

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE MEDICINA



SECRETARIA DE INVESTIGACION
COORDINACION GENERAL DE POSGRADO

“Evaluación de la participación de las cinasas Cdk5, CKII, PKB y las fosfatasas PP1 y PP2A en la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar”

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN MEDICINA MOLECULAR

Q U E P R E S E N T A:

Biol. José Daniel Angeles Salazar

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez
Instituto de Biotecnología-UNAM

Cuernavaca, Morelos, México marzo de 2024

Cuernavaca, Morelos, México a 5 de marzo de 2024

Miembros del comité tutorial:

Dr. Juan José Acevedo Fernández
Facultad de Medicina-UAEM

Dra. Gabriela Castañeda Corral
Facultad de Medicina-UAEM

Dr. Luis Alberto Cañedo Dorantes
Facultad de Medicina-UAEM

M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara
Instituto de Biotecnología-UNAM

Miembros del jurado del examen:

Dr. Juan José Acevedo Fernández
Facultad de Medicina-UAEM

Dr. Luis Alberto Cañedo Dorantes
Facultad de Medicina-UAEM

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz
Facultad de Medicina-UAEM

M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara
Instituto de Biotecnología-UNAM

Agradecimiento a fuentes de Financiamiento:

Este proyecto fue llevado a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y financiado por PAPIIT-UNAM IN205722 a TN e IN215519 e IN209922 de CB. Ángeles-Salazar, J.D (No. de CVU 1037742), obtuvo una Beca de Maestría del CONAHCyT.

Agradecimientos:

A mi directora de tesis la Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez, a quien agradezco, respeto y admiro por sus conocimientos, la paciencia y la devoción a su trabajo que siempre la caracterizo desde que la conocí. Por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y guiarme académicamente, pese a los percances presentados, siempre me mostro la mejor forma de hacer las cosas.

A los miembros del comité: Dr. Juan José Acevedo Fernández, Dra. Gabriela Castañeda Corral, Dr. Luis Alberto Cañedo Dorantes a quienes agradezco y la M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara, por todo su apoyo, observaciones y disposición durante el desarrollo de este proyecto, y como parte de mi jurado de tesis.

A los Drs. Takuya Nishigaki y Alberto Darszon Israel quienes me dieron la oportunidad de pertenecer al grupo de investigación. Gracias por su apoyo y disponibilidad.

A la M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara, el Biol. José Luis de la Vega Beltrán y Paulina Torres Rodríguez por su disponibilidad y el apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto.

Al M.C. Andrés Saraleguí, quien es técnico del Laboratorio Nacional de Microscopia (LNMA) por su apoyo en el uso del microscopio confocal.

Al Sr. Antonio blancas por el cuidado de los acuarios para los erizos.

A los integrantes de la Unidad de Computo del Instituto de Biotecnología. Arturo Ocadiz Ramírez, Juan Manuel Hurtado Ramírez, Servando Aguirre Cruz, Roberto Pablo Rodríguez Bahena y David Santiago Castañeda Carreón

A mis compañeros de laboratorio; principalmente al Ing. Hiram Pacheco Castillo, a la M. C. Erika Zagal Huerta y al Biol. Fernando Aranda Lozano por aclarar mis dudas y brindarme su amistad.

A la Facultad de Medicina por permitirme ser parte de la institución y darme los conocimientos fundamentales para mi desarrollo como estudiante, así como a su planta de docentes por las clases recibidas.

A mi mama Leonor Salazar Jayer, a mi hermana Mariela Angeles Salazar, a mi papa Jose Santos Angeles Chimal y a mi primo Emanuel Salazar Venegas quienes son mi familia y sin quienes nada de esto sería posible. A mis amigos Javier Rodríguez Hernández, Dania Brito Beltrán, Carlos Alberto Orta y Clara Itzel Gómez Guerrero.

ÍNDICE

Abreviaturas	vi
RESUMEN	7
INTRODUCCION	8
Fecundación	8
Los espermatozoides de erizo de mar	8
La motilidad del espermatozoide	10
-La motilidad del espermatozoide de erizo de mar	11
La fosforilación de proteínas	12
-Las proteínas cinasas en el espermatozoide	13
-Las proteínas fosfatasa en el espermatozoide	15
-Las proteínas cinasas y fosfatasa en el espermatozoide de erizo de mar	15
Proteínas de la cascada de señalización disparada por el Speract	17
ANTECEDENTES	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y METODOS	22
Reactivos	22
Obtención de espermatozoides	24
Solubilización de espermatozoides de erizo de mar (eem)	24
Aislamiento de membranas plasmáticas de eem	24
Separación de cabezas y flagelos	24
Aislamiento de membranas plasmáticas de flagelos de eem	25
-Aislamiento de membranas plasmáticas de cabezas de eem	25
Dot Blot y Western Blot	26
Inmunofluorescencia	27
Evaluación de la motilidad de los espermatozoides	28
Protocolo de captura de imágenes y análisis de trayectorias de espermatozoides de erizo de mar	28
Análisis estadístico de las trayectorias de los eem	29
RESULTADOS	30
Cdk5 se encuentra en los flagelos de eem	30
CKII está en flagelos de eem y participa en la motilidad basal	33

PKB se localiza en flagelos de eem pero no participa en la motilidad.....	38
PP1 está en flagelos de eem pero no participa en la motilidad basal.....	42
PP2A está en eem y se localiza en cabeza y flagelo, pero no participa en la motilidad basal	46
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

Figuras:

Figura 1. Esquema del espermatozoide de erizo de mar (eem).	10
Figura 2. Nado basal del eem.....	12
Figura 3. Cdk5 está en eem de <i>L. pictus</i> y de <i>S. purpuratus</i>	30
Figura 4. Cdk5 se inmunolocaliza en la mitocondria y en el flagelo de los eem de <i>L. pictus</i>	31
Figura 5. Cdk5 participa en la velocidad basal de los eem de <i>L. pictus</i>	32
Figura 6. Cdk5 participa en la motilidad de los eem de <i>L. pictus</i>	33
Figura 7. CKII está eem de <i>L. pictus</i> y de <i>S. purpuratus</i>	34
Figura 8. CKII está en los flagelos de los eem de <i>L. pictus</i> y de <i>S. purpuratus</i>	35
Figura 9. CKII se inmunolocaliza en el flagelo, acrosoma y mitocondria de los eem de <i>L. pictus</i>	36
Figura 10. CKII participa en la velocidad basal de los eem de <i>L. pictus</i>	37
Figura 11. CKII participa en la motilidad de los eem de <i>L. pictus</i>	38
Figura 12. PKB está en eem de <i>L. pictus</i> y de <i>S. purpuratus</i>	39
Figura 13. PKB se inmunolocaliza en el flagelo y mitocondria de los eem de <i>L. pictus</i>	40
Figura 14. PKB no participa en la velocidad basal de los eem de <i>L. pictus</i>	41
Figura 15. PKB no participa en la motilidad de los eem de <i>L. pictus</i>	42
Figura 16. PP1 está en eem de <i>S. purpuratus</i>	43
Figura 17. PP1 se inmunolocaliza en el flagelo y mitocondria de los eem de <i>L. pictus</i>	44
Figura 18. PP1 no participa en la velocidad basal de los eem de <i>L. pictus</i>	45
Figura 19. PP1 no participa en la motilidad de los eem de <i>L. pictus</i>	46
Figura 20. PP2A está en eem de <i>L. pictus</i> y de <i>S. purpuratus</i>	47
Figura 21. PP2A está en flagelos y de <i>S. purpuratus</i>	47
Figura 22. PP2A se inmunolocaliza en el flagelo y mitocondria de los eem de <i>L. pictus</i>	48
Figura 23. PP2A no participa en la velocidad basal de los eem de <i>L. pictus</i>	49

Figura 24. PP2A no participa en la motilidad de los eem de *L. pictus*..... 50

Tablas:

Tabla 1. Sitios predichos de fosforilación por PKA, PKC, y CKII en Isoformas de PKC..... 17

Tabla 2. Sitios predichos de fosforilación por PKA, PKC, PKB, Cdk5 y CKII en proteínas que participan en la casada de señalización del Speract..... 19

Tabla 3. Inhibidores de las cinasas CKII y PKB y de las fosfatasas PP1 y PP2A 23

Tabla 4. Características de anticuerpos empleados 23

Tabla 5. Porcentaje de identidad de epítomos de anticuerpos generados contra las diferentes enzimas de humano, y las secuencias correspondientes en genomas de *S. purpuratus* y *L.pictus* 23

Abreviaturas

ACm, adenilil ciclasa transmembranal.

AMA, agua de mar artificial.

AMA1Ca, agua de mar artificial con 1 mM calcio y pH 7.

AMPc, adenosina monofosfato cíclico.

AO, Ácido okadaico, inhibidor de PP2A.

ATP, adenosina trifosfato.

°C, grado centígrado.

Ca²⁺, calcio.

[Ca²⁺]_i, concentración de calcio intracelular.

CatSper, canal catiónico de calcio específico de espermatozoide.

CaV2.3, canal de calcio dependiente de voltaje tipo R.

Cdk5, cinasa dependiente de ciclina 5.

CKII, cinasa de caseína tipo II.

Cl⁻, cloro

DAG, diacilglicerol.

DMSO, dimetilsulfóxido

DTT, ditioneitol.

eem, espermatozoide de erizo de mar.

Em, potencial de membrana.

FDEs, fosfodiesterasas.

GMPc, guanosina monofosfato cíclico.

HCO₃⁻, bicarbonato.

K⁺, potasio.

KCl, cloruro de potasio.

kDa, kilodaltones.

M, molar.

ml, mililitro.

mM, milimolar.

Na⁺, Sodio.

nM, nanomolar.

pH_i, pH intracelular.

PKA, proteína cinasa dependiente de AMPc.

PKB, proteína cinasa tipo B.

PKC, proteína cinasa activada por fosfatidilserina, DAG y Ca²⁺.

PP1, fosfatasa de serina y threonina tipo 1.

PP2A, fosfatasa de serina y treonina tipo 2A.

sAC, adenilil ciclasa soluble.

Sp, *Strongylocentrotus purpuratus*

SpHCN, canal de sodio activado por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos de *Strongylocentrotus purpuratus*.

μl, microlitro.

μm, micrómetro.

μM, micromolar.

RESUMEN

El objetivo del espermatozoide es fecundar al ovulo, para lo cual debe nadar hacia este. El nado del espermatozoide de erizo de mar (eem) involucra cambios intracelulares en pH, Ca^{2+} , AMPc y fosforilación de proteínas mediada por cinasas tanto dependientes de AMPc (PKA), como activadas por diacilglicerol y Ca^{2+} (PKC). Se sabe que la fosforilación mediada por PKA y PKC es importante para el inicio de la motilidad (Tash & Means 2005; Loza-Huerta *et al.*, 2021). Mediante análisis proteómico, se encontró que la caseína cinasa II (CKII) y las fosfatasa PP1 y PP2A están en balsas lipídicas aisladas de flagelos de eem de *Strongylocentrotus purpuratus* (Beltrán, 2019). Además, un análisis *in silico* del modelo de las proteínas de la cascada de señalización activada por Speract, en el flagelo del eem, predijo que hay varios sitios de fosforilación por PKA, PKC, la cinasa dependiente de ciclinas 5 (Cdk5), CKII y por la proteína cinasa B (PKB) y en el mismo trabajo, se identificó PP1 como sustrato de PKA. (Loza-Huerta *et al.*, 2021). Lo anterior sugiere la participación de Cdk5, CKII, PKB, PP1 y PP2A en la motilidad del eem. Debido a lo anterior, el objetivo de este proyecto fue evaluar la participación de dichas enzimas en la motilidad basal de los eem. Inicialmente, mediante experimentos de *Dot Blot* y *Western Blot*, encontramos que Cdk5, CKII, PKB, PP1 y PP2A están en muestras tanto de eem *S. purpuratus*, como de *L. pictus* y con experimentos de inmunofluorescencia, mostramos que todas las enzimas se localizan tanto en el flagelo como en la mitocondria de espermatozoides de *L. pictus* y que CKII, además está en el acrosoma de las células. Finalmente, al evaluar la participación de Cdk5, CKII, PKB, PP1 y PP2A en la motilidad de eem de la misma especie, utilizando sus inhibidores correspondientes (Roscovitina, CX-4549, AZD5363, Caliculina A y Ácido okadaico), encontramos que tanto Cdk5 como CKII participan en la motilidad basal de los espermatozoides de erizo de mar. CKII también podría regularse por PKC e indirectamente por Ca^{2+} (Lee *et al.*, 2016).

INTRODUCCION

Fecundación

La fecundación es un proceso en el cual se fusionan los gametos haploides tanto masculino como femenino para dar origen a otro organismo genéticamente diferente que será diploide. Es un evento importante para que los organismos dependientes de la reproducción sexual puedan preservar su especie. La fecundación depende de la comunicación entre los gametos y el ambiente que los rodea. Al liberarse, los gametos se deben encontrar para que la fecundación se lleve a cabo en escasos minutos u horas, de lo contrario mueren. Dicho evento consta de varios procesos secuenciales: tras el contacto y el reconocimiento de los gametos, empieza la entrada de los espermatozoides al óvulo, la fusión del material genético y la activación del cigoto para iniciar con el desarrollo (Yanagimachi, 1994). Mediante la reproducción sexual se consigue la combinación de genes derivados de los progenitores, cada célula posee dos juegos cromosomales heredados de cada uno de los padres respectivamente, en los cuales la producción de gametos ocurre en las gónadas (testículos en machos y ovarios en las hembras) (Vacquier, 1998). La reproducción sexual puede ser tanto interna como externa. La reproducción sexual externa es el método más simple y común de fecundación donde el macho y la hembra implicados ni siquiera tienen que encontrarse debido a que la hembra solo debe depositar sus óvulos y el macho fecundar, este proceso no es aleatorio pues implica primero que ambos encuentren un sitio apropiado para depositar sus gametos, las variaciones en el nado de los espermatozoides y las condiciones ambientales determinarán si puede fecundar al ovulo (Levitan, 1998; Breed & Moore, 2016).

Los espermatozoides de erizo de mar

En los invertebrados del filo Echinodermata se ha estudiado ampliamente la fecundación ya que estos modelos brindan algunas ventajas como generar una gran cantidad de gametos, la facilidad para obtenerlos, el acceso a todo el proceso de fecundación y del desarrollo embrionario (Alberts *et al.*, 2007). Los erizos de mar fueron los primeros modelos y los más

usados en embriología a los cuales se debe la mayor parte de la información sobre la fecundación (Hertwig, 1877; Darszon *et al.*, 2008; Espinal Enríquez *et al.*, 2014; Vacquier *et al.*, 2014). Las especies más empleadas son *Strongylocentrotus purpuratus*, *Lytechinus variegatus*, *Lytechinus pictus*, *Arbacia punctulata*, *Hemicentrotus pulcherrimus* y *Paracentrotus lividus* (Hamdoun *et al.*, 2018). El genoma de *S. purpuratus* se encuentra totalmente secuenciado y se sabe que de los 23,300 genes que posee comparte 7,077 con el humano (Sodergren *et al.*, 2006). Los eem son células haploides altamente polarizadas que tienen como función fecundar al óvulo. De un erizo de *S. purpuratus* se pueden obtener hasta 1 ml de semen (8,000 millones de eem/ml) al inyectarle 0.5 M de KCl en la cavidad intracelómica. El eem se divide en: cabeza, cuya dimensión es 2 μm de largo la cual contiene al acrosoma, el núcleo y una mitocondria, y posee un flagelo con una dimensión de $\sim 0.2 \times 50 \mu\text{m}$ (Vacquier, 1986; Vacquier *et al.*, 2014; Darszon *et al.*, 2011).

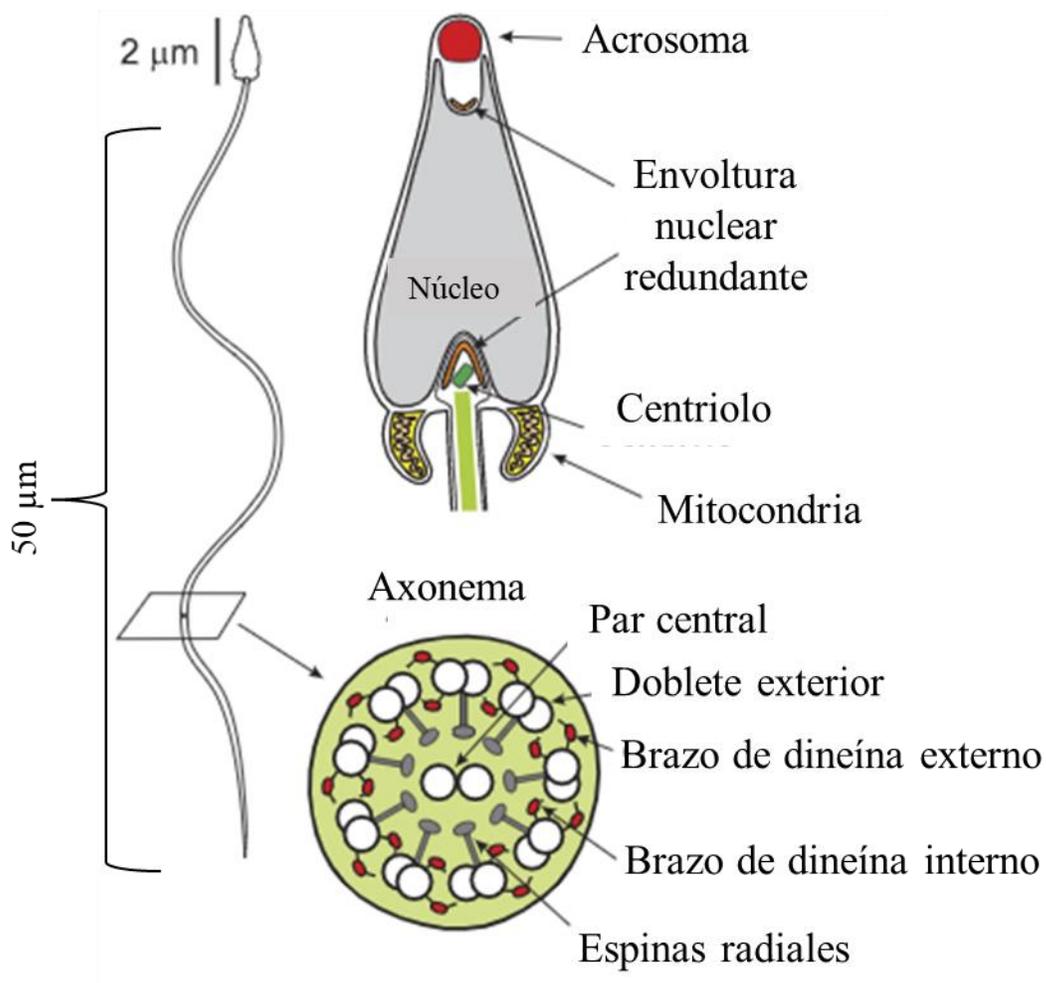


Figura 1. Esquema del espermatozoide de erizo de mar (eem). La parte superior muestra la cabeza con los organelos que la integran, y en la parte inferior una sección transversal del flagelo compuesto principalmente por el axonema, el aparato motor del flagelo. Modificada de Darszon *et al.*, 2011.

La motilidad del espermatozoide

La motilidad es una de las funciones más importantes de los gametos masculinos ya que el objetivo principal del espermatozoide es el de llevar su material genético al ovulo, por lo que ha desarrollado estrategias sofisticadas para regular su motilidad (Darzon *et al.*, 2011). El axonema es la estructura que da propulsión al flagelo (Lindemann & Lesich, 2010), se trata de una estructura formada por nueve pares de microtúbulos alrededor de un par central (estructura 9+2). Cada par está conectado con su doble vecino mediante la proteína nexina y además posee una serie de proyecciones llamadas espinas radiales que actúan como espaciadores para posicionarse alrededor del par central de microtúbulos. Los pares de los microtúbulos están anclados a la base del flagelo que generalmente termina en la pieza de conectora en los espermatozoides de mamíferos. La fuerza que permite a los microtúbulos producir el batido flagelar se genera por las dineínas ATPasas que se encuentran unidireccionalmente a lo largo del flagelo. Las dineínas de un par interactúan con el siguiente doblete, durante el batido flagelar, las de un lado del axonema tienden a doblar el flagelo en una dirección y las del lado opuesto doblan el flagelo en la dirección contraria (Brokaw, 2009). Por lo tanto, el batido flagelar consta de episodios alternos de activación de conjuntos de dineínas opuestos, donde cada conjunto se enciende mientras el otro se apaga. El control de la activación de los conjuntos de proteínas reside en el axonema mismo (Lindemann & Lesich, 2010). La actividad de las dineínas ATPasas se regula por pH, ATP, ADP, Ca^{2+} y fosforilación mediada por la cinasa PKA (Christen *et al.*, 1983; Morisawa, 1994; Mita & Nakamura, 1998; Inaba, 2003; Lindemann & Lesich, 2010; García *et al.*, 2016). También se ha demostrado que el AMPc es un segundo mensajero esencial en la fisiología del espermatozoide (Yanagimachi, 1994), el cual es sintetizado por dos tipos de adenilil ciclasas, la soluble (sAC) (Litvin *et al.*, 2003) y las transmembranales (ACm). En mamífero se sabe que la sAC es esencial para la regulación de la motilidad y fertilidad (Esposito *et al.*, 2004; Hess *et al.*, 2005).

-La motilidad del espermatozoide de erizo de mar

El eem en el interior de la gónada permanece inmóvil debido a la alta concentración de CO_2 y un bajo pH intracelular ($\text{pH}_i = 7.2$). La motilidad se inicia a un pH mayor como el del agua de mar, de 8.0 (Johnson *et al.*, 1983) y una alta concentración de K^+ extracelular (Christen *et al.*, 1986; Hamamah & Gatti, 1998). Posteriormente hay un eflujo rápido de H^+ , que eleva el pH_i de 7.2 a 7.6 (Lee *et al.*, 1983). El aumento de pH_i activa las dineínas del axonema, las cuales son ATPasas dependientes de pH que se activan por alcalinización del pH_i de 7.5 a 8.0 (Christen *et al.*, 1983), una vez que el pH incrementa, las dineínas ATPasas consumirán el ATP previamente producido a partir de la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria (Christen *et al.*, 1986, Trimmers & Vacquier, 1986). La respiración mitocondrial y la motilidad de los espermatozoides se encuentran ligadas y reguladas por el pH_i el cual depende de la composición iónica externa del medio (concentración de sales) (Christen *et al.*, 1982). La alcalinización artificial del espermatozoide con NH_4Cl , ha permitido probar que el aumento del pH_i participa directamente en la motilidad del espermatozoide (Lee *et al.*, 1983). Manipular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a la que se exponen los espermatozoides permeabilizados o desmembrados de invertebrados altera la asimetría del movimiento flagelar. La alta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inhibe la motilidad flagelar (Brokaw 1979; Tash & Means, 1982). Se ha propuesto que el canal CatSper es el responsable de la principal entrada de Ca^{2+} y participa en la motilidad y quimiotaxis (Velázquez-Pérez, 2016; Espinal-Enríquez *et al.*, 2017; Angeles, 2021). Además de que el genoma de eem cuenta con 10 subunidades de las 13 identificadas del canal CatSper (CatSper1-4, β , γ , δ , ϵ_1 y ϵ_2) (Huang *et al.*, 2023) de las cuales 7 se han identificado por análisis proteómico (CatSper1,2,4, β , γ y δ) (Espinal-Enríquez *et al.*, 2017; Beltrán *et al.*, 2016). En la regulación de la motilidad del eem también participa el AMPc (Vacquier *et al.*, 2014; Beltrán, 2019), el cual como ya mencionamos es sintetizado por la sAC y las ACm (Garbers & Kopf, 1980; Beltrán *et al.*, 2007; Vacquier *et al.*, 2014). Los resultados de experimentos de inmunofluorescencia y microscopía de epifluorescencia mostraron inicialmente, que la sAC está en los flagelos de los espermatozoides (Bookbinder *et al.*, 1990), posteriormente mediante microscopía confocal, se mostró que también está en la región de la cabeza (Beltrán *et al.*, 2007). La sAC participa en la motilidad basal y se sabe

que produce ~94% del AMPc del eem (Loza-Huerta, 2013; Vacquier, *et al.*, 2014). En eem también se localizaron cuatro ACms; ACm1 en el área del acrosoma en la cabeza, ACm2 en cabeza y flagelo, ACm9 en todo el espermatozoide y ACm5 en áreas del acrosoma y mitocondria en la cabeza (Beltrán *et al.*, 2007, Vacquier *et al.*, 2014). Existe evidencia de la participación de la fosforilación mediada por PKA, y PKC en la motilidad de los eem (White *et al.*, 2007; Loza-Huerta *et al.*, 2013). Además, en los eem hay una comunicación cruzada entre PKA y PKC involucrada en la regulación de su motilidad (Loza-Huerta *et al.*, 2021). El eem posee la característica de batir el flagelo en ondas casi planas dándole una asimetría en relación con el eje de la cabeza, confinándolo a un plano bidimensional lo que permite observarlo en la superficie de un cubreobjeto. En dichas condiciones se han observado 3 tipos de nado basal, donde ~59% giran en sentido contrario a las manecillas del reloj, ~34% presentan un nado lineal y ~7% un nado estático en forma de temblor (Figura 3) (Loza-Huerta, 2007).

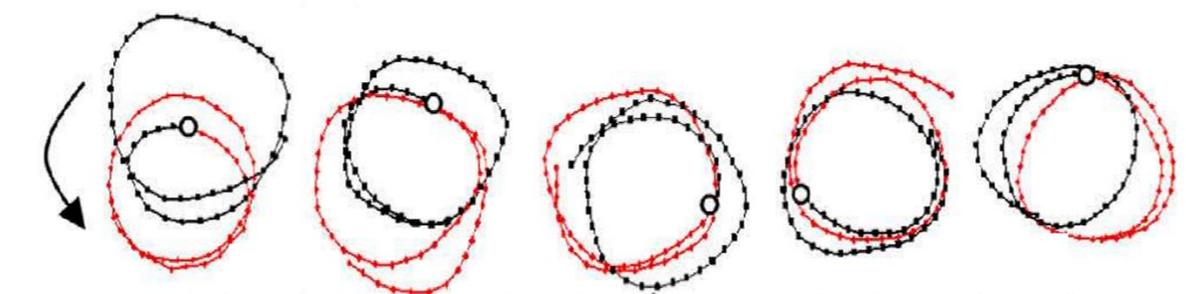


Figura 2. Nado basal del eem. Trayectorias de movimientos que realiza el eem en agua de mar artificial (AMA), en dirección contraria a las manecillas del reloj, el círculo blanco indica la posición intermedia del eem en un periodo de 2 s, el trazo punteado (rojo) indica el movimiento de la célula antes y después (negro). Modificado de Wood *et al.*, 2005.

La fosforilación de proteínas

La fosforilación reversible de proteínas es una modificación postraducciona reconocida como el mecanismo principal para el control de eventos intracelulares en células eucariotas, y en el espermatozoide donde no se ha demostrado síntesis de proteínas, la fosforilación es un mecanismo mucho más importante para regular la función de muchas proteínas (Mizrahi & Breitbart, 2014). Las proteínas cinasas son enzimas que dependen de ATP que añaden un

grupo fosforilo al grupo –OH de una tirosina, serina o treonina (Tyr, Ser o Thr) en alguna proteína. Este proceso lo hacen reversible mediante una segunda clase de enzimas denominadas fosfatasas que hidrolizan los ésteres de fosfato resultantes de la cadena lateral, liberando el grupo Pi. Durante la fosforilación, el grupo terminal fosfato (γ) del ATP se transfiere a residuos de serina o treonina por una clase de cinasas de las familias AGC y CaMK, o a residuos específicos de otro tipo de cinasas de la familia de las proteínas cinasas de tirosina (PTK). La reacción de fosforilación suele llevarse a cabo en el citoplasma celular, donde el ATP es más abundante. La frecuencia entre el estado fosforilado y defosforilado dependen de la actividad relativa de las cinasas y las fosfatasas, y no en todos los casos es reversible (Mathews *et al.*, 2014).

-Las proteínas cinasas en el espermatozoide

El espermatozoide cuenta con una considerable cantidad de cinasas clasificadas en diferentes grupos: reguladas por nucleótidos cíclicos (AGC) como la PKA, la activada por fosfatidilserina, diacilglicerol (DAG) y Ca^{2+} (PKC), la proteína cinasa B (PKB), las dependientes de ciclinas (CMGC) como Cdk5 y únicas como la caseína cinasa II (CKII) (Hanks & Hunter, 1995), donde algunas participan en procesos fisiológicos que ayudan a la fecundación como la motilidad. La PKA fue la primera cinasa identificada en espermatozoide y la más estudiada (Garbers *et al.*, 1973), se encuentra en espermatozoide de humano, ratón, porcino y bovino (Visconti *et al.*, 1997; Lefièvre *et al.*, 2002). Está constituida por dos subunidades regulatorias ($\text{RI}\alpha$, $\text{RI}\beta$, $\text{RII}\alpha$ y $\text{RII}\beta$) y dos subunidades catalíticas ($\text{C}\alpha$, $\text{C}\beta$, $\text{C}\gamma$ y PrKK) que dependen de la unión de dos moléculas de AMPc a las subunidades regulatorias para dejar expuesto los sitios catalíticos (Taylor *et al.*, 2004). Esta enzima incrementa su actividad previa a la fosforilación de tirosinas durante el fenómeno de la capacitación (Visconti *et al.*, 1997, 1998). Se ha visto que en espermatozoide de bovino regula de manera indirecta a la fosfatasa de serina-treonina $\text{PP1}\gamma 2$ que es activada por la proteína cinasa activada por PKC, posteriormente la $\text{PP1}\gamma 2$ inhibe indirectamente a la cinasa de fosfatidilinositol-3 (PI3K) que produce fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP_3) que es responsable de varios procesos de crecimiento, movimiento, adhesión, síntesis de proteínas

y rearreglo del citoesqueleto, reacción acrosomal y activación de PKB (Fisher *et al.* 1998, Etkovitz *et al.* 2007, Jungnickel *et al.* 2007; Fayard *et al.*, 2010, Rotfel *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado la participación de PKA en la fosforilación del canal CatSper en mamífero (Orta *et al.*, 2018). PKC es una enzima perteneciente al grupo de las cinasas AGC mismo grupo al cual pertenecen PKA y PKB. Las PKC, se dividen en convencionales (α , β I, BII y γ), novedosas (η , ϵ , δ y θ) y atípicas (λ , ι y ζ). Según el tipo de enzima cada dominio tendrá sitios de unión para diferentes moléculas, los cuales son cuatro dominios conservados: C1 (sitio de unión para ésteres de forbol y DAG), C2 (sitio de unión para los ácidos grasos y Ca^{2+}), C3 y C4 (ATP y el sustrato, respectivamente) (Castagna, *et al.*, 1982; Coussens *et al.*, 1986; Ono *et al.*, 1989; Nishizuka, 1995). La PKC se encuentra a lo largo del flagelo del espermatozoide de bovino (Lax *et al.*, 1997), en la región acrosomal del espermatozoide de ratón y carnero (Endo *et al.*, 1991; Breitbar, 1992) en la pieza principal del espermatozoide de humano y tanto en humano como en espermatozoide de jabalí y de codorniz se sabe que participa en la regulación de la motilidad (Rotem *et al.*, 1990; Matsuzaki *et al.*, 2017; Teijeiro *et al.*, 2017). En mamífero, la cinasa PKB tiene tres isoformas (PKB α , PKB β y PKB γ) que comparten un dominio N-terminal homólogo de pleckstrina, un dominio catalítico central y un dominio C-terminal hidrofóbico (Fayard *et al.*, 2010). Se sabe que PKB se encuentra en la pieza media y pieza principal del espermatozoide de humano (Koppers *et al.*, 2011), en espermatozoides de porcino (Lackey & Gray, 2015), en la pieza media del espermatozoide de caballo y de ratón donde participa en la motilidad (Gallardo *et al.*, 2014, Quan & Liu *et al.*, 2016). La Cdk5 es una cinasa que se activa por las proteínas p35 y p39 (Sharma *et al.*, 2020), la cual se ha identificado en espermatozoides de humano, porcino, ratón y rata mediante *Western Blot* (Rosales *et al.*, 2004; Lackey & Gray, 2015). Además, en ratón y rata, está descrito que Cdk5 participa en la fosforilación de las fibras densas externas, proteínas del citoesqueleto del espermatozoide (Rosales *et al.*, 2004). La cinasa CKII es una enzima de serina y treonina con dos subunidades catalíticas (CKII α y CKII α') y dos subunidades regulatorias (CKII β) y CKII α' que parecen participar en la espermatogénesis de mamífero (Lou *et al.*, 2008). También se ha encontrado CKII α y CKII α' en la región acrosomal y CKII β en el flagelo de espermatozoides de ratón (Mannowetz *et al.*, 2010), y detectado mediante *Western Blot* en espermatozoide de humano y porcino (Lackey & Gray, 2015), así mismo esta cinasa es activada por fosforilación mediante PKC (Lee, *et al.*, 2016),

y tiene la capacidad de activar tanto a PKB como a la fosfatasa PP2A (Heriche *et al.*, 1997; Di Maira *et al.*, 2005).

-Las proteínas fosfatasas en el espermatozoide

Como se mencionó antes, las fosfatasas quitan los grupos fosfato de las moléculas. En el espermatozoide se han identificado principalmente fosfatasas de serina y treonina (PSTPs) pertenecientes al grupo de las fosfoproteínas fosfatasas (PPPs) siendo PP1 y PP2A las subfamilias encontradas en espermatozoides de diferentes especies. En espermatozoide de humano la subunidad PP1 γ está en la pieza media y pieza principal del flagelo, y las subunidades PP2A y PP2B a lo largo de todo el flagelo (Signorelli *et al.*, 2013), las subunidades PP1 γ 1 y PP1 γ 2 se encontraron en espermatozoide de macaco Rhesus, bovino, ratón y hámster mientras que en rana solo se encontró PP1 γ 1 mediante experimentos de *Western Blot* (Smith, *et al.*, 1996, Chakrabarti *et al.*, 2007). En el caso particular del espermatozoide de bovino la supresión de la actividad de PP2A resulto en un incremento de la motilidad; de manera similar ocurrió con la inhibición de la subunidad PP1 γ 2 en ratón (Chakrabarti *et al.*, 2007; Dudiki *et al.*, 2015). Además de que la inactivación de PP2A es un paso previo a la fosforilación de tirosinas en la capacitación, donde se regula por las cinasas CKII y Src (Heriche *et al.*, 1997; Krapf *et al.*, 2009).

-Las proteínas cinasas y fosfatasas en el espermatozoide de erizo de mar

La PKA fue la primera cinasa que se identificó en eem (Garbers & Kopf, 1980; Garbers *et al.*, 1980; Lee & Iverson, 1976) y desde esa época se sabe que cuando la concentración de AMPc aumenta, la PKA se activa, ciertas proteínas del axonema (aparato motor) del flagelo se fosforilan y se inicia la motilidad flagelar, la cual se mantiene hasta que el espermatozoide se fusiona con el óvulo (Garbers & Kopf, 1980; Garbers, 1989). Se ha propuesto que cambios en el estado de fosforilación de las ~250 proteínas que conforman el axonema (Inaba, 2003), regulan la motilidad de los espermatozoides, debido a aumentos en los niveles de AMPc y

de Ca^{2+} (Tash, 1989; Darszon *et al.*, 2008), aunque muy pocas proteínas se han identificado a nivel molecular. En eem, la PKA (González-Mora, 2016), las adenilil ciclasas (sAC) (Beltrán *et al.*, 2007; Vacquier *et al.*, 2014) y sustratos fosforilados de PKA (pPKAs) y de PKC (pPKCs), se distribuyen a lo largo del espermatozoide (Loza-Huerta *et al.*, 2013). Actualmente se sabe que el genoma de *S. purpuratus* cuenta con las isoformas de PKC δ e ι (Loza-Huerta *et al.*, 2021). En la regulación de la motilidad del eem de *S. purpuratus* está involucrada una fosfatasa dependiente de calmodulina (CaM) y de Ca^{2+} (Tash *et al.*, 1988). Además, en nuestro grupo (Beltrán, 2019), mediante análisis proteómico de flagelos de eem se identificaron las fosfatasas PP1A (gi|72045279) y PP2A (gi|115675671). Sin embargo, falta corroborar la localización de dichas fosfatasas en el eem y si estas participan en la motilidad. Dado que la motilidad es un proceso fundamental en la fecundación de los eem, que el erizo de mar fue el primer animal en el cual se describió dicha función y donde está mejor caracterizada. En este proyecto nos proponemos usar el eem para identificar a algunas cinasas y fosfatasas que podrían participar en la motilidad.

Tabla 1. Sitios predichos de fosforilación por PKA, PKC, y CKII en Isoformas de PKC

Protein name	ID	Molecular weight (kDa)	PKA	PKC	CKII
Other proteins not in the speract signalling cascade model					
RAC-gamma serine/threonine-protein kinase γ 1 (PKB1, Akt or RAC γ 1)	XP_030854897.1	54	0 (3)		
RAC-gamma serine/threonine-protein kinase (PKB, Akt or RAC γ 2)	XP_787246.2	56		3 (1)	
Protein kinase C (PKC)	XP_030840335.1	21	1 (0)	2 (0)	
Protein kinase C delta type isoform X1 (PKC δ X1)	XP_030828326.1	79	1 (2)	6 (1)	
Protein kinase C delta type isoform X2 (PKC δ X2)	XP_030828326.1	71	1 (2)	9 (1)	
Protein kinase C iota type isoform X1 (PKC ι X1)	XP_011682840.2	76	4 (3)	7 (2)	1
Protein kinase C iota type isoform X2 (PKC ι X2)	XP_011682845.2	71	4 (3)	10 (0)	1
Protein kinase C iota type isoform X3 (PKC ι X3)	XP_030843097.1	69	4 (2)	5 (0)	1
Protein kinase C iota type isoform X4 (PKC ι X4)	XP_011682846.2	69	4 (3)	8 (0)	1
Protein kinase C iota type isoform X5 (PKC ι X5)	XP_030843098.1	66	4 (3)	9 (0)	1
Ca-independent PKC X1 (Ca-indep PKC X1)	XP_030854593.1	87	5 (3)	14 (1)	
Ca-independent PKC X2 (Ca-indep PKC X2)	XP_030854594.1	87	5 (3)	14 (1)	
Ca-independent PKC X3 (Ca-indep PKC X3)	XP_030854595.1	87	5 (3)	14 (1)	
Ca-independent PKC X4 (Ca-indep PKC X4)	XP_030854596.1	83	4 (3)	11 (1)	

Los números en las columnas de las cinasas indican los sitios predichos de fosforilación por PKA y PKC con una probabilidad > 0.7 . ID: número de identificación. (x): Numero de motivos fosforilados reconocidos como sustratos fosforilados α -PKA y α -PKC, respectivamente. Tabla modificada de Loza-Huerta, *et al.*, 2021.

Proteínas de la cascada de señalización disparada por el Speract

La cascada de señalización del Speract, es una vía de señalización propuesto para explicar los cambios por los que pasa el eem una vez que el decapeptido Speract liberado por el ovulo del erizo de mar, se pone en contacto con su receptor (SpR) (Guerrero *et al.*, 2020). Cuando el Speract se une a SpR, se activa una guanilato ciclasa transmembranal (GC), que sintetiza GMPc (Su & Vacquier 2006). El aumento de GMPc permite la activación del canal de K⁺, Tetra-KCNG, permitiendo la salida de este ion y consecuentemente hiperpolarizando el potencial de membrana. Esto permite la activación del intercambiador de Na⁺/H⁺ específico del espermatozoide (sNHE), lo que permite el aumento del pH_i. Simultáneamente se activa el canal de Na⁺ dependiente de voltaje (SpHCN), que permite el influjo de Na⁺ depolarizando el potencial de membrana. Este aumento activa las sAC (Vacquier *et al.*, 2014), que producen

AMPC a partir de ATP. El aumento de AMPc y de pH_i así como la depolarización activan el canal de Ca^{2+} específico del espermatozoide (CatSper) (Ren *et al.*, 2001), que permite un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Chung *et al.*, 2017; Espinal-Enríquez *et al.*, 2017; Seifert *et al.*, 2015). Es posible que el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ active a los canales de Cl^- activados por Ca^{2+} y K^+ , (CaCC y CaCK) para volver a hiperpolarizar el potencial de membrana. Finalmente sabemos que el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es importante ya que se ha observado que hay un aumento de este ion en la respuesta quimiotáctica del eem (Guerrero *et al.*, 2010b).

Tabla 2. Sitios predichos de fosforilación por PKA, PKC, PKB, Cdk5 y CKII en proteínas que participan en la casada de señalización del Speract

Protein name	ID	Molecular weight (kDa)	PKA	PKC	PKB	cdk5	CKII
Speract receptor (SpR)	XP_011672290.2	121	4 (3)	13 (0)	1		
Atrial natriuretic peptide receptor 1 (ANP or mGC)	XP_030828282.1	93	4 (1)	4 (0)			
Sperm phosphodiesterase 5 (PDE5)	NP_001029121.1	108	4 (2)	15 (0)	1(1)		1
Tetrameric potassium-selective cyclic nucleotide gated channel (Tetra-KCNG)	NP_001075433.1	253	3 (6)	8 (1)	1		
Sperm-specific sodium proton exchanger isoform X1 (sNHE)	XP_030844648.1	140	2 (1)	10 (0)			
Soluble adenylyl cyclase (sAC)	NP_001020380.1	209	15 (13)	17 (0)	1		3
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit 1 (PKA C1)	XP_030852244.1	40	4 (2)	3 (0)			
cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit PRK (PKA C PRK)	XP_011681046.1	40	0 (2)	8 (0)			
cAMP-dependent protein kinase type II regulatory subunit (PKA RII)	NP_999688.1	41	1 (3)	4 (1)			1
Hyperpolarization-activated (Ih) channel (Sph)	NP_999729.1	87	1 (2)	8 (1)			
Hyperpolarization-gated and cyclic nucleotide regulated channel (HCN)	NP_001028182.1	74	6 (3)	5 (0)			
Cation channel sperm-associated protein 1 (CatSper1)	XP_030854941.1	54	0 (1)	3 (0)			
Cation channel sperm-associated protein 2 (CatSper2)	XP_030832241.1	60	2 (2)	4 (0)			
Cation channel sperm-associated protein 3 (CatSper3)	XP_030835949.1	46	1 (2)	2 (0)			
Cation channel sperm-associated protein 4 (CatSper4)	XP_030846926.1	60	2 (1)	13 (2)			2
Cation channel sperm-associated protein β (CatSper β)	XP_030853793.1	68	5 (0)	9 (0)			
Cation channel sperm-associated protein γ (CatSper γ)	XP_030855182.1	37	0 (3)	4 (0)			
Cation channel sperm-associated protein ϵ 1 (CatSper ϵ 1)	XP_030855090.1	47	0 (0)	5 (0)			
Cation channel sperm-associated protein ϵ 2 (CatSper ϵ 2)	XP_011664202.2	56	0 (0)	4 (0)			
EF-Hand Calcium Binding Domain 9 (EFCAB9)	XP_003728906.1	25	0 (0)	2 (0)			
Testis potassium dependent sodium/calcium (NCKX)	NP_999790.1	72	2 (1)	5 (1)			1
Sperm plasma membrane calcium transporting ATPase (CaP)	NP_001028822.1	127	1 (4)	8 (0)			
Transmembrane protein 16 (TMEM16)	NP_001073009.1	106	1 (4)	4 (0)			
Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 (CaKC)	XP_030835947.1	119	6 (4)	16 (0)	1		
Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D-such as isoform X1 (Cav1.2)	XP_030827881.1	229	14 (16)	9 (4)	1	3	
Voltage-dependent calcium channel A α 1 X18 (Cav2.3)	XP_030853667.1	289	7 (7)	24 (1)	1	2	1

Los números en las columnas de las cinasas indican los sitios predichos de fosforilación por PKA y PKC con una probabilidad > 0.7. (x): Numero de motivos fosforilados reconocidos como sustratos fosforilados de PKA y PKC, respectivamente. ID: número de identificación. Tabla Modificada de Loza-Huerta *et al.*, 2021.

ANTECEDENTES

Incluso con las considerables diferencias en la ecología reproductiva y las señales de activación que caracterizan a los diferentes taxones a los que pertenecen los mamíferos (filo Chordata) y los erizos de mar (filo Echinodermata), las vías de señalización que activan la motilidad están altamente conservadas en los pocos taxones que se han descrito hasta la fecha (Speer *et al.*, 2021). En los invertebrados marinos, hay alcalinización intracelular que estimula a la sAC que produce AMPc (Vacquier *et al.*, 2014), que activa a la PKA que a su vez fosforila proteínas flagelares y de la señalización del calcio mediada por CatSper (Kaupp *et al.*, 2008), y juntos estimulan el batido flagelar y finalmente la motilidad (Speer *et al.*, 2021). Cada componente de esta vía conservada parece ser necesaria para la motilidad y la fecundación de los espermatozoides en los erizos de mar, ya que los ratones que carecen de SLC9C1, sAC, PKA o CatSper presentan graves defectos en la motilidad de los espermatozoides, lo que los vuelve infértiles (Wang *et al.*, 2003; Nolan *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006). Un análisis *in silico*, mediante el programa NetPhosK, indica que varias de las proteínas que participan en la cascada de señalización del Speract (Guerrero *et al.*, 2020), poseen sitios predichos de fosforilación por Cdk5, CKII, PKA, PKB y PKC (Tabla 2; Loza-Huerta *et al.*, 2021). Cdk5 tiene como blanco a los canales de calcio activados por voltaje Cav1.2 (3) y Cav2.3 (2), (Caterall, 2011), y uno por PKB. Cav2.3 también tiene un sitio predicho de fosforilación por CKII. Además, CKII tiene sitios predichos de fosforilación en la fosfodiesterasa 5 (FDE5), en PKA, en una de las subunidades del canal iónico de Ca²⁺ (CatSper4), en el intercambiador Na⁺ y Ca²⁺ dependiente de K⁺ (NCKX) (Su & Vacquier, 2002) y en la sAC, la cual tiene también un sitio predicho de fosforilación por PKB. Finalmente, la proteína cinasa B (PKB) además de los sitios de fosforilación predichos ya mencionados también los hay en el receptor del Speract (RSp), en la FDE5 y en el canal tetramérico de K⁺ regulado por nucleótidos cíclicos (Tetra-KCNG). De hecho, el análisis proteómico de eem reveló que el RSp, PKA, CK, las fosfatasa PP1 y PP2A, y la FDE5, son sustratos fosforilados por PKA (Loza-Huerta, 2013), y tenemos evidencia de la participación de PKA en la quimiotaxis de los eem (Ángeles, 2021), además de que la FDE5 afecta la motilidad de los eem (Su & Vacquier 2006). Finalmente, CKII α (XP_003728583.1) se

encontró mediante experimentos de proteómica en balsas lipídicas de flagelos de eem de *S. purpuratus* (Beltrán, datos no publicados).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La falta de información acerca de los mecanismos que regulan el proceso de motilidad del espermatozoide, impide el desarrollo de tecnologías para comprender mejor este fenómeno. El modelo del erizo de mar permite una mayor comprensión del fenómeno de la motilidad debido a que produce una mayor cantidad de espermatozoides en contraparte con los mamíferos. Además, se pueden simular las condiciones ideales de su entorno para probar diferentes condiciones experimentales al ser un organismo de fecundación externa. Sabemos que la fosforilación de proteínas es un proceso llevado a cabo por cinasas y fosfatasas que es importante en el nado del espermatozoide, por lo que la identificación de las cinasas y fosfatasas involucradas en la motilidad del espermatozoide de erizo de mar brindará información que permitirá avanzar en el entendimiento de los mecanismos que regulan dicho proceso.

HIPÓTESIS

Las cinasas PKB, CKII y Cdk5 y las fosfatasas PP1 y PP2A regulan la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar

OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar cinasas y fosfatasas involucradas en la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar

Objetivos particulares

1. Localizar las cinasas PKB, CKII y Cdk5 y las fosfatasas PP1 y PP2A en los espermatozoides de erizo de mar.
2. Evaluar la participación de las cinasas y fosfatasas detectadas en flagelos, en la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Los reactivos: Roscovitina No. 186692-46-6 se compró en Sigma Aldrich, Merck KGaA, (Darmstadt, Alemania). AZD5363 No. MBS576509 se obtuvo en MyBioSource (San Diego, Estados Unidos). CX-4945 No. 1009820-21-6 se compró al distribuidor de MedChemExpress y Caliculina y Acido Okadaico A No. de PHZ1044 se obtuvieron de Thermo Fisher Scientific (Massachussets, Estados Unidos). Debido a que no existen anticuerpos comerciales específicos para las enzimas Cdk5, CKII, PKB, PP1 y PP2A de erizo de mar, se seleccionaron anticuerpos (Tabla 4), cuyo epítipo tiene un porcentaje de identidad mayor al 80% (Tabla 5) con la secuencia predicha de cada proteína en el genoma de *S. purpuratus*. Como anticuerpo secundario se usó α -conejo-HRP No. sc-2004 del distribuidor Santa Cruz Biotechnology y el acoplado a Alexa Fluor 488 No. A11008 de Invitrogen. Los cocteles de inhibidores de proteasas (“cOmplete” libre de EDTA), y de fosfatasas (“PhosSTOP”) se adquirieron de ROCHE (Indianápolis, Estados Unidos). Los estándares de peso molecular SDS7B No. S8455, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Misuri, Estados Unidos). Las membranas de PVDF y de nitrocelulosa para *Western Blot* son de Millipore Co. No. IPVH00010 (Darmstand, Alemania) y BIO-RAD No. 1620112 (California, Estados Unidos) respectivamente. El reactivo para revelar por quimioluminiscencia se consiguió de PIERCE, Thermo Fisher Scientific y los films de radiografía fueron de Carestream.

Tabla 3. Inhibidores de las cinasas CKII y PKB y de las fosfatasa PP1 y PP2A

Proteína	Inhibidor	IC ₅₀ (nM)	Concentración (µM)	Modelo
Cinasas				
Cdk5	Roscovitina	¹ 16 000	0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100	¹ Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>
CKII	CX-4945	² 2 100	5, 10 20, 40	² Línea celular de cáncer de prostata PC3
PKB	AZD5363	³ 8 (PKB ₂ y PKB ₃), 25.43 (PKB ₁)	1, 5, 15, 30	⁴ Línea celular U87-MG
Fosfatasa				
PP1	Caliculina A	⁵ 2	0.031, 0.1, 0.316, 1	⁵ Fosfatasa de miosina B de musculo liso
PP2A	Acido okadaico	⁵ 500	0.5, 1, 2, 5	

CKII: caseína cinasa II, PKB: proteína cinasa B, PKC: cinasa activada por Ca²⁺ y diacilglicerol, PP1: fosfatasa I de serina y treonina, PP2A: fosfatasa 2A de serina y treonina. Miere *et al.*, 1997¹; Pierre *et al.*, 2011²; <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?tab=biology&ligandId=7709>³; Davies *et al.*, 2012⁴; Ishihara *et al.*, 1989⁵.

Tabla 4. Características de anticuerpos empleados

Anticuerpo	ID	Epitope	Reactividad	Proveedor	No. De catalogo	Aplicación
α-cdk5	Q00535	K3-T26	Humano, raton, rata y mono	Affinity	AF6371	WB, IHC, IF/ICC, ELISA
α-CKII	P68400	M1-Y50	Humano	Bethyl	A300-196A	WB, IHC, IF/ICC, ELISA
α-PKB	P31749	P452-A480	Humano, raton y rata	Affinity	AF0836	WB, IF, ELISA
α-PP1	P62140	V250-R331	Humano, raton y rata	Abclonal	A13528	WB, IHC, IF
α-PP2A	P67775	M1-A231	Humano y raton	ThermoFisher	PA5-29754	WB, ICC, IF, IHC

Los anticuerpos fueron hechos en conejo, contra los epítomos de las secuencias de las cinasas Cdk5, CKII, PKB y las fosfatasa PP1 y PP2A de humano. Se trata de anticuerpos policlonales, que son reconocidos por el anticuerpo secundario HRP-Goat α-Rabbit IgG. ID: número de identificación; WB: wester blot; IHC: inmunohistoquímica; IF/ICC: inmunofluorescencia/inmunocitoquímica; ELISA: enzimoimmunoanálisis de adsorción.

Tabla 5. Porcentaje de identidad de epítomos de anticuerpos generados contra las diferentes enzimas de humano, y las secuencias correspondientes en genomas de *S. purpuratus* y *L. pictus*

Enzima	Especies	*ID erizo de mar	**ID humano	Epitope de humano	% Ident
Cdk5	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	XP_030840991.1	Q00535	K3-T26	95.83
CKII		XP_003728583.1	P68400	M1-Y50	90.91
PKB		XP_787246.2	P31749	P452-A480	100
PP1		XP_030854284.1	P62140	V250-R331	94.29
PP2A		XP_780423.1	P67775	M1-A231	93.39
Cdk5	<i>Lytechinus pictus</i>	XP_054767517.1	Q00535	K3-T26	91.67
CKII		XP_054748235.1	P68400	M1-Y50	93.33
PKB		XP_054758907.1	P31749	P452-A480	NA
PP1		XP_054758910.1	P62140	V250-R331	94.29
PP2A		XP_054773849.1	P67775	M1-A231	92.04

% Ident: Porcentaje de identidad entre la secuencia del epítomo de las enzimas Cdk5, CKII, PKB, PP1 o PP2A de humano y la secuencia de la enzima correspondiente en erizo de mar; ID: número de identificación; NA: No aplica; *: genomas de las dos especies de erizo de mar, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_015342785.2/ (*S. purpuratus*) y https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000002235.5/ (*L. pictus*); **: <https://www.uniprot.org/>

Obtención de espermatozoides

Los espermatozoides de erizo de mar (eem) se obtuvieron de las especies *L. pictus* (Obtenidos de Marinus) y *S. purpuratus* (Javier García Pámares. Ensenada, Baja California, México). Los erizos se mantienen en agua de mar artificial marca Oceanic a ~1000 mOsm y pH 8 a una temperatura de 14-15 °C. Los erizos se inyectaron en la región intracelómica con 0.1-1 ml de KCl 0.5 M para obtener los gametos, los cuales se colectaron con una pipeta Pasteur y se almacenaron en tubos Eppendorf en un termo con hielo a 4 °C durante 2-3 días, a estos espermatozoides se les denomina “secos”.

Solubilización de espermatozoides de erizo de mar (eem)

Los eem secos (2.5 µl) se diluyeron en 1.5 ml de en agua de mar artificial (AMA en mM: NaCl 485, CaCl₂ 10, KCl 10, MgSO₄ 30, NaHCO₃ 2.5, MgCl₂ 26, HEPES 10 y EDTA 0.1 a ~1000 mOsm y pH 8) conteniendo 1 mM de calcio y bajo pH (AMA1Ca pH 7) para eliminar las células inmaduras llamadas celomocitos. El sobrenadante se centrifugo a 1000 x g durante 7 minutos. Al precipitado se le agregó 80 µl de Tris-HCl/HEPES 20 mM con EDTA 25 mM, EGTA 2 mM, cOmplete y 20 µl de mezcla digestora 5X (Tris-HCl 20 mM pH 6.8, azul de bromofenol 10 µg/ml, SDS 10%, glicerol 50%, β-mercaptoetanol 5%, EDTA 8 mM, EGTA 2 Mm). Se agitó en vortex durante 20 minutos a 4 °C, y se calentó a 70°C por 20 minutos. La mezcla se centrifugó a 10,000 x g/10 min y se recuperó el sobrenadante para separar las proteínas en un gel desnaturizante al 12% considerando que el rango de pesos moleculares (PMs) de las proteínas de interés es de 22-54 kDa.

Aislamiento de membranas plasmáticas de eem

Separación de cabezas y flagelos

Los eem (1 ml) se diluyeron con 14 ml de AMA1Ca pH 7 a 4°C los cuales se centrifugaron a 121 xg por 5 minutos, el sobrenadante se aspiró y se transfirió a otro tubo. El precipitado resultante se descartó y se repitió el paso anterior 3 veces para separar celomocitos. El sobrenadante se centrifugo a 3000 xg por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 10 ml de AMA1Ca pH 7 en presencia de inhibidores (leupeptina 10 µM, pepstatina 1 µM, DTT 1 mM, inhibidor de tripsina 1 mg/ml, aproptinina 1 µg/ml, EGTA y EDTA 1 mM), y se pasó por aguja de No. 21, 20 veces. El precipitado se centrifugo 2000 xg por 5 minutos. El sobrenadante correspondió a los flagelos y el precipitado a las cabezas.

Aislamiento de membranas plasmáticas de flagelos de eem

Los flagelos derivados de 1 ml de eem se centrifugaron a 35,000 xg por 40 minutos y el precipitado se resuspendió en 10 ml de solución hipotónica (Tris 10 mM, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, DTT 0.1 mM, Leupeptina 10 µM y pepstatina 1 µM a pH 8) y se homogeneizó. Se colocaron 5 ml de la suspensión anterior sobre 10 ml de una solución colchón de sacarosa (Tris 10 mM, sacarosa 40%, CaCl₂ 1 mM y DTT 0.1 mM a pH 8) en tubo (marca Corex) de 15 ml para centrifugarse a 20,000 xg por 75 minutos. Al final se obtuvo un gradiente con una banda en la interfase con el colchón de sacarosa correspondientes a las Membranas MID y en la parte superior las membranas TOP. Las membranas se diluyeron por separado al menos 3 veces con solución hipotónica, y se centrifugaron a 200,000 xg por 30 minutos. Las membranas se resuspendieron con el mínimo volumen de solución hipotónica, se hicieron alícuotas de 20 a 40 µl y se guardaron a -70°C.

-Aislamiento de membranas plasmáticas de cabezas de eem

Esto se hizo como está reportado (Darzon *et al.*, 1994) y se describe a continuación. Las cabezas precipitadas (ver sección anterior) se resuspendieron en 2 ml de AMA1Ca pH 7, y se transfirieron a un tubo conteniendo 1 ml de Affi-Gel (esferas cargadas positivamente que

se unen a la membrana plasmática) para incubarlas a 4°C por 15 minutos con agitación suave. A continuación, se agregaron por la pared del tubo, 11 ml de heparina (40 U/ml en AMA1Ca pH 7) y se mezcló suavemente por 15 minutos para centrifugarse a 484 xg por 5 minutos para finalmente descartar el sobrenadante. El precipitado se re suspendió en 10 ml de solución de lisis para centrifugarse a 2000 rpm por 5 minutos. El precipitado se lavó 2 veces con 10 ml de solución de lisis sin inhibidores y el precipitado, se transfirió con 1 ml de AMA1Ca pH 7 a un tubo Corex de 15 ml mantenido en hielo, y se sonicó por 2 minutos, 3 veces. Posteriormente se centrifugo a 10,000 xg por 10 minutos para recuperar las membranas en el sobrenadante. Las membranas finalmente se centrifugaron a 200,000 xg por 30 minutos, se tomó el sobrenadante que contiene a los acrosomas y se resuspendieron en el mínimo volumen posible (μ ls) de AMA1Ca pH 7 para alicuotar y guardar a -70°C.

Dot Blot y Western Blot

Estos experimentos se llevaron a cabo según lo establecido en el laboratorio para espermatozoides de erizo de mar (Loza-Huerta, 2013) con algunas modificaciones. Los espermatozoides secos se diluyeron 1:15 en AMA1Ca pH7 y se lavaron un par de veces. Las células, se recuperaron por centrifugación a 3500 x g durante 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en AMA pH 8. Las proteínas de los eem se separaron por peso molecular en geles de SDS-PAGE al 12%. Se transfirieron a membranas de PVDF durante una hora a 0.5 mA por mini-gel en una cámara de transferencia semiseca (Serial No. 221BR 43937 BIO-RAD) utilizando un amortiguador de transferencia (glicina 190 mM, Trisma base 25 mM sin ajustar el pH (aproximadamente pH 8.6). Los sitios inespecíficos de las proteínas transferidas a las membranas se bloquearon con leche al 5% en el amortiguador TBS (Trisma base 25 mM, NaCl 138 mM pH 7.6) que contiene 0.05% del detergente no iónico Tween-20 (TBS-T) por 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti-CKII diluido 1:250 o anti-PP2A diluido 1:500, teniendo como base los resultados obtenidos mediante *Dot Blot* para posteriormente incubar las membranas con el anticuerpo secundario hecho contra conejo (Cabra, α -conejo HRP 1.10000) en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con TBS-T y después con TBS 3 veces

durante 10 minutos cada uno. Las proteínas unidas al anticuerpo se revelaron por quimioluminiscencia (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate at. 34080 Thermo Fisher Scientific) exponiendo las membranas por diferentes tiempos en un film de radiografía. Para determinar la dilución de anticuerpos a utilizar en experimentos de *Western Blot*, se hicieron experimentos de *Dot Blot*. Para esto, se colocó 1 μ l de muestra solubilizada, derivada de eem En una membrana de nitrocelulosa y se dejó secar, para posteriormente seguir el protocolo descrito arriba para revelar el *Western Blot* a partir del bloqueo con leche. En experimentos de este tipo se utilizaron diluciones de los anticuerpos primarios α -Cdk5, α -CKII, α -PKB, α -PP1 y α -PP2A (1:125, 1:250 y 1:500), atendiendo las recomendaciones del proveedor para cada anticuerpo.

Inmunofluorescencia

Este protocolo se llevó a cabo como está montado en el laboratorio para espermatozoides de erizo de mar (modificado de Granados-Gonzales *et al.*, 2005 y Velázquez-Pérez, 2016). Se diluyeron 5 μ l de eem secos en 1.5 ml de AMA 1Ca pH 7 y se realizó un lavado de los eem. Se centrifugo el sobrenadante a 1000 xg por 10 minutos a 4°C y el precipitado se diluyó en 1.5 ml de AMA1Ca pH 7. Posteriormente se pusieron 20 μ l de eem en cada pozo de un portaobjeto “PTFE” (Electron Microscopy Sciences, No. 63424-06) y se dejaron durante 1 h a 4°C en el interior de una cámara húmeda para después fijar con paraformaldehído al 4% en AMA pH 8 recién preparado, durante 10 minutos y se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos. Los eem se permeabilizaron con Tritón-X100 al 0.1% en PBS pH 7.4 por 10 minutos y se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos. Los eem se bloquearon con BSA al 2% en PBS por 1 h a 4°C. Posteriormente, los eem se incubaron con α -Cdk5, α -CKII, α -PKB, α -PP1 o α -PP2A todos diluidos 1:10 salvo PP2A (1:25) en BSA al 0.1% en PBS toda la noche a 4°C y se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos. Finalmente, los eem se incubaron con α -conejo (acoplado a Alexa 488), diluido 1:200 en BSA al 0.1% en PBS por 1 h a temperatura ambiente, los eem se lavaron 3 veces con PBS por 5 minutos y se añadió 1.5 μ l de citifluor para evitar el fotoblanqueo. Se posicionó un cubreobjetos encima del portaobjeto, se selló con barniz y la muestra se observó mediante microscopia de epifluorescencia a 470 nm que

permite obtener una imagen mediante el software CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer).

Evaluación de la motilidad de los espermatozoides

Todo se hizo como está montado en el laboratorio para espermatozoides de erizo de mar (Loza-Huerta, 2007) con algunas modificaciones como se describe a continuación. Los eem secos se diluyeron 1:10 en AMA1Ca pH 6.8 y de ahí se tomó 1 μ l que se diluyó en 500 μ l de AMA pH 6.8, en presencia o ausencia (control) del inhibidor de la cinasa Cdk5, Roscovitina (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 μ M), el inhibidor de la cinasa CKII, CX-4985 (5, 10, 20 y 40 μ M), el inhibidor de la cinasa PKB, AZD5363 (1, 5, 15 y 30 μ M), el inhibidor de la fosfatasa PP1, Caliculina A (31, 100, 316 y 1000 nM), el inhibidor de la fosfatasa PP2A, Ácido okadaico (0.5, 1, 2 y 5 μ M) o con DMSO al 2% (diluyente de CX-4945, AZD5363, Caliculina A y Ácido Okadaico) en una cámara de registro circular para microscopio. En esta cámara de registro se pusieron cubreobjetos redondos (25 mm de diámetro; marca VWR) que fueron pretratados con poli-Hema (No. de 3932 Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml diluido en etanol al 95%, para eliminar el exceso de poli-Hema y evitar que los espermatozoides se pegaran al vidrio. La cámara de registro se enjuagó con 500 μ l agua destilada 3 a 4 veces y posteriormente con AMA, dependiendo de la condición experimental. La cámara de registro se posiciona en la platina de un microscopio invertido de epifluorescencia Nikon Eclipse TE 300 en un regulador de temperatura a 14°C registrando 15 segundos del nado de los eem después de 8 minutos de incubación con el inhibidor correspondiente. Para enfocar y ver los eem se utilizó el objetivo de 40X, con una cámara AndoriXon.

Protocolo de captura de imágenes y análisis de trayectorias de espermatozoides de erizo de mar

Para registrar y analizar las trayectorias de los eem se utilizó el programa Andor iQ2, para crear protocolos y obtener archivos en formato .tif. El protocolo está programado para grabar un video de 15 segundos dividido en 340 imágenes que se repitió de manera manual pasado los 8 minutos de incubación con el inhibidor correspondiente. Mediante el programa ImageJ analizamos los videos obtenidos del programa Andor iQ2 restándoles la fracción inmóvil mediante un algoritmo que calcula una proyección de intensidad media de los 15 segundos que dura el video. Mediante el “*plugin*” TrackMate se rastrean las trayectorias de cada uno de los espermatozoides y se genera un archivo de Excel (.xls). Posteriormente utilizamos el lenguaje de programación R para realizar análisis estadísticos, en el cual se genera un código (script) que produce una gráfica con los valores correspondientes de la velocidad de nado de las poblaciones de espermatozoides analizados de cada condición.

Análisis estadístico de las trayectorias de los eem

Posteriormente con el mismo script se realizó una prueba de normalidad *Shapiro-test* sobre la distribución de la motilidad medida de cada condición para determinar qué tipo de análisis estadístico se debía de llevar a cabo en cada población. Si se trataba de una distribución normal ($p < 0.05$) se hacía un análisis paramétrico de ANOVA de una vía, pero en caso contrario ($p > 0.05$) se procedió a hacer un análisis estadístico no paramétrico de *Kruskal-Wallis* ($p < 0.05$). El valor de p entre la comparación de dos distribuciones determinó si estas poseen o no diferencia significativa siendo $p < 0.05$ significativamente diferente y $p > 0.05$ sin diferencia significativa. Una vez determinados los valores mediante la comparación de poblaciones de cada condición, el script generó una gráfica de barras de cada una de ellas y se validaron las diferencias mediante una prueba de *Tukey-test* para los resultados obtenidos de ANOVA y test *Conover* para los resultados obtenidos de *Kruskal-Wallis*.

RESULTADOS

Cdk5 se encuentra en los flagelos de eem

Dado que los anticuerpos comerciales que utilizamos para saber si Cdk5, CKII, PKB, PP1 y PP2A están en eem son comerciales y generados contra proteínas de humano, inicialmente realizamos experimentos de *Dot Blot* para determinar la dilución del anticuerpo a partir de la cual se puede detectar la señal correspondiente a alguna de las enzimas. En el caso particular de Cdk5 detectamos señal en solubilizado total (ST) de eem de *L. pictus* y en cabezas de eem de *S. purpuratus*, a partir de la dilución 1:125 (Figura 3).

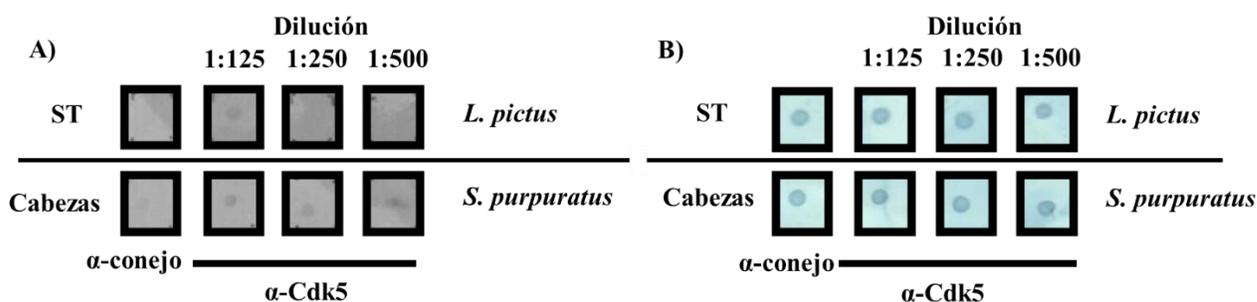


Figura 3. Cdk5 está en eem de *L. pictus* y de *S. purpuratus*. A) *Dot blot* de solubilizado total (ST) de eem de *L. pictus*, y de cabezas de eem de *S. purpuratus* con α -Cdk5 1:125, 1:250 y 1:500. El revelado se hizo con α -conejo-HRP diluido 1:10,000 (1^{era} columna), mismo que se usa como control de especificidad. B) Membranas de nitrocelulosa usadas en A, teñidas con negro de amido como control de carga de proteína. Se muestra un experimento representativo de n=2.

Debido a que se confirmó la presencia de Cdk5 en flagelos de espermatozoides de rata (Rosales *et al.*, 2004), y que Cdk5 está en ST y de cabezas de eem, consideramos importante realizar experimentos de inmunofluorescencia para determinar su distribución. En los experimentos de inmunofluorescencia se detectó a Cdk5 en el flagelo y en la mitocondria (Figura 4), lo cual podría explicar la señal observada en muestras de ST y cabezas del eem de *S. purpuratus* corroborando que Cdk5 se encuentra en cabeza y flagelo del eem.

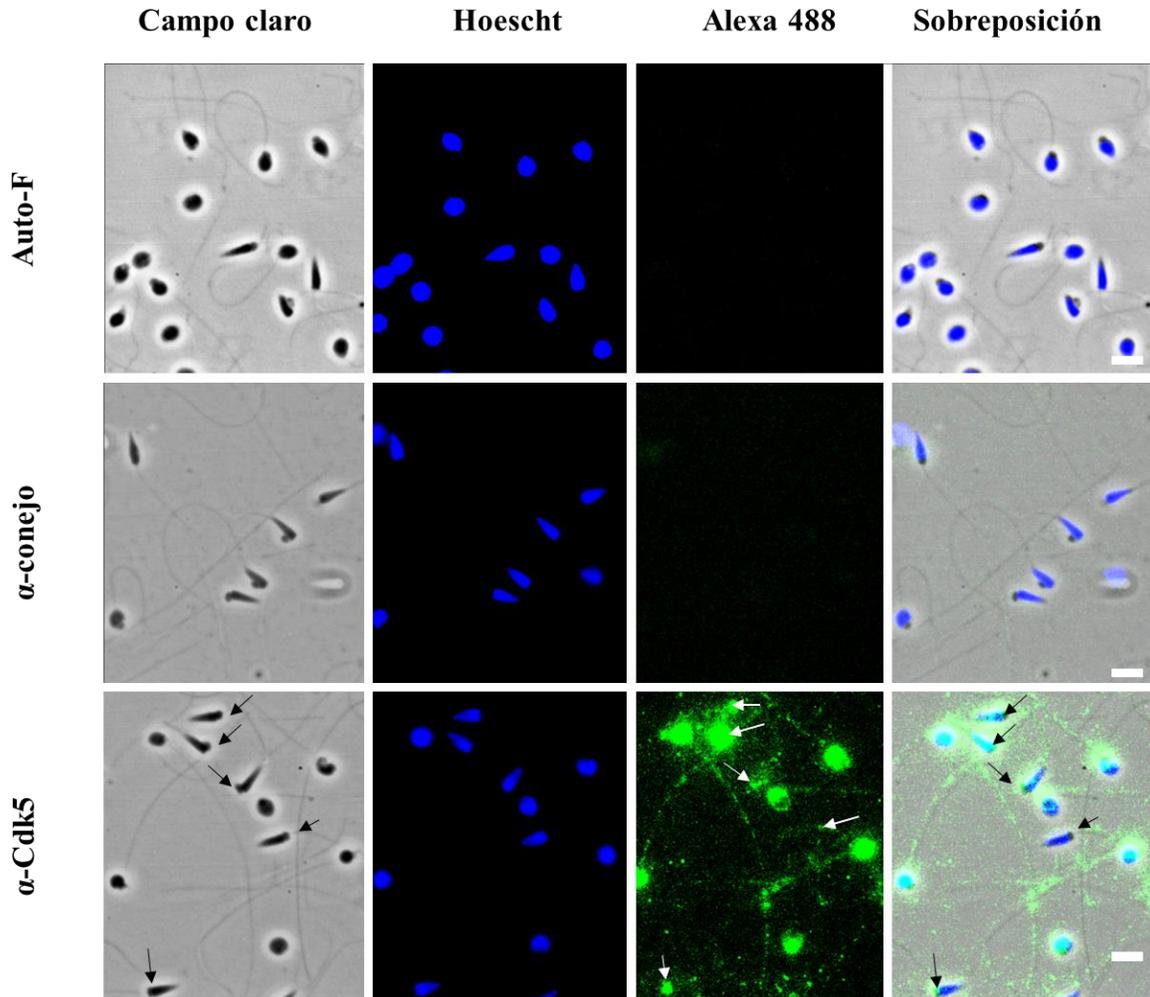


Figura 4. Cdk5 se inmunolocaliza en la mitocondria y en el flagelo de los eem de *L. pictus*. Imágenes de eem tomadas mediante microscopia de epifluorescencia. Campo claro (primera columna), fluorescencia de Hoescht (λ_{ex} 350 nm; segunda columna), Alexa 488 (λ_{ex} 470 nm; tercera columna) y sobreposición del campo claro con fluorescencia (cuarta columna). Las filas corresponden a: 1^{ra}, control de autofluorescencia (Auto-F); 2^{da}, control con anticuerpo secundario (α -conejo 1:200); 3^{ra}, α -Cdk5 (1:10). En el renglón de α -Cdk5 columnas de Alexa 488 y sobreposición, las flechas señalan el área de la mitocondria en el espermatozoide. La barra blanca en la esquina inferior derecha de cada cuadro equivale a 2 μ m. Se muestra un experimento representativo de n=3.

Posteriormente evaluamos la participación de Cdk5 en la motilidad de los eem con el inhibidor Roscovitina a las concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 25, 50, 75 y 100 μ M, y observamos una disminución significativa de la motilidad de los eem a partir de una concentración 5 μ M (Figura 5 y 6).

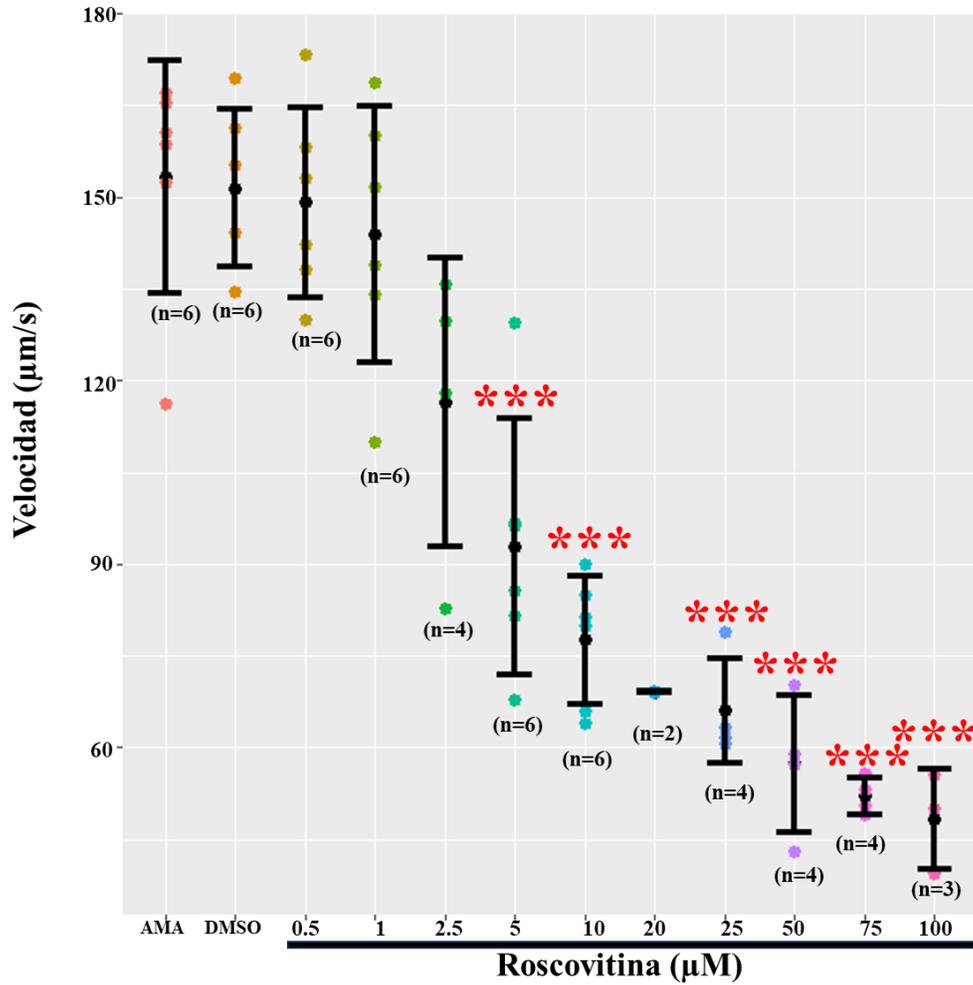


Figura 5. Cdk5 participa en la velocidad basal de los eem de *L. pictus*. Velocidades promedio registradas después de exponer a los eem en agua de mar artificial (AMA), conteniendo DMSO al 0.83% (diluyente de inhibidor) o Roscovitina (inhibidor de Cdk5), a las concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µM durante 10 min a 14°C. Se realizó prueba *Kruskal-Wallis* y posteriormente una prueba de *Conover*, entre las poblaciones de AMA, DMSO y Roscovitina, donde ***p < 0.0001 comparando con AMA. n: es el número de erizos empleados.

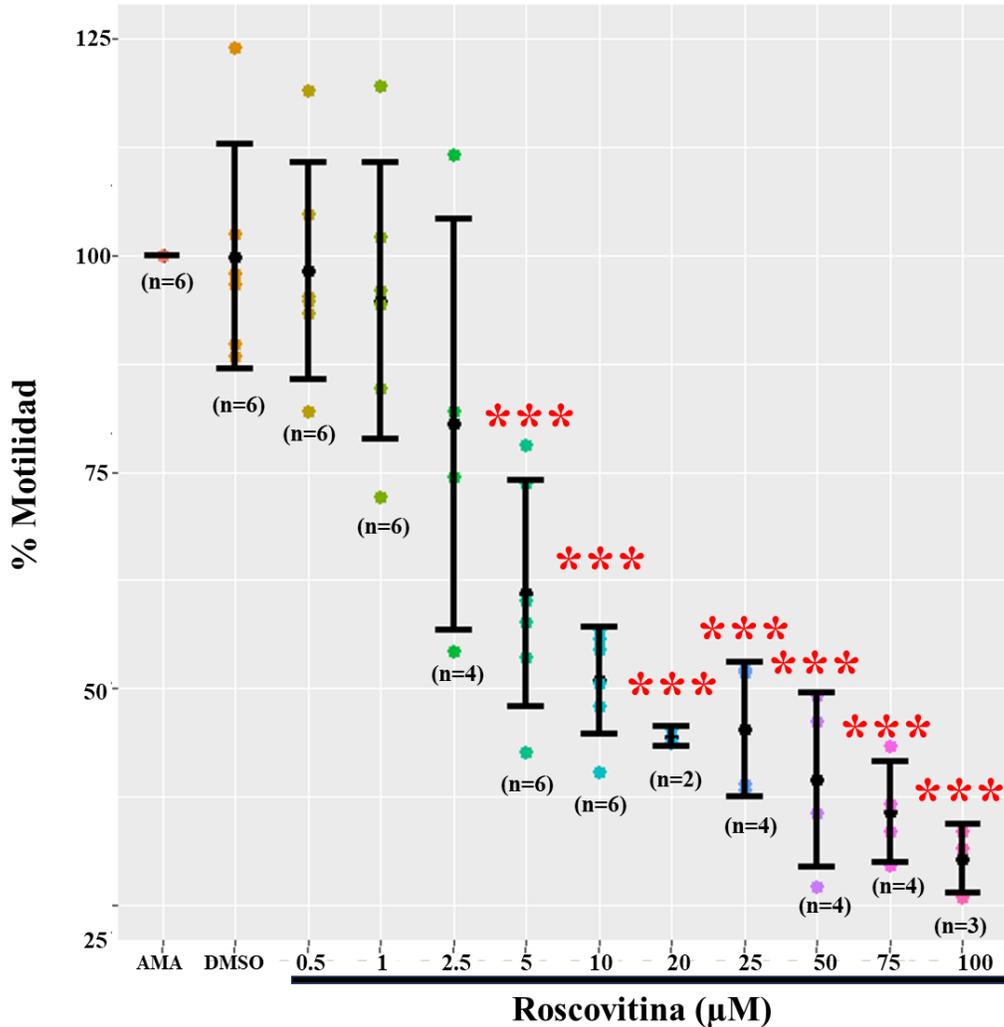


Figura 6. Cdk5 participa en la motilidad de los eem de *L. pictus*. Porcentajes de motilidad registrados después de exponer a los eem en agua de mar artificial (AMA), conteniendo DMSO al 0.83% (diluyente de inhibidor) o Roscovitina (inhibidor de Cdk5), a las concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 75 y 100 µM durante 10 min a 14°C. Se realizó prueba *Kruskal-Wallis* y posteriormente una prueba de *Conover*, entre las poblaciones de AMA, DMSO y Roscovitina, donde *** $p < 0.0001$ comparando con AMA. n: es el número de erizos empleados.

CKII está en flagelos de eem y participa en la motilidad basal

Como mencionamos en el resumen, CKII se detectó mediante análisis proteómico en balsas lipídicas de flagelos de eem *S. purpuratus* (Beltrán, 2019), y es una enzima que posee más sitios probables de fosforilación en proteínas de la cascada de señalización de Sperract después de PKA y PKC (Loza-Huerta et al., 2021). Debido a lo anterior, inicialmente hicimos experimentos de *Dot Blot* para confirmar su presencia. Los resultados obtenidos de los

experimentos de *Dot Blot* mostraron que a partir de una dilución de 1:125 de α -CKII, se detecta la enzima en ST de eem de *L. pictus* y en cabezas y flagelos de *S. purpuratus* (Figura 7).

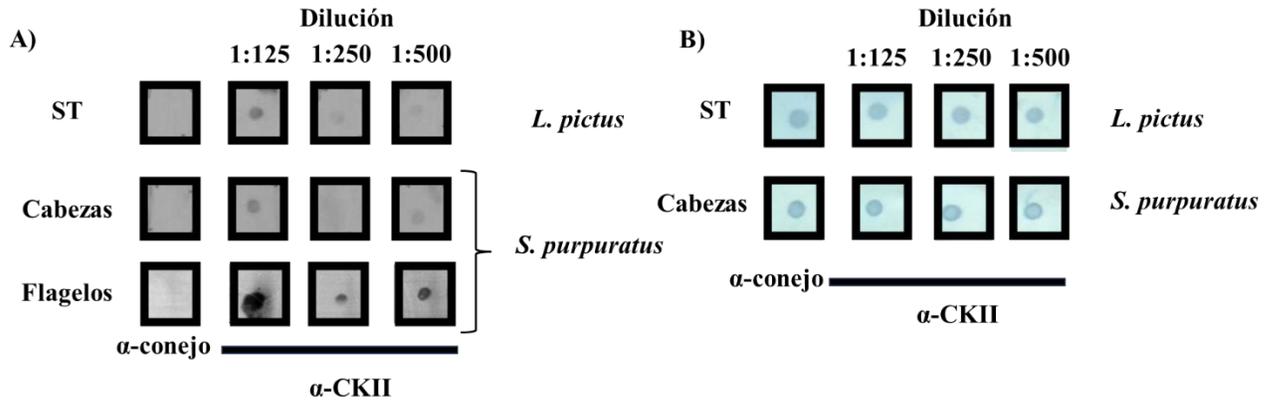


Figura 7. CKII está eem de *L. pictus* y de *S. purpuratus*. A) *Dot blot* de solubilizado total (ST) de eem de *L. pictus*, y cabezas y flagelos de eem de *S. purpuratus* con α -CKII 1:125, 1:250 y 1:500. El revelado se hizo con α -conejo-HRP diluido 1:10,000 (1^{era} columna), mismo que se usa como control de especificidad. B) Membranas de nitrocelulosa usadas en A, teñidas con negro de amido como control de carga de proteína. Se muestra un experimento representativo de n=2.

Una vez determinada la dilución a utilizar del anticuerpo contra CKII, realizamos experimento de *Western Blot*. La Figura 8A muestra que CKII (43 kDa) está tanto en ST (10 μ l) de eem de *L. pictus*, como en eem de *S. purpuratus*. En la Figura 8B podemos observar la banda correspondiente a CKII en muestras de flagelos completos (5 μ l) y en la Figura 8C y D, en sobrenadantes de membranas MID y TOP obtenidas por centrifugación a 200,000 $xg/30$ minutos.

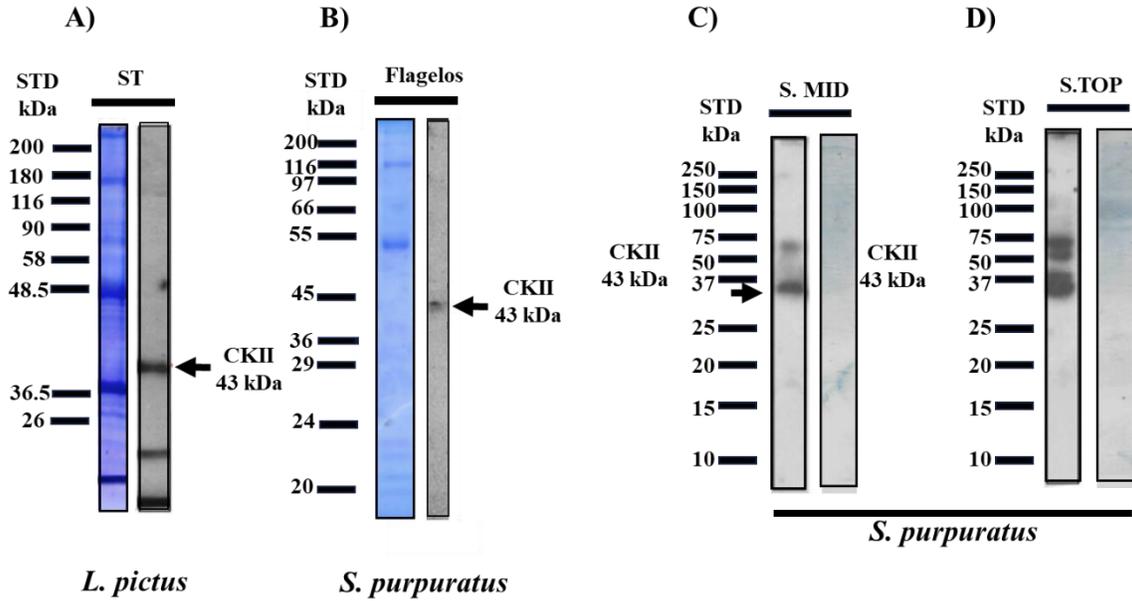


Figura 8. CKII está en los flagelos de eem de *L. pictus* y de *S. purpuratus*. Gel de PA-SDS teñido con azul de coomassie R250 (lado izquierdo) y *Western blot* (WB, lado derecho) con α -CKII 1:250 de ST de eem de *L. pictus* (A) y de flagelos de eem *S. purpuratus* (B). WB (lado izquierdo; con α -CKII 1:250) y membrana teñida con negro de amido (lado derecho; control de carga de proteína) de sobrenadantes (200,000 xg/30 minutos) de membranas MID (S.MID; C) y TOP (S.TOP; D). La flecha en los WBs, indica el peso molecular de CKII (43 kDa). Se muestra un experimento representativo de n=2.

Los resultados de tanto *Dot Blot* como *Western Blot* mostraron que CKII está en el eem, particularmente en los flagelos. Para ver la localización de CKII en la célula, realizamos experimentos de inmunofluorescencia en donde encontramos que la enzima se localiza a lo largo de los eem de *L. pictus*; en las áreas del acrosoma, la mitocondria y del flagelo (Figura 9).

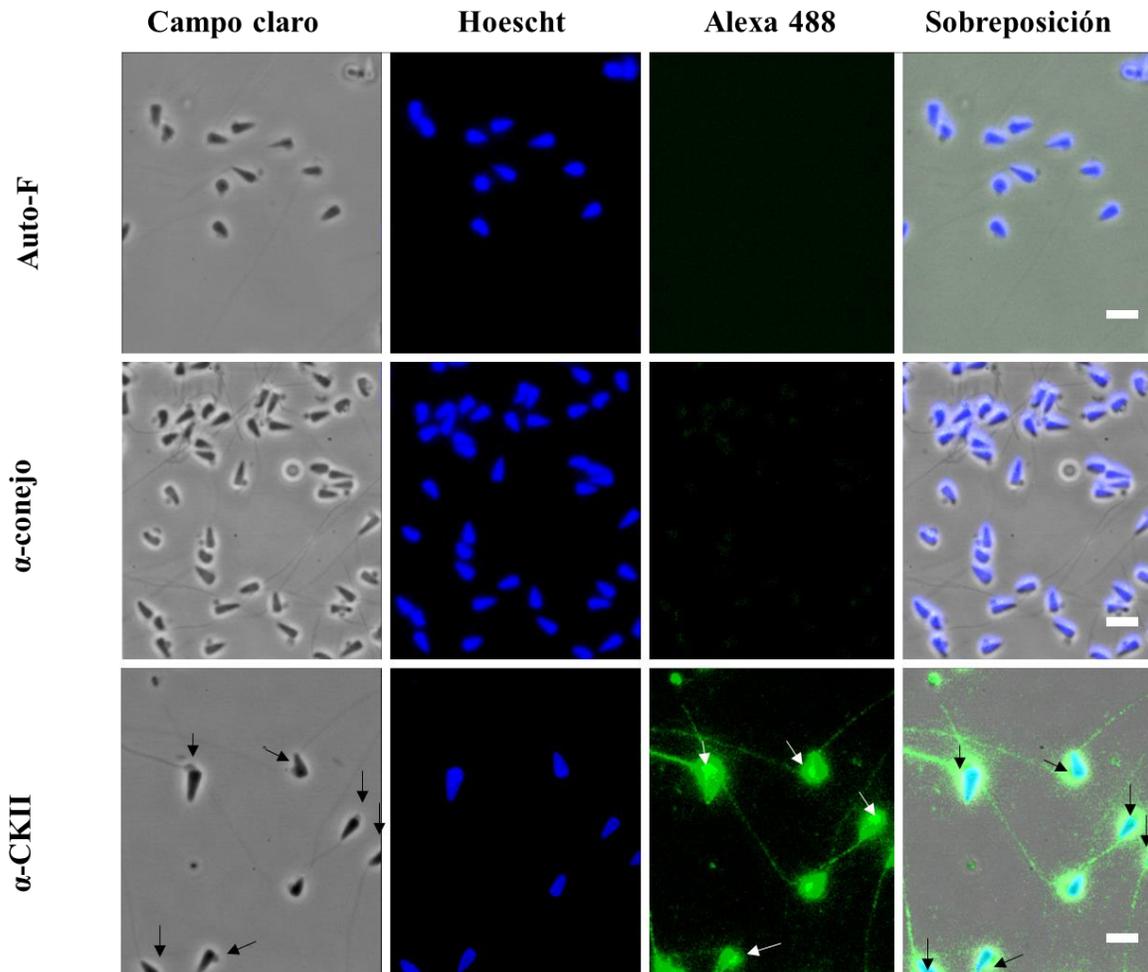


Figura 9. CKII se inmunolocaliza en el flagelo, acrosoma y mitocondria de los eem de *L. pictus*. Imágenes de eem tomadas mediante microscopia de epifluorescencia. Campo claro (primera columna), fluorescencia de Hoescht (λ_{ex} 350 nm; segunda columna), Alexa 488 (λ_{ex} 470 nm; tercera columna) y sobreposición del campo claro con fluorescencia (cuarta columna). Las filas corresponden a: 1^{ra}, control de autofluorescencia (Auto-F); 2^{da}, control con anticuerpo secundario (α -conejo 1:200); 3^{ra}, α -CKII (1:10). En el renglón de α -CKII columnas de Alexa 488 y sobreposición, las flechas señalan el área de la mitocondria en el espermatozoide. La barra blanca en la esquina inferior derecha de cada cuadro equivale a 2 μ m. Se muestra un experimento representativo de n=3.

Puesto que CKII está en el flagelo de los eem, finalmente evaluamos su participación en la motilidad exponiendo las células a CX-4945 (inhibidor de CKII). En los experimentos de motilidad (Figura 10 y 11) pudimos observar una disminución de la motilidad basal de los eem a partir de 10 μ M y una reducción de \sim 50% con 40 μ M del inhibidor. Lo anterior sugiere que CKII participa en la motilidad basal de los eem.

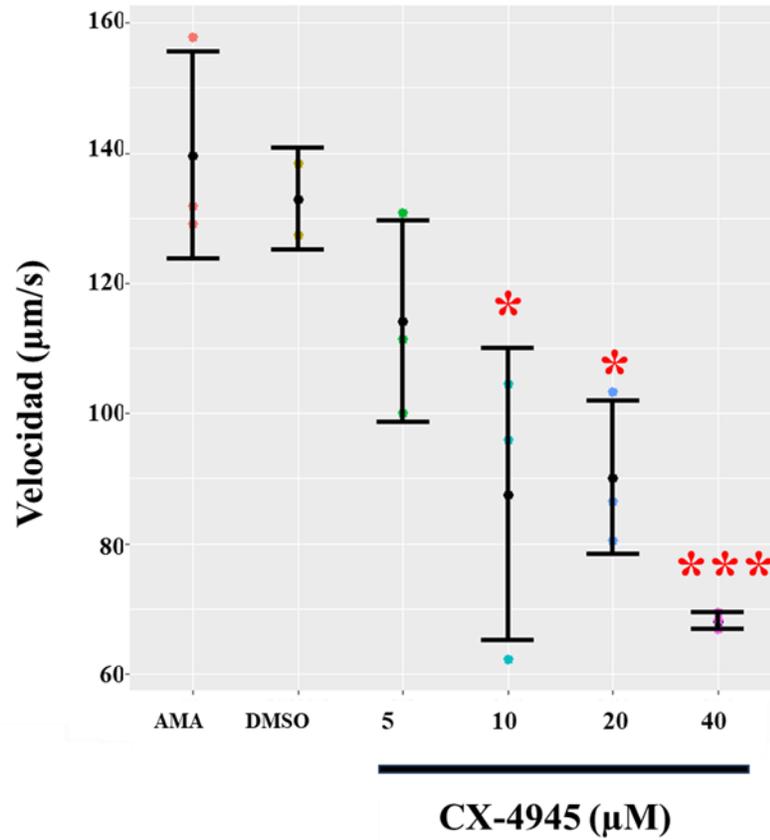


Figura 10. CKII participa en la velocidad basal de los eem de *L. pictus*. Velocidades promedio registradas después de exponer a los eem en agua de mar artificial (AMA), conteniendo DMSO al 0.04% (diluyente de inhibidor) o CX-4945 (inhibidor de CKII), a las concentraciones de 5, 10, 20 y 40 µM durante 8 min a 14°C. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía y posteriormente una prueba *post hoc* de Tukey, entre las poblaciones de AMA, DMSO y CX-4945, donde * $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ comparando con AMA, $n=3$.

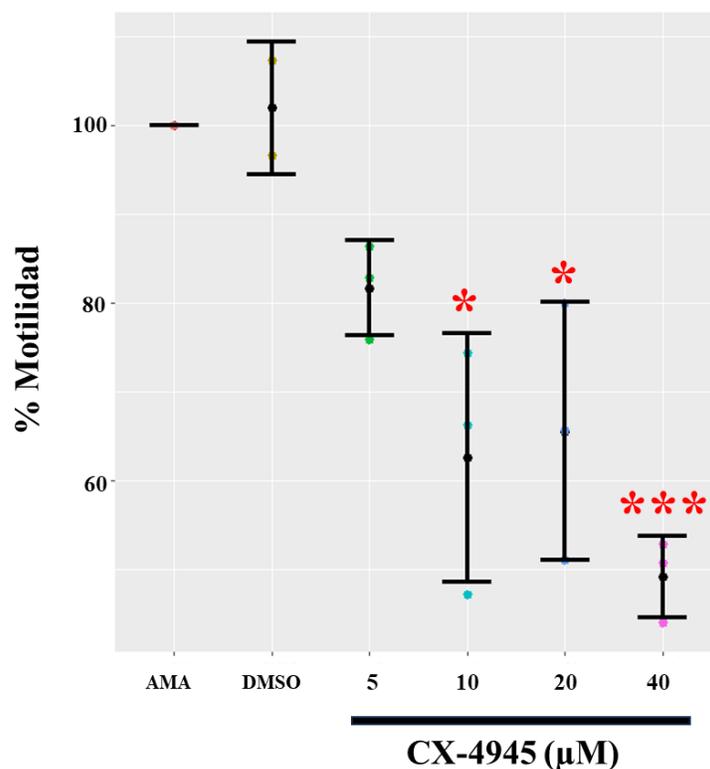


Figura 11. CKII participa en la motilidad de los eem de *L. pictus*. Porcentajes de motilidad registrados después de exponer a los eem en agua de mar artificial (AMA), conteniendo DMSO al 0.04% (diluyente de inhibidor) o CX-4945 (inhibidor de CKII), a las concentraciones de 5, 10, 20 y 40 µM durante 8 min a 14°C. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía y posteriormente una prueba *post hoc* de Tukey, entre las poblaciones de AMA, DMSO y CX-4945, donde * $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ comparando con AMA, $n=3$.

PKB se localiza en flagelos de eem pero no participa en la motilidad

Está reportado que PKB se inmunolocaliza en el flagelo de espermatozoide de caballo y que participa en la motilidad del espermatozoide de ratón (Gallardo *et al.*, 2014; Quan & Liu, 2016). Lo anterior sugiere que PKB podría tener una participación también en la motilidad de los eem. Inicialmente realizamos experimentos de *Dot Blot* y anti-PKB, en distintas fracciones de los eem. En la Figura 12A podemos observar señal en el solubilizado total (ST) de eem de *L. pictus* a partir de la dilución del anticuerpo, de 1:125, mientras que en el caso de las muestras de cabezas y membranas TOP provenientes de *S. purpuratus* observamos señal a partir de la dilución 1:250.

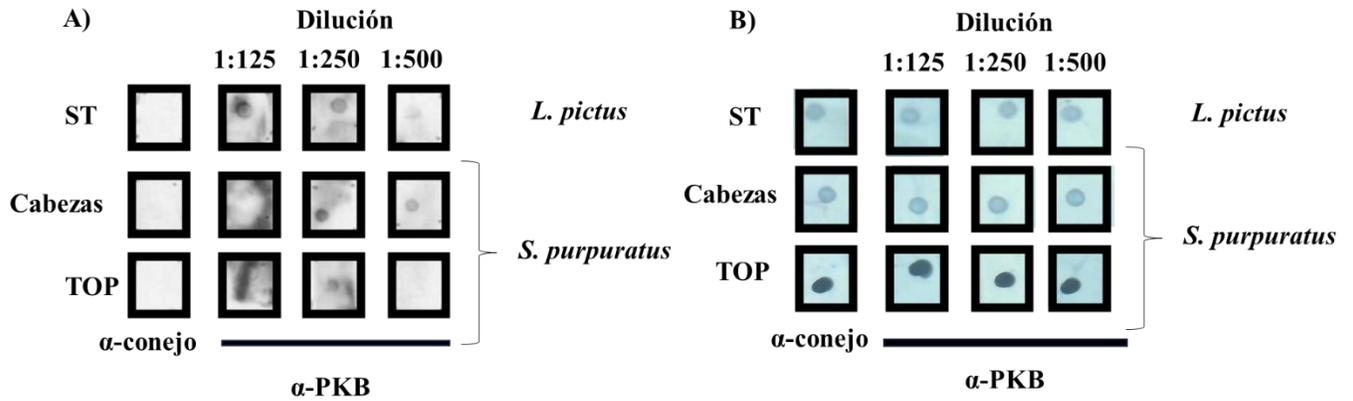


Figura 12. PKB está en eem de *L. pictus* y de *S. purpuratus*. A) *Dot blot* de solubilizado total (ST) de eem de *L. pictus*, y cabezas y membranas TOP de flagelos de eem de *S. purpuratus* con α -PKB 1:125, 1:250 y 1:500. El revelado se hizo con α -conejo-HRP diluido 1:10,000 (1^{era} columna), mismo que se usa como control de especificidad. B) Membranas de nitrocelulosa usadas en A, teñidas con negro de amido como control de carga de proteína. Se muestra un experimento representativo de n=2.

Debido a que encontramos a PKB en cabeza y en membranas TOP de flagelos de eem, realizamos experimentos para localizar esta enzima. Mediante experimentos de inmunofluorescencia encontramos que PKB está distribuida tanto en mitocondria como a lo largo del flagelo de los eem (Figura 13).

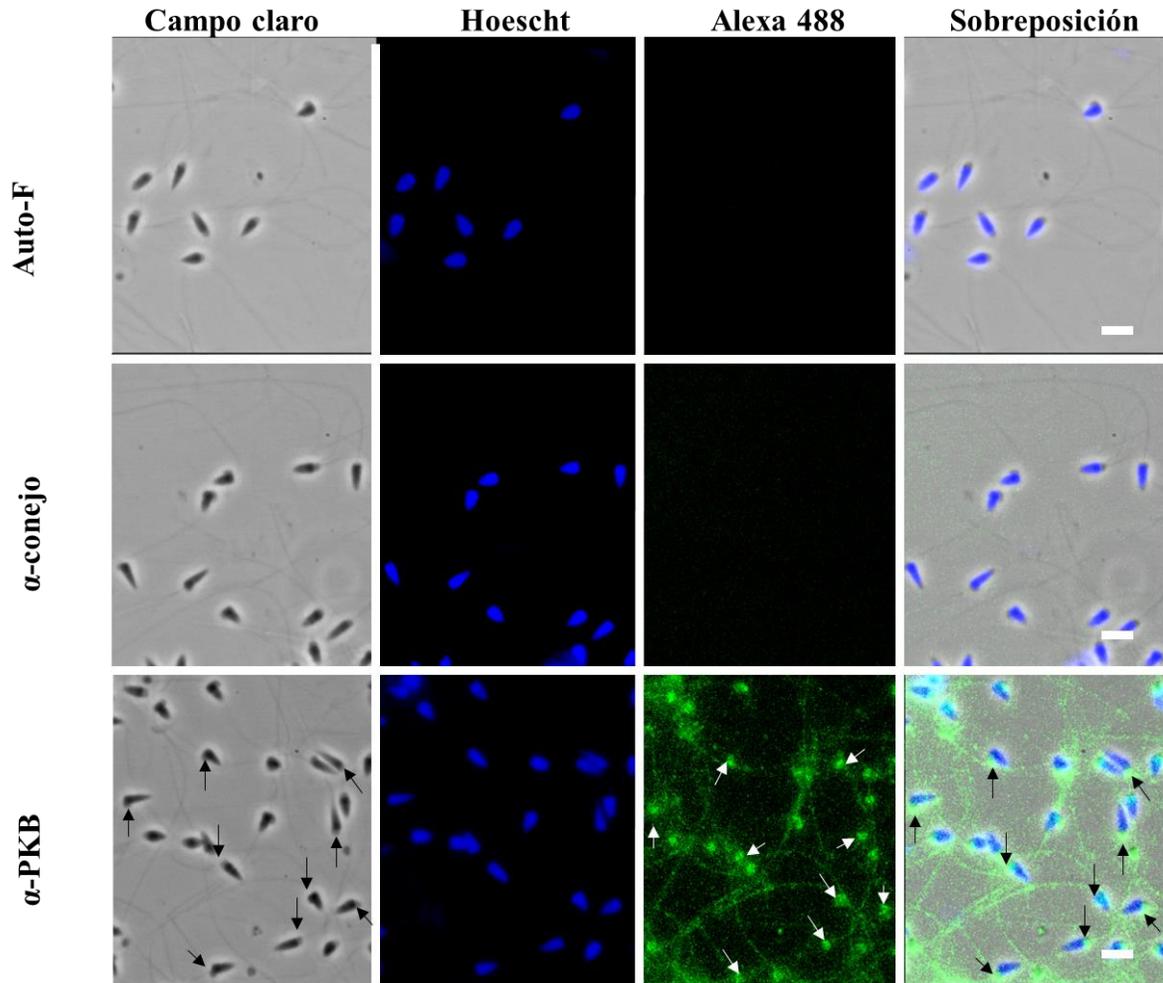


Figura 13. PKB se inmunolocaliza en el flagelo y mitocondria de los eem de *L. pictus*. Imágenes de eem tomadas mediante microscopia de epifluorescencia. Campo claro (primera columna), fluorescencia de Hoescht (λ_{ex} 350 nm; segunda columna), Alexa 488 (λ_{ex} 470 nm; tercera columna) y sobreposición del campo claro con fluorescencia (cuarta columna). Las filas corresponden a: 1^{ra}, control de autofluorescencia (Auto-F); 2^{da}, control con anticuerpo secundario (α -conejo 1:200); 3^{ra}, α -PKB (1:10). En el renglón de α -PKB columnas de Alexa 488 y sobreposición, las flechas señalan el área de la mitocondria en el espermatozoide. La barra blanca en la esquina inferior derecha de cada cuadro equivale a 2 μ m. Se muestra un experimento representativo de n=3.

Posteriormente realizamos experimentos de motilidad en donde observamos que no había una diferencia significativa en presencia del inhibidor de PKB, AZD5363 (1, 5, 15 y 30 μ M). Dado que este inhibidor tiene una IC_{50} de 8 nM, los resultados sugieren que PKB no participa en la motilidad basal de los eem (Figura 14 y 15).

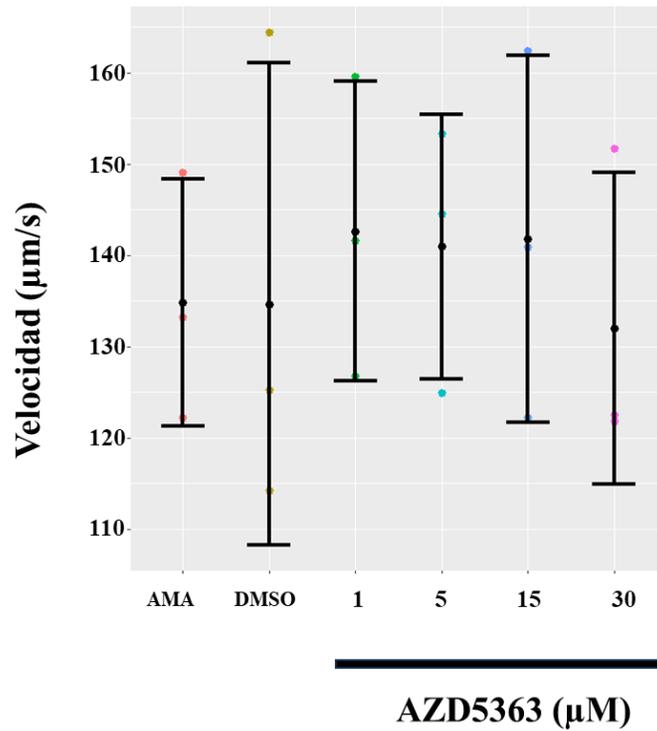


Figura 14. PKB no participa en la velocidad basal de los eem de *L. pictus*. Velocidades promedio registradas después de poner los eem en agua de mar artificial (AMA), con DMSO al 0.3 % (diluyente de inhibidor) o con AZD5363 (inhibidor de PKB), a las concentraciones 1, 5, 15 y 30 µM durante 8 min a 14°C. Se realizó prueba paramétrica de ANOVA de 1 vía y posteriormente una prueba post hoc de *Tukey* entre las poblaciones de AMA, DMSO y AZD5363, n=3.

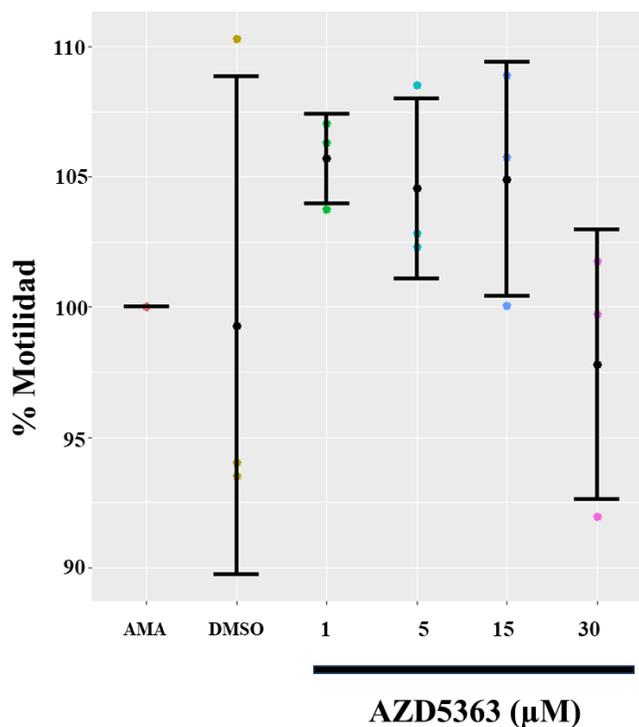


Figura 15. PKB no participa en la motilidad de los eem de *L. pictus*. Porcentajes de motilidad registrados después de poner los eem en agua de mar artificial (AMA), con DMSO al 0.3 % (diluyente de inhibidor) o con AZD5363 (inhibidor de PKB), a las concentraciones 1, 5, 15 y 30 µM durante 8 min a 14°C. Se realizó prueba paramétrica de ANOVA de 1 vía y posteriormente una prueba post hoc de *Tukey* entre las poblaciones de AMA, DMSO y AZD5363, n=3.

PP1 está en flagelos de eem pero no participa en la motilidad basal

Sabiendo por resultados de análisis proteómico que PP1 se encuentra en Balsas Lipídicas de eem de *S. purpuratus*, decidimos validar su presencia mediante experimentos de *Dot Blot* (Beltrán, 2019). La figura 16 muestra que hay señal en las membranas TOP de flagelos de la especie *S. purpuratus* a diluciones de 1:125-500, la cual disminuye al aumentar la dilución.

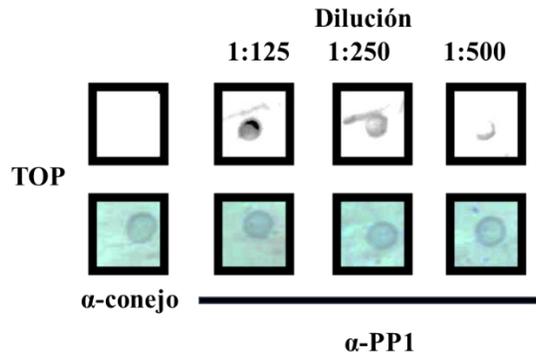


Figura 16. PP1 está en eem de *S. purpuratus*. A) *Dot blot* de las muestras de membranas de flagelos TOP de espermatozoide de *S. purpuratus* con α -PP1 1:125, 1:250 y 1:500. El revelado se hizo con α -conejo-HRP diluido 1:10,000 (1^{era} columna), mismo que se usa como control de especificidad. B) Membranas de nitrocelulosa usadas en A, teñidas con negro de amido como control de carga de proteína. Se muestra un experimento representativo de n=3.

Una vez que observamos mediante experimentos de *Dot Blot*, que la PP1 está en los flagelos de eem de *S. purpuratus*, procedimos a realizar experimentos de inmunofluorescencia, en los que observamos que PP1 se encuentra en la mitocondria y flagelo de los espermatozoides (Figura 17).

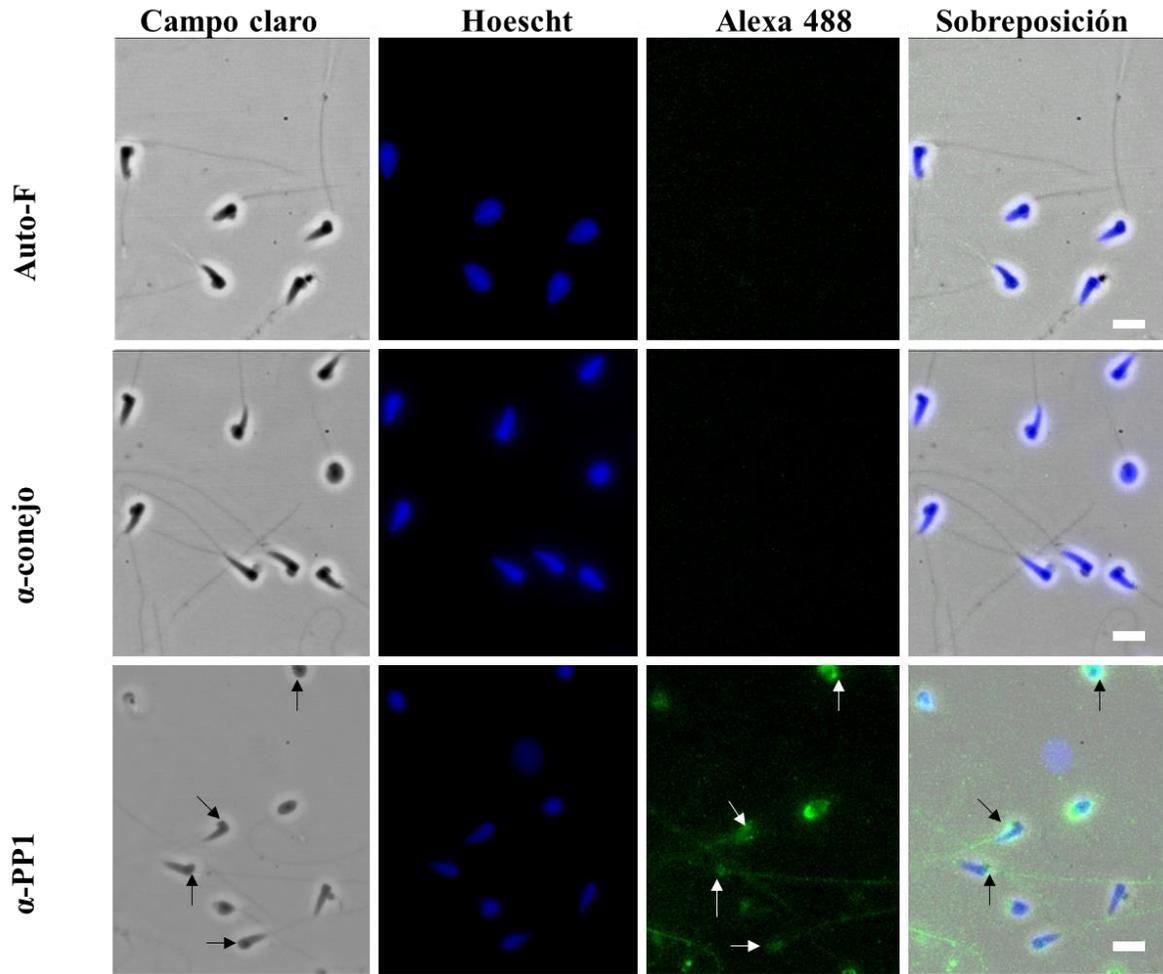


Figura 17. PP1 se inmunolocaliza en el flagelo y mitocondria de los eem de *L. pictus*. Imágenes de eem tomadas mediante microscopia de epifluorescencia. Campo claro (primera columna), fluorescencia de Hoescht (λ_{ex} 350 nm; segunda columna), Alexa 488 (λ_{ex} 470 nm; tercera columna) y sobreposición del campo claro con fluorescencia (cuarta columna). Las filas corresponden a: 1^{ra}, control de autofluorescencia (Auto-F); 2^{da}, control con anticuerpo secundario (α -conejo 1:200); 3^{ra}, α -PP1 (1:10). En el renglón de α -PP1 columnas de Alexa 488 y sobreposición, las flechas señalan el área de la mitocondria en el espermatozoide. La barra blanca en la esquina inferior derecha de cada cuadro equivale a 2 μm . Se muestra un experimento representativo n=3.

Finalmente procedimos a evaluar la participación de la PP1 en la motilidad en presencia del inhibidor Caliculina A (31, 100, 316 y 1000 nM), sin embargo, no observamos una diferencia significativa entre el control y la concentración más alta utilizada de 1000 nM del inhibidor mencionado. Es importante aclarar que la IC_{50} de la Caliculina A es de 2 nM para PP1, por lo que los resultados sugieren que PP1 no participa en la motilidad basal de los eem (Figura 18 y 19).

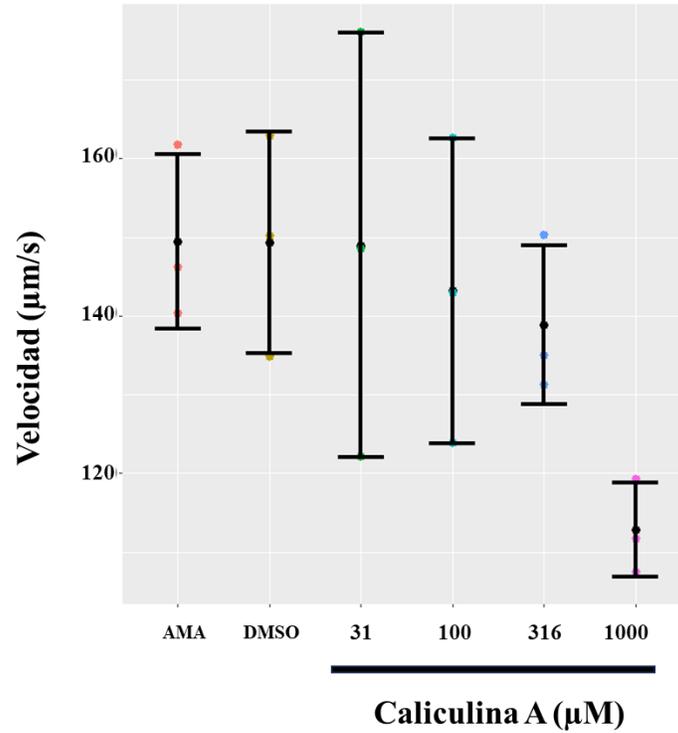


Figura 18. PP1 no participa en la velocidad basal de los eem de *L. pictus*. Velocidades promedio registradas después de poner los eem en agua de mar artificial (AMA), con DMSO al 1 % (diluyente del inhibidor) o con Caliculina A (inhibidor de PP1), a las concentraciones 31, 100, 316 y 1000 nM. Se realizó prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* y posteriormente una prueba post hoc de *Conover* entre las poblaciones de AMA, DMSO y Caliculina A, n=3.

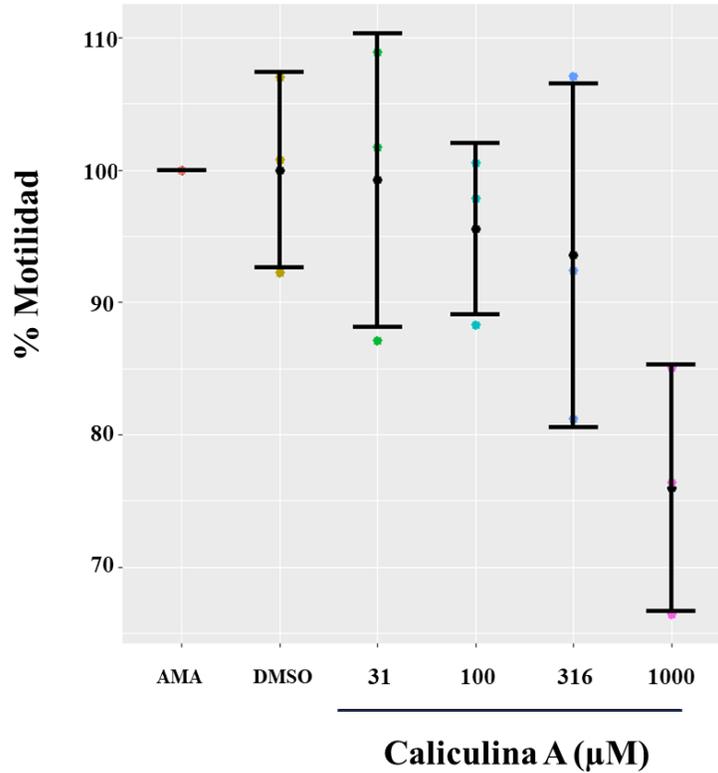


Figura 19. PP1 no participa en la motilidad de los eem de *L. pictus*. Porcentajes de motilidad registrados después de poner los eem en agua de mar artificial (AMA), con DMSO al 1 % (diluyente del inhibidor) o con Caliculina A (inhibidor de PP1), a las concentraciones 31, 100, 316 y 1000 nM. Se realizó prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* y posteriormente una prueba post hoc de *Conover* entre las poblaciones de AMA, DMSO y Caliculina A, n=3.

PP2A está en eem y se localiza en cabeza y flagelo, pero no participa en la motilidad basal

PP2A fue reportada en balsas lipídicas de flagelos de eem de *S. purpuratus* (Beltrán, 2019) mediante experimentos de proteómica, así que hicimos experimentos de *Dot Blot* para validar la expresión de esta enzima en dichas células. Los resultados obtenidos mostraron que a partir de una dilución 1:250 de α -PP2A observamos señal en muestras de ST procedente de eem *L. pictus* y en muestras de cabezas y membranas MID y TOP de flagelos de espermatozoides de *S. purpuratus* (Figura 20).

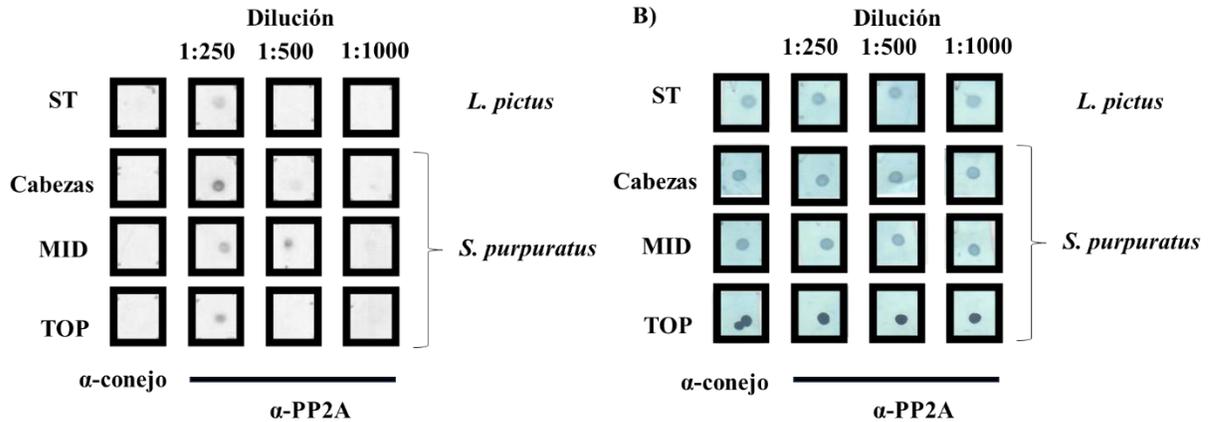


Figura 20. PP2A está en eem de *L. pictus* y de *S. purpuratus*. A) *Dot blot* de solubilizado total (ST) de eem de *L. pictus*, y de cabezas, membranas de flagelos TOP y MID de eem de *S. purpuratus*. con α -PP2A 1:250, 1:500 y 1:1000. El revelado se hizo con α -conejo-HRP diluido 1:10,000 (1^{era} columna), mismo que se usa como control de especificidad B) Membranas de nitrocelulosa usadas en A, teñidas con negro de amido como control de carga de proteína. Se muestra un experimento representativo de n=2.

Debido a la alta distribución de PP2A en las muestras de eem, decidimos realizar experimentos de *Western Blot*. Encontramos que PP2A se mantuvo en muestras de cabeza y flagelo de eem de *L. pictus* y en membranas MID y TOP de flagelos de eem de *S. purpuratus* como en sus respectivos sobrenadantes (Figura 21A), estos resultados sugieren que PP2A podría participar en la motilidad del eem.

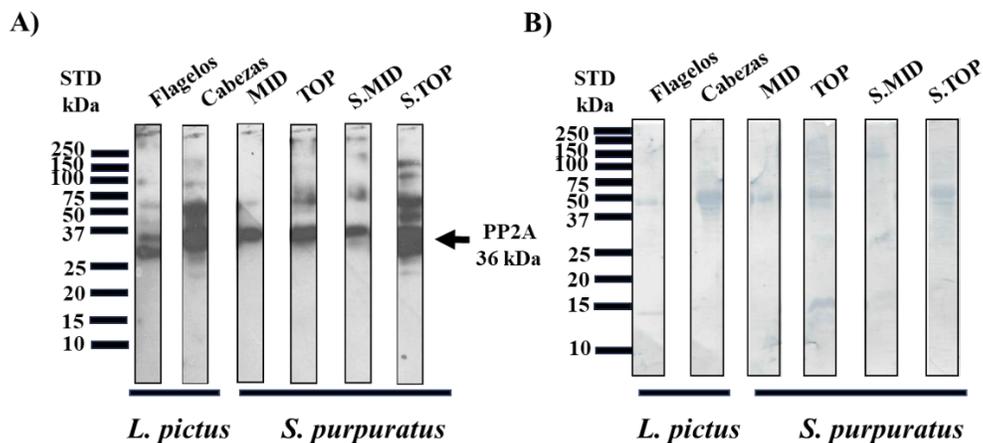


Figura 21. PP2A está en flagelos y de *S. purpuratus*. A) *Western blot* con α -PP2A 1:500 de flagelos y cabezas de eem de *L. pictus*, y de membranas MID, membranas TOP, sobrenadantes de membranas MID (S.MID) y sobrenadantes de membranas TOP (S.TOP) de flagelos de eem de *S. purpuratus*, ambos sobrenadantes obtenidos de una centrifugación a 200, 000 xg/30 min. Del lado derecho a A se indica el peso molecular de

PP2A (36 kDa). B) Membranas usadas en A teñidas con negro de amido como control de carga de las proteínas electro-transferidas. Se muestra un experimento representativo de n=2.

Puesto que confirmamos la presencia de PP2A en eem, procedimos a localizarla mediante experimentos de inmunofluorescencia. La Figura 22 muestra que PP2A está tanto en mitocondrias como en flagelos de eem de *L. pictus*.

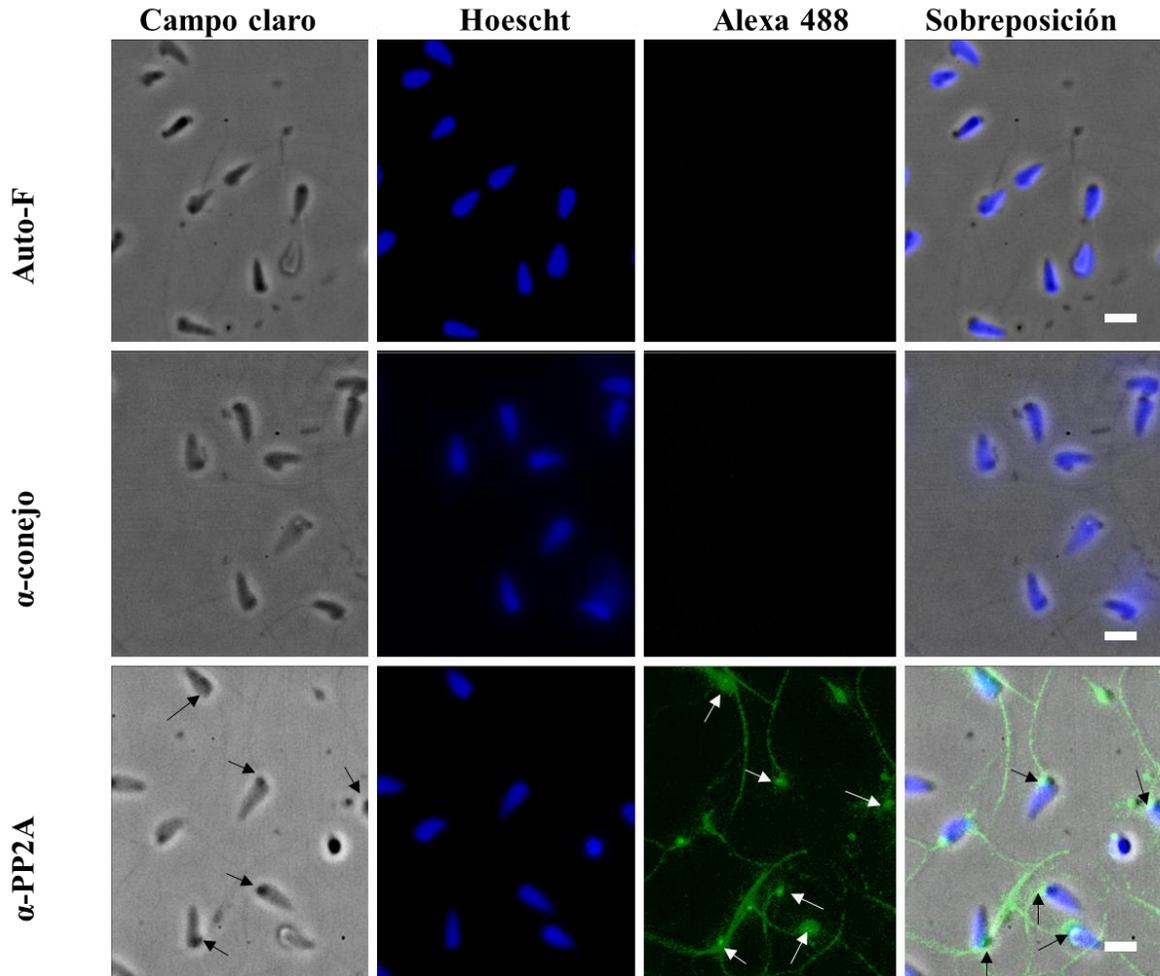


Figura 22. PP2A se inmunolocaliza en el flagelo y mitocondria de los eem de *L. pictus*. Imágenes de eem tomadas mediante microscopia de epifluorescencia. Campo claro (primera columna), fluorescencia de Hoescht (λ_{ex} 350 nm; segunda columna), Alexa 488 (λ_{ex} 470 nm; tercera columna) y sobreposición del campo claro con fluorescencia (cuarta columna). Las filas corresponden a: 1^{ra}, control de autofluorescencia (Auto-F); 2^{da}, control con anticuerpo secundario (α -conejo 1:200); 3^{ra}, α -PP2A (1:25). En el renglón de α -PP2A columnas de Alexa 488 y sobreposición, las flechas señalan el área de la mitocondria en el espermatozoide. La barra blanca en la esquina inferior derecha de cada cuadro equivale a 2 μ m. Se muestra un experimento representativo n=3.

Finalmente hicimos experimentos de motilidad en donde incluso con 5 μM del inhibidor de PP2A, Ácido Okadaico (0.05, 1, 2 y 5 μM), el cual tiene una IC_{50} de 1.2 nM, no observamos una inhibición. Nuestros resultados sugieren que, PP2A no participa en la motilidad basal de los espermatozoides de *L. pictus* (Figura 23 y 24).

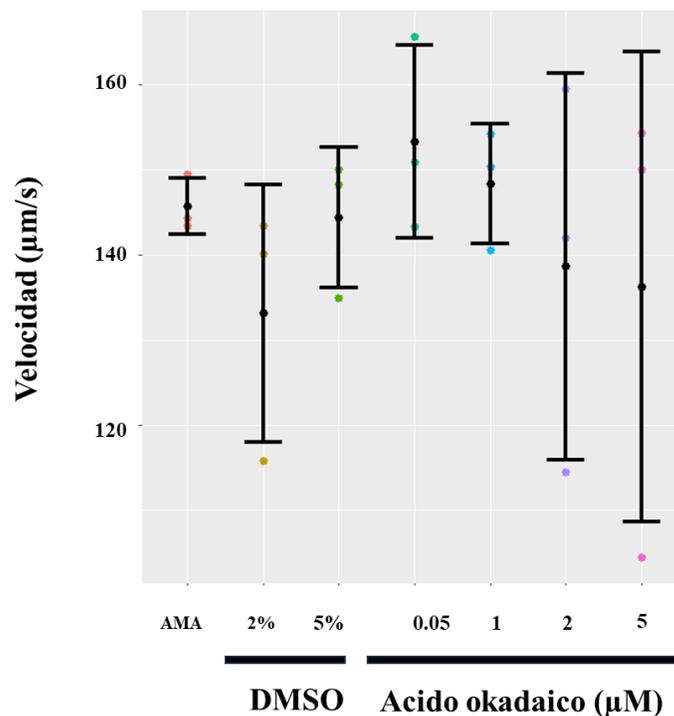


Figura 23. PP2A no participa en la velocidad basal de los eem de *L. pictus*. Velocidades promedio registradas después de poner los eem en AMA, con DMSO al 2 % (diluyente del inhibidor) o con ácido okadaico (inhibidor de PP2A), a las concentraciones 0.5, 1, 2 y 5 μM . Se realizó prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* y posteriormente una prueba post hoc de *Conover* entre las poblaciones de AMA, DMSO y Acido okadaico, $n=3$.

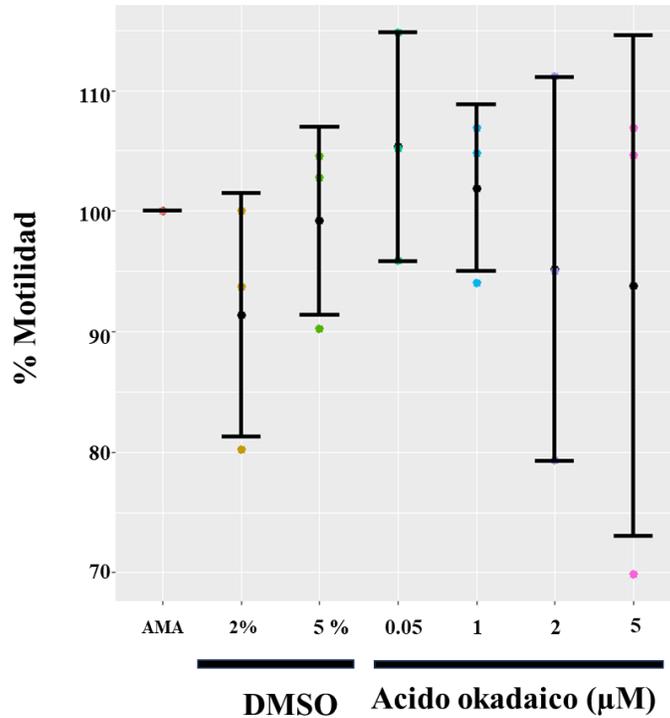


Figura 24. PP2A no participa en la motilidad de los eem de *L. pictus*. Porcentajes de motilidad registrados después de poner los eem en AMA, con DMSO al 2 % (diluyente del inhibidor) o con ácido okadaico (inhibidor de PP2A), a las concentraciones 0.5, 1, 2 y 5 μ M. Se realizó prueba no paramétrica de *Kruskal-Wallis* y posteriormente una prueba post hoc de *Conover* entre las poblaciones de AMA, DMSO y Acido okadaico, $n=3$.

DISCUSIÓN

Como se mencionó con anterioridad la fosforilación es un mecanismo importante para que el eem pueda nadar, encontrarse con el óvulo homólogo y fecundarlo. La identificación de enzimas encargadas de este proceso nos puede brindar información sobre su participación en otros procesos aun no descritos en este modelo. El hecho de que las cinasas Cdk5, CKII, PKB y las fosfatasa PP1 y PP2A se encuentren en modelos tan diversos, nos habla de posibles mecanismos que se han preservado a lo largo de millones de años. En el caso de Cdk5 se sabe que se encuentra en solubilizado total del espermatozoide de cerdo (Lackey & Gray, 2015) y que fosforila las fibras densas externas del flagelo del espermatozoide de rata (Rosales *et al.*, 2004). En este proyecto detectamos a Cdk5 tanto en solubilizas totales como en cabezas de eem de *S. purpuratus* (Figura 3) mediante experimentos de *Dot Blot*, y la inmunolocalizamos en flagelos de eem de *L. pictus* (Figura 4), además de que demostramos

que participa en la motilidad basal de los eem. Para complementar estos resultados se deben de realizar experimentos de *Western Blot*. Así mismo se deben realizar experimentos de motilidad con el inhibidor de cdk5, p21. En el caso de CKII pudimos observar que se encuentra en sobrenadantes de membranas TOP y MID de flagelos (Figura 8) y que se inmunolocaliza en las mitocondrias y en los flagelos de los eem de *L. pictus* (Figura 9), además de participar en la motilidad basal (Figura 10 y 11). Es importante mencionar que CKII se regula por PKC (Lee *et al.*, 2016), otra cinasa que también participa en la motilidad basal del eem (Loza-Huerta *et al.*, 2021). Se sabe que la inhibición de PKB disminuye la motilidad del espermatozoide de ratón (Quan & Liu, 2016), y que se localiza en la pieza media del espermatozoide de caballo (Gallardo *et al.*, 2014). De manera similar mediante experimentos de *Dot Blot*, encontramos a PKB en muestras de cabezas y membranas TOP de flagelo, y corroboramos su presencia en los flagelos de los eem mediante experimentos de inmunofluorescencia (Figura 13). El hecho de encontrar a PKB membranas TOP de flagelo, y de que tenga α -hélices, sugiere que la cinasa podría ser transmembranal o bien estar unida covalentemente a la membrana. Además, mostramos que el inhibidor de la PKB no tiene efecto en la motilidad de los eem lo cual sugiere que esta enzima no participa en la motilidad (Figura 14 y 15). Es importante corroborar estos resultados realizando experimentos complementarios con MK-2206, otro inhibidor de PKB (Valero *et al.*, 2016). ya que se sabe que PKB se activa por CKII (Di Maira *et al.*, 2005). En el caso de las fosfatasa PP1 y PP2A se sabe que se localizan en la pieza media del flagelo del espermatozoide de humano (Signorelli *et al.*, 2013), nosotros encontramos que PP1 está en vesículas de membranas de flagelo TOP (Figura 16) del flagelo del eem de *S. purpuratus* y que PP2A está ampliamente distribuida en ST, cabezas, flagelos, membranas MID y TOP (Figura 20 y 21) así como en sus respectivos sobrenadantes (Figura 21). Aunque ambas fosfatasas las inmunolocalizamos en mitocondria y en el flagelo del eem (Figura 17 y 22), nuestros resultados utilizando solo un inhibidor para cada fosfatasa, sugieren que ninguna de ellas participa en la motilidad basal de los eem (Figura 18-19 y 23-24). Es importante evaluar la participación de PP1 en la motilidad de los eem también con otro inhibidor específico llamado Tautomicina, debido a que PP1 posee sitios predichos de fosforilación por PKA, que también participa en la regulación de la motilidad basal del eem (Loza-Huerta *et al.*, 2021). Además, nuestros resultados validan la presencia de PPI en el flagelo identificada a nivel molecular mediante

análisis proteómico en Balsas Lipídicas derivadas de flagelos aislados de eem (Beltrán, 2019). Así mismo se sabe que PP2A es regulada por CKII (Heriche *et al.*, 1997), por lo que hay que hacer experimentos de motilidad con otro inhibidor de PP2A llamado Citostatina. Cabe aclarar que, el hecho de que las enzimas PKB, PP1 y PP2A aparentemente no participan en la motilidad basal de los eem, no descarta la posibilidad de que lo hagan en la motilidad estimulada como es el caso de la quimiotaxis, la cual es inducida por Speract, el péptido regulador de la motilidad estimulada (García-Rincón *et al.*, 2016). Como mencionamos en la introducción (Tabla 2), las enzimas en las cuales enfocamos este proyecto tienen sitios predichos de fosforilación en varias de las proteínas de la cascada de señalización que dispara la unión del Speract a su receptor en el flagelo del eem. Lo anterior indica la importancia de evaluar la participación de las cinasas Cdk5, CKII, PKB y de las fosfatasas PP1 y PP2A en la quimiotaxis de los eem.

CONCLUSIONES

- En este proyecto mediante experimentos de *Dot Blot* y *Western Blot*, encontramos que Cdk5, CKII, PKB, PP1 y PP2A están en muestras tanto de eem *S. purpuratus*, como de *L. pictus*.
- Cdk5, CKII, PKB, PP1 y PP2A se localizan en el flagelo y mitocondria de los eem de *L. pictus*.
- CKII además está en la región acrosomal.
- Cdk5 y CKII participan en el nado basal del eem.

PERSPECTIVAS

- Evaluar la participación de las cinasas Cdk5 (Inhibidor, p21) y CKII (Inhibidor, W16) en la motilidad basal de los eem.

- Determinar la participación de las enzimas PKB (Inhibidores, AZD5363 y MK-2206), PP1 (Inhibidores, Caliculina A y Tautomocina) y PP2A (Inhibidores, Ácido Okadaico y Citostatina) tanto en la motilidad basal como en la quimiotaxis de los eem, con los inhibidores indicados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alberts B. Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed., p. 1392). New York Garland Science.
- Ángeles-Salazar J. D. (2021). Participación de CatSper y de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) en la quimiotaxis del espermatozoide de erizo de mar (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Audesirk, T., Audesirk, G. & Byers, B (2013). *Biología. La vida en la Tierra Con fisiología* (9^{na} ed., p. 793). Pearson Educación de México, S.A de C.V., México, 2013.
- Beltrán, C., Vacquier, V. D., Moy, G., Chen, Y., Buck, J., Levin, L. R., & Darszon, A. (2007). Particulate and soluble adenylyl cyclases participate in the sperm acrosome reaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(4), 1128–1135.
- Beltrán, C. (2019). ADENOSINA 3',5'-MONOFOSFATO CÍCLICO EN LA FISIOLÓGÍA DEL ESPERMATOZOIDE DEL ERIZO DE MAR. *El espermatozoide: una mirada desde Mexico*, 60–90.
- Bookbinder, L. H., Moy, G. W., & Vacquier, V. D. (1990). Identification of sea urchin sperm adenylyl cyclase. *Journal of Cell Biology*, 111(5), 1859–1866.
- Breitbart, H., Lax, J., Rotem, R., & Naor, Z. (1992). Role of protein kinase C in the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Biochemical Journal*, 281(2), 473–476.
- Brokaw, C. J. (1979). Calcium-induced asymmetrical beating of triton-demembrated sea urchin sperm flagella. *The Journal of Cell Biology*, 82(2), 401–411.
- Brokaw, C. J. (2009). Thinking about flagellar oscillation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(8), 425–436.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(13), 7847–7851.

- Chakrabarti, R., Cheng, L., Puri, P., Soler, D., & Vijayaraghavan, S. (2007). Protein phosphatase PP1 γ 2 in sperm morphogenesis and epididymal initiation of sperm motility. *Asian Journal of Andrology*, 9(4), 445–452.
- Christen, R., Schackmann, W., & Shapiro, M. (1982). Elevation of the Intracellular pH Activates Respiration and Motility of Sperm of the Sea Urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* *, 257(24), 14881–14890.
- Christen, R., Schackmann, R. W., & Dahlquist, F. W. (1983). Short note, 289–294.
- Christen, R., Schackmann, R. W., & Shapiro, B. M. (1986). Ionic regulation of sea urchin sperm motility, metabolism and fertilizing capacity. *The Journal of Physiology*, 379(1), 347–365.
- Chung, J. J., Miki, K., Kim, D., Shim, S. H., Shi, H. F., Hwang, J. Y., ... Clapham, D. E. (2017). Catsper γ regulates the structural continuity of sperm ca²⁺ signaling domains and is required for normal fertility. *ELife*, 6, 1–25.
- Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., ... Ullrich, A. (1986). Multiple, Distinct Forms of Bovine and Human Protein Kinase C Suggest Diversity in Cellular, 3702(July).
- Darszon, A., Labarca, P., Beltrán, C., García-Soto, J., & Liévano, A. (1994). Sea Urchin Sperm: An Ion Channel Reconstitution Study Case. *Methods*, 6(1), 37–50.
- Darszon, A., Guerrero, A., Galindo, B. E., Nishigaki, T., & Wood, C. D. (2008). Sperm-activating peptides in the regulation of ion fluxes, signal transduction and motility. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 595–606.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. (2010). CALCIUM CHANNELS IN THE DEVELOPMENT, MATURATION, AND FUNCTION OF SPERMATOOZOA, 1305–1355.
- Davies, B. R., Greenwood, H., Dudley, P., Crafter, C., Yu, D. H., Zhang, J., Li, J., Gao, B., Ji, Q., Maynard, J., Ricketts, S. A., Cross, D., Cosulich, S., Chresta, C. C., Page, K., Yates, J., Lane, C., Watson, R., Luke, R., ... Pass, M. (2012). Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: Pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(4), 873–887.
- Di Maira, G., Salvi, M., Arrigoni, G., Marin, O., Sarno, S., Brustolon, F., Pinna, L. A., & Ruzzene, M. (2005). Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death & Differentiation*, 12(6), 668–677.
- Dudiki, T., Kadunganattil, S., Ferrara, J. K., Kline, D. W., & Vijayaraghavan, S. (2015). Changes in carboxy methylation and tyrosine phosphorylation of protein phosphatase

- PP2A are associated with epididymal sperm maturation and motility. *PLoS ONE*, 10(11), 1–18.
- Espinal-Enríquez, J., Darszon, A., Guerrero, A., & Martínez-Mekler, G. (2014). In Silico Determination of the Effect of Multi-Target Drugs on Calcium Dynamics Signaling Network Underlying Sea Urchin Spermatozoa Motility. *PLoS ONE*, 9(8), e104451.
- Espinal-Enríquez, J., Priego-Espinosa, D. A., Darszon, A., Beltrán, C., & Martínez-Mekler, G. (2017). Network model predicts that CatSper is the main Ca²⁺ channel in the regulation of sea urchin sperm motility. *Scientific Reports*, 7(1), 4236.
- Esposito, G., Jaiswal, B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A. M., Robben, T. J. A. A., Strik, A. M., ... Gossen, J. A. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(9), 2993–2998.
- Etkovitz, N., Rubinstein, S., Daniel, L., & Breitbart, H. (2007). Role of PI3-kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, 77(2), 263–273.
- Fayard, E., Xue, G., Parcellier, A., Bozulich, L., & Hemmings, B. A. (2010). Protein Kinase B (PKB/Akt), a Key Mediator of the PI3K Signaling Pathway. In *Assessment & Evaluation in Higher Education* Vol. 37, pp. 31–56.
- Fisher, H. M., Brewis, I. A., Barratt, C. L. R., Cooke, I. D., & Moore, H. D. M. (1998). Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. *Molecular Human Reproduction*, 4(9), 849–855.
- García-Rincón, J., Darszon, A., & Beltrán, C. (2016). Speract, a sea urchin egg peptide that regulates sperm motility, also stimulates sperm mitochondrial metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(4), 415–426.
- Gallardo Bolaños, J. M., Balao Da Silva, C. M., Martín Muñoz, P., Morillo Rodríguez, A., Plaza Dávila, M., Rodríguez-Martínez, H., ... Peña, F. J. (2014). Phosphorylated AKT preserves stallion sperm viability and motility by inhibiting caspases 3 and 7. *Reproduction*, 148(2), 221–235.
- Garbers, D. L., First, N. L., Gorman, S. K., & Lardy, H. A. (1973). The Effects of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Inhibitors on Ejaculated Porcine Spermatozoan Metabolism. *Bor*, 8, 599-606.
- Garbers, D. L., Janette Tubb, D., & Kopf, G. S. (1980). Regulation of Sea Urchin Sperm Cyclic AMP-Dependent Protein Kinases by an Egg Associated Factor. *Biology of Reproduction*, 22(3), 526–532.

- Garbers DL, Kopf GS. The regulation of spermatozoa by calcium cyclic nucleotides. *Adv Cyclic Nucleotide Res.* 1980;13: 251-306.
- Garbers, D. L. (1989). Molecular Basis of Fertilization. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 719–742.
- Garcia, M. L., & Kaczorowski, G. J. (2016). Ion channels find a pathway for therapeutic success. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(20), 5472–5474.
- Granados-Gonzalez, G., Mendoza-lujambio, I., & Rodriguez, E. (2005). Identification of voltage-dependent Ca²⁺ channels in sea urchin sperm, 579, 6667–6672.
- Guerrero, A., Nishigaki, T., Carneiro, J., Tatsu, Y., Wood, C. D., & Darszon, A. (2010). Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Developmental Biology*, 344(1), 52–65.
- Hamamah, S., & Gatti, J. L. (1998). Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction*, 13(SUPPL. 4), 20–30.
- Hamdoun, A., Schrankel, C. S., Nesbit, K. T., & Espinoza, J. A. (2018). *Sea urchins as lab animals for reproductive and developmental biology. Encyclopedia of Reproduction* (Second Edition, Vol. 6). Elsevier.
- Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification 1. *The FASEB Journal*, 9(8), 576–596.
- Hertwig, O. (1877). Beitrage zur kenntnis der bildung, befruchtung und theilung des thierischen eies. *Morphol. Jahr.* 3, 1–86. In J. Farley (Ed.), *Gametes and Spores: Ideas About Sexual Reproduction 1750–1914* (p. 161). Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press
- Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., ... Moss, S. B. (2005). The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Developmental Cell*, 9(2), 249–259.
- Huang, X., Miyata, H., Wang, H., Mori, G., Iida-Norita, R., Ikawa, M., Percudani, R., & Chung, J.-J. (n.d.). *A CUG-initiated CATSPERq functions in the CatSper channel assembly and serves as a checkpoint for flagellar trafficking.*
- Inaba, K. (2003). Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoological Science*, 20(9), 1043–1056.
- Ishihara, H., Martin, B. L., Brautigan, D. L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D., & Hartshorne, D. J. (1989). Calyculin A and

- okadaic acid: Inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 159(3), 871–877.
- Johnson, C. H., Clapper, D. L., Winkler, M. M., Lee, H. C., & Epel, D. (1983). A volatile inhibitor immobilizes sea urchin sperm in semen by depressing the intracellular pH. *Developmental Biology*, 98(2), 493–501.
- Jungnickel, M. K., Sutton, K. A., Wang, Y., & Florman, H. M. (2007). Phosphoinositide-dependent pathways in mouse sperm are regulated by egg ZP3 and drive the acrosome reaction. *Developmental Biology*, 304(1), 116–126.
- Kaupp, U. B., Kashikar, N. D., & Weyand, I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annual Review of Physiology*, 70, 93–117.
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. v., Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M., & Visconti, P. E. (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 285(11), 7977–7985.
- Lackey, B. R., & Gray, S. L. (2015). Identification of kinases, phosphatases, and phosphorylation sites in human and porcine spermatozoa. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(6), 345–352.
- Lax, Y., Rubinstein, S., & Breitbart, H. (1997). Subcellular distribution of protein kinase C α and β I in bovine spermatozoa, and their regulation by calcium and phorbol esters. *Biology of Reproduction*, 56(2), 454–459.
- Lee, M. Y. W., & Iverson, R. M. (1976). An adenosine 3':5' monophosphate dependent protein kinase from sea urchin spermatozoa. *BBA - Enzymology*, 429(1), 123–136.
- Lee, H. cheung, Johnson, C., & Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Developmental Biology*, 95(1), 31–45.
- Lee, Y. H., Park, J. W., & Bae, Y. S. (2016). Regulation of protein kinase CK2 catalytic activity by protein kinase C and phospholipase D2. *Biochimie*, 121, 131–139.
- Lefièvre, L., Jha, K. N., De Lamirande, E., Visconti, P. E., & Gagnon, C. (2002). Activation of protein kinase A during human sperm capacitation and acrosome reaction. *Journal of Andrology*, 23(5), 709–716.
- Lindemann, C. B., & Lesich, K. A. (2010). Flagellar and ciliary beating: The proven and the possible. *Journal of Cell Science*, 123(4), 519–528.
- Litvin, T. N., Kamenetsky, M., Zarifyan, A., Buck, J., & Levin, L. R. (2003). Kinetic Properties of “Soluble” Adenylyl Cyclase, 278(18), 15922–15926.

- Lou, D. Y., Dominguez, I., Toselli, P., Landesman-Bollag, E., O'Brien, C., & Seldin, D. C. (2008). The Alpha Catalytic Subunit of Protein Kinase CK2 Is Required for Mouse Embryonic Development. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), 131–139.
- Loza-Huerta A. (2007). Identificación del tipo de adenilil ciclasas que participan en la regulación de la movilidad del espermatozoide de erizo de mar (Tesis de Licenciatura). Universidad de Colima, México.
- Loza-Huerta A. (2013). Identificación de proteínas en complejos de señalización que modifican su estado de fosforilación con la movilidad de los espermatozoides de erizo de mar (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Loza-Huerta, A., Vera-Estrella, R., Darszon, A., & Beltrán, C. (2013). Certain Strongylocentrotus purpuratus sperm mitochondrial proteins co-purify with low density detergent-insoluble membranes and are PKA or PKC-substrates possibly involved in sperm motility regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(11), 5305–5315.
- Loza-Huerta, A., Darszon, A. and Beltrán, C. (2021) Crosstalk between protein kinase A and C regulates sea urchin sperm motility. Enviado: Zygote - ZYG-2021-0007.R1. Aceptado. Submission Confirmation, July 12.
- Mannowetz, N., Kartarius, S., Wennemuth, G., & Montenarh, M. (2010). Protein kinase CK2 and new binding partners during spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(22), 3905–3913.
- Mathews C.K., Van Holde K.E. y Ahern K.G. (2014) Bioquímica. 4ª Edición, Editorial PEARSON.
- Matsuzaki, M., Mizushima, S., Ichikawa, Y., Shiba, K., Inaba, K., & Sasanami, T. (2017). Effects of a protein kinase inhibitor on sperm motility in the Japanese quail. *Journal of Poultry Science*, 54(1), 73–79.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P. J., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J. G., & Moulinoux, J. P. (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry*, 243(1–2), 527–536.
- Mizrahi, R., & Breitbart, H. (2014). Mitochondrial PKA mediates sperm motility. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(12), 3404–3412.
- Morisawa M. Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoolog Sci.* 1994 Oct;11(5):647-62.
- Nishigaki, T., José, O., González-Cota, A. L., Romero, F., Treviño, C. L., & Darszon, A. (2014). Intracellular pH in sperm physiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(3), 1149–1158.

- Nishizuka Y., (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*, (9), 484-496.
- Nolan, M. A., Babcock, D. F., Wennemuth, G., Brown, W., Burton, K. A., & Mcknight, G. S. (2004). Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Ca₂ orchestrates cAMP signaling for male fertility, 0-5.
- Ono, Y. (1989). Protein kinase C C subspecies from rat brain: Its structure, expression, and properties, 86(May), 3099-3103.
- Orta, G., De La Vega-Beltran, J. L., Martín-Hidalgo, X. D., Santi, C. M., Visconti, P. E., & Darszon, X. A. (2018). CatSper channels are regulated by protein kinase A. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16830-16841.
- Pierre, F., Chua, P. C., O'Brien, S. E., Siddiqui-Jain, A., Bourbon, P., Haddach, M., Michaux, J., Nagasawa, J., Schwaebe, M. K., Stefan, E., Vialettes, A., Whitten, J. P., Chen, T. K., Darjania, L., Stansfield, R., Anderes, K., Bliesath, J., Drygin, D., Ho, C., ... Ryckman, D. M. (2011). Discovery and SAR of 5-(3-Chlorophenylamino) benzo [c] [2,6] naphthyridine-8- carboxylic Acid (CX-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the Treatment of Cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(2), 635-654.
- Quan, Y., & Liu, Q. (2016). Effect of Akti-2 on sperm motility, capacitation and acrosome reaction in a mouse model. *Biomedical Reports*, 4(5), 578-582.
- Quill, T. A., Ren, D., Clapham, D. E., & Garbers, D. L. (2001). A voltage-gated ion channel expressed specifically in spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12527-12531.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., ... Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*, 413(6856), 603-609.
- Rotem, R., Paz, G. F., Homonnai, Z. T., Kalina, M., & Naor, Z. (1990). Protein kinase C is present in human sperm: Possible role in flagellar motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(18), 7305-7308.
- Rosales, J. L., Lee, B. C., Modarressi, M., Sarker, K. P., Lee, K. Y., Jeong, Y. G., ... Lee, K. Y. (2004). Outer Dense Fibers Serve as a Functional Target for Cdk5-p35 in the Developing Sperm Tail. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1224-1232.
- Sharma, S., & Sicinski, P. (2020). A kinase of many talents: Non-neuronal functions of CDK5 in development and disease. *Open Biology*, 10(1).

- Seifert, R., Flick, M., Bönigk, W., Alvarez, L., Trötschel, C., Müller, A., ... Strünker, T. (2015). The CatSper channel controls chemosensation in sea urchin sperm, *34*(3), 379–392.
- Signorelli, J. R., Díaz, E. S., Fara, K., Barón, L., & Morales, P. (2013). Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: A new requirement for this event. *PLoS ONE*, *8*(12).
- Smith, G. D., Wolf, D. P., Trautman, K. C., Da Cruz E Silva, E. F., Greengard, P., & Vijayaraghavan, S. (1996). Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biology of Reproduction*, *54*(3), 719–727.
- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A., Angerer, R. C., Angerer, L. M., Arnone, M. I., Burgess, D. R., Burke, R. D., Coffman, J. A., Dean, M., Elphick, M. R., Ettensohn, C. A., Foltz, K. R., Hamdoun, A., Hynes, R. O., Klein, W. H., Marzluff, W., ... Wright, R. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, *314*(5801), 941–952
- Su, Y.-H., & Vacquier, V. D. (2002). A flagellar K⁺-dependent Na⁺/Ca²⁺ exchanger keeps Ca²⁺ low in sea urchin spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(10), 6743–6748.
- Su, Y.-H., & Vacquier, V. D. (2006). Cyclic GMP-specific Phosphodiesterase-5 Regulates Motility of Sea Urchin Spermatozoa. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(1), 114–121.
- Tash, J. S., & Means, A. R. (1982). Regulation of Protein Phosphorylation and Motility of Sperm by Cyclic Adenosine Monophosphate and Calcium. *Biology of Reproduction*, *26*(4), 745–763.
- Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., & Means, A. R. (1988). Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *Journal of Cell Biology*, *106*(5), 1625–1633.
- Tash, J. S. (1989). Protein phosphorylation: The second messenger signal transducer of flagellar motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *14*(3), 332–339.
- Taylor, S. S., Yang, J., Wu, J., Haste, N. M., & Anand, G. (2004). PKA: a portrait of protein kinase dynamics, *1697*, 259–269.
- Teijeiro, J. M., Marini, P. E., Bragado, M. J., & Garcia-Marin, L. J. (2017). Protein kinase C activity in boar sperm. *Andrology*, *5*(2), 381–391.
- Trimmer, J. S., & Vacquier, V. D. (1986). ACTIVATION OF SEA URCHIN GAMETES, 1–26.

- Valero, M. L., Sabariego, R., Cimas, F. J., Perales, C., Domingo, E., Sánchez-Prieto, R., & Mas, A. (2016). Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Interacts with the Akt/PKB Kinase and Induces Its Subcellular Relocalization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(6), 3540–3550.
- Vacquier, V. D. (1998). Evolution of Gamete Recognition Proteins. *Science*, 281(5385), 1995–1998.
- Vacquier, V. D., Loza-huerta, A., García-rincón, J., Darszon, A., & Beltrán, C. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Soluble adenylyl cyclase of sea urchin spermatozoa ☆. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1842(12), 2621–2628.
- Velázquez-Pérez, M., Héctor Ramírez, Adán Guerrero, Alberto Darszon and Carmen Beltrán (2016) CatSper, a specific cation channel of sperm is involved in sperm chemotaxis in sea urchin. XXXI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Aguascalientes, Ags. Noviembre 6-11.
- Visconti, P. E., Johnson, L. R., Oyaski, M., Forne, M., Moss, S. B., Gerton, G. L., & Kopf, G. S. (1997). <Regulation, Localization, and Anchoring of Protein.pdf>, 363, 351–363.
- Visconti, P. E., Galantino-Homer, H., Moore, G. D., Bailey, J. L., Ning, X., Fornes, M., & Kopf, G. S. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 19(2), 242–248. Retrieved from
- Wang, D., King, S. M., Quill, T. A., Doolittle, L. K., & Garbers, D. L. (2003). A new sperm-specific Na⁺/H⁺ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nature Cell Biology*, 5(12), 1117–1122.
- White, D., De Lamirande, E., & Gagnon, C. (2007). Protein kinase C is an important signaling mediator associated with motility of intact sea urchin spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 210(22), 4053–4064.
- Wood, C. D., Nisihigaki, T., Furuta, T., Baba, S. A., & Darszon, A. (2005). Real-time analysis of the role of Ca²⁺ in flagellar movement and motility in single sea urchin sperm. *Journal of Cell Biology*, 169(5), 725–731.
- Xie, F., Garcia, M. A., Carlson, A. E., Schuh, S. M., Babcock, D. F., Jaiswal, B. S., ... Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Developmental Biology*, 296(2), 353–362.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity, 2, 371–372.

Cuernavaca, Mor., 05 de diciembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: "**Evaluación de la participación de las cinasas Cdk5, CKII, PKB y las fosfatasa PP1 y PP2A en la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno José Daniel Angeles Salazar. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Juan José Acevedo Fernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2023-12-07 14:04:12 | Firmante

Vil3CSTzgnR0Ljfo2RVOuqb+FqI/3TK49zS2shuPNmT1gv2b0j5hZauWiOhe4oUbYADvX6EkoPwT4+Y0TJn/5a0OJ56ShuJCPrT3kWZtxnz/bjYh6gzIWE21eO4JEKDVaewuqwcDG
DuCoaVIZOECRKWrlvSCEX1g/ZIbRG40FJ5Ex1Whk1S8JLEF/+n4p5IWk95Mkl6/NldIIL/dZMAgcX40wClw6FQauCtSILMHIJZUKn5ZE0OYyGEZUCYAz3C8Bv/3qMQ7rfzIYSjkcN
4gYfGwk5xpocwLisydDVfiPoLb/9RzzF0f+v3/Lj4Pq58/G3h3ALej/pQ/ADymCq1uCw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ZcJz6qNDd](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/jQ6KmSSdeexx0GyGotdQ0f6UNMbj7IYJ>



Cuernavaca, Mor., 05 de diciembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: "**Evaluación de la participación de las cinasas Cdk5, CKII, PKB y las fosfatasas PP1 y PP2A en la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno José Daniel Angeles Salazar. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. Ma. del Carmen Beltrán Núñez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MA DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ | Fecha:2023-12-05 15:29:58 | Firmante

p5++Vytuj8EiEJ8zeick7gKzngZ49FqLpgXNX15B5OIEmpRtBz87D/ZiCi+Up1TtIG9E0VWwsKTHBjXOxGgZr5R5VLKXF0029MUB1cwRQhbwgg6egaA8R1JVfG3Ep5Fw+G3inGhp
dPRACfWniJUO2XQ6Xu4qkUdY0fgW4kk5sTxm0YaysN3Nj2obrfxCjEpJrlbEBIAGVNrPn5wa+2WjMOMw87kFiajMECWjHBJTDTR2+mSpin0NaPNZBAWlv+MtALV1Mi15wQMO
Dh2TRt2njHSUL2qE6SFhXRNTPh71HjhDIX/fEtzPey2hgrBN8BLWOPYRNTvjfx6C6c4YYFbsHw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[KdirPN9ZS](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/m7tom5gaEQ9Fy5swkUWfjvQ0vjvdqBpl>





Cuernavaca, Mor., 05 de diciembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: "**Evaluación de la participación de las cinasas Cdk5, CKII, PKB y las fosfatasas PP1 y PP2A en la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno José Daniel Angeles Salazar. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Luis Enrique Alberto Cañedo y Dorantes



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUIS ENRIQUE ALBERTO CAÑEDO Y DORANTES | Fecha:2023-12-08 12:52:31 | Firmante

DPoUxgdX9YXmEd7EeiLGgphX4mAm6FY0zw5IAJQXWGDOqFO8hd7MBzsZkMmyekMxGbo6MOna9MWBmHrnPLzPI5OtFvSRGFzCN6rW/BZaDo5JOMliQsGMmm4aDIRVZP
AwwGLvjOwzqUuV6mwrypQJFJxPYZwvJcp2krDBliJuvrRTQLZvgfr+YI0vo0sAjrVHrEjIlg5uRQZfMsaBD2gXf9AZPpu+NOIVPrNBhw9gtNCnxGRSrompVK0jHpU0azeXjlsXOdqkzF
R+FLfKbHNFgil4D/dkWERmnCAoxnepFyFVp2HrgCwKxJdDAScdyIWRmhQKuJfLPGVtOngKBgkww==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[TvAliEd0u](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/H54XlpzFvhd35s1WtbLlqfTXNXiE4RFZ>

Cuernavaca, Mor., 05 de diciembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: "**Evaluación de la participación de las cinasas Cdk5, CKII, PKB y las fosfatasa PP1 y PP2A en la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno José Daniel Angeles Salazar. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIO ERNESTO CRUZ MUÑOZ | Fecha:2023-12-11 09:21:01 | Firmante

BNlcbxXTfeH4AXfxiSwz1fWKD2uJ4N1iWA9CGynTSAGD8G4rQJcnZLreH9+zunFrmngaYYnHp4PuuQo6V0x2gdpqAt6RmAj4ygp8H3PDnQG9GqztlPQFXh20V/RGkqpMECfS
nqza8JRUttagTsbpsT6C1WnDiO9vYY+RFqYtn0JXqWChIVdBk45BCClxhnJqyuazzGJhRvDrPU+DcoheyuX0EZ4OP1S0P47TNNs0oztaYGguRFV0kFifJtdUIHZ4+MHeDdTflb2Q
gw4Kx8qbEj23OaTDevPZv2nOgUmWxTHY38r2Q8ywc+8A1qlxBfaQh4HMi0qfTxJIsJoLDkk3Aw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[0bRVHgmse](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QJMNIwDIq4yP2LDmnc0re8axPtPMDqtp>



Cuernavaca, Mor., 05 de diciembre de 2023.

Dra. Graciela Jiménez Santana

Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

Presente:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: "**Evaluación de la participación de las cinasas Cdk5, CKII, PKB y las fosfatasas PP1 y PP2A en la motilidad de los espermatozoides de erizo de mar**", que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó el alumno José Daniel Angeles Salazar. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

M.C. Yoloxochitl Sánchez Guevara



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

YOLOXOCHITL SÁNCHEZ GUEVARA | Fecha:2023-12-05 20:39:30 | Firmante

S8xNkA2AEYkudafSj6jV4Ct+/1c17pE1mRnwg+ckHHhPpRd/zmF97eN5NrcgsWWk6/1egdN3yiEn0EhAvRdDuDPmDSI9tnGoc38RmeE83Zb5Vh1sxdJ0m5lhHWujGOO7UXxO3
Qr4FbeC9xSTV+AP4IjdDjIlo7sU/IFhWjhL8v/J6lnuXarj25cbH9XjxR3rgtwmy4tsCMZCqhgcQEVXRJUcqwt8j1JtBIZso+eoyUfaA+VKIP7n/k+LQDxQ2M8dbKwJZ+BkedW/K2b+sOfel
cGB8kmXJpzoiuNW/qgERhtqtlClc3QeTUt2lu6dosNg6hl0sb/GWSMsVOuOCQa5iw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[rEvl1c1kL](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/2ZuDMalDUAMUKzoQYhnJcsEOvObZjLpa>

