. Green, D.R., et al., *The pathophysiology of mitochondrial cell death*
The Fas signaling pathway: more than a paradigm
TNF-R1 signaling: a beautiful pathway
Mitochondria and apoptosis. *Science*, 2004. **305**(5684): p. 626-9.
287. Tapia, J.A. and F.J. Peña, *Apoptotic Events in Male Germ Cells and in Mature Mammalian Spermatozoa*, in *Apoptosis: Involvement of Oxidative Stress an*

Bibliografia

- Intracellular Ca²⁺ Homeostasis*, G.R. Salido, J.A., Editor. 2009, Springer. p. 165-199.
288. Tournier, C., et al., *Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway*. *Science*, 2000. **288**(5467): p. 870-4.
289. Taha, E.A., et al., *Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men*. *Urology*, 2012. **80**(4): p. 822-5.
290. Davar, R., L. Sekhavat, and N. Naserzadeh, *Semen parameters of non-infertile smoker and non-smoker men*. *J Med Life*, 2012. **5**(4): p. 465-8.
291. Mostafa, T., *Cigarette smoking and male infertility*. *J Adv Res*, 2010. **1**: p. 7.
292. Chen, Y.R. and T.H. Tan, *The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review)*. *Int J Oncol*, 2000. **16**(4): p. 651-62.
293. Fan, M., et al., *Modulation of mitogen-activated protein kinases and phosphorylation of Bcl-2 by vinblastine represent persistent forms of normal fluctuations at G2-M1*. *Cancer Res*, 2000. **60**(22): p. 6403-7.
294. Kim, B.J., S.W. Ryu, and B.J. Song, *JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(30): p. 21256-65.
295. Tsuruta, F., et al., *JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins*. *EMBO J*, 2004. **23**(8): p. 1889-99.
296. Xia, Z., et al., *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis*. *Science*, 1995. **270**(5240): p. 1326-31.
297. Reinhard, C., et al., *Tumor necrosis factor alpha-induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2*. *EMBO J*, 1997. **16**(5): p. 1080-92.
298. Bogoyevitch, M.A. and B. Kobe, *Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006. **70**(4): p. 1061-95.
299. Schroeter, H., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis*. *Biochem J*, 2003. **372**(Pt 2): p. 359-69.
300. Eminel, S., et al., *JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(53): p. 55385-92.
301. Zhou, Q., et al., *c-Jun N-terminal kinase regulates mitochondrial bioenergetics by modulating pyruvate dehydrogenase activity in primary cortical neurons*. *J Neurochem*, 2008. **104**(2): p. 325-35.
302. Zhou, Q., et al., *Activation of c-Jun-N-terminal kinase and decline of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity during brain aging*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(7): p. 1132-40.
303. Ashizawa, K., et al., *The addition of mitogen-activated protein kinase and p34cdc2 kinase substrate peptides inhibits the flagellar motility of demembrated fowl spermatozoa*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **240**(1): p. 116-21.
304. Weidinger, S., et al., *Tryptase inhibits motility of human spermatozoa mainly by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway*. *Hum Reprod*, 2005. **20**(2): p. 456-61.
305. Xia, Y. and M. Karin, *The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases*. *Trends Cell Biol*, 2004. **14**(2): p. 94-101.
306. Ford, W.C., *Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round?* *Hum Reprod Update*, 2006. **12**(3): p. 269-74.