

Tesis de Posgrado

Relación estructura-función de la proteína epididimaria de rata "DE", y su potencial uso para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad

Ellerman, Diego A.

2001

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ellerman, Diego A.. (2001). Relación estructura-función de la proteína epididimaria de rata "DE", y su potencial uso para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3358_Ellerman.pdf

Cita tipo Chicago:

Ellerman, Diego A.. "Relación estructura-función de la proteína epididimaria de rata "DE", y su potencial uso para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2001.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3358_Ellerman.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Relación estructura-función de la proteína epididimaria de rata "DE", y su potencial uso para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad.

Autor:

**Lic. Diego.
A. Ellerman**



Director:

**Dra. Patricia
S. Cuasnicú**

**Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires**

W 2358
7 24

Instituto de Biología y Medicina Experimental.

Buenos Aires, 2001

University of Buenos Aires

School of Exact and Natural Sciences

**Structure-function relationship of rat epididymal protein DE,
and its potential use for the development of an
immunological method of fertility regulation.**

Author: Lic. Diego A. Ellerman

Director: Dr. Patricia S. Cuasnicú

Thesis presented to obtain the Ph.D. degree

Institute of Medicine and Experimental Biology

Buenos Aires, April 2001

Resumen

La glicoproteína epididimaria de rata "DE" se asocia al espermatozoide durante la maduración, y participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios presentes en la superficie del ovocito. Con el fin de comprender los mecanismos involucrados en la participación de DE en dicho proceso, se estudió la importancia de la estructura de DE para la actividad de la proteína. El clonado del ADNc de DE permitió obtener la secuencia de los 227 aminoácidos (aa) de la proteína. El análisis de dicha secuencia indicó que DE pertenece a la familia CRISP (cystein rich secretory proteins), y la presencia de 16 cisteínas en la molécula. El ADNc fue utilizado luego para expresar la proteína recombinante en bacterias (recDE). El estudio de recDE y de la proteína nativa deglicosilada, indicó que la actividad biológica residiría en la porción peptídica de la molécula. Por otro lado, el análisis del estado de oxidación de las cisteínas indicó que la mayoría de ellas formaría puentes disulfuro, y que la ruptura de los mismos afectaría la actividad de la proteína. La expresión de distintos fragmentos recombinantes de DE y su empleo en ensayos biológicos, reveló que la actividad de la proteína residiría en la región comprendida entre los aa 62-158.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la inmunización de ratas con proteína DE produce una respuesta inmune y una inhibición significativa de la fertilidad. El presente trabajo indica que los mecanismos responsables de dicha inhibición involucrarían la entrada de anticuerpos anti-DE al tracto reproductivo, su interacción con los espermatozoides, y la disminución de la capacidad fertilizante de los mismos, abriendo la posibilidad del potencial uso de DE para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad. Dado que para ello es necesario poder disponer del antígeno en grandes cantidades, la proteína recombinante fue utilizada en ensayos de inmunización, que indicaron que recDE, al igual que la proteína nativa, es capaz de producir una respuesta inmune y una reducción de la fertilidad. Con el fin de investigar la posible aplicación de este método inmunológico en el hombre, la capacidad inmunogénica de la proteína humana homóloga a DE, proteína ARP, fue estudiada en un modelo de primates no humanos, observándose la inducción de una elevada respuesta inmune en los animales inmunizados.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al esclarecimiento de los mecanismos involucrados en la participación de DE en el proceso de fusión de gametas, y apoyan el potencial uso de esta proteína y sus homólogos para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad tanto en animales como en el hombre.

Palabras clave: reproducción, fertilización, espermatozoide, ovocito, fusión de membranas, fertilidad, anticoncepción, anticuerpos anti-espermatozoide.

Abstract

Rat epididymal glycoprotein "DE" associates with sperm during maturation and participates in gamete fusion through complementary sites localized on the egg surface. To get a better understanding of the molecular mechanisms underlying the participation of DE in this process, the relevance of protein DE structure for its biological activity was studied. Cloning of DE cDNA allowed obtaining the sequence of the 227 aminoacids (aa) of the protein. The analysis of the sequence, indicated that DE belongs to the CRISP (cystein rich secretory proteins) family, and the presence of 16 cysteines in the molecule. DE cDNA was then used for the bacterial expression of the recombinant protein (recDE). The study of recDE as well as of the deglycosilated native DE (nDE) indicated that the activity of the protein resides on the peptidic portion of the molecule. The evaluation of the oxidative state of cysteines indicated that most of them would be involved in disulfide bridges, and that the rupture of these bridges would affect the protein activity. The expression of different recombinant fragments of DE, and their use in biological assays indicated that the biological activity of DE would be located within the region encompassed by aa 62-158. Previous results from our laboratory indicate that immunization of rats with protein DE induces an immune response and a significant inhibition of fertility. The present study indicated that the mechanisms responsible for this inhibition would involve the entry of antibodies into the reproductive tract, their association to sperm, and the reduction of sperm fertilizing ability. These results suggested the potential use of DE for developing and immunological method of fertility regulation. Since an important requirement for this purpose, is the possibility of obtaining the antigen in large quantities, recombinant DE was used in immunization studies, which revealed that, like native DE, recDE is able to produce an immune response as well as an inhibition of fertility. In order to explore the potential application of this immunological approach to humans, the immunogenic ability of the human protein homologue of DE, protein ARP, was evaluated in a non human primate model. The induction of a high immune response was observed in all the immunized animals. Together, the results obtained in this work contribute to a better understanding of the molecular mechanisms underlying the participation of DE in sperm-egg fusion, and support the potential use of DE for the development of an immunological method of both animal and human fertility regulation.

Keywords: reproduction, fertilization, sperm, oocyte, membrane fusion, contraception, anti-sperm antibodies.

a

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Cuasnicú, en primer lugar por haberme permitido trabajar en su laboratorio, pero fundamentalmente por la amplia instrucción y la íntegra formación recibida, y por haber invertido en ello una inapreciable cantidad de tiempo y de energía. Por el entusiasmo transmitido por la Fertilización, y por haberme brindado innumerables y diversas oportunidades.

A Débora, Vero, Mauro, Tristán, Dolores, Vanina, y Julieta por ser excelentes compañeros, por la permanente colaboración, y por hacer tan placentero el trabajo de todos los días.

A Pato, Pata, Clarisa, Paula, Mariana, Leticia, Jefferson, Giselle, Martín, Marcelo, Ale; Fernanda, Lili, Mariano, Karina Z, Guille, Leo, Karina del P, Nacho, Andrea D, Viviana, Celia, Astrid, Silvina, Andrea L., Laura, Juan Carlos, por su compañerismo y solidaridad, por los consejos, sugerencias y préstamos.

A los Drs. Mónica Vázquez, Jorge Tezón y Marta Tessone por el permanente apoyo y estímulo.

A Saúl, Hugo y todo el personal del biotero, por la eterna buena voluntad y paciencia con los pedidos de último momento.

A María y José por ser la compañía de la sección trasnoche.

A Marcelo Lamamí por todo el material fotográfico.

A Vilma, Amalia, Mónica, Zulema, Horacio, y todo el personal de biblioteca, recepción, secretaría y limpieza, así como a todos los miembros del IBYME por la colaboración de todos los días.

A Santiago Werbach y al Dr. Alberto Kornblihtt por la invaluable ayuda con el clonado y expresión de "DE".

Al Dr. Héctor Chemes y las Dras. Lustig y Chiochio por la observación de los cortes de los órganos reproductivos.

Al Dr. David Hamilton por la biblioteca de ADNc de epidídimo de rata.

Al CONICET y a PLACIRH por haberme otorgado el apoyo económico indispensable para la realización de esta Tesis.

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxi-ribonucleico
ADNc	ADN copia
ARN	ácido ribonucleico
BSA	albúmina sérica bovina
β gal	β galactosidasa
CBB	azul de Coomasie
DO ₆₀₀	densidad óptica a 600 nm
DTT	ditiotreitól
eCG	gonadotrofina coriónica equina
esp	espermatozoides
ELISA	Inmunoensayo
FITC	isotiocianato de fluoresceína
hCG	gonadotrofina coriónica humana
HOPT	test de penetración de ovocitos de hámster
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IgA	inmunoglobulina A
IgG	inmunoglobulina G
IPTG	isopropil-tiogalactósido
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
TA	temperatura ambiente
RA	reacción acrosomal
RFM	medio de fertilización de rata
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
ZP	zona pelúcida

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Células germinales y gametogénesis	2
Anatomía de los órganos reproductivos femeninos.....	3
La gameta femenina	6
Anatomía de los órganos reproductivos masculinos	6
La gameta masculina.....	9
Maduración epididimaria	11
Capacitación.....	13
Reacción acrosomal	14
Interacción entre el espermatozoide y la ZP	16
Fusión del espermatozoide con el ovocito	17
Unión espermatozoide-ovocito	18
Sitios de iniciación de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito.....	20
Detección de la ocurrencia de la fusión	21
Especificidad de especie en la fusión	22
Consecuencias de la fusión	23
Moléculas involucradas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito.....	24
Moléculas del ovocito	25
Moléculas del espermatozoide	27
Proteína DE	30
OBJETIVOS	38
MATERIALES Y MÉTODOS	40
PARTE I	41
Animales	41
Proteína DE y anticuerpo anti-DE.....	41
Clonado de DE	41
Preparación de la solución madre de fagos y titulación	42
Lisogenización de <i>Escherichia coli</i> Y1089 con fagos recombinantes.....	43
Producción de la proteína de fusión β gal-DE	43
Estimación del tamaño de los insertos de los clones obtenidos	44
Secuenciación del inserto del clon 1	44
Subclonado del ADNc de DE a pRSET	45
Expresión de pRSET-DE	45
Expresión de proteínas recombinantes en pMAL-p2.....	46
Deglicosilación enzimática	48
Reducción y alquilación.....	49
Detección de grupos sulfidrido (-SH).....	49
Separación electroforética de las proteínas	49

Tinción de geles	50
Western blot	51
Capacitación de espermatozoides.....	51
Superovulación de las hembras y preparación de los ovocitos.....	52
Ensayo de fusión <i>in vitro</i>	53
Ensayo de unión espermatozoide-ovocito.....	53
Ensayos de viabilidad y motilidad de los espermatozoides.....	54
Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de ovocitos.....	54
Inmunofluorescencia cuantitativa de ovocitos	55
PARTE II:	56
Animales.....	56
Ensayos de inmunización.....	56
Obtención y almacenamiento de los sueros.....	57
Enzoinmunoensayo (ELISA).....	57
Apareos	59
Histología.....	60
Obtención de fluidos reproductivos y espermatozoides	60
Ensayos de motilidad y viabilidad de los espermatozoides.....	62
Ensayo de fusión de gametas	62
Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides.....	62
Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de ovocitos humanos	63
Preparación de citosoles de órganos de rata y de mono	63
Western blot	64
RESULTADOS	65
PARTE I: ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA	
ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA DE	66
Capítulo 1: Clonado y expresión de la proteína DE	66
Clonado del ADNc de DE	66
Búsqueda de homologías y análisis estructural de la secuencia de DE	70
Expresión de la proteína recombinante.....	77
Capítulo 2: Actividad biológica de la proteína DE recombinante.....	93
Inhibición de la penetración de ovocitos sin ZP	93
Unión de la proteína DE recombinante al ovocito	97
Actividad de la proteína DE nativa deglicosilada	99
Importancia de los puentes disulfuro para la actividad de la proteína	101
Capítulo 3: Región peptídica responsable de la actividad biológica	105
Expresión de los fragmentos recombinantes F1, F2 y F3	107
Actividad biológica de los fragmentos F1, F2 y F3.....	112
Expresión de los fragmentos F4 y F5.....	116
Actividad biológica de F4 y F5	116

PARTE II. POTENCIAL USO DE DE PARA EL DESARROLLO DE UN MÉTODO INMUNOLÓGICO DE REGULACIÓN DE LA FERTILIDAD.....	127
Capítulo 1: Estudio de los mecanismos involucrados en la inhibición de la fertilidad en ratas inmunizadas con la proteína DE.....	127
Determinación de anticuerpos anti-DE y su relación con la fertilidad.....	127
Estudio histológico de los órganos reproductivos de machos y hembras	136
Presencia de anticuerpos anti-DE en el tracto reproductivo de machos y hembras.....	141
Presencia de la proteína DE sobre los espermatozoides.....	141
Asociación de los anticuerpos a los espermatozoides en el tracto femenino y masculino.....	145
Efectos de la inmunización sobre el funcionamiento de los espermatozoides	148
Capítulo 2: Inmunización de ratas con proteína DE recombinante	155
Inmunogenicidad de recDE	155
Inhibición de la fertilidad luego de la inmunización con recDE	159
Capítulo 3: Capacidad inmunogénica de la proteína ARP en primates no humanos.....	168
Participación de ARP en el proceso de fertilización: Presencia de sitios complementarios para ARP sobre el ovocito humano.....	168
Antigenicidad común de las proteínas ARP humana y de macaco	172
Inmunogenicidad de ARP en macacos.....	175
DISCUSIÓN.....	187
PARTE I: ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA DE.....	188
Capítulo 1: Clonado y expresión de DE.....	188
Capítulo 2: Actividad de la proteína recombinante.....	194
Capítulo 3: Región peptídica responsable de la actividad biológica	202
PARTE II: POTENCIAL USO DE DE PARA EL DESARROLLO DE UN MÉTODO INMUNOLÓGICO DE REGULACIÓN DE LA FERTILIDAD	211
Capítulo 1: Mecanismos involucrados en la inhibición de la fertilidad luego de la inmunización de ratas con DE.....	211
Capítulo 2: Inmunización con la proteína recombinante.....	223
Capítulo 3: Capacidad inmunogénica de la proteína ARP en primates no humanos.....	226
CONCLUSIÓN	239
REFERENCIAS	240

La fertilización es el proceso por el cual una gameta femenina y otra masculina se unen creando la cigota que dará origen a la descendencia. Este modo de reproducción bisexual a través de la fertilización emergió durante la evolución y ha sido mantenido en la mayoría de los metazoarios, incluidos los mamíferos. Se cree que el éxito de este modo de reproducción bisexual se debería a que el mismo podría acelerar la velocidad de adaptación evolutiva y al mismo tiempo evitar la acumulación irreversible de mutaciones perjudiciales en un ambiente cambiante y competitivo (1). Desde el punto de vista de sus genomas, la gameta femenina y masculina son similares, pero sus historias previas son diferentes.

Células germinales y gametogénesis

Las gametas son células haploides que se originan por la división meiótica de las células germinales diploides. Este es un proceso complejo, llamado gametogénesis.

Aunque las gametas son producidas en la gónada del adulto, la línea germinal diploide se establece tempranamente durante la embriogénesis. Estas células se originan en el saco vitelino y migran mediante movimientos ameboides hasta alcanzar el mesonefros, donde se desarrollará la gónada. En el macho, las células germinales se denominan espermatogonias, y en las hembras, oogonias (2). La división meiótica de las oogonias comienza durante el desarrollo embrionario, e involucra a todas las células germinales, que se transforman en ovocitos primarios (**Figura I**). Dado que los mismos no pueden dividirse mitóticamente, la hembra comienza su vida fértil con un número finito de potenciales gametas. La meiosis avanza hasta arrestarse en diplotene de la profase I, y las células permanecen en este estadio desde el nacimiento hasta la pubertad, momento en que algunas células reanudan la meiosis. Al terminar la telofase, el ovocito primario se divide desigualmente: una de las células hijas, el ovocito secundario, recibe la mayor parte del citoplasma, y la

otra, el corpúsculo polar, recibe una cantidad mínima de citoplasma. En cada ciclo menstrual, cierto número de ovocitos (dependiente de la especie) es capaz de alcanzar el estadio en que son ovulados.

En la mayoría de los mamíferos, los ovocitos son ovulados en el estadio de metafase II, con el primer corpúsculo polar emitido. La meiosis continúa sólo después de la entrada del espermatozoide, resultando en la extrusión del segundo cuerpo polar (3).

A diferencia de la hembra, las células germinales del macho comienzan a dividirse por meiosis recién en la pubertad, y no lo hace la totalidad de las células, sino que siempre permanece una población de espermatogonias que se multiplica por mitosis. Esto determina que el número de gametas masculinas no esté limitado como en la hembra. La espermatogénesis presenta otra diferencia respecto a la ovogénesis, y está dada por el hecho de que cada espermatogonia que entra en meiosis origina cuatro espermatozoides, en lugar de un ovocito por ovogonia (**Figura I**). Esto también contribuye a la mayor capacidad del macho de producir gametas respecto a la hembra (4).

Anatomía de los órganos reproductivos femeninos

El órgano que aloja las oogonias y donde ocurre la ovogénesis es el ovario. Estos órganos pares se encuentran adosados a la pared posterior en la cavidad pélvica. Muy cerca del ovario se encuentra el oviducto, que lo comunica con el cuerpo del útero (**Figura II**). La región del oviducto proximal al ovario, llamada *ampulla*, es en donde se produce la fertilización, en tanto la región distal, el *isthmus*, sirve de reservorio de espermatozoides. El útero es el lugar donde se implanta y desarrolla el embrión. A diferencia de los ovarios y oviductos que son estructuras pares, el útero es una estructura única en primates, y bicornes en la mayoría de los mamíferos (3).

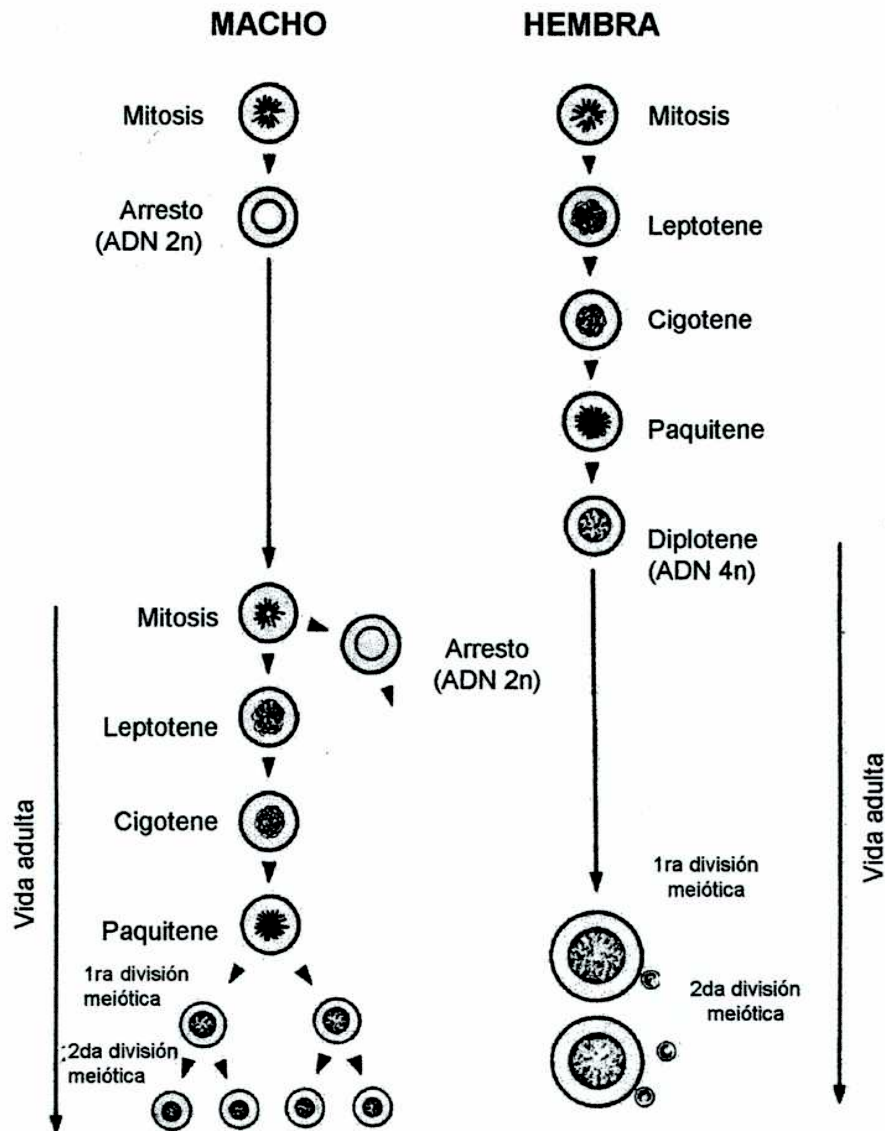


Figura I: Ciclos de vida de las células germinales masculinas y femeninas. Las células germinales de ambos sexos se dividen por mitosis hasta la diferenciación sexual de la gónada. Las células germinales femeninas entran en meiosis durante la vida fetal, mientras que las células germinales masculinas mantienen una población de células en reposo que se pueden dividir por mitosis, y a partir de las cuales continúan emergiendo células meióticas durante toda la vida adulta.

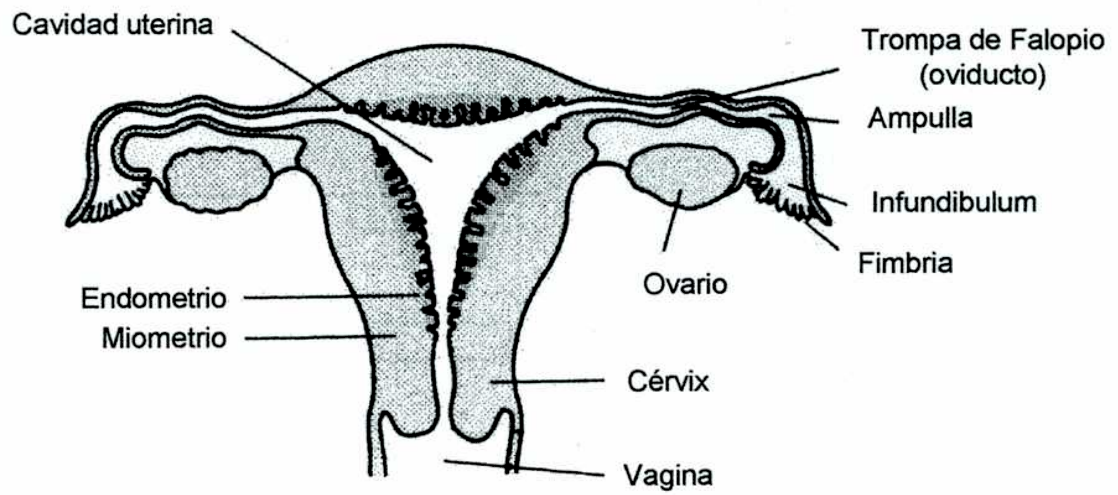


Figura II: Esquema del tracto reproductivo femenino humano.

La gameta femenina

El ovocito de los mamíferos euterianos consiste en una masa esférica de citoplasma de unos 70-120 μm de diámetro limitada por la membrana plasmática (oolema), que a su vez está contenida por una envoltura glicoproteica, la zona pelúcida (ZP) (**Figura III**). Entre la ZP y el oolema se encuentra un espacio lleno de fluido, el espacio perivitelino. El ovocito ovulado se encuentra inmerso en una matriz de ácido hialurónico y células de la granulosa, estructura que se conoce como *cumulus oophorus*.

La ZP es una envoltura que protege a los ovocitos y embriones de daños físicos. La ZP de ratón, que es la que ha sido más estudiada y está mejor caracterizada, está compuesta por tres proteínas principales, ZP1, ZP2 y ZP3 (5,6), que presentan tanto glicosilación de tipo N (residuos glicosídicos unidos al grupo amino de la asparagina), como del tipo O (hidratos de carbono unidos al grupo oxidrilo de los aminoácidos serina o treonina) (7), y se disponen formando filamentos interconectados (6,8).

Anatomía de los órganos reproductivos masculinos

La gónada masculina, el testículo, contiene los túbulos seminíferos que son las estructuras dentro de las cuales se produce la espermatogénesis (**Figura IV**). Estos túbulos se unen entre sí en la *rete testis*, que se conecta mediante los ductos eferentes con el epidídimo. Este órgano consiste en un largo conducto con muchas circunvoluciones, del que habitualmente se distinguen tres regiones: *caput* (o cabeza), *corpus* (o cuerpo) y *cauda* (o cola). El *caput* es la región más próxima al testículo, el *corpus* es la región media, y el *cauda* es la región distal al testículo, que sirve de lugar de almacenamiento de espermatozoides. El *caput* epididimario se continúa con el *vas deferens*, que

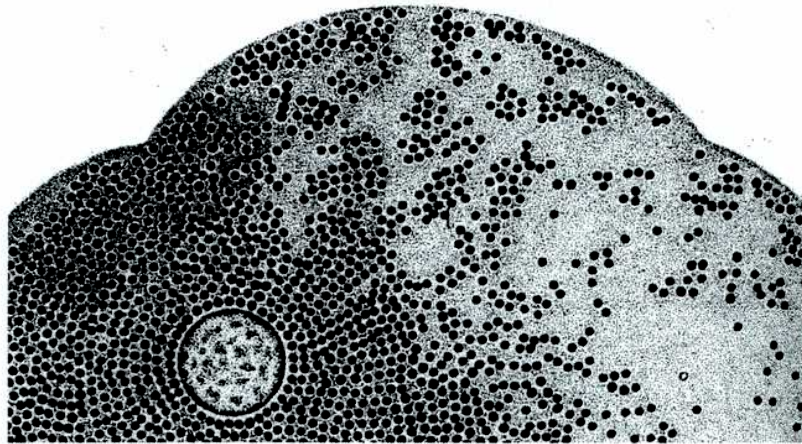
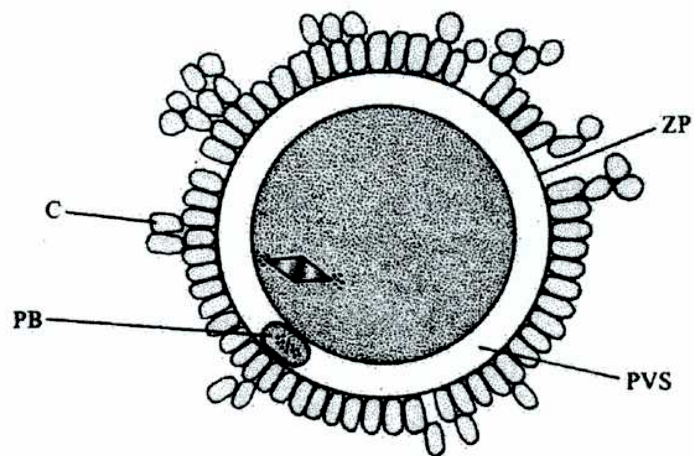
A**B**

Figura III: (A) Ovocito ovulado, inmerso en el *cumulus oophorus*. **(B)** Esquema de un ovocito ovulado en metafase II. C: célula del cumulus, PB: primer cuerpo polar, ZP: zona pelúcida, PVS espacio perivitelino.

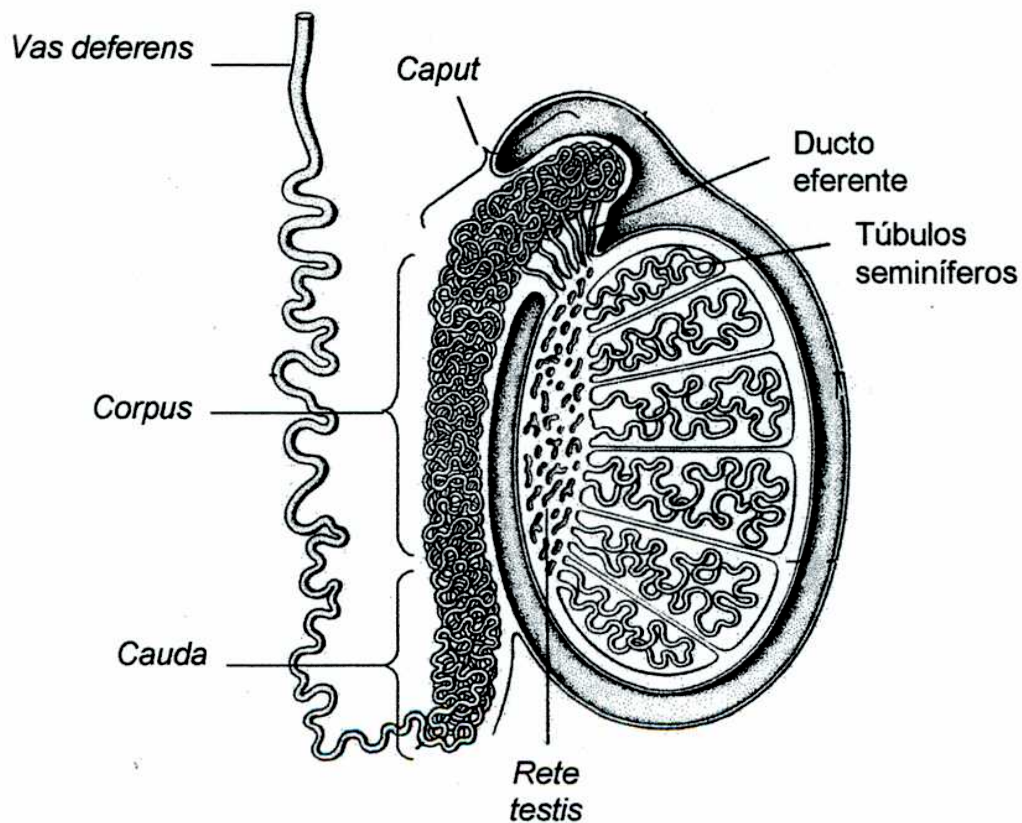


Figura IV: Esquema de un testículo y epidídimo de mamífero.

durante la eyaculación recoge las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales) y conduce a los espermatozoides hasta la uretra.

Una característica importante de la anatomía testicular es la presencia de uniones estrechas entre las células de Sertoli. Estas uniones forman una barrera que limita el pasaje de moléculas de gran tamaño, como los anticuerpos, entre las células adyacentes. Esta permeabilidad reducida es parte de lo que se conoce como barrera hemato-testicular, y determina que las células haploides se encuentren aisladas del sistema inmune.

La gameta masculina

Los espermatozoides de las distintas especies, aunque presentan un tamaño variable que no guarda relación con el tamaño corporal, comparten una estructura general similar. Esta célula altamente diferenciada, posee básicamente dos componentes morfológicos: la cabeza que contiene el material genético, y la cola que le confiere motilidad.

Cabeza: Dentro de esta estructura se encuentra el núcleo, que contiene la cromatina altamente condensada. El ADN está asociado a unas proteínas básicas y de bajo peso molecular, llamadas protaminas. Estas proteínas que reemplazan a las histonas, permiten un empaquetamiento de la cromatina mayor al de una célula somática, y forman puentes disulfuro intermoleculares que aumentan su estabilidad.

El núcleo se encuentra envuelto en su parte anterior por el acrosoma, que es una estructura membranosa que contiene enzimas involucradas en la penetración del ovocito. La membrana acrosomal puede ser diferenciada en externa o interna, de acuerdo a su aposición con la membrana plasmática o nuclear, respectivamente (**Figura V**). Como toda célula, el espermatozoide, incluido el acrosoma, está limitado por la membrana plasmática.

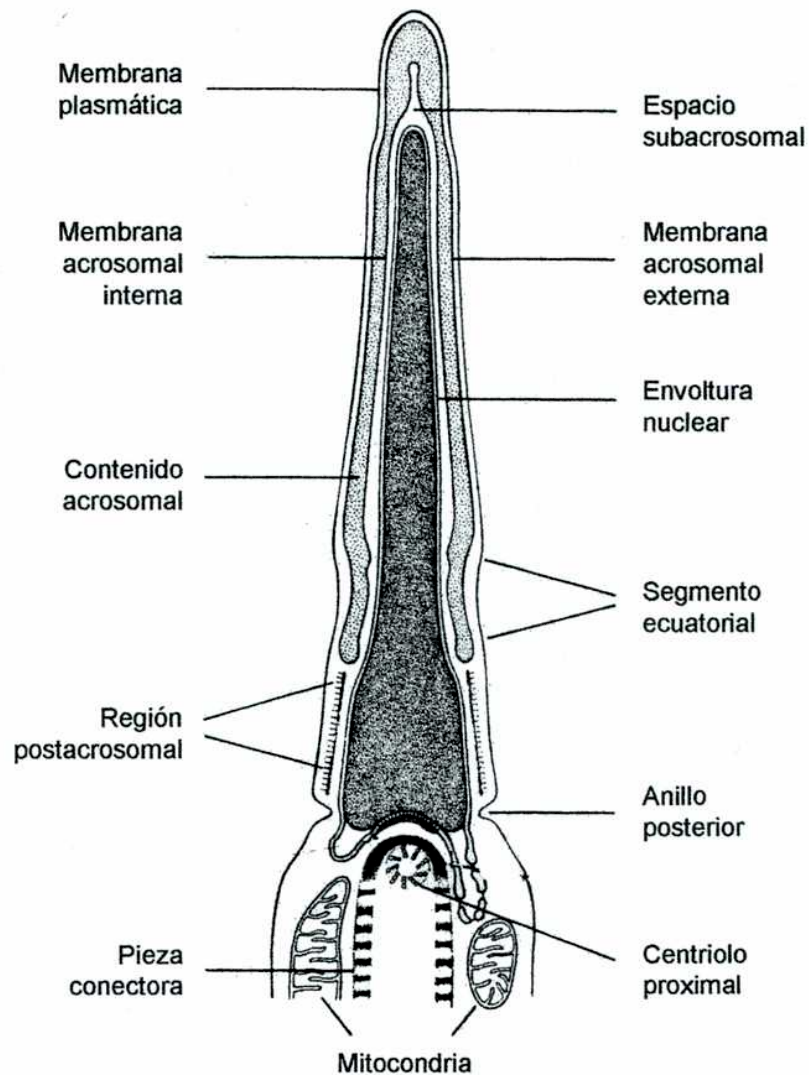


Figura V: Estructura de la cabeza de un espermatozoide.

La región de la membrana plasmática que cubre el acrosoma se conoce como región acrosomal, en tanto que la región por debajo del acrosoma recibe el nombre de post-acrosomal. La parte posterior del acrosoma que no se vesiculiza durante la región acrosomal se denomina segmento ecuatorial. Esta región tiene una extensión variable según la especie, y es la zona por la cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito.

Cola: El componente principal de la cola es el axonema, que consiste en un par de microtúbulos centrales rodeados por un cilindro de 9 pares de microtúbulos. Esta estructura es la que genera el movimiento de la cola. Usualmente la cola se divide en tres regiones o piezas: pieza media, pieza principal y pieza final (**Figura VI**). El axonema de la pieza media está recubierto por mitocondrias que se disponen en hélice, y que proveen al espermatozoide de energía.

Maduración epididimaria

A diferencia de los invertebrados y vertebrados inferiores (tales como teleósteos y anfibios anuros), en los mamíferos, los espermatozoides testiculares no tienen la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito (1). Esta capacidad se adquiere durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, proceso que se conoce como maduración epididimaria (9-13). Es difícil determinar el lugar exacto del epidídimo donde se adquiere la capacidad fertilizante, ya que no todos los espermatozoides adquieren dicha capacidad simultáneamente, y existe variación entre las distintas especies. Sin embargo, como regla general, la gran mayoría de los espermatozoides obtiene el potencial fertilizante al llegar al *cauda* epididimario.

Otra diferencia fisiológica entre espermatozoides testiculares y epididimarios consiste en su capacidad de movimiento. Mientras que los espermatozoides testiculares son inmóviles o débilmente móviles, los mismos adquieren una motilidad progresiva y direccional durante su tránsito por el epidídimo (1).

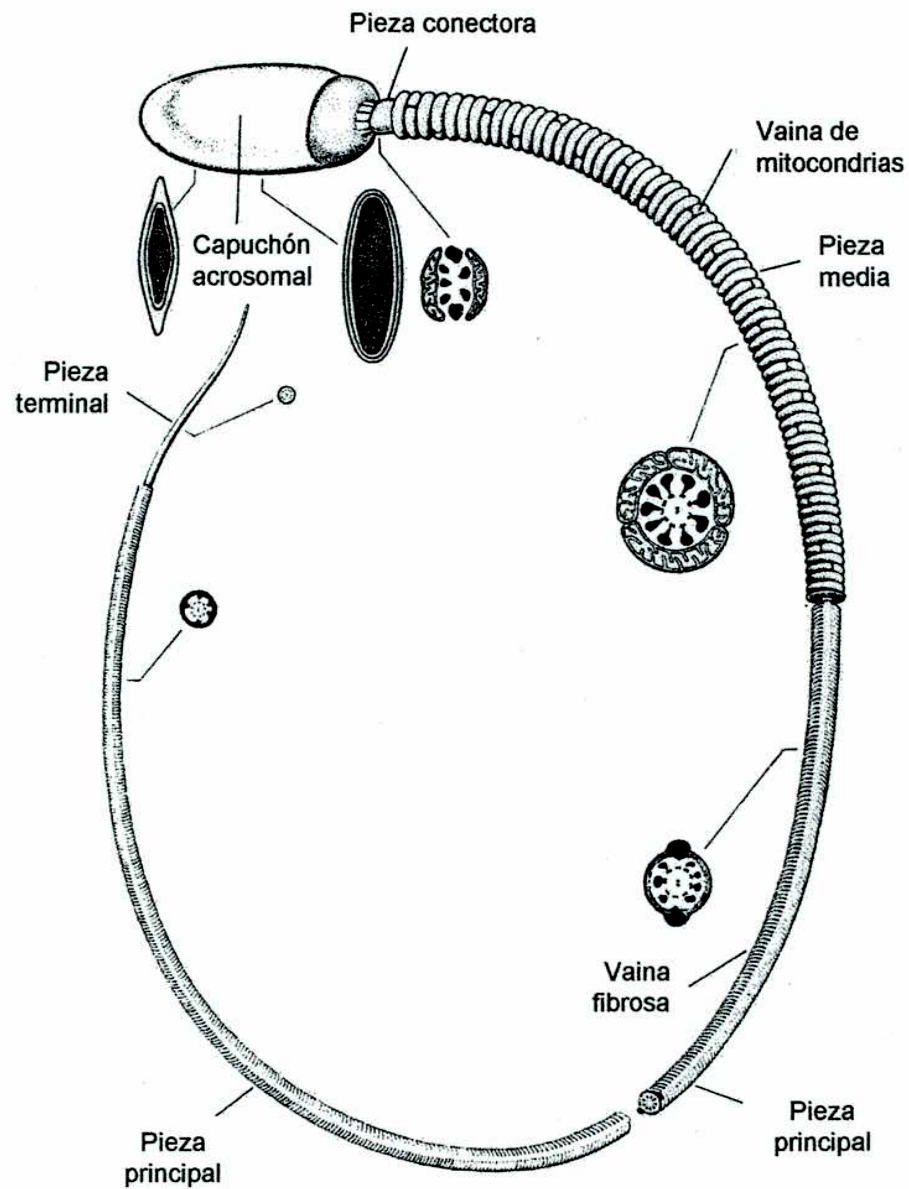


Figura VI: Estructura interna de un espermatozoide de mamífero típico.

Durante este proceso de maduración, ocurren numerosos cambios en la membrana plasmática del espermatozoide, que involucran tanto a lípidos como a proteínas. En cuanto a las proteínas, se produce el procesamiento y/o migración de aquellas ya existentes sobre el espermatozoide, o bien la adquisición de nuevas proteínas secretadas por el epidídimo. Mientras que algunas de estas proteínas mediarían la interacción del espermatozoide con el ovocito (1), otras, que reciben el nombre de factores decapacitantes, estabilizarían la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia de una reacción acrosomal prematura (14).

Capacitación

Los espermatozoides maduros que salen del epidídimo tienen la capacidad de moverse, y una capacidad potencial pero no inmediata de fertilizar al ovocito. Esta capacidad se expresa luego de permanecer durante cierto período en el tracto femenino. Este fenómeno fue originalmente descrito en 1951 (15,16) y recibe el nombre de capacitación (17). Si bien las bases moleculares de este proceso no son totalmente conocidas, uno de los principales eventos involucrados en la capacitación es la disminución del contenido de colesterol de la membrana plasmática (18-20) debido a su captura por la albúmina y por lipoproteínas de alta densidad presentes en el tracto femenino (21,22). Esto podría explicar el aumento de la fluidez de la membrana que ocurre con la capacitación. Además de la disminución del contenido de colesterol, ocurren numerosos cambios en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación. Aquellas proteínas débilmente asociadas se disocian del espermatozoide durante este proceso (14,23-25). Otras proteínas en cambio, modifican su localización en el espermatozoide, migrando a otra región de la membrana (26-29). Estos cambios en la membrana plasmática son necesarios para que posteriormente ocurra la reacción acrosomal y, por lo tanto, preparan al espermatozoide para la fertilización.

Existen otros fenómenos asociados a la capacitación, tal como la fosforilación en tirosina de diversas proteínas del espermatozoide, el aumento del pH intracelular, y la hiperpolarización de la membrana plasmática (30,31). Sin embargo, se desconoce si estos procesos son componentes esenciales de la capacitación.

Un fenómeno íntimamente relacionado con la capacitación, observado tanto *in vivo* como *in vitro* en todas las especies estudiadas, es la hiperactivación. Con este nombre se describe el tipo de movimiento que presentan los espermatozoides en el lugar de la fertilización. Este movimiento se caracteriza por un incremento en la velocidad, una disminución de la linealidad, un aumento de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, y por movimientos del flagelo similares a latigazos (30).

Se cree que la hiperactivación ayuda al desprendimiento de los espermatozoides de las células oviductales (32), y que sería esencial para la penetración de la ZP (33).

Reacción acrosomal

El acrosoma es una estructura membranosa que cubre la porción anterior del núcleo del espermatozoide. Dentro del acrosoma existe una complicada matriz proteica, así como diversas enzimas hidrolíticas, principalmente la proteasa acrosina y la hialuronidasa (1). La reacción acrosomal (RA) consiste en la liberación del contenido acrosomal, y presenta similitudes con el proceso de exocitosis. La reacción comienza con la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos, con excepción del segmento ecuatorial (**Figura VII**). En los sitios de fusión, la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa forman vesículas, y se crean poros por los que se libera el contenido acrosomal. Como resultado, la

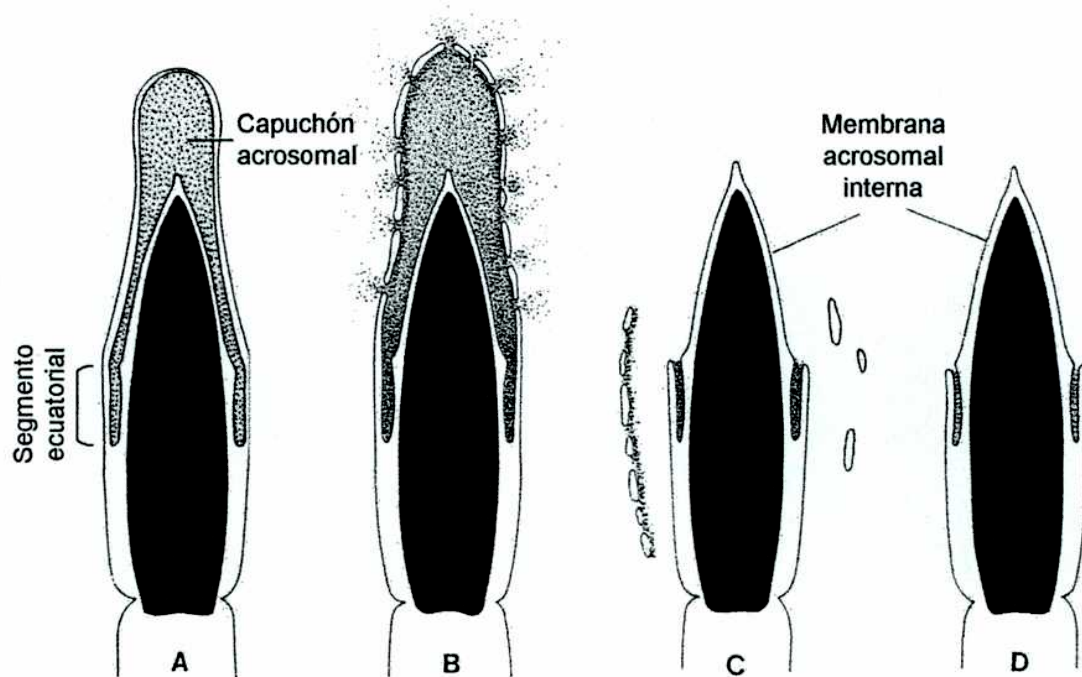


Figura VII: Esquema de la progresión de la reacción acrosomal. **A)** Antes de la reacción. **B)** La reacción en progreso; múltiples puntos de fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática permiten la liberación o exposición del contenido acrosomal. **C-D)** Se completa la reacción; las membranas vesiculizadas se dispersan o se mantienen unidas por la matriz acrosomal.

membrana acrosomal interna adquiere continuidad con la membrana plasmática.

A diferencia de la capacitación, este proceso es muy rápido e irreversible. El estado capacitado de los espermatozoides es una condición esencial para que los mismos puedan sufrir una RA fisiológica (34). La misma se dispara cuando un espermatozoide capacitado entra en contacto con la ZP del ovocito (35). La proteína ZP3 actúa como ligando (36), y su unión con el receptor en el espermatozoide produce la agregación de los mismos (37), lo que inicia una cascada de transducción de señales en el espermatozoide que incluye un aumento en la concentración del calcio intracelular (1).

La importancia fisiológica de la RA radica en que sólo luego de haber reaccionado un espermatozoide es capaz de atravesar la ZP y fusionarse con el oolema (38,39). Por lo tanto, la RA tiene una función dual: permite que el espermatozoide pueda atravesar la ZP y que posteriormente pueda fusionarse con el oolema.

Interacción entre el espermatozoide y la ZP

Los espermatozoides capacitados se unen firmemente a la ZP antes de penetrarla. Esta unión es mediada por la interacción entre moléculas de la ZP y de la superficie del espermatozoide, y comprende dos pasos: 1) la unión del espermatozoide intacto a la ZP, o "unión primaria", y 2) la unión del espermatozoide reaccionado, o "unión secundaria". En el ratón, las moléculas de la ZP con capacidad de unir al espermatozoide son ZP2 y ZP3. Esta última es el ligando primario que se une a la membrana plasmática de la región acrosomal del espermatozoide no reaccionado, mientras que ZP2 es el ligando secundario que preferentemente se une a la membrana acrosomal interna del espermatozoide reaccionado (40-42). La proteína ZP3 de ratón

posee tanto la capacidad de unir al espermatozoide como de disparar la RA. Mientras que la unión del espermatozoide a la ZP requiere de los oligosacáridos unidos en O son responsables de la unión del espermatozoide (43), la inducción de la RA requiere tanto de la parte glicosídica como peptídica (44). En cuanto al receptor del espermatozoide para la ZP, diversas proteínas han sido postuladas como receptor primario, entre ellas la galactosiltransferasa (45-47), sp56 (48), y p95 (49,50). Sin embargo, el tema es objeto de controversias, y ninguna de las proteínas postuladas es aceptada unánimemente como mediadora de la unión primaria. Por el contrario, existen numerosas evidencias que indican que la acrosina estaría involucrada en la unión secundaria (1).

La interacción espermatozoide-ZP es, en general, especie-específica. Esto significa que un espermatozoide es capaz de unirse y penetrar sólo la ZP de un ovocito de la misma especie. Aunque esto es lo que ocurre en general, existen algunas excepciones con especies próximamente relacionadas, como por ejemplo entre distintas especies de ratón del género *Peromyscus* (1). La unión y penetración de la ZP, incluso puede ocurrir entre gametas de especies distantes, como por ejemplo con espermatozoides ovinos y ovocitos bovinos, y espermatozoides de hámster con ovocitos humanos (1).

Fusión del espermatozoide con el ovocito

La fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito constituye un evento clave en el proceso de fertilización, ya que sólo luego de la ocurrencia de la fusión un ovocito puede considerarse fertilizado.

La fusión de membranas ocurre luego de que el espermatozoide ha atravesado la ZP y el espacio perivitelino. La cabeza del espermatozoide se une a la membrana plasmática del ovocito y luego de un breve período, que varía según la especie, se produce una abrupta declinación o cesación del

movimiento de la cola (51). Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (52). La parte posterior de la cabeza y la cola son incorporadas a través de un proceso de fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es incorporada al citoplasma de un modo similar a la fagocitosis (**Figura VIII**).

Unión espermatozoide-ovocito

La unión y fusión de gametas constituyen dos eventos independientes ya que, bajo ciertas condiciones, los espermatozoides pueden unirse al oolema sin fusionarse. Sin embargo, está generalmente aceptado que la unión es un requisito para que ocurra la fusión (53). Se ha visto unión no conducente a fusión en el caso de espermatozoides con acrosoma intactos (39) y en ciertos casos de unión entre espermatozoides y ovocitos sin ZP de especies distintas (54). Dado que la presencia de Ca^{2+} es necesaria para la ocurrencia de la fusión, pero no para la unión, en ausencia de Ca^{2+} los espermatozoides pueden unirse sin fusionarse (55).

Myles (53) propone que, teniendo en cuenta que los espermatozoides pueden unirse al oolema sin que ocurra la fusión, es posible que exista más de un mecanismo para el evento de unión, en los que se utilicen distintos tipos de proteínas. Algunos de estos mecanismos de unión podrían no ser conducentes a fusión. También es posible que se requieran varios eventos de unión sucesivos para que las membranas se fusionen y que los primeros eventos de unión puedan ocurrir a pesar de que luego la fusión no ocurra. Por lo tanto, los autores han propuesto que es importante tener en cuenta que los efectos observados por distintos tratamientos sobre el proceso de fusión podrían deberse a un efecto sobre algún paso específico de la unión y no sobre el proceso de fusión en sí.

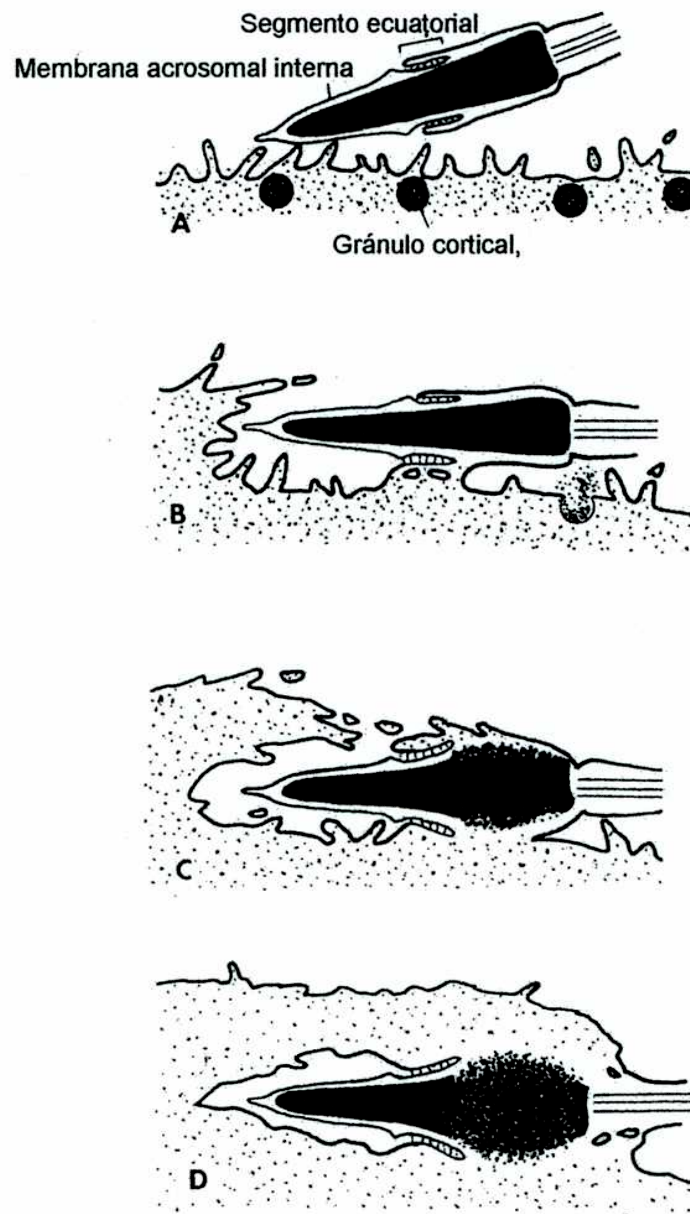


Figura VIII: Diagrama de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito.

La interpretación de los resultados obtenidos por distintos laboratorios con respecto a la etapa de unión puede resultar engorrosa debido a que la unión es generalmente evaluada luego de un período variable de coincubación de las gametas y de una serie de lavados realizados por pipeteo, con el fin de liberar los espermatozoides débilmente unidos al oolema. Este paso depende exclusivamente del operador (fuerza de pipeteo, número de lavados, etc.) provocando una gran variabilidad en los resultados obtenidos por distintos operadores. Por otro lado, si en el momento de evaluar la unión, la fusión ya ha ocurrido, ésta podría provocar alguna alteración de la membrana (ver Exocitosis de gránulos corticales) de forma tal que los espermatozoides no se unan de la misma manera que lo hacían previo a la fusión, provocando así la liberación de los espermatozoides unidos. Más aún, la ocurrencia de una unión no conducente a fusión podría estar enmascarando la ocurrencia de la unión conducente a este evento (53).

Sitios de iniciación de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito

Las regiones de la membrana plasmática que inicialmente participan en la fusión son restringidas tanto en el espermatozoide como en el ovocito. En el caso del espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial es la que primeramente se fusiona con el ovocito (1,56). Excepcionalmente, en los casos en que durante la reacción acrosomal también se pierde el segmento ecuatorial (por ejemplo, luego de largas incubaciones en condiciones capacitantes), la fusión puede iniciarse por la región post-acrosomal (57). Es importante recalcar que el segmento ecuatorial sólo adquiere capacidad de fusionarse con el oolema una vez que el espermatozoide ha sufrido la reacción acrosomal (1,38,58,59). Los espermatozoides intactos, independientemente de que se encuentren capacitados o no, no son capaces de fusionarse con el ovocito (38,60). La motilidad parecería no ser un requisito absoluto para la ocurrencia de la

fusión, ya que ha sido demostrado que espermatozoides inmóviles o de muy baja motilidad son capaces de fusionarse con el ovocito (1).

En el caso del ovocito, la superficie del mismo se encuentra polarizada y pueden distinguirse al menos dos regiones: el dominio que recubre el huso meiótico, que se halla libre de microvellosidades, y el resto de la membrana del ovocito, que presenta numerosas microvellosidades. Además de estas diferencias estructurales entre ambas regiones, las proteínas presentes en la región libre de microvellosidades presentan una mayor movilidad respecto a aquellas presentes en el resto del oolema (61). La fusión raramente ocurre por la región de la membrana libre de microvellosidades (52,62-64). Esto podría deberse a que el segundo corpúsculo polar se forma y libera por esta región luego de la fertilización, resultando "peligroso" que el espermatozoide se fusione e incorpore allí ya sea porque su presencia podría interferir con la correcta liberación del segundo corpúsculo, o bien porque el mismo espermatozoide podría ser eliminado durante el proceso de extrusión.

Si bien al asociarse al oolema, el espermatozoide entra en contacto con las microvellosidades, aún no se conoce si las mismas son esenciales para la ocurrencia de la fusión (65).

Detección de la ocurrencia de la fusión

En general, los ensayos de fusión espermatozoide-ovocito son llevados a cabo *in vitro*, utilizando para ello ovocitos sin ZP, con lo cual se evita la interferencia de la zona en la realización del ensayo y en la interpretación de los resultados (39).

Existen principalmente dos formas de evaluar la ocurrencia de la fusión espermatozoide-ovocito. El método más comúnmente utilizado es la observación de la incorporación del espermatozoide al citoplasma del ovocito, que constituye una evidencia indirecta pero inequívoca de que la fusión de membranas ha ocurrido. El otro método utilizado consiste en preteñir los

ovocitos con un fluorocromo específico para ADN, como lo es el Hoechst 33342, y luego inseminarlos con espermatozoides no tratados. Si ocurre la fusión, el fluorocromo entra al espermatozoide que se ha fusionado y tiñe su ADN, resultando en la aparición de una cabeza fluorescente en la superficie del ovocito. Los espermatozoides que no se han fusionado permanecen no fluorescentes (66,67).

Especificidad de especie en la fusión

Debido a que el ovocito de hámster sin ZP puede ser penetrado por espermatozoides de todas las especies estudiadas hasta el momento (39), y que inicialmente los estudios de fusión de gametas se realizaron en esta especie, durante mucho tiempo se creyó que no existía especificidad de especie en el proceso de fusión. Sin embargo, actualmente es aceptado que, aunque menos restringida que la penetración de la ZP, existe especificidad de especie en este proceso. Es así como por ejemplo, los ovocitos de ratón sólo pueden ser penetrados por espermatozoides de la misma especie (68). La fusión de gametas heterólogas es posible en algunos casos, pero sólo con gametas provenientes de determinadas especies y no siempre en ambas direcciones. Por ejemplo, los ovocitos de rata pueden ser penetrados heterológamente por espermatozoides de ratón, pero los ovocitos de ratón no pueden ser penetrados por espermatozoides de rata (69). Inclusive, los mismos ovocitos de hámster sin ZP poseen cierto grado de especificidad ya que, al ser inseminados en una misma cápsula con iguales cantidades de espermatozoides provenientes de hámster, cobayo y humanos, el número de espermatozoides de hámster que se encuentra en cada ovocito siempre es mayor al correspondiente a las otras especies (38).

Consecuencias de la fusión

Luego de la fusión con el espermatozoide, el ovocito inicia una serie de eventos morfológicos y bioquímicos que llevan a la división celular y diferenciación, o sea a la formación de un nuevo individuo. A esta reanudación de la actividad del ovocito se lo denomina activación. Unos segundos luego de que la fusión ha ocurrido se produce un aumento transitorio de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático en el ovocito (70). Los indicadores más visibles de la activación son a) la exocitosis de los gránulos corticales y b) la reanudación de la meiosis.

a) *Exocitosis de los gránulos corticales*: Los gránulos corticales son vesículas derivadas del aparato de Golgi que contienen mucopolisacáridos y diversas enzimas, y se disponen en la periferia del ovocito. Pocos minutos luego de producida la fusión, más del 95% de los gránulos corticales ha sido expulsado por exocitosis (1). Su función es modificar la ZP, en lo que se denomina la “reacción de zona”, como así también el oolema de forma tal de prevenir la polispermia. Ha sido demostrado en varias especies, que las proteasas liberadas de los gránulos corticales provocan la hidrólisis parcial de proteínas de la ZP (cerdo:(71), humano: (72)). En el ratón, ZP2 (120 kDa) es hidrolizada, resultando en una proteína de 90 kDa a la que se denomina ZP2_r (73). ZP3 también es modificada por el contenido de los gránulos corticales, pero en este caso se modifica el patrón de glicosilación de dicha proteína (74).

El oolema también es modificado luego de la reacción cortical, y este cambio se conoce como “reacción vitelina”. Dado que las membranas de los gránulos corticales se integran al oolema luego de su exocitosis (75), se postula que tanto su contenido como sus membranas juegan un papel importante en el establecimiento del bloqueo de polispermia a nivel de la membrana plasmática.

En algunas especies, como el hámster, humano y perro, la prevención de polispermia depende principalmente de la reacción de zona. En otras especies, como el conejo y el murciélago, el bloqueo depende principalmente de la modificación del oolema, por lo cual estos ovocitos presentan normalmente espermatozoides supernumerarios en el espacio perivitelino. Existe además un tercer grupo de especies, que incluye a la rata, ratón y cobayo, en el que el bloqueo de polispermia depende de ambos (1).

b) Reanudación de la meiosis: Una vez que se ha completado la meiosis y liberado el segundo corpúsculo polar, el complemento haploide resultante se transforma en el pronúcleo femenino. En tanto, el núcleo del espermatozoide se decondensa y se transforma en el pronúcleo masculino. En ambos pronúcleos comienza la síntesis de ADN. Una vez que los pronúcleos han completado su desarrollo, migran al centro del ovocito, sus envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar lugar a la primera división meiótica.

Moléculas involucradas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito

Si bien el proceso de fusión de gametas ha sido ampliamente caracterizado en sus aspectos estructurales, sólo en los últimos años se han realizado estudios tendientes a identificar las moléculas involucradas en esta interacción. La estrategia más comúnmente utilizada consiste en probar si anticuerpos poli- o monoclonales contra proteínas del espermatozoide son capaces de interferir con la ocurrencia de la fusión. Por lo tanto, si bien escasa, la mayor parte de la información disponible se refiere a moléculas del espermatozoide, y es más limitada cuando se trata de las moléculas del ovocito involucradas en fusión.

Moléculas del ovocito

La existencia de componentes de la membrana del ovocito involucrados en el proceso de fusión fue sugerida por primera vez por Boldt y colaboradores (76,77) quienes demostraron que el tratamiento de ovocitos de ratón con proteasas afecta la habilidad de dichos ovocitos de fusionarse con el espermatozoide. Estudios posteriores mostraron que una proteína de 94 kDa desaparece de los ovocitos tratados y puede ser regenerada por los ovocitos luego de varias horas de terminado el tratamiento, paralelamente a la recuperación de la capacidad de fusión de dichos ovocitos (78,79). La situación en el hámster parece ser distinta que en el ratón ya que el oolema del ovocito de hámster es muy resistente al tratamiento proteolítico (80,81). Bronson y Fusi (82,83) mostraron que el agregado de un péptido que contenía la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) a ovocitos de hámster sin ZP afectaba la interacción con el espermatozoide, indicando la existencia de sitios de unión para RGD en la superficie del ovocito. Dado que muchas integrinas reconocen al péptido RGD, se sugirió que estos sitios de unión podrían ser integrinas. La presencia de distintos tipos de integrinas en el oolema fue demostrada por diferentes grupos (84-86). Almeida y colaboradores (86) sugirieron que, en particular la integrina $\alpha_6\beta_1$, sería el receptor para la subunidad β de fertilina, una proteína del espermatozoide involucrada en fusión.

Recientemente, se describió la asociación entre la integrina $\alpha_6\beta_1$ y la proteína CD9 en la membrana del ovocito de ratón (87). CD9 es un miembro de la superfamilia de proteínas con cuatro dominios transmembrana (o tetraspaninas), que funcionan a través de interacciones laterales con otras proteínas de superficie (88). Así, estas moléculas funcionarían como "facilitadores" más que como receptores, y reclutarían otras moléculas de superficie para el proceso de fusión. Otras tetraspaninas han sido implicadas en la fusión de membranas en otros sistemas, tal como en la fusión de mioblastos durante la diferenciación de células musculares (89). La

participación de CD9 en la fusión de gametas se confirmó con el uso de animales "knock out" para esta proteína. Ovocitos provenientes de estos animales tienen una capacidad normal de unir espermatozoides, pero presentan una sévera inhibición en su capacidad de fusionarse (90-92). Debido a la asociación entre CD9 y $\alpha_6\beta_1$ en la superficie del ovocito (90), se ha postulado que CD9 participaría en la fusión a través de su interacción con $\alpha_6\beta_1$ (87,90-92). Sin embargo, recientemente se ha informado que ovocitos que carecen de la integrina $\alpha_6\beta_1$ presentan una capacidad de fusión normal, por lo que la integrina no sería esencial para la fusión de las gametas (93). En consecuencia, CD9 podría participar indirectamente en este proceso a través de su interacción con otras proteínas del ovocito o, alternativamente, podría interactuar directamente con una proteína del espermatozoide. En este sentido, se conoce el caso de una tetraspanina que funciona como receptor, la proteína CD81 que es utilizada por el virus de la hepatitis C para entrar a la célula huésped (94).

Coonrod et al (95) estudiaron el efecto del tratamiento de ovocitos de ratón con la fosfolipasa específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), observando una inhibición de la unión de los espermatozoides al oolema, así como de la fusión de las gametas. El análisis por SDS-PAGE bidimensional de las proteínas liberadas por la enzima, reveló la presencia de una proteína de 70k Da (pI 5) y otra de 35-45 kDa (pI 5.5). Por su parte el tratamiento de ovocitos de hámster con PI-PLC, liberó un grupo de proteínas de 25-40 kDa (pI 5-6) al mismo tiempo que inhibió la interacción de los ovocitos con espermatozoides humanos (96). Se ha propuesto que las proteínas liberadas por la PI-PLC constituirían proteínas unidas al oolema mediante un ancla de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que estarían involucradas en la interacción de las gametas. La identidad de estas proteínas aún no se conoce.

Moléculas del espermatozoide

Saling y colaboradores (97) mostraron que dos anticuerpos monoclonales (M29 y M37) son capaces de inhibir específicamente el proceso de fusión en el ratón. El anticuerpo M29 reconoce un antígeno de 40 kDa que se localiza en el segmento ecuatorial del espermatozoide. El antígeno reconocido por el anticuerpo M37, no ha sido aún caracterizado.

El anticuerpo monoclonal OBF13, dirigido contra espermatozoides de ratón, también produce una reducción significativa del porcentaje de ovocitos penetrados (98). Si bien el antígeno reconocido por OBF13 no ha sido aún identificado, su localización ha sido extensamente estudiada. El anticuerpo no se une a espermatozoides epididimarios frescos, mientras que reconoce la región acrosomal de espermatozoides frescos permeabilizados (99) y toda la cabeza de los espermatozoides reaccionados (99,100). Los autores postulan que el antígeno reconocido por OBF13 estaría localizado en el acrosoma de los espermatozoides intactos y que, luego de la reacción acrosomal, podría migrar hacia la región post-acrosomal.

Focarelli et al (101) identificaron una proteína de 20 kDa en el espermatozoide humano, que llamaron gp20. La proteína se localiza sobre la cabeza y la pieza media de la cola en espermatozoides frescos, y en el segmento ecuatorial de espermatozoides capacitados. El anticuerpo anti-gp20 es capaz de inhibir la penetración de ovocitos de hámster por espermatozoides humanos, sugiriendo la posible participación de la proteína en la fusión de las gametas. La secuenciación del extremo N-terminal de gp20 indicó una homología del 100% con CD52, una proteína previamente descrita como asociada a la maduración epididimaria (102), y con la proteína SAGA, previamente identificada como uno de los antígenos reconocidos por anticuerpos aglutinantes de pacientes inmunofértiles (103).

La proteína "ecuatorina", denominada así por su localización en el segmento ecuatorial, fue identificada en el espermatozoide de rata y de ratón utilizando

anticuerpos monoclonales (104). En experimentos de fertilización *in vitro*, el anticuerpo monoclonal MN9 anti-ecuatorina no afecta la motilidad de los espermatozoides, la unión de los mismos a la ZP, o la penetración de la ZP. Sin embargo, el porcentaje de ovocitos fertilizados se reduce significativamente, observándose la acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino (105). La fertilización *in vitro* de ovocitos sin ZP también es inhibida por el anticuerpo MN9, confirmando el efecto del anticuerpo sobre la etapa de fusión de las gametas.

Otro anticuerpo monoclonal dirigido contra espermatozoides humanos reaccionados, el anticuerpo MH61, produce una inhibición en el porcentaje de ovocitos de hámster sin ZP penetrados por espermatozoides humanos (test de hámster) (106). MH61 reconoce una proteína de 43 kDa que se localiza en la región post-acrosomal del espermatozoide reaccionado, y no se une a espermatozoides frescos. La secuenciación de la proteína reconocida indicó que la misma correspondía a la proteína de adhesión CD46 (107).

Resultados similares se obtuvieron al utilizar el anticuerpo monoclonal PH-30 que inhibe el proceso de fusión y reconoce una proteína a la que se denominó PH-30 y más recientemente, "fertilina" (108). En el ratón, fertilina se localiza en el segmento ecuatorial del espermatozoide reaccionado (109), ubicación consistente con una posible participación en el proceso de fusión. Fertilina está formada por dos subunidades, α (47 kDa) y β (30 kDa), cada una de las cuales es una proteína integral de membrana que se expresa como un precursor de mayor tamaño (108,110), que contiene un dominio desintegrina y un dominio metaloproteasa (111). Estas proteínas fueron los primeros miembros clonados de la creciente familia ADAM (a desintegrin and metalloprotease domain) (112-114). Las desintegrinas son proteínas que se unen a las integrinas, moléculas involucradas en la adhesión celular. Mientras que la subunidad β conserva el dominio desintegrina en la proteína madura, la subunidad α presenta un potencial péptido de fusión (110), similar a los

observados en diferentes proteínas virales. Estas características de fertilina permitieron elaborar un modelo para explicar su participación en la fusión de gametas: el dominio desintegrina de fertilina β se uniría a una integrina del ovocito, lo que expondría el péptido fusogénico de fertilina α , conduciendo a la fusión de las membranas (115). Mientras que diversos trabajos han cuestionado la función propuesta para la subunidad α (116-118), diversas evidencias apoyan la función propuesta para fertilina β . Péptidos sintéticos con la secuencia correspondiente a la región desintegrina de fertilina β fueron capaces tanto de unirse al ovocito, como de inhibir la fusión espermatozoide-ovocito (119). Por otro lado, la construcción de ratones deficientes en fertilina β y el análisis de su fertilidad, indicó que los ratones macho resultaron infértiles (120). Si bien los espermatozoides de estos animales presentaron una reducción en su capacidad para unirse al oolema en ensayos de fusión *in vitro*, la causa de la infertilidad *in vivo* resultó ser la incapacidad de los espermatozoides para llegar al oviducto, por lo que fertilina β podría poseer otras funciones adicionales.

La proteína "cirtestina" fue clonada en el ratón, y mostró ser también un miembro de la familia ADAM (112,121). La presencia de péptidos específicos para la región desintegrina de cirtestina, así como de anticuerpos dirigidos contra estos péptidos, produce una fuerte inhibición tanto de la unión como de la fusión entre el espermatozoide y el ovocito (109,122). En cuanto a la localización celular de cirtestina, existen controversias. Mientras que Linder y colaboradores (123) describen que la misma se localiza exclusivamente sobre la membrana acrosomal interna del espermatozoide de ratón, Yuan et al (109) la detectan por inmunofluorescencia sobre el segmento ecuatorial de espermatozoides de ratón. Si bien los ratones macho "knock out" para esta proteína son infértiles, la capacidad de fusión de los espermatozoides no está afectada, y la infertilidad se debería a la inhibición de la interacción de los espermatozoides con la ZP (124). Por lo tanto, no es del todo claro el papel desempeñado por esta proteína en el proceso de fusión de las gametas.

La proteína DE y su participación en el proceso de fusión en la rata, fueron descritas inicialmente por nuestro laboratorio. Su caracterización, así como las evidencias de su participación en la fusión de gametas, se describen a continuación.

Proteína DE

Las proteínas "D" y "E", descritas por primera vez por Cameo y Blaquier en 1976 (125), fueron denominadas así en base a su migración respecto a la albúmina (a la que se le asignó la letra "A") en geles no desnaturalizantes. Posteriormente, otros laboratorios describieron proteínas epididimarias con características bioquímicas similares a D y E. Mientras que Brooks y Higgins (126) mantuvieron la nomenclatura original asumiendo que sus proteínas correspondían a las originalmente descritas por Cameo y Blaquier, otros autores utilizaron diversos nombres para estas proteínas (127-130). El ADNc de dos de estas proteínas fue clonado por Brooks et al (131) y por Charest et al (132), que obtuvieron la misma secuencia.

La purificación y caracterización inicial de D y E indicó la naturaleza ácida de las mismas, con puntos isoelectrónicos de 5.13 y 4.95 para D y E respectivamente, y un peso molecular de 37 kDa. La naturaleza glicoproteica de ambas proteínas se describió originalmente por la reacción positiva con ácido periódico, seguido de reactivo de Schiff (133), determinándose posteriormente que la masa glicosídica representa un 10 % del total y está compuesta por residuos manosa, galactosa, N-acetil glucosamina, ácido N-acetil neuramínico, y glucosa (134).

Dadas las características comunes entre D y E, y la copurificación luego de numerosos pasos de separación de proteínas, se postuló que la glicosilación heterogénea de un único polipéptido originaría ambas proteínas (134), pasando a ser designadas como una única entidad: "DE".

La proteína DE se sintetiza específicamente en el epidídimo, mayoritariamente en el *caput*, y en menor medida en el *corpus* (135), y se asocia a los espermatozoides durante el tránsito epididimario (136), localizándose en la región del acrosoma anterior (137). Recientes resultados de nuestro laboratorio indican la existencia de dos poblaciones asociadas a la superficie del espermatozoide con afinidades diferentes: una población mayoritaria que se asocia en forma débil, y puede ser extraída mediante el tratamiento con NaCl 0.4 M, y una fracción minoritaria que se asocia con mayor afinidad y requiere el tratamiento con detergentes o agentes caotrópicos para lograr su disociación del espermatozoide (138). En tanto la población “fuertemente unida” aparece en espermatozoides del *caput* epididimario y se mantiene constante a lo largo de la maduración, la población “débilmente unida” se incrementa durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo (138).

La inseminación intrauterina con espermatozoides de rata preincubados con el anticuerpo anti-DE, produjo porcentajes de fertilización significativamente menores que aquellos obtenidos con espermatozoides preincubados con un anticuerpo control (139). Este resultado constituyó la primera evidencia de la posible participación de DE en el proceso de fertilización. Posteriormente, se observó que la proteína DE migraba de su localización original hacia el segmento ecuatorial, luego de la capacitación *in vitro* o *in vivo* (140). La relocalización de la proteína al segmento ecuatorial, región por la cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito, sugirió la posibilidad de que la misma participara en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito. Resultados posteriores de nuestro laboratorio indicaron que la presencia de proteína DE durante la coincubación de espermatozoides y ovocitos de rata sin ZP, producía una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados (141). El efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración, y específico para la proteína DE, ya que la presencia de otras proteínas utilizadas como control (ovoalbúmina, α lactoalbúmina, anhidrasa carbónica)

no tuvieron efecto sobre el porcentaje de ovocitos fertilizados. La unión inicial de los espermatozoides a los ovocitos, no fue afectada por la presencia de la proteína DE, indicando que la misma participa en un evento posterior a la unión de las gametas y conducente a la fusión de las membranas. Estos resultados sugerían la existencia de sitios complementarios para DE en la superficie del ovocito. Mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta, se observó la presencia de dichos sitios complementarios sobre toda la superficie del ovocito, exceptuando el área libre de microvellosidades que cubre el huso meiótico, área por la cual el espermatozoide raramente se fusiona con el ovocito. Por lo tanto, mientras la proteína DE se localiza sobre la región fusogénica de la membrana plasmática del espermatozoide, los sitios complementarios para DE se encontrarían localizados en la región fusogénica de la membrana plasmática del ovocito. Estos resultados constituyeron la primera evidencia acerca de la existencia de sitios complementarios para una proteína del espermatozoide sobre el ovocito de mamíferos.

Con el fin de estudiar la relevancia de los sitios complementarios para DE en la fusogenicidad del oolema, se investigó la relación entre la aparición de dichos sitios durante el desarrollo de los ovocitos, y la adquisición de la capacidad fusogénica de los mismos. Los resultados indicaron que los ovocitos inmaduros con un diámetro menor a 50 μm , no presentaron capacidad de fusionarse con los espermatozoides, como así tampoco sitios complementarios para DE en su superficie (142). Por el contrario, los ovocitos inmaduros con un diámetro superior a los 50 μm , o en estadios de maduración más avanzados, mostraron capacidad para fusionarse con espermatozoides, como así también la presencia de sitios complementarios para DE. La participación de los mismos en la adquisición de la capacidad fusogénica quedó demostrada por la inhibición de la fertilización producida por la presencia de la proteína DE durante la coincubación de espermatozoides con ovocitos inmaduros (142). Estos resultados indicaron que la aparición de sitios

complementarios para DE mediaría la adquisición de fusogenicidad del oolema durante la ovogénesis.

Recientemente, en nuestro laboratorio se ha estudiado la presencia de la proteína DE en el ratón. Experimentos de Western blot utilizando el anticuerpo contra la proteína DE de rata, indicaron la presencia de una proteína con un tamaño similar en extractos epididimarios y de espermatozoide (143). En estudios de IFI, anti-DE reconoció a la proteína sobre la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide de ratón. Al igual que en la rata, la presencia de la proteína durante la coincubación de espermatozoides y ovocitos sin ZP, produjo una disminución significativa en el porcentaje de fertilización, sin inhibir la unión de las gametas. La incubación de ovocitos de ratón sin ZP con la proteína DE, y su posterior utilización en ensayos de IFI utilizando anti-DE como primer anticuerpo, indicó la presencia de sitios complementarios para DE en la región fusogénica de los ovocitos de esta especie (143).

Considerando que existe información sobre la participación tanto de fertilina como de DE en la fusión de gametas de ratón, es posible delinear una secuencia de eventos involucrados en el proceso de fusión en este modelo animal. Fertilina mediaría la unión inicial de las gametas, a través de la interacción de su dominio desintegrina con una integrina presente sobre el oolema, mientras que la proteína DE y sus sitios complementarios participarían en un evento posterior a la unión y conducente a la fusión de las membranas plasmáticas de ambas gametas. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual DE participaría en el proceso de fusión, aún se desconoce. La identificación de los componentes estructurales de la proteína involucrados en su función permitirá avanzar en la comprensión de dicho mecanismo. Por lo tanto, **el objetivo de la primer parte de esta Tesis ha sido estudiar la relación existente entre la estructura de la proteína DE, y la actividad biológica de la misma.**

Con el fin de investigar si además de participar en el proceso de fusión, la proteína DE era relevante para la fertilidad de un individuo, ratas macho y hembra de las cepas Sprague-Dawley, Wistar y Lewis fueron inmunizadas con proteína DE purificada de epidídimo, evaluándose tanto la presencia de anticuerpos anti-DE como la fertilidad de los animales durante un período de 6 meses. Mientras que ninguno de los animales de la cepa Sprague-Dawley presentaron anticuerpos anti-DE, y su fertilidad fue del 100%, el 92 % de los sueros de animales Wistar, y el 93% de los correspondientes a animales Lewis, resultaron positivos para la presencia de estos anticuerpos, y presentaron una inhibición significativa o completa de la fertilidad (144).

La especificidad de la respuesta inmune quedó evidenciada por experimentos de Western blot, en los que los sueros inmunes reconocieron, a diferencia de los sueros controles, a la proteína DE en extractos epididimarios y de espermatozoides, sin reaccionar en forma cruzada con otras proteínas de diversos tejidos reproductivos y esenciales (145). Por otro lado, los sueros inmunes fueron capaces de reconocer, por IFI, a la proteína DE tanto en su localización dorsal en espermatozoides frescos, como en su localización ecuatorial en espermatozoides capacitados. El efecto de los sueros sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides fue evaluado mediante procedimientos indirectos, en los que espermatozoides epididimarios preincubados con los sueros fueron expuestos a ovocitos sin ZP en ensayos de fusión. La incubación de los espermatozoides con suero proveniente de animales inyectados con DE produjo una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados, a diferencia de los espermatozoides incubados con suero control. Esta inhibición no involucró la aglutinación o inmovilización de los espermatozoides (144). Por su parte, la inseminación intrauterina con espermatozoides expuestos a los sueros inmunes, produjo una reducción del porcentaje de ovocitos penetrados recuperados del oviducto, respecto al obtenido con espermatozoides incubados con suero control (145). Esta inhibición tampoco fue debida a un efecto sobre la

viabilidad o motilidad de los espermatozoides, ni sobre su capacidad de sufrir la capacitación, o la RA.

En conjunto, estos resultados apoyaban la participación de los anticuerpos como mediadores del efecto inhibitorio de la fertilidad. La capacidad demostrada por DE de producir una respuesta inmune y una reducción de la fertilidad en animales inmunizados sugiere su potencial uso para el desarrollo de un método inmunológico para el control de la fertilidad. Una evidencia que apoya fuertemente esta posibilidad, es la existencia de casos de infertilidad humana asociados a la presencia de anticuerpos anti-espermatozoides (AAE) en suero. La presencia de AAE ha sido implicada en 5-30 % de los casos de infertilidad (146), y es detectada en prácticamente todos los hombres vasectomizados (147). Los pacientes vasectomizados con altos títulos de anticuerpos AAE tienen una baja probabilidad de recuperar la fertilidad luego de la vasoanastomosis (148,149). Exceptuando su infertilidad, los pacientes inmunofértiles tanto hombres como mujeres, no presentan ninguna alteración en su salud a pesar de la persistencia por años de los AAE. Estos datos sugieren que las proteínas del espermatozoide pueden generar en ambos sexos una respuesta inmune capaz de inhibir la fertilidad, y en ausencia de daños colaterales.

Además de la proteína DE, se ha ensayado la capacidad de diversos antígenos del espermatozoide para producir una respuesta inmune y una reducción de la fertilidad. El resultado más exitoso se logró con la inmunización de cobayos con PH20, una glicoproteína de la superficie del espermatozoide (150) que posee actividad de hialuronidasa y está involucrada en la unión secundaria a la ZP (151). La totalidad de los machos y de las hembras inyectados presentó una inhibición completa de la fertilidad, que revirtió luego de la disminución de los títulos anti-PH20 en suero (152). Sin embargo, posteriormente, se demostró que la inmunización de los machos con PH20 produce orquitis autoinmune severa, por lo cual la infertilidad luego de la inmunización se debería a la ausencia de espermatozoides en el epidídimo

y no a una inhibición específica de la actividad de la proteína (153). Esto puso de manifiesto la importancia de conocer los mecanismos involucrados en la inhibición de la fertilidad en este tipo de estudios. Por lo tanto, **uno de los objetivos de este trabajo consistió en estudiar los mecanismos involucrados en la inhibición de la fertilidad luego de la inmunización de ratas con la proteína DE.**

El potencial uso de una proteína para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad, requiere sin embargo, que la proteína pueda ser producida en gran escala y de manera homogénea, lo que es muy difícil de lograr a partir de la purificación de la proteína nativa. Esto lleva a que sea necesario lograr la expresión recombinante de la proteína, o la síntesis orgánica de un péptido correspondiente a la misma. Por lo tanto, **el siguiente objetivo de este trabajo, consistió en evaluar si la proteína DE expresada en forma recombinante es capaz de reproducir los efectos de la proteína nativa, tanto en lo que respecta a la inducción de una respuesta inmune como a la inhibición de la fertilidad en animales.**

El potencial desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad humana utilizando proteínas del espermatozoide, requiere la previa identificación y caracterización de una proteína involucrada en el proceso de interacción de gametas de dicha especie. En este sentido, dos grupos de trabajo describieron en 1996 la presencia de una proteína similar a DE en el ser humano. Esta proteína, llamada ARP (AEG-Related Protein) (154) o hCRISP-1 (155), presenta una identidad del 40% con la secuencia de la proteína publicada por Brooks (131) y Charest (132), se expresa específicamente en el epidídimo, y se asocia a la superficie del espermatozoide humano durante la maduración. Debido a las numerosas similitudes entre ARP y DE, existía la posibilidad de que la proteína humana

cumpliera una función similar a la proteína DE, razón por la cual nuestro laboratorio comenzó a investigar la participación de ARP en el proceso de fusión de gametas. Dado que por motivos éticos, no es posible realizar el ensayo de fertilización utilizando espermatozoides y ovocitos humanos, se recurrió al empleo del test de hámster (HOPT: hamster oocyte penetration test), comúnmente utilizado en clínicas de infertilidad para predecir la capacidad fertilizante de una muestra de espermatozoides humanos. Este ensayo, se basa en el hecho de que los espermatozoides humanos pueden penetrar ovocitos de hámster sin ZP, lo cual brinda información sobre la capacidad que tiene el espermatozoide humano de capacitarse, sufrir la RA y fusionarse con el oolema. La presencia del anticuerpo anti-ARP durante la coincubación de espermatozoides humanos con ovocitos de hámster produjo una reducción significativa del porcentaje de ovocitos penetrados, sin afectar la viabilidad o motilidad de los espermatozoides, o la unión inicial de los espermatozoides al oolema (156), sugiriendo la participación de ARP en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito. Si bien estos resultados, junto con los obtenidos en las ratas inmunizadas con DE, apoyan el potencial uso de ARP para el desarrollo de un método inmunológico de control de la fertilidad en el ser humano, es necesario primeramente realizar una serie de ensayos en una especie cercana. Por esta razón el **último objetivo de esta Tesis consistió en el estudio de la capacidad inmunogénica de la proteína epididimaria ARP en un modelo de primates no humanos.**

OBJETIVO

De acuerdo a lo descripto, el presente trabajo ha tenido dos objetivos principales:

- I. Estudio de la relación estructura-función de la proteína DE.**
- II. Estudio del potencial uso de DE para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad.**

Para llevar a cabo dichos objetivos, se realizaron los siguientes estudios:

Parte I:

1. Clonado y secuenciación de DE, y expresión de la proteína recombinante en bacterias.
2. Estudio de la importancia de los hidratos de carbono y puentes disulfuro para la actividad biológica de la proteína.
3. Identificación del sitio o dominio de la proteína responsable de su actividad.

Parte II:

1. Estudio de los mecanismos responsables de la inhibición de la fertilidad en ratas inmunizadas con DE.
2. Evaluación de la capacidad de la proteína DE recombinante de producir una respuesta inmune y una inhibición de la fertilidad.
3. Estudio de la capacidad inmunogénica de la proteína epididimaria humana ARP en primates no humanos.

ODO

Parte I

Animales

Para la obtención de gametas, se utilizaron ratas macho adultas (3-12 meses), y hembras prepúberes (26-29 días de edad) de la cepa Sprague-Dawley

Las ratas fueron mantenidas en el bioterio del IBYME, con alimento y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad

Proteína DE y anticuerpo anti-DE

La proteína DE utilizada en este trabajo fue purificada de acuerdo a lo descrito por Garberi y colaboradores (133,134). Brevemente, la purificación incluye la precipitación del citosol epididimario con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, una cromatografía en Sephadex G-100 y un paso final de cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-Concanavalina A (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia). Cuando este material es sometido a electroforesis y tinción con plata, sólo se detectan las bandas correspondientes a DE.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el anticuerpo anti-DE: anticuerpo policlonal (fracción IgG), dirigido contra las bandas de la proteína DE, desarrollado en conejo en nuestro laboratorio (157).

Clonado de DE

Se utilizó una biblioteca de ADNc de epidídimo de rata en λ gt11, cedida por el Dr. D. Hamilton (Universidad de Minnesota, EE.UU.). Para el plaqueo de los bacteriófagos se creció un cultivo de células *E. coli* Y1090 en 5 ml de LB conteniendo 0.2% maltosa, hasta su saturación. El cultivo fue centrifugado a 3000 rpm por 10 min, y las células fueron resuspendidas en 2,5 ml de medio

SM (SO_4Mg_2 10 mM, NaCl 0.1 M, gelatina 0.025%). En un tubo estéril se mezclaron 200 μl de esta suspensión de bacterias con la solución de fagos (entre 10 y 20 μl) y con 3 ml de "top agar" (SO_4Mg_2 10 mM, 0.8% agar en LB mantenido a 45°C). Una vez homogeneizado, el contenido del tubo fue esparcido rápidamente sobre una placa de 90mm de LB-agar. Luego de la solidificación del "top agar", la placa fue cultivada a 42°C hasta la aparición de las playas de lisis. En ese momento, se colocó sobre el agar una membrana de nitrocelulosa preincubada por 2 hs en IPTG 10 mM, y la placa fue incubada durante 16 hs a 37°C. Los filtros fueron luego revelados como se indica en la descripción de la técnica de Western blot, excepto que el anticuerpo anti-DE fue diluido en presencia de un 10% de un extracto de proteínas de *E. coli*, con el fin de capturar los anticuerpos que pudieran reaccionar con las proteínas bacterianas. Este extracto se preparó a partir de un cultivo saturado de bacterias, que fue luego centrifugado, resuspendido en PBS (1/30 del volumen original), y finalmente sonicado.

Las playas positivas fueron extraídas del agar mediante una pipeta Pasteur estéril y colocadas en un microtubo conteniendo 1 ml de medio SM. Los clones positivos fueron purificados mediante tres rondas sucesivas de "screening", obteniéndose finalmente los clones aislados de contaminantes. En la primer ronda se analizaron 10^4 fagos, detectándose seis positivos, de los cuales cuatro pudieron ser purificados.

Preparación de la solución madre de fagos y titulación

En una placa de LB-agar se sembraron 10^5 fagos del clon a amplificar, tal como se describe en la sección anterior. La placa se incubó a 42°C hasta la confluencia de las playas de lisis, y luego de agregarse 5 ml de SM estéril, se dejó a 4°C durante 16 hs. El medio fue colectado, y centrifugado en presencia

de un 2% de cloroformo. La fase acuosa fue recuperada y almacenada a 4°C en presencia de un 2% de cloroformo.

La titulación de las soluciones de fagos se realizó sembrando gotas de 5 µl de diluciones seriadas al décimo, sobre placas de LB-agar conteniendo una capa de "top agar" con bacterias Y1090. De esta manera se pueden analizar múltiples diluciones en una misma placa de Petri.

Lisogenización de *Escherichia coli* Y1089 con fagos recombinantes

Una colonia aislada de *E. coli* Y1089 fue inoculada en 5 ml de LB- ampicilina (100µg /ml) conteniendo 0.2 % maltosa, y el cultivo fue crecido a 37°C durante toda la noche. El cultivo saturado fue diluido 1:100 en LB conteniendo SO_4Mg_2 10mM, crecido hasta una densidad óptica a 600 nm ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0.25, y luego incubado en hielo durante 30 min. Cien µl de esta solución fueron inoculados con 5 o 10 µl de cada fago recombinante, e incubados a 32°C durante 30 min. Luego de realizarse una dilución 1:10⁵, se sembraron 100µl en placas de LB-ampicilina, las que fueron incubadas a 32°C durante toda la noche. Cada una de las colonias resultantes fue repicada a dos placas de LB-agar conteniendo una cuadrícula numerada. Una de las placas fue incubada durante toda la noche a 30°C, y la otra a 42°C. Las colonias que crecieron a 30°C y no crecieron a 42°C fueron seleccionadas para la posterior expresión de las proteínas recombinantes.

Producción de la proteína de fusión β gal-DE

Cada colonia lisogénica fue crecida a 32°C en 5 ml de LB-ampicilina (LB-amp). El cultivo saturado fue diluido 1:100 en 5 ml de LB-amp, crecido a 32°C hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ =0.5-0.6, y luego incubado a 42°C durante 30 minutos. El cultivo fue luego fraccionado en dos tubos, agregándose a uno de ellos IPTG hasta una concentración final de 2,5 mM. Luego de una incubación de 2 hs a

37 °C, se centrifugó 1 ml de cada tubo a 3000 rpm por 10 min, y se resuspendió el pellet en 100µl de buffer siembra.

Estimación del tamaño de los insertos de los clones obtenidos

Los insertos fueron amplificados por PCR y luego separados por electroforesis en gel de agarosa 1 %. El templado para la PCR se preparó a partir de 10 µl de la solución madre de cada fago, a los que se les agregó 50 µl de agua. Esta dilución fue hervida durante 10 min, utilizándose luego 35 µl de esta solución como molde para la PCR. Los “primers” empleados hibridan a ambos lados del sitio único de clonado de λgt11 (gentileza del laboratorio del Dr. Levin, INGEBI). Se utilizó la polimerasa “Taq” (Promega) y el siguiente ciclado:

5 min a 94°C
1 min a 94°C }
1 min a 60°C } 30 ciclos
1,5 min a 72°C }
5 min a 72°C

Secuenciación del inserto del clon 1

El inserto del clon 1 fue amplificado por PCR y purificado a partir de un gel de agarosa “low melting point” mediante una columna Wizard PCR (Promega). La secuenciación se realizó en forma automática en el INGEBI empleando los “primers” con los que se amplificó el inserto.

Subclonado del ADNc de DE a pRSET

La estrategia para el subclonado al vector pRSET se indica en la **Figura 9**. El ADNc de longitud completa de DE fue amplificado por PCR como se describiera anteriormente para los distintos clones de la biblioteca de epidídimo de rata. El fragmento amplificado fue precipitado con etanol, digerido con las enzimas de restricción NcoI y HindIII, purificado mediante una columna S-400 (Pharmacia) y luego ligado al vector pRSET (B) digerido con las mismas enzimas y purificado de la misma manera.

Se transformaron bacterias DH5 α competentes con el producto de la ligación, y la presencia del plásmido en las colonias resultantes fue analizada mediante la purificación del ADN plasmídico y la separación del mismo por electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, el plásmido obtenido de diferentes colonias fue digerido con las enzimas NcoI y HindII, y sometido a electroforesis en agarosa 1%, para evaluar la presencia del inserto.

Expresión de pRSET-DE

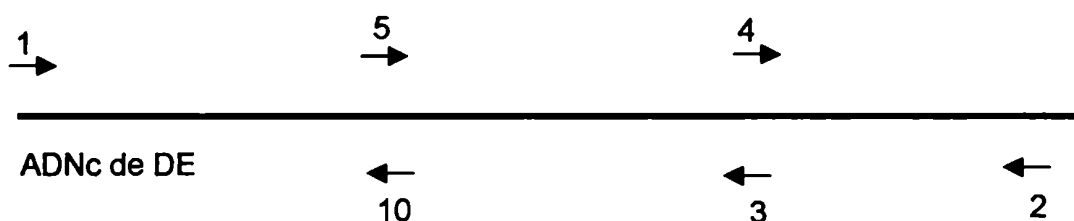
Los plásmidos pRSET-DE provenientes de colonias independientes, fueron utilizados para transformar bacterias competentes de la cepa BL21 (pLYS S). Colonias aisladas de bacterias BL21 transformadas con pRSET-DE fueron crecidas en LB-amp a 37°C durante toda la noche. El cultivo saturado fue diluido 1:100 en LB-amp y crecido hasta una $DO_{600nm}=0.5$, momento en que fue dividido en dos fracciones, una de las cuales recibió PTG hasta una concentración final de 1 mM. Los cultivos fueron incubados durante 2-3 hs a 37°C y luego centrifugados 1 min a 12000 rpm. El pellet fue resuspendido en buffer de siembra (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1% Azul de bromofenol), y posteriormente analizado por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Expresión de proteínas recombinantes en pMAL-p2

La expresión de la proteína DE y los fragmentos recombinantes, fue llevada a cabo mediante la amplificación por PCR de las regiones codificantes correspondientes. Para tal fin se utilizaron los siguientes "primers":

Primer	Secuencia	Sitios
1	5' ACGGATCCCAAGATAACCACTGATGAATG 3'	BamHI
2	5' CAACTGCAGACCTGATTATGTGGACTGG 3'	PstI
3	5' TCTACAAGCTT <u>A</u> ATTGCCACCAGGACAA 3'	HindIII y <u>Stop</u>
4	5' AAGGATCCGGTGGCAATTATGTAGGAAG 3'	BamHI
5	5' TAGGATCCAGGTGCATTTACAATGACAG 3'	BamHI
10	5' TCGACAAGCTT <u>C</u> ATTTCTGAGCGTTCACATA 3'	HindIII y <u>Stop</u>

Los "primers" mencionados hibridan con el ADNc de DE en las regiones indicadas en el esquema siguiente:



La amplificación se realizó con la polimerasa Deep Vent (New England Biolabs) para reducir la probabilidad de introducción de mutaciones durante la amplificación, utilizando las siguientes combinaciones de "primers" y los siguientes ciclos térmicos:

Proteína	Primers
recDE	1 y 2
F1	1 y 3
F2	2 y 4
F3	2 y 5
F4	3 y 5
F5	1 y 10

5 min a 94°C

1 min a 94°C
1 min a 40°C
1 min a 72°C

5 ciclos

1 min a 94°C
1 min a 50°C
1 min a 72°C

25 ciclos

5 min a 72°C

Los “primers” fueron diseñados conteniendo un sitio para una enzima de restricción en su extremo 5’ (indicado en rojo a la derecha de la secuencia), para facilitar el posterior clonado en el vector de expresión. El vector de expresión utilizado fue pMAL-p2 (New England Biolabs) que produce una proteína de fusión con MBP (“maltose binding protein”). Tanto el vector como los fragmentos amplificados fueron precipitados con etanol, digeridos con las enzimas de restricción apropiadas, purificados mediante columnas de sephacryl S-400 (Pharmacia), y posteriormente ligados. Bacterias *E.coli* DH5 α fueron transformadas con el producto de la ligación y las colonias transformantes fueron analizadas para determinar la presencia del plásmido. Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con las enzimas de restricción

apropiadas para cada caso y separados por electroforesis en un gel de agarosa 1%, para analizar la presencia del inserto en el plásmido.

Las distintas construcciones recombinantes fueron utilizadas para transformar bacterias BL21, que fueron crecidas a 37°C en LB-ampi 2% glucosa hasta una $DO_{600nm} = 0.5$, y luego de la adición de IPTG 0.1mM, incubadas durante toda la noche a 26°C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación durante 20 minutos a 4000 x g. En los casos de expresión citoplásmica de la proteína recombinante, las células fueron resuspendidas en buffer 20 mM Tris (pH 7.4) 1M NaCl, 1mM EDTA, y finalmente sonicadas. En los casos de expresión en el periplasma, las células fueron resuspendidas en 30 mM Tris (pH 8), 20% sucrosa, 1M EDTA, centrifugadas, y resuspendidas en 5 mM SO_4Mg a 0°C. Esta suspensión fue agitada durante 10 minutos en hielo, y luego centrifugada a 8000 x g durante 20 minutos, recuperándose el sobrenadante.

En todos los casos, la suspensión final fue centrifugada durante 30 min a 12000 x g, y el sobrenadante pasado por una columna de resina amilosa equilibrada con 20 mM Tris (pH 7.4) 1M NaCl, 1 mM EDTA, eluyéndose la proteína de fusión con maltosa 10mM. Las fracciones conteniendo el eluido fueron dializadas 24 hs contra H_2O , y luego contra una solución con la composición salina del medio utilizado para ensayos de fertilización *in vitro*, RFM (158). La proteína fue finalmente concentrada por centrifugación en Centriplus. Alternativamente, las proteínas fueron dializadas contra H_2O y luego liofilizadas.

Deglicosilación enzimática

La proteína DE nativa fue resuspendida en buffer 50 mM Na_3PO_4 (pH 7.5) y luego incubadas a 37°C durante 2 hs con 1 U de PNGasaF (New England Biolabs) por cada 5µg de proteína. Luego de este período, la proteína fue dializada contra medio de fertilización RFM durante 16 hs a 4°C.

Reducción y alquilación

La proteína DE fue resuspendida en buffer Tris 50 mM (pH 8.5) e incubada con ditioneitol (DTT) 250 mM durante 2 hs a 37°C. Luego de este período, se agregó 1 volumen de ácido iodoacético (AIA) 1.5 M y la proteína se incubó durante 2 hs a temperatura ambiente (TA) en oscuridad. Tanto el DTT como el AIA se eliminaron por diálisis durante 24 hs contra medio de fertilización. Dado que la proteína fue utilizada posteriormente en ensayos de fusión de gametas, era importante controlar que, luego de la diálisis, la muestra no fuera tóxica para las gametas debido a la presencia de DTT o AIA residual. Para este fin, se utilizó como control, una solución sin proteína que fue tratada de la misma manera.

Detección de grupos sulfidrilo (-SH).

Cantidades iguales de proteína DE nativa, recombinante o MBP fueron tratadas con 6 µg/ml biotina-maleimida en PBS durante 1h a TA. Las proteínas fueron luego separadas por SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada durante 1 hr, y luego incubadas durante 1 hr con extravidina-peroxidasa (1:1000 en PBS). Luego de tres lavados con 0.02% Tween20 en PBS (PBS-T20), la presencia de grupos SH se reveló por incubación de las membranas con diaminobencidina (DAB) 0.4mg/ml en Tris 0.1M (pH 7.4), H₂O₂ 0.1%.

Separación electroforética de las proteínas

Para llevar a cabo la separación electroforética de las muestras, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS, de 1.5 mm de espesor, preparados siguiendo la técnica descripta por Laemmli (159). Las muestras fueron diluidas

en buffer de siembra con SDS, 10% glicerol y azul de bromofenol (BPB), y separadas bajo condiciones de corriente constante (20 mA por gel) a TA.

En cada calle del gel se sembró el equivalente a 80 μ l del cultivo bacteriano (para tinción con Coomasie y Western blot), una masa de 6-9 μ g de las proteínas recombinantes purificadas (tinción con nitrato de plata), y 0.2-0.5 μ g de la proteína DE nativa (Western blot).

Tinción de geles

Con Azul de Coomasie: Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron sumergidos y agitados en Azul de Coomasie R250 (CBB)(0.25% en 45% metanol, 10% ácido acético) durante 2 hs a TA. El exceso de colorante fue eliminado mediante sucesivas incubaciones en destañidor (50% metanol, 10% ácido acético)

Con nitrato de plata: los geles fueron fijados durante 1 h en una solución 40% metanol-10% ácido acético, y sometidos a dos incubaciones de 30 minutos en 10% etanol 5% ácido acético, y a una incubación de 10 minutos en 0.1% $K_2Cr_2O_7$, 0.03% HNO_3 . Luego de tres lavados con agua, los geles fueron incubados durante 30 minutos con 0.2% $AgNO_3$ y luego lavados con agua durante 10 minutos. El revelado se inició mediante una incubación de 30 segundos con 3% Na_2CO_3 , 0.02% formaldehído, seguida de una segunda incubación hasta la aparición del color. La reacción se finalizó con el agregado de ácido acético al 5%.

Para su conservación, los geles fueron secados mediante vacío y calor, sobre un papel de filtro.

Western blot

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida fueron electro-transferidas (160) a membranas de nitrocelulosa. Ocasionalmente, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar las proteínas. Para ello, las membranas fueron incubadas durante cinco minutos en Ponceau 0.1% en ácido acético 5%, y el exceso de colorante removido mediante lavados con agua deionizada. Posteriormente, el colorante asociado a las proteínas fue eliminado durante el paso de bloqueo. Las membranas fueron bloqueadas con 20 mg/ml de leche descremada y luego incubadas con anti-DE (diluido 1:250 en solución de bloqueo) o con anti-MBP (diluido 1:500 en solución de bloqueo). Luego de tres lavados con PBS-T20, las membranas fueron incubadas con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo acoplado a biotina (1:500 en PBS). Luego de los lavados correspondientes, las membranas de nitrocelulosa fueron expuestas a extravidina conjugada con peroxidasa (1:1000). Por último, se realizó la reacción de revelado con el sustrato DAB (40 µg/ml, H₂O₂ 0.01% en Tris 0.1 M pH 7.5), deteniéndose la misma con un exceso de agua corriente. Excepto los lavados que fueron de 10 min, todas las incubaciones fueron realizadas por un período de 60 min a TA, con agitación.

Capacitación de espermatozoides

Para la recuperación de espermatozoides epididimarios que luego serían utilizados en ensayos de fusión, los animales fueron anestesiados en una atmósfera de éter etílico, y los epidídimos extraídos y liberados cuidadosamente de tejido adiposo y de sangre. Posteriormente, se efectuaron incisiones en el *cauda* epididimario, para permitir la salida de los espermatozoides. Con el fin de obtener una muestra enriquecida en células móviles, se efectuó un sistema de selección que consistió en una modificación

de la técnica descrita por Shalgi y col. (161). El contenido viscoso del *cauda* epididimario fue recogido con una pinza y colocado en el fondo de un tubo cónico de 15 ml, previamente seccionado a la altura de 4 ml. La masa de espermatozoides fue rápida pero cuidadosamente cubierta con 2 ml de medio de fertilización de rata (RFM) (158) equilibrado y mantenido a 37°C. Luego de aproximadamente 10 minutos de incubación a 37°C en un incubador de gaseo automático conteniendo una atmósfera de 5% de CO₂, se recuperó la capa superior del tubo conteniendo los espermatozoides de mayor motilidad. La concentración de espermatozoides se determinó por conteo en una cámara hemocitométrica.

La capacitación se realizó en placas para cultivo de tejidos conteniendo 500 µl de RFM cubiertos por 300 µl de aceite mineral (Fisher, soybolt viscosity 125/135) por hoyo. Las placas se equilibraron en estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 30 minutos, procediéndose luego a sembrar los espermatozoides en una concentración final de $0,75 \times 10^6$ espermatozoides/ml. Finalmente, las placas se incubaron a 37°C en estufa de CO₂ por un período de 4-5 horas para permitir la capacitación.

Superovulación de las hembras y preparación de los ovocitos

Ratas hembras prepúberes fueron superovuladas con una inyección de 20 UI de eCG, seguida, a las 48 -72 horas, por una inyección de 25 UI de hCG. Las hembras fueron sacrificadas a las 12-15 horas luego de la inyección de hCG, y ambos oviductos fueron extraídos cuidadosamente. Los complejos ovocito-cúmulus fueron obtenidos mediante punción de la *ampulla*, y las células del cúmulus fueron disociadas mediante una incubación con hialuronidasa 1% (type IV, Sigma) a TA. La ZP fue removida mediante el tratamiento con solución ácida de Tyrode (pH 2.5) durante 10-20 segundos (162), luego del cual, los ovocitos fueron rápidamente lavados en medio RFM.

Ensayo de fusión *in vitro*

Los ovocitos libres de ZP fueron colocados en un número de 10 a 15 en cápsulas de fertilización (previamente equilibradas en estufa a 37 °C y 5% de CO₂) conteniendo una gota de 200 µl de RFM cubierta por aceite mineral. Las cápsulas se dejaron equilibrar durante 15-20 minutos más antes del agregado de los espermatozoides capacitados, en una concentración final de 1 a 2,5 x 10⁵ espermatozoides/ml. Las gametas se co-incubaron durante 2-4 horas. Finalmente, los ovocitos fueron lavados para remover los espermatozoides que hubieran quedado débilmente unidos, y montados entre un portaobjetos (conteniendo 4 gotas de una mezcla 9:1 de vaselina líquida y parafina) y un cubreobjetos, para su posterior evaluación bajo microscopio óptico. Se consideraron “penetrados” o “fertilizados” a aquellos ovocitos que presentaban dos pronúcleos y la presencia de la cola del espermatozoide dentro del citoplasma del ovocito. El porcentaje de células fertilizadas fue calculado como el número de ovocitos fertilizados/número de ovocitos observados x 100.

Ensayo de unión espermatozoide-ovocito

Ovocitos de rata sin ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados como se describiera anteriormente, y luego de 30 minutos de co-incubación a 37° en estufa gaseada, los mismos fueron lavados y fijados en glutaraldehído 2% en PBS durante 10 min. La unión de espermatozoides al ovocito fue evaluada mediante dos índices: 1) el porcentaje de ovocitos con al menos un espermatozoide unido, y 2) el número de espermatozoides unidos por ovocito.

Ensayos de viabilidad y motilidad de los espermatozoides

Espermatozoides capacitados fueron incubados a 37°C en estufa gaseada, en presencia de 6 μ M recDE, 6 μ M MBP, o 60 μ M de F2, F4 o F5 durante 1 h. Al cabo de este tiempo, la viabilidad fue evaluada incubando 40 μ l de la suspensión de espermatozoides con 10 μ l de eosina 0.5% en solución salina. Los espermatozoides fueron colocados en portaobjetos precalentados a 37°C, y la incorporación del colorante fue determinada por microscopía óptica. El porcentaje de viabilidad se calculó como: número de espermatozoides que no incorporó colorante/ número total de espermatozoides observados x 100. La motilidad fue evaluada colocando una alícuota sobre portaobjetos precalentados a 37°C, y por observación bajo microscopio óptico.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de ovocitos

Los ovocitos sin ZP fueron incubados con 6 μ M recDE o con distintos fragmentos recombinantes de DE durante 1 h a 37°C, y luego fijados en p-formaldehído 2% durante 45 min a TA. Luego de 3 lavados con PBS conteniendo 4 mg/ml de BSA (PBS-BSA4), los ovocitos fueron incubados en SCAN 5% en PBS durante 30 min a 37°C para bloquear los sitios inespecíficos. Luego de una incubación de 1 h a 37°C con anti-MBP diluido 1:100 en SCAN 1%, los ovocitos fueron lavados en PBS-T20, e incubados durante 30 min a 37°C con anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:25 en PBS). Al finalizar una serie de lavados con PBS-BSA-T20, los ovocitos fueron incubados durante 2 min con 50 μ l de Azul de Venas, y finalmente observados bajo microscopio de fluorescencia.

Inmunofluorescencia cuantitativa de ovocitos

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con 3 μ M recDE en presencia de distintas concentraciones de DE nativa, durante 1 hr a 37°C y luego fijados con p-formaldehído 2% en PBS durante 40 min a TA. Los ovocitos fueron luego procesados para IFI como se describiera anteriormente, excepto que como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgG de conejo acoplado a biotina (1:500). Después de los correspondientes lavados, los ovocitos fueron incubados durante 1 h a TA con extravidina conjugada con fosfatasa alcalina (1:1000), lavados nuevamente, colocados individualmente en microtubos, e incubados durante 3 hs a TA con 0.1 mM 4-metil umbeliferilfosfato en buffer DEA. Finalmente, luego de agregar 1 ml de glicina 0.5M (pH 10) a cada tubo, la formación de producto fue cuantificada en un fluorímetro Hoeffler.

Parte II:

Animales

Las ratas utilizadas fueron animales adultos (80-90 días al comienzo de la inmunización) de la cepa Wistar, y fueron mantenidas en el bioterio del IBYME, con alimento y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad

Para la producción de anticuerpos anti-ARP, se utilizaron conejos New Zealand adultos de cuatro meses de edad.

Los monos inmunizados fueron individuos adultos (6-15 años de edad) de la especie *Macaca fascicularis*, mantenidos en las instalaciones del Centro Regional de Primates de California, con un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, a 25-27°C.

Ensayos de inmunización

Ratas: En el ensayo de inmunización con proteína DE recombinante, las cantidades administradas de cada antígeno son las indicadas en las **Tablas 9 y 10**. Cada inyección se preparó disolviendo la proteína en 300 µl de solución fisiológica, realizando luego una emulsión con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (ACF) para la primera inyección, y con adyuvante incompleto de Freund (AIF) para las restantes. Se administraron 300 µl de la emulsión en forma subcutánea en la región dorsal y 300 µl en forma intramuscular en un miembro trasero.

Conejos: Para la preparación de un anticuerpo contra la proteína ARP humana, dos conejos recibieron cuatro inyecciones, cada una de 200 µg de ARP recombinante en 800 µl de emulsión. Al igual que para las ratas, se utilizó ACF para la primera inmunización, y AIF para las siguientes. Las

inyecciones fueron espaciadas cada un mes, y se administraron en forma subcutánea en el dorso del animal.

Monos: los animales recibieron cuatro inyecciones, espaciadas cada 25 días. Como adyuvante se utilizó Montanide ISA 51 para todas las inyecciones. Cada inyección consistió en 200µg de proteína en un volumen total (antígeno + adyuvante) de 1 ml, administrándose 0.5 ml en forma intramuscular en cada muslo. Las inyecciones se aplicaron los días 0, 25, 50 y 75, en tanto los sueros se obtuvieron antes de la primera inmunización, y los días 14, 38, 64 y 89.

Obtención y almacenamiento de los sueros

Para la obtención de los sueros, las ratas fueron anestesiadas y sangradas vía yugular, realizándose una incisión que permitiera la visualización de la vena y su punción. Se extrajeron aproximadamente entre 1.5 y 2 ml de sangre por animal, utilizándose jeringa y aguja N° 21. La sangre se incubó durante 30 minutos a 37°C, para favorecer la coagulación, y luego durante 16 hs a 4°C. Los sueros fueron separados del coágulo por centrifugación durante 15 minutos a 1.700 rpm a 4 °C, y luego fraccionados y almacenados a -20°C.

Enzimoinmunoensayo (ELISA)

Este método se utilizó para el seguimiento de la respuesta inmune, para la determinación de los niveles de anticuerpos presentes en los fluidos reproductivos, y para la cuantificación de la proteína DE asociada a los espermatozoides. Se colocaron 50 µl de una solución 1 ng/µl de proteína (DE nativa, MBP, hARP o mARP, según el caso) en Na₂CO₃ (0.3 M, pH 9.5) por hoyo de placa de ELISA incubándose durante toda la noche a 4°C. La proteína no unida fue eliminada mediante tres lavados con PBS-T20, y luego

las placas fueron bloqueadas durante 90 minutos a TA con leche descremada 20 mg/ml en PBS. Descartada la solución de bloqueo, se agregaron 50 µl por hoyo de cada uno de los sueros obtenidos (1:100 en PBS-BSA 0.1% para los sueros de rata, y diluciones variables de los sueros de mono). Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37°C durante 1 hora; luego de lo cual las mismas fueron lavadas nuevamente tres veces con PBS-T20. A continuación, las placas fueron incubadas con 50 µl/hoyo de segundo anticuerpo (anti-IgG de rata acoplado a biotina 1:500, o anti-IgG de mono acoplado a biotina 1:1000) diluido en PBS-BSA 1%, durante 60 minutos a 37°C. Luego de tres lavados, se agregó una dilución 1:1000 de extravidina conjugada a fosfatasa alcalina en PBS-BSA, y las placas fueron incubadas durante 30 minutos a TA. Finalmente, las mismas fueron incubadas con 1mg/ml de p-nitrofenilfosfato (Sigma 104) en buffer dietanolamina (DEA)(10% v/v DEA, 1,25 % HCl 1N, 0.4 mM MgCl₂), hasta la aparición del color (15-20 minutos), deteniéndose la reacción con NaOH 0,5N y efectuándose la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm.

Para la detección de anticuerpos anti-DE en los fluidos del tracto reproductor masculino y femenino de rata o en el plasma seminal de monos, dichos fluidos sin diluir fueron utilizados como primer anticuerpo, siguiéndose el procedimiento descrito anteriormente.

Todas las mediciones fueron realizadas por duplicado, utilizando como blanco hoyos a los que no se acopló antígeno. El valor del blanco fue restado del promedio obtenido para cada muestra.

ELISA de espermatozoides: La cuantificación de la proteína DE sobre la superficie de los espermatozoides se realizó fijando espermatozoides epididimarios frescos a las placas de ELISA. Se colocaron 50 µl de una suspensión de 10⁵ esp./ml en PBS por hoyo, centrifugándose luego las placas a 2000 rpm durante 10 minutos. Luego de una incubación con 75 µl/hoyo de glutaraldehído 2% en PBS durante 10 minutos, las placas fueron lavadas con

PBS e incubadas con anticuerpo anti-DE (1:100 en PBS-BSA) durante 1 hr a 37°C, seguido de anti-IgG de conejo conjugado con biotina (1:500 en PBS-BSA) durante 1 hr a 37°C. Finalmente, las placas fueron incubadas 1 hr a TA con avidina fosfatasa alcalina (1:1000), y la reacción de color desarrollada como se describiera más arriba.

Titulación por dilución final: Se tomó como título, la inversa de la dilución mayor con resultado positivo. Se adoptó como criterio de positividad, que la absorbancia obtenida fuera mayor que el promedio más tres desvíos estándar de los valores obtenidos para sueros controles o preinmunes a la misma dilución. Por lo tanto, para cada dilución, se midieron al menos cuatro sueros controles, se obtuvo el promedio y la desviación estándar, y se calculó el valor de corte.

Captura de anticuerpos anti-MBP: para medir los anticuerpos específicos contra ARP en los sueros de monos inmunizados con hARP, y utilizando la proteína de fusión como antígeno acoplado a la placa, se realizó una captura de los anticuerpos anti-MBP. Para ello, los sueros fueron diluidos en PBS-BSA conteniendo 100 ng/μl de proteína MBP soluble. La eficiencia de la captura se evaluó utilizando a MBP como antígeno acoplado a la placa.

Apareos

La fertilidad de los animales fue evaluada por apareos naturales en los momentos indicados en las **Figura 36** para los animales inmunizados con la proteína nativa, y en la **Figura 55** para los animales inmunizados con la proteína recombinante. Cada macho, inmunizado o control, fue alojado en una caja junto con tres hembras fértiles durante 7 días, luego de lo cual el macho fue retirado y las hembras examinadas durante 21 días para evaluar signos de

preñez. Las crías de cada hembra fueron contadas, y su sexo determinado. La fertilidad de cada macho fue expresada como: número de hembras preñadas x 100/3.

En el caso de las hembras, para los animales inmunizados con la proteína DE nativa, se colocó un macho fértil con una hembra inmunizada y una hembra control. Para los animales inmunizados con proteína DE recombinante, cada macho fue alojado con una hembra inmunizada con MBP y con una hembra inmunizada con recDE o con proteína DE nativa. En todos los casos, el apareo se mantuvo durante 7 días, luego de lo cual el macho fue retirado. Al igual que con los machos, las crías de cada hembra fueron contadas y su sexo determinado. Se asignó una fertilidad de 100% a las hembras que fueron preñadas, y de 0% a las hembras que no quedaron preñadas.

Histología

Con el fin de realizar un análisis histológico, las ratas fueron anestesiadas y sus órganos removidos y fijados por inmersión en solución de Boin durante 24 horas. Los órganos fueron luego incluidos en parafina, y cortados en micrótopo. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados bajo microscopio óptico.

Obtención de fluidos reproductivos y espermatozoides

Rata: Para disminuir el riesgo de contaminación de los fluidos reproductivos con sangre durante su obtención, los animales fueron previamente perfundidos con PBS. Las ratas fueron anestesiadas con éter, y su caja torácica abierta mediante una incisión en la línea media. Una aguja conectada a una jeringa de 100 ml fue introducida en el ventrículo izquierdo del corazón, y asegurada con una pinza. Un pequeño corte fue realizado en la aurícula

derecha para permitir el drenado del exceso de líquido circulante, y aproximadamente 200 ml de PBS fueron perfundidos a través del ventrículo izquierdo. La progresión y el resultado de la perfusión se evaluó por el cambio en la coloración de los órganos del animal.

En el caso de los machos, los epidídimos fueron removidos, y separados en sus distintas regiones: *caput*, *corpus* y *cauda*. El *caput* del epidídimo fue colocado en 1 ml de RFM y el *corpus* en 0.5 ml. Al *cauda* epididimario se le efectuaron pequeños cortes, y luego fue colocado en 1 ml de RFM, mientras que el vaso deferente fue escurrido con una pinza, liberándose su contenido en 0.5 ml de medio. Las suspensiones obtenidas fueron centrifugadas a 500 x g durante 10 minutos para separar las células de los fluidos. Los sobrenadantes se centrifugaron a 100.000 x g durante 20 minutos y se almacenaron a -20 °C para la determinación de anticuerpos por ELISA. Los espermatozoides de cada región del epidídimo liberados al medio fueron fijados para ser sometidos a IFI.

El fluido uterino se obtuvo aspirando el contenido del útero con una jeringa de 1 ml conteniendo RFM fresco y conectada a una aguja N° 25. El fluido oviductal fue recuperado perfundiendo medio RFM fresco por el interior del oviducto insertando una aguja N° 30 en un extremo del mismo (*ostium*). Los fluidos fueron centrifugados y los sobrenadantes almacenados a -20 °C.

Mono: Las muestras de semen fueron obtenidas por electroeyaculación (163), y recogidas en tubos cónicos de 15 ml conteniendo 5 ml de medio BWW. Luego de 15-30 min, el coágulo fue retirado y los espermatozoides fueron diluidos mediante el agregado de 2 ml de BWW conteniendo albúmina, y luego lavados mediante una centrifugación a 300 x g durante 10 min.

Ensayos de motilidad y viabilidad de los espermatozoides

Alícuotas de espermatozoides frescos en RFM, provenientes de machos de los distintos grupos experimentales, fueron colocadas en portaobjetos precalentados a 37 °C, y el porcentaje de células móviles y el porcentaje de células viables fue determinado como se describiera en la Parte I.

Ensayo de fusión de gametas

Espermatozoides recuperados el cauda epididimario de animales inmunizados o controles fueron capacitados y utilizados para inseminar ovocitos sin ZP, tal como se describiera anteriormente.

Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides

Los espermatozoides frescos, capacitados o recuperados del tracto femenino, fueron lavados con PBS, centrifugados a 300 rpm durante 10 minutos y finalmente fijados con p-formaldehído 2% en PBS durante 10 minutos a TA. Los espermatozoides así preparados fueron luego extendidos sobre portaobjetos pretratados con polilisina (0.05 mg/ml), e incubados con suero de cabra normal (SCAN) 5% en PBS durante 30 minutos a 37°C. Las muestras fueron luego incubadas durante 1 hr a 37°C con el primer anticuerpo (anti-DE 1:100, o los diferentes sueros diluidos 1:50 en SCAN 1%). Luego de tres lavados con PBS, los espermatozoides fueron incubados durante 30 minutos a 37 °C con anti-IgG de conejo o de rata (dilución 1:100 en PBS-BSA) conjugado con FITC. Finalmente, luego de lavar las muestras tres veces con PBS, las mismas fueron montadas bajo glicerol 90% en PBS, selladas con esmalte y observadas bajo microscopio de epifluorescencia (Nikon, Labophot)

utilizando un filtro B-2A. En algunos casos, los espermatozoides fueron contrastados mediante una incubación de 1 min con Azul de Evans.

Para evaluar la presencia de la proteína DE en el tejido epididimario, los cortes histológicos obtenidos de epidídimos de animales inmunes y controles, fueron tratados con distintos alcoholes para remover la parafina, y luego procesados tal como se describiera anteriormente, utilizando el anticuerpo anti-DE como primer anticuerpo.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de ovocitos humanos

La ZP de ovocitos humanos descartados de protocolos de fertilización in vitro fue disuelta mediante el tratamiento con solución ácida de Tyrode, como se describiera para los ovocitos de rata. Los ovocitos fueron incubados con 6 μ M de hARP recombinante o MBP durante 1 h a 37°C y luego sometidos a IFI utilizando anti-ARP o anti-MBP (1:100) como primer anticuerpo.

Preparación de citosoles de órganos de rata y de mono

Para la preparación de citosoles de los distintos órganos, los mismos fueron extraídos de animales sacrificados, e inmediatamente colocados en hielo. Los órganos fueron disgregados en frío, mediante cortes con tijeras, hasta obtener una preparación homogénea. Posteriormente, fueron agregados 1.5 volúmenes de una solución Tris 50 mM, pH 7.4 conteniendo 0.2 mM de PMSF, completándose la homogeneización mediante la utilización de un homogeneizador Polytron. Finalmente, la preparación resultante fue centrifugada durante 20 min a 10000 x g y el sobrenadante centrifugado durante 60 min. a 105.000 x g a una temperatura de 4°C, con el fin de obtener la fracción correspondiente al citosol de cada muestra. Las fracciones obtenidas se dializaron contra 100 volúmenes de una solución de Tris 50 mM,

pH 6.8, y la concentración proteica de las muestras se determinó mediante la técnica descrita por Lowry y colaboradores (164).

Western blot

Las proteínas (20 μ g) presentes en los citosoles de los distintos órganos fueron separadas por SDS-PAGE, y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, que fueron procesadas como se describiera para la Parte I, excepto que como primer anticuerpo se utilizaron los sueros de las ratas, conejos, o monos inmunizados (1:50 en solución de bloqueo), y como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgG de rata, de conejo, o de mono respectivamente, acoplado a biotina.

TADO

Parte I: Estudio de la relación entre la estructura y la actividad de la proteína DE

Capítulo 1: Clonado y expresión de la proteína DE

Tal como se describió en la introducción, las evidencias halladas por nuestro laboratorio indican que la proteína DE participa en el proceso de fusión de las gametas. Sin embargo, se desconoce qué aspectos estructurales de la proteína son importantes para su actividad. Con el fin de comprender el mecanismo molecular de la participación de DE en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito, se inició el estudio de la relación entre la estructura y la función de la proteína. En primer lugar, y para conocer la estructura de la proteína, era importante determinar su secuencia aminoacídica completa.

Clonado del ADNc de DE

Para determinar la secuencia de la proteína DE, así como para obtener el ADNc y posteriormente expresar la proteína recombinante, se procedió a clonar la proteína DE mediante un "screening" de una biblioteca de ADNc de epidídimo de rata (cedida gentilmente por el Dr. Hamilton, Universidad de Minnesota, EE.UU.), utilizando nuestro anticuerpo policlonal anti-DE.

En el "screening" primario se analizaron 10^4 clones, de los cuales seis resultaron positivos. Luego de tres sucesivas rondas de "screening", aislamiento y plaqueo a una dilución menor, cuatro de los clones pudieron ser purificados.

Con el objeto de caracterizar cada uno de los clones obtenidos, se estudió el tamaño de la proteína expresada por cada uno de ellos. Para ello, se construyeron bacterias *E. coli* Y1089 lisógenas para cada fago recombinante, se indujo la expresión de la proteína recombinante con isopropil-tiogalactósido

(IPTG), y se analizaron por Western blot las proteínas producidas. Dado que la proteína recombinante producida por el bacteriófago λ gt11 es una proteína de fusión entre la β galactosidasa (β gal) y la proteína codificada por el inserto (**Figura 1 A**), se utilizó la proteína β gal como control de peso molecular. En caso de que alguno de los clones contuviera la secuencia codificante completa de DE, el tamaño esperado de la proteína sería de aproximadamente 141 kDa (116 kDa de la β gal + 25 kDa de DE). Los resultados presentados en la **Figura 1B** indican que para cada clon, el anticuerpo reconoce una banda de mayor intensidad en la calle correspondiente al cultivo inducido que en aquella correspondiente al cultivo sin inducir. En todos los casos, la banda reconocida presentó una movilidad ligeramente inferior a la β gal sola, sugiriendo que el tamaño de la proteína DE expresada era bastante pequeño, y que, por lo tanto, los fagos obtenidos contendrían un fragmento incompleto del ADNc.

Para determinar el tamaño de los insertos, se realizó una amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre cada clon, utilizando “primers” externos al sitio único de clonado de λ gt11 (**Figura 1A**). La posterior electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados, permitió determinar el tamaño de cada inserto (**Figura 2**). Los distintos clones contenían insertos de tamaños similares, comprendidos en un rango de 320-430 nucleótidos.

El número de aminoácidos esperados para una proteína de 32 kDa con un 10% de hidratos de carbono es de aproximadamente 260, por lo que, teniendo en cuenta que cada aminoácido es codificado por un triplete de nucleótidos, se estima que el ADNc que contenga toda la secuencia codificante sea de al menos 780 pares de bases (pb). Ninguno de los clones contendría, entonces, la secuencia codificante completa, confirmándose lo inferido anteriormente a través del análisis del tamaño de las proteínas.

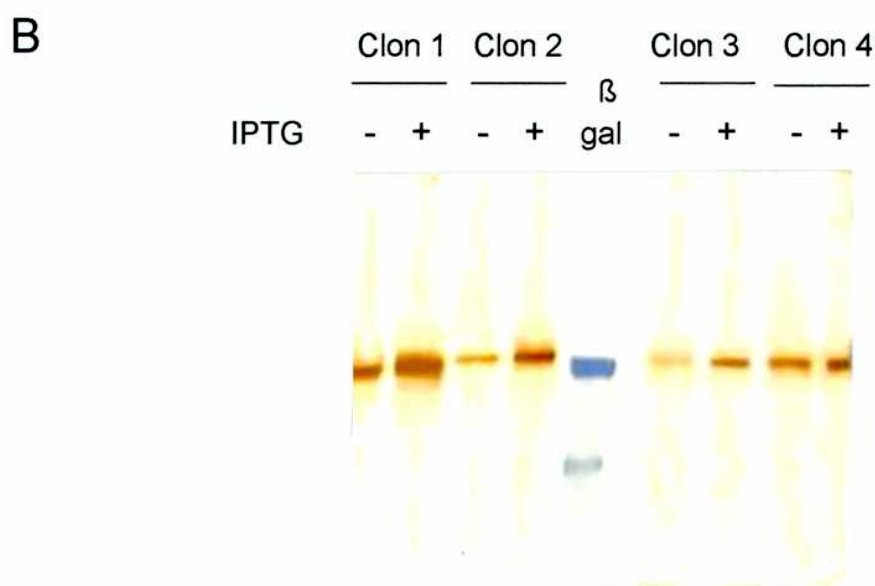
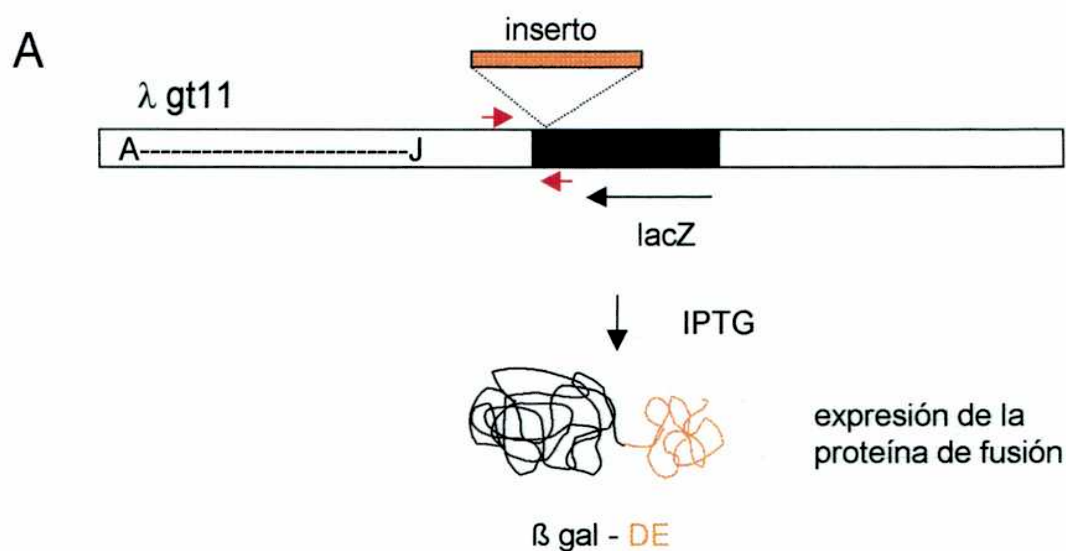


Figura 1: (A) Esquema del vector λ gt11 mostrando el sitio de clonado, que se encuentra dentro del gen lacZ. La inducción con IPTG produce la expresión de la proteína DE fusionada a la β galactodidasa (β gal). **(B)** Bacterias lisógenas para cada clon fueron cultivadas, y la expresión de las proteínas de fusión fue inducida con IPTG. Las proteínas presentes en los extractos de estos cultivos fueron analizadas por Western blot utilizando el anticuerpo anti-DE.

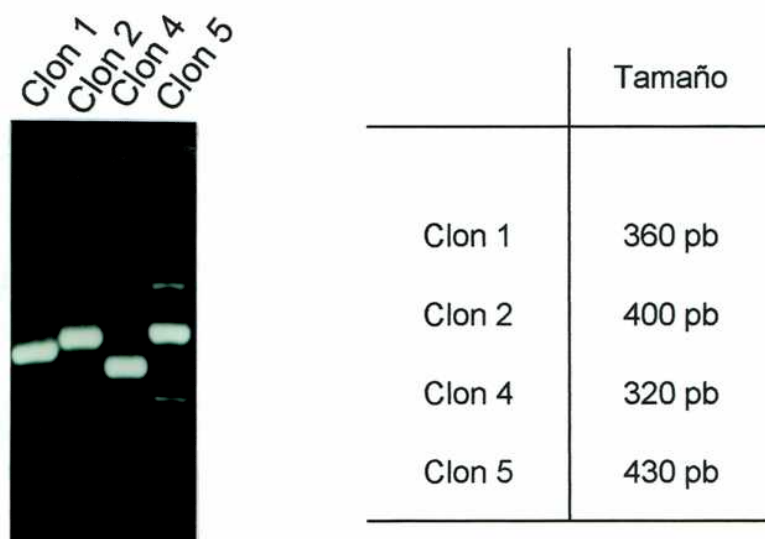


Figura 2: Tamaño de los insertos de los distintos clones purificados de λ gt11. Los insertos fueron amplificados por PCR utilizando los “primers” indicados en rojo en la Figura 1A, y luego separados por electroforesis en gel de agarosa. La tabla indica los tamaños calculados a partir del gel.

Con el fin de determinar la identidad de los clones obtenidos, se amplificaron y purificaron los clones 1 y 5, secuenciándose sus respectivos insertos. De los dos insertos, sólo pudo obtenerse, por lectura de ambas cadenas de ADN, la secuencia correspondiente al clon 1. La misma presentó un 100% de homología con la secuencia de la proteína epididimaria de rata previamente descrita por Brooks et al (131) y la proteína AEG descrita por Charest et al (132). Ambos grupos obtuvieron la misma secuencia codificante para una proteína de 246 aminoácidos (aa). Dado que los 19 aa iniciales corresponderían al péptido señal, la proteína madura contendría 227 aminoácidos. La identificación del aa N-terminal no fue posible por encontrarse bloqueado. La secuencia obtenida para el clon 1 correspondió a 165 pb de la región 3' codificante y 94 pb de la región 3' no codificante de la secuencia nucleotídica (**Figura 3**).

Búsqueda de homologías y análisis estructural de la secuencia de DE

La secuencia aminoacídica de DE indica que la misma pertenece a la familia de proteínas CRISP (cystein rich secretory proteins) (165). Las proteínas pertenecientes a esta familia presentan 16 cisteínas conservadas, 14 de las cuales se encuentran comprendidas dentro de los aa 135-227, es decir en el tercio C-terminal (**Figura 4**). En los mamíferos, existen tres miembros de esta familia: CRISP-1 (DE o AEG-1), proteína de expresión epididimaria, CRISP-2 (AEG-2 o TPX-1) que se expresa en el testículo, localizándose dentro del acrosoma (166) o asociada al flagelo del espermatozoide (167), y CRISP-3 que se expresa mayoritariamente en la glándula salival (155,165,168), pero también en glándulas accesorias, tal como la próstata humana (155) y la vesícula seminal y ampulla equina (169). Fuera de los mamíferos, otras moléculas pertenecientes a la familia CRISP, son la proteína llamada helotermína, proveniente del veneno de la lagartija *Heloderma horridum horridum* (170,171) y la proteína llamada CRVP (cystein rich venom protein)

AAGCAAAGGGACAATATCTCATTCTGCTCTGAAAATAGAACC <u>ATGGC</u> ATTAATGTTAGTG	60
CTGTTGTTTCCTGGCTGCTGTATTGCCCCCATCTCTTCTTCAAGATACCACTGATGAATGG	120
GATAGAGATCTTGAGAATTTGTCAACCACTAAACTGTCAGTCCAAGAAGAGATCATAAAC	180
AAGCACAACCAATTGAGACGAACGGTTTCTCCGTCTGGTAGTGACTTACTAAGAGTGGAA	240
TGGGACCATGATGCTTATGTGAACGCTCAGAAATGGGCAAACACGTGCATTTACAATCAC	300
AGTCCTCTACAACACAGGACAACCACATTAAAATGTGGTGAGAATTTGTTTCATGGCAAAT	360
TACCCTGCATCGTGGTCTTCTGTAATCCAAGATTGGTATGATGAATCCCTTGATTTTGTC	420
TTTGGTTTTCGGCCCCAAAAAAGTTGGTGTTAAAGTCGGACACTATACTCAGGTTGTTTGG	480
AATTCAACTTTCCTGGTTGCATGTGGAGTTGCTGAATGCCCTGACCAACCATTGAAATAC	540
TTTTATGTTTGTCACCTATTGTCCTGGTGGCAATTATGTAGGAAGACTATACTCACCTTAC	600
ACAGAAGGAGAACCTTGTGACAGTTGTCCTGGTAATTGTGAAGATGGGCTGTGCACCAAT	660
GACAGTTGTCCTGGTAATTGTGAAGATGGGCTGTGCACCAAT	
TAGTTGTGAATAGAAGATAATTATTCTAACTGTGGCGATCTGAAGAAGATGGTGAGCTGC	720
TAGTTGTGAATTGAAGATAATTATTCTAACTGTGGCGATCTGAAGAAGATGGTGAGCTGC	
GACGATCCACTTCTTAAAGAAGGTTGCAGAGCTTCATGCTTCTGTGAAGACAAAATTCAT	780
GACGATCCACTTCTTAAAGAAGGTTGCAGAGCTTCATGCTTCTGTGAAGACAAAATTCAT	
<u>TAAATTTCCAGTCCACATAATCAGGTCCATGTAGAAAAGGAAAATACCCTCTACTTAGTC</u>	840
<u>TAAATTTCCAGTCCACATAATCAGGTCCATGTAGAAAAGGAAAATACCCTCTACTTAGTC</u>	
TTACCATGTCTGGTTGCTTCAGAAAAAAAATAAATCTTAATCTCAGCAAAAAAAA	897
TTACCATGTCTGGTTGCTTCAGAAAAAAAATAAATC	

Figura 3: Homología entre la secuencia nucleotídica publicada por Brooks (131) y Charest (132) (indicada en negro), y la secuencia obtenida para el clon 1 de DE (en rojo). El codón ATG inicial y el codón TAA de terminación se indican subrayados.

MALMLVLLFL	AAVLPPSLLQ	DTTDEWDRDL	ENLSTTKLSV
QEEIINKHNQ	LRRTVSPSGS	DLLRVEWDHD	AYVNAQKWAN
RQIYNHSPLQ	HRTTTLKQGE	NLFMANYPAS	WSSVIQDWYD
ESLDFVFGFG	PKKVGVKVGH	YTQVWNSTF	LVAQGVAECP
DQPLKYFYVC	HYCPGGNYVG	RLYSPYTEGE	PCDSCPGNCE
DGLCTNSCEY	EDNYSNCGDL	KKMVSQDDPL	LKEGCRASCFF
QEDKIH			

Figura 4: Secuencia completa de la proteína DE. Las cisteínas presentes en la molécula se muestran resaltadas en verde.

presente en el veneno de la serpiente *Trimeresurus mucrosquamatus* (172). Helotermia es una toxina que produce letargia e hipotermia en las presas de la lagartija (170), y actúa inhibiendo la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico al bloquear los canales rianodínicos (171). Tal como se observa en la **Tabla 1**, la proteína DE presenta porcentajes de identidad variables con los miembros de esta familia.

Tabla 1: Proteínas pertenecientes a la familia CRISP y sus correspondientes porcentajes de identidad con la proteína DE

Proteína	Especie	Identidad	Expresión	Referencia
DE (CRISP-1)	Rata	100%	Epidídimo	
CRISP-1	Ratón	70%	Epidídimo	(173)
ARP (CRISP-1)	Humano	40%	Epidídimo	(154,155),
ARP (CRISP-1)	Macaco	40%	Epidídimo	(174)
CRISP-1	Equino	39%	ND	(*)
CRISP-1	Bovino	60%	ND	(*)
TPX-1(CRISP-2)	Rata	48%	Testículo	(167,175)
TPX-1 (CRISP-2)	Ratón	56%	Testículo	(176)
TPX-1 (CRISP-2)	Humano	55%	Testículo	(176)
AA1 (CRISP-2)	Cobayo	54%	Testículo	(177),
CRISP-3	Ratón	53%	Gl. salival	(165,168)
CRISP-3	Humano	55%	Gl. Salival/ próstata	(155)
CRISP-3	Equino	53%	Vesícula seminal	(169)
Helotermia	Lagartija	43%	Veneno	(170)
CRVP	Ofidio	45%	Veneno	(172)

(*) Secuencias parciales (187 aa en la proteína equina, y 111 aa en la bovina) aún no publicadas pero disponibles en bases de datos de proteínas. El código que permite identificar las secuencias respectivas en la base de datos "embl" es CAA07159 para la proteína equina, y CAB90615 para la proteína bovina. ND: no descripto.

DE presenta porcentajes de homología más bajos (25-35%) con otras proteínas de diverso origen, que tienen incompleto o carecen totalmente del dominio C-terminal rico en cisteínas. Entre ellas se encuentra un grupo de proteínas de plantas (PR-1 a, b y c) (178), proteínas aisladas del veneno de insectos (Ag 5)(179,180), proteínas presentes en el cuerpo fructífero de un basidiomicete (Sc7 y Sc14) (181), proteínas de cestodes (ASP)(182-184) y proteínas humanas asociadas a tumores (GliPR, RTVP-1 (185-187). Las proteínas CRISP junto con estas proteínas conforman la superfamilia "Scp/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7", llamada así por los primeros miembros descriptos.

La búsqueda de dominios o sitios consenso conocidos en la base de datos PROSITE (188), indicó la presencia de una región para la asociación de ácidos grasos, funcional sólo en ciertas lipoproteínas bacterianas, y la presencia de dos secuencias cortas, típicas de la superfamilia Scp/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7 (**Figura 5**), y de función desconocida. Por lo tanto, no se encontraron posibles dominios con función conocida que permitan explicar el mecanismo por el cual DE participa en el proceso de fusión.

El análisis de la secuencia mediante el programa de predicción de estructuras secundarias PHD (Profile network prediction HeiDelberg)(190,191), reveló los resultados presentados en la **Figura 6**. Las regiones con probabilidad de formar α hélice con una longitud considerable (12-20 aa) son de especial interés, ya que podrían ser potenciales péptidos de fusión. La naturaleza anfipática de la α hélice no es evaluada por este tipo de programas, por lo que el análisis se realiza dibujando la secuencia aminoacídica sobre un esquema que representa la α hélice, en forma ordenada y respetando la periodicidad de 3.6 aa por vuelta de hélice, y luego se analiza la distribución de las cargas eléctricas. De las tres regiones de la secuencia con probabilidad de formar

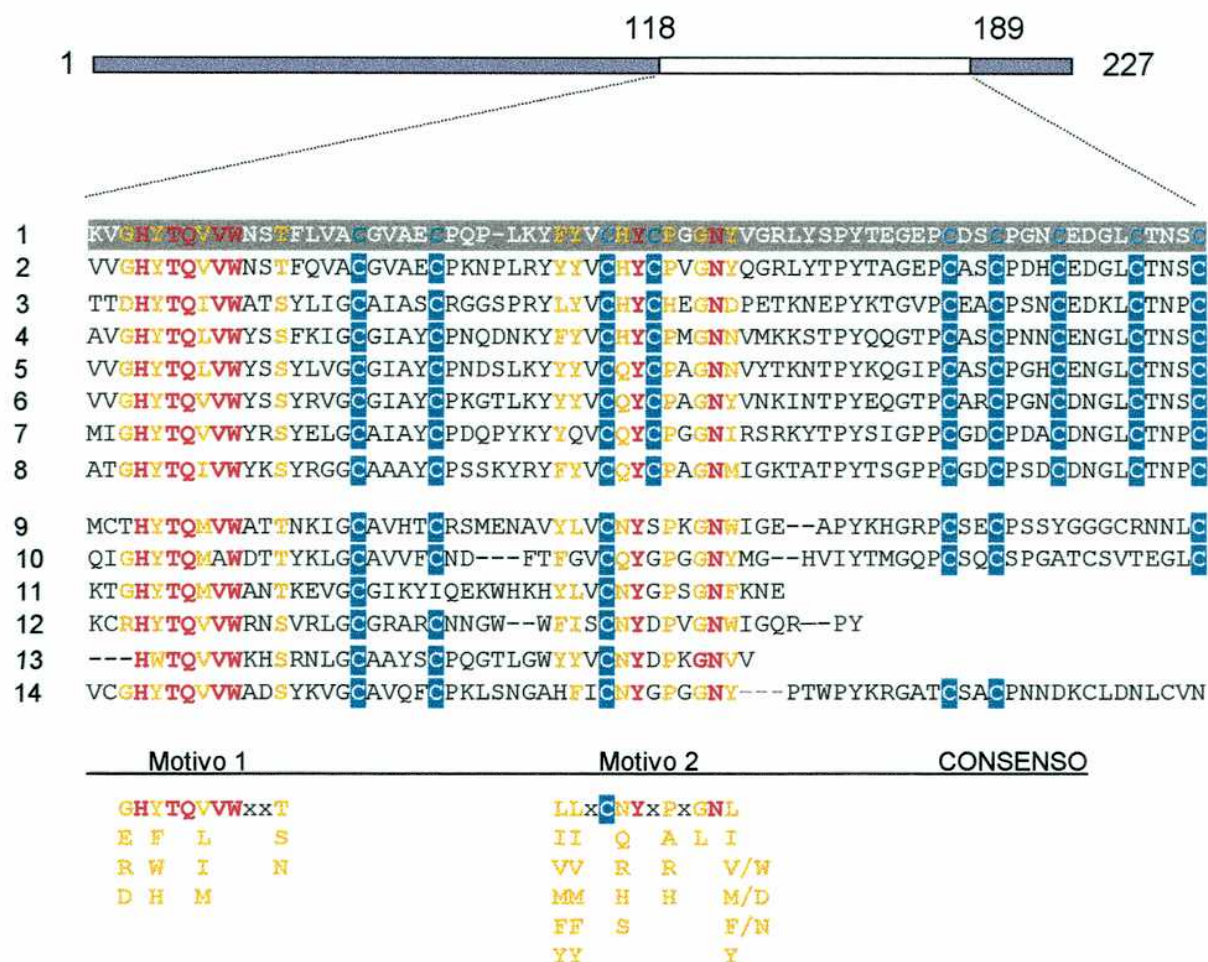


Figura 5: Alineamiento de proteínas de la superfamilia Scp/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7, en la región que contiene los dos motivos característicos de dicha superfamilia. El esquema superior representa la secuencia completa de DE, indicando la región que se detalla en el alineamiento. En naranja se indican los aminoácidos conservados, y en rojo los aminoácidos conservados estrictamente. Las cisteínas conservadas se señalan resaltadas en verde. Las ocho secuencias superiores corresponden a proteínas CRISP, y las seis inferiores a otras proteínas de la superfamilia que carecen de la región C terminal rica en cisteínas, o la tienen incompleta. **1:** DE, **2:** DE de ratón (173), **3:** ARP humana (154,155), **4:** TPX-1 de ratón (176), **5:** TPX-1 de cobayo (177), **6:** CRISP-3 equina (169), **7:** helotermina (171), **8:** CRVP (172), **9:** Lung late gestation protein (189), **10:** Ancylostoma secreted protein (183,184), **11:** Ag 5 de *Vespula vulgaris* (QNX) (180), **12:** PR-1 de tomate (CFE) (178), **13:** Sc-17 (181), **14:** Gli PR (185).

La secuencia consenso para cada motivo muestra los aa estrictamente conservados, así como los diferentes aa posibles para las posiciones variables.

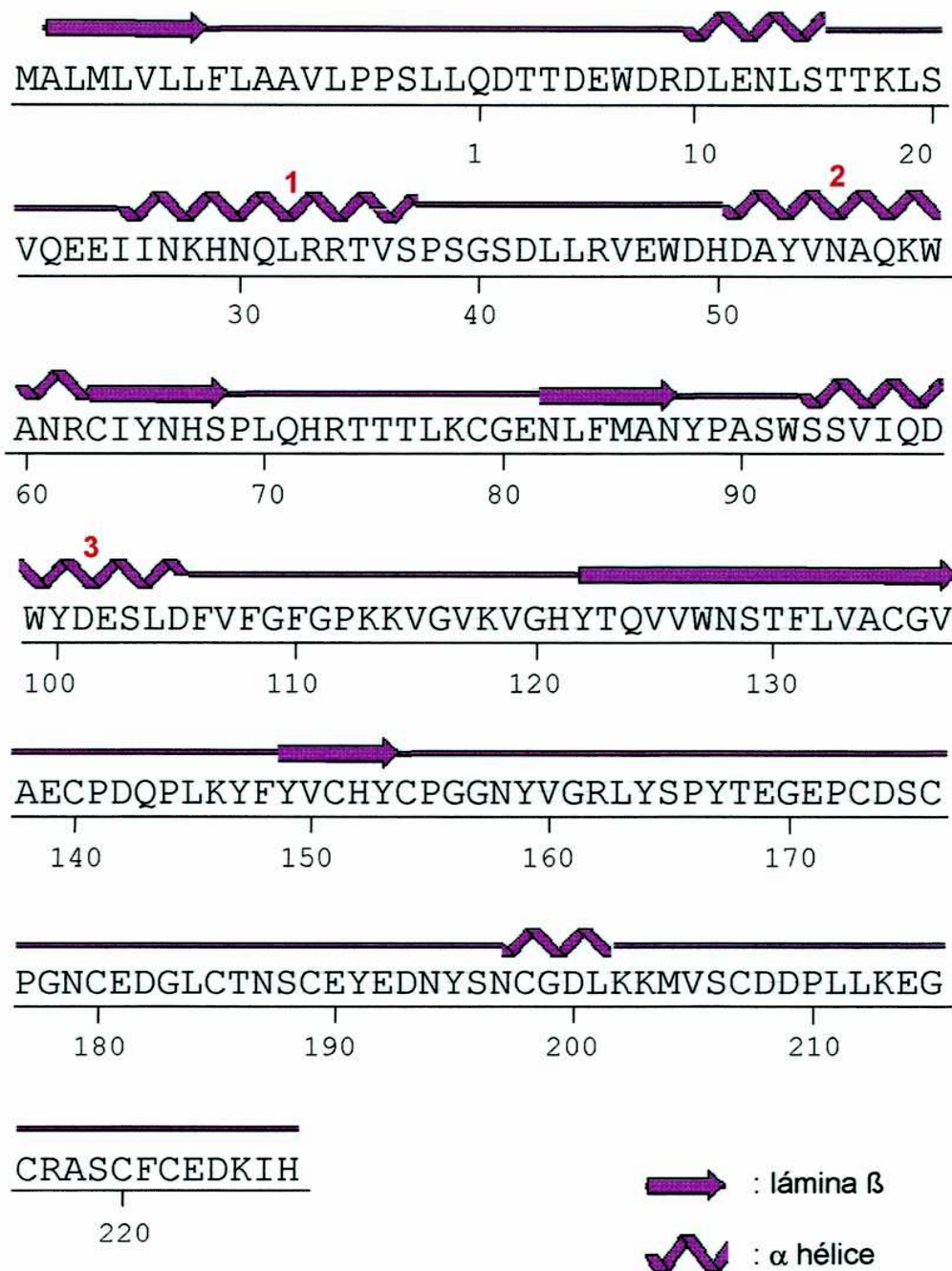


Figura 6: Estructura secundaria de la proteína DE estimada mediante el programa PHD.

una α hélice, sólo la comprendida entre los aa 111-123 podría formar una α hélice anfipática (**Figura 7**).

Con el fin de obtener información respecto a la posible estructura tridimensional de la proteína DE, se utilizaron los datos disponibles para dos proteínas miembros de la superfamilia Scp/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7. Una de ellas es la proteína PR-1 (Pathogenesis Related Protein-1), que presenta una identidad de 37% con DE, cuya estructura tridimensional ha sido resuelta por resonancia magnética nuclear (192) y su código en el Protein Data Bank (PDB) es "1CFE". La otra proteína es la denominada VesV5 o Antígeno 5 en diversos insectos, que presenta un 32% de homología con DE, y una estructura espacial, estudiada mediante difracción de rayos X, que posee el código "1QNX" en la PDB. Si bien la homología entre la proteína DE y estas dos proteínas no es demasiado alta, VesV5 y PR-1 poseen estructuras tridimensionales muy similares a pesar de presentar un 33% de homología entre ellas. Por lo tanto, es posible pensar que la proteína DE podría presentar una configuración espacial similar. En base a las estructuras de PR-1 y VesV5, se obtuvo la estructura terciaria para la región de la proteína DE que presenta homología con estas dos proteínas (aa 52-186), mediante el servicio "SwissModel" de la base de datos "Swiss Protein" (193). La predicción de la estructura espacial ilustrada en la **Figura 8** sin embargo, no supone la formación de una α hélice en la región comprendida entre los aa 111-123.

Expresión de la proteína recombinante

Luego de determinar la identidad de la proteína DE, el paso siguiente consistió en su expresión en forma recombinante. Dado que ninguno de los clones obtenidos contenía la totalidad de la secuencia codificante, se utilizó para la expresión un clon con estas características gentilmente cedido por el Dr. D. Hamilton.

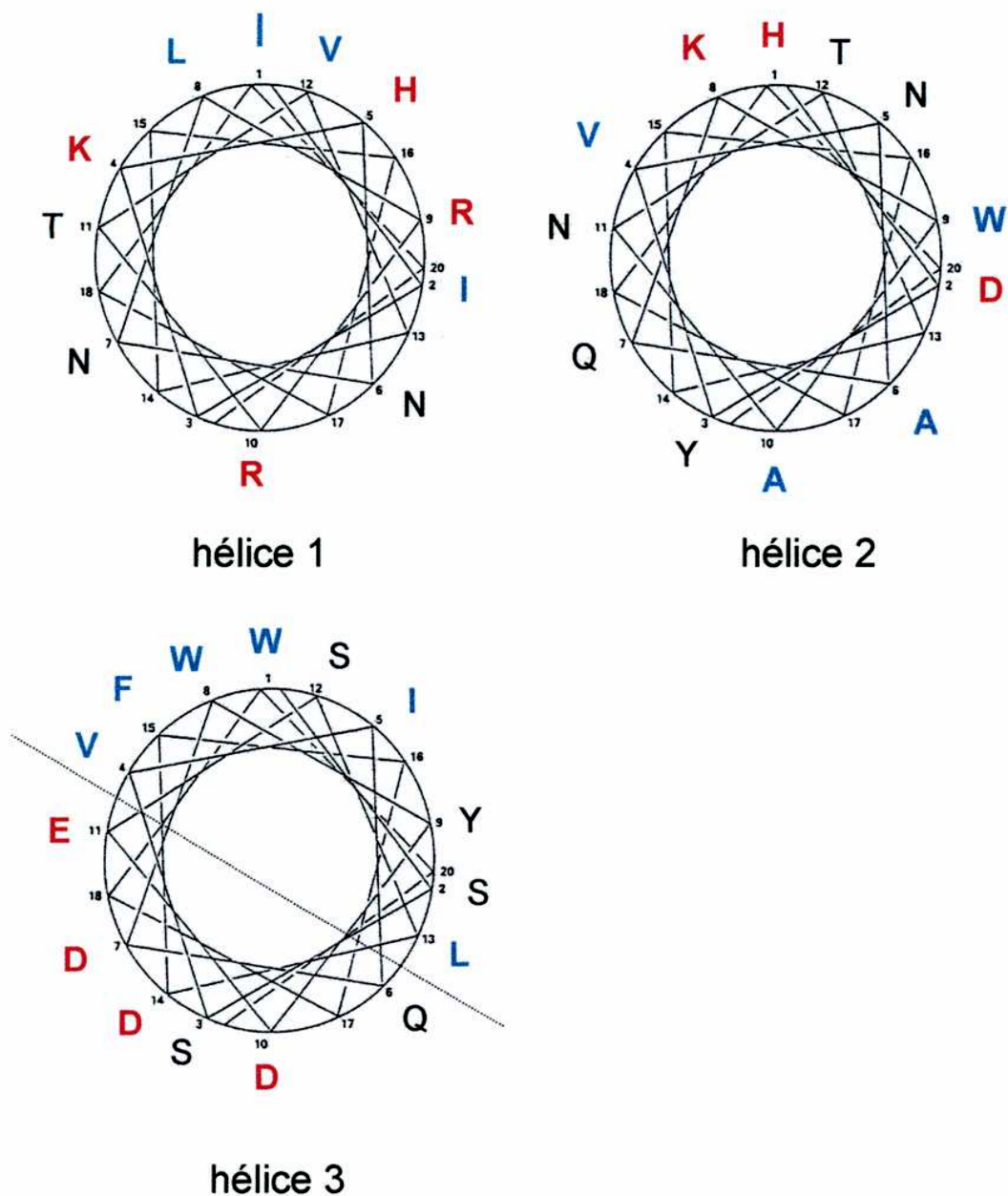


Figura 7: Análisis de la posible formación de hélices anfipáticas en la proteína DE. Las tres secuencias estudiadas corresponden a las regiones numeradas en la Figura 6. Los aminoácidos cargados se indican en rojo, y los hidrofóbicos en azul. La línea de puntos en la hélice 3 divide la cara que contiene las cargas eléctricas de aquella que contiene todos los aminoácidos hidrofóbicos.

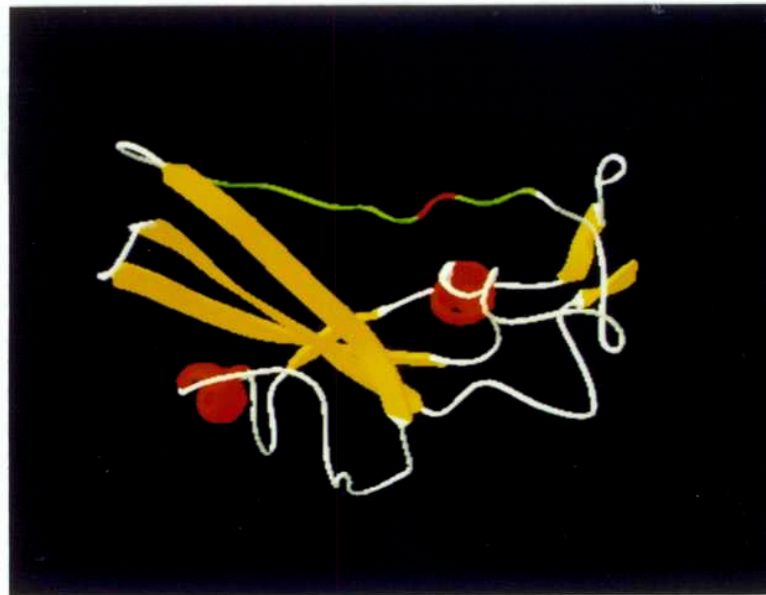


Figura 8: Estructura tridimensional de la proteína DE estimada a partir de la información disponible para otras proteínas de la misma superfamilia. La secuencia correspondiente a los aa 111-123, que formaría la α hélice anfipática se muestra en verde, las láminas β se ilustran en amarillo, y las α hélices en rojo.

En primer lugar, se utilizó el plásmido pRSET como vector de expresión. La secuencia codificante de DE fue subclonada del vector λ gt11 al vector pRSET, utilizando la estrategia esquematizada en la **Figura 9**. Luego de controlar que la construcción se hubiera producido correctamente, la misma fue utilizada para transformar bacterias BL21 (pLysS). Las bacterias transformadas fueron crecidas, y luego inducidas con IPTG, analizándose posteriormente las proteínas de cada cultivo por SDS-PAGE y Western blot. Como control positivo de la inducción, se utilizó el ADNc de una proteína viral clonado en pRSET (gentileza del laboratorio del Dr. Mentaberry, INGEBI). Los resultados obtenidos por tinción de los geles con Azul de Coomasie (CBB) indicaron que mientras que en el control positivo se observaba claramente la inducción de una banda, la misma no se detectaba en ninguno de los cultivos que llevaban el plásmido pRSET-DE (**Figura 10**). Sin embargo, el análisis por Western blot utilizando el anticuerpo anti-DE, mostró la presencia de una banda en las calles correspondientes a una de las dos colonias estudiadas. El tamaño de esta banda era de aproximadamente 31 kDa (**Figura 11**), es decir, el esperado para la proteína recombinante. Para evaluar si esta banda estaba presente en otras colonias transformadas con pRSET-DE, se indujeron con IPTG 10 colonias independientes, analizándose sus proteínas de igual forma, y obteniéndose resultados similares: mientras que en ensayos de Western blot se observó la presencia de esta banda en algunas de las colonias pero no así en el control, la misma no era evidente en geles teñidos con CBB.

Si bien los resultados sugerían la especificidad de la banda observada, resultaba llamativa su detección por Western blot y no por tinción con CBB. Para confirmar la especificidad de los resultados obtenidos, se realizaron dos construcciones diferentes: una construcción consistente en la delección del extremo N-terminal (ΔN), y otra con una delección del extremo C-terminal (ΔC) (**Figura 12A**).

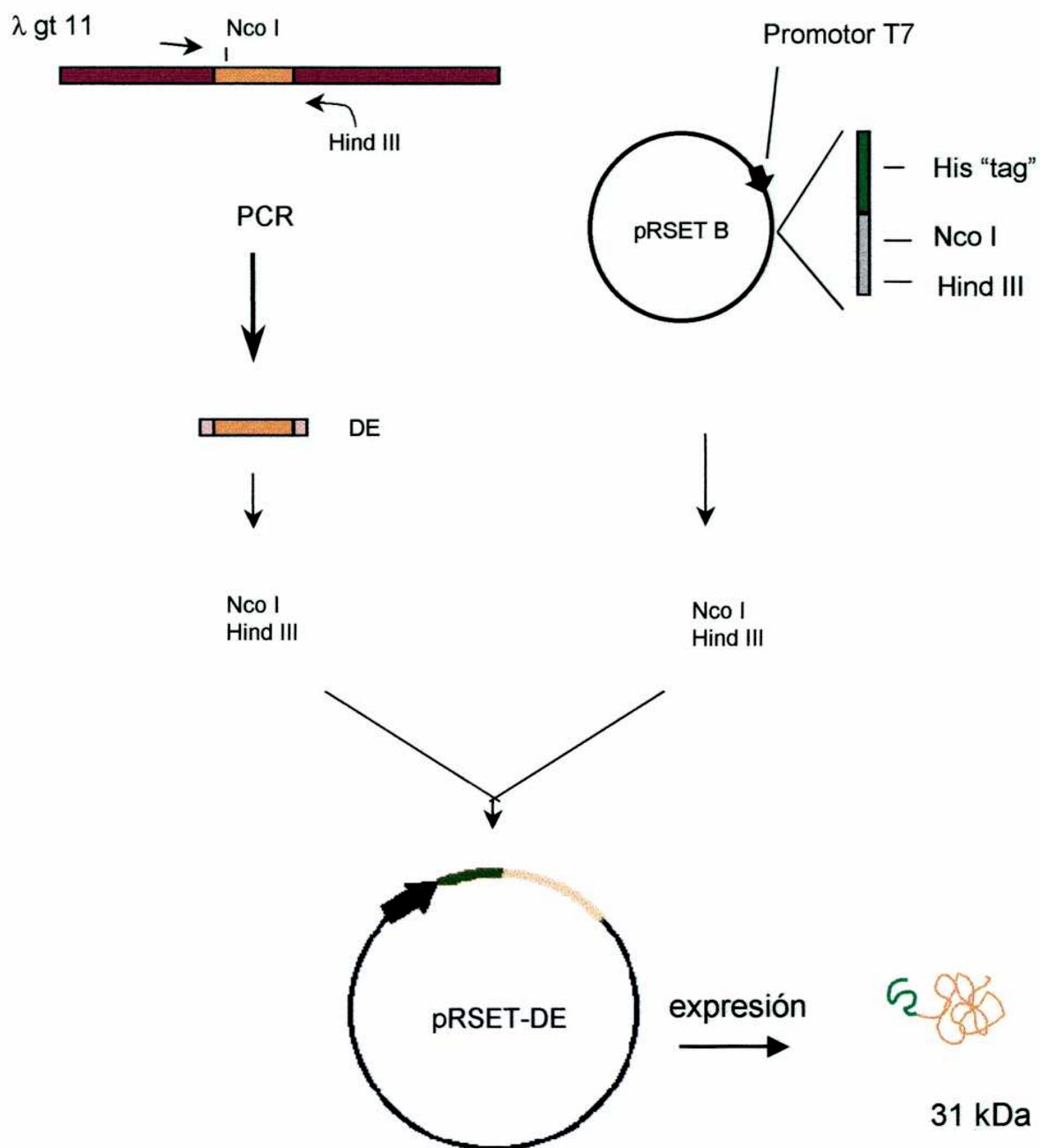


Figura 9: Estrategia de subclonado de la secuencia codificante para DE al vector de expresión pRSET B.

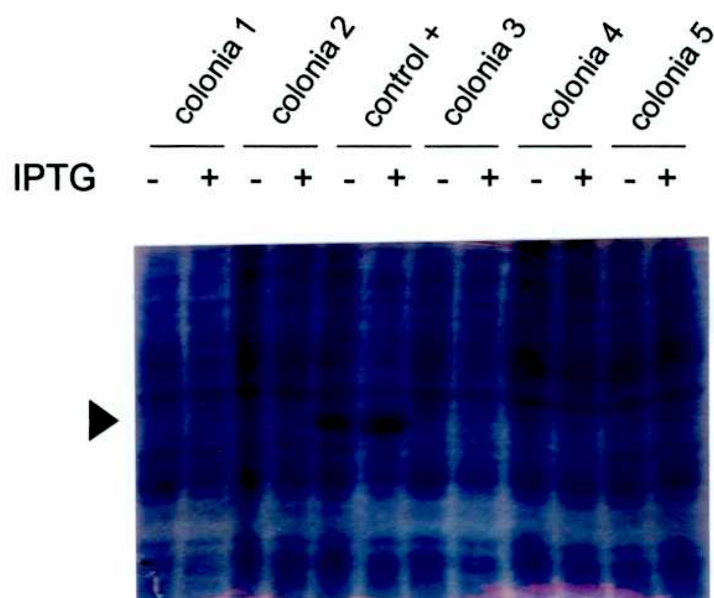


Figura 10: Expresión de recDE en pRSET.

Bacterias BL21 transformadas con pRSET-DE fueron crecidas en presencia o ausencia de IPTG. Los extractos proteicos correspondientes a 5 colonias independientes fueron separados por SDS-PAGE, y el gel fue teñido con Azul de Coomasie (CBB). Como control positivo se utilizó el vector pRSET llevando el ADNc de una proteína viral con un peso molecular similar al esperado para DE (31kDa). La flecha señala la posición de la proteína recombinante del control positivo.

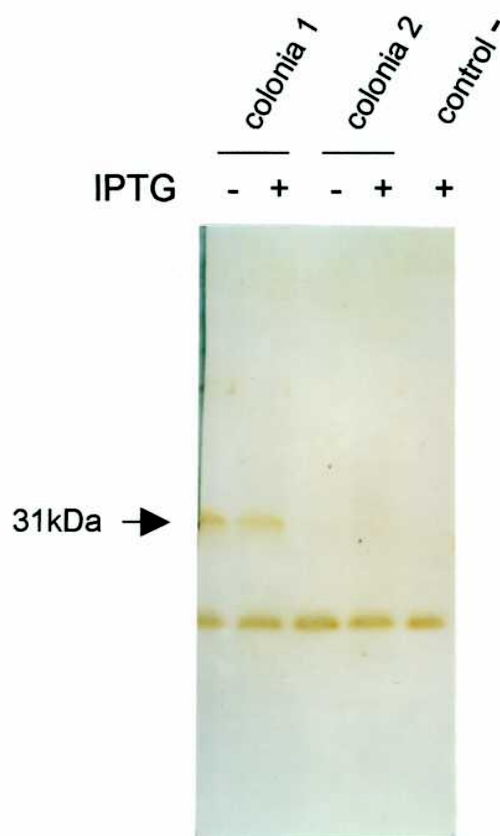


Figura 11: Análisis por Western blot de las proteínas expresadas en bacterias transformadas con pRSET-DE. Dos colonias independientes fueron crecidas en presencia (+) o ausencia (-) de IPTG, y extractos de estos cultivos fueron separados por SDS-PAGE, transferidos a nitrocelulosa y luego analizados por Western blot utilizando el anticuerpo anti-DE. Como control negativo (control -) se utilizó un extracto de bacterias transformadas con el vector sin inserto. La flecha señala la banda presente en uno de los extractos y ausente en el control negativo.

El tamaño esperado para la proteína DE expresada a partir de estas construcciones es de aproximadamente 21 kDa. Por lo tanto, si la banda detectada por Western blot realmente correspondiera a la proteína DE, debería aumentar su migración electroforética.

Con las construcciones indicadas, se transformaron entonces bacterias BL21 (pLys S), y se crecieron cultivos en presencia o ausencia de IPTG. Tal como se observa en la **Figura 12B**, el análisis por Western blot de las proteínas de estas bacterias indicó la presencia de una banda con un tamaño aparente de 20-21 kDa, muy cercano al tamaño de 20 kDa esperado para el producto de cada construcción.

Estos resultados indicaron que la banda reconocida por el anticuerpo correspondería a la proteína DE recombinante; por lo que la falta de detección de la misma en geles teñidos con CBB se debería a una baja expresión de la misma.

Luego de transformar bacterias con pRSET-DE, se observó que las colonias que aparecían eran mucho más chicas que las correspondientes a bacterias transformadas con el vector sin inserto. En forma similar, los cultivos líquidos de bacterias transformadas con pRSET-DE crecían bastante más lentamente que los cultivos control (**Figura 13**). Esto podía deberse a un efecto tóxico de la proteína recombinante para las bacterias, lo cual podría justificar el bajo nivel de expresión.

Dado que las evidencias indicaban que este sistema de expresión no era de utilidad para la proteína DE, se decidió cambiar el vector de expresión. A continuación, se utilizó el vector pMAL-p2, el cual produce una proteína de fusión con la "maltosa binding protein" (MBP) y, potencialmente, dirige la proteína de fusión al periplasma bacteriano. La expresión de DE en este sistema produciría una proteína de 67 kDa de peso molecular (42 kDa provenientes de MBP y 25 kDa de DE).

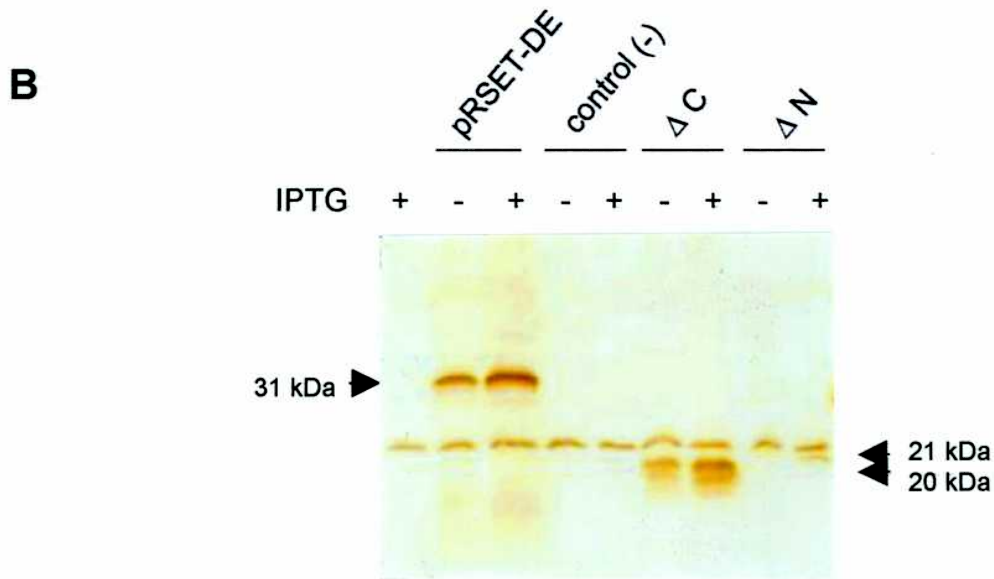
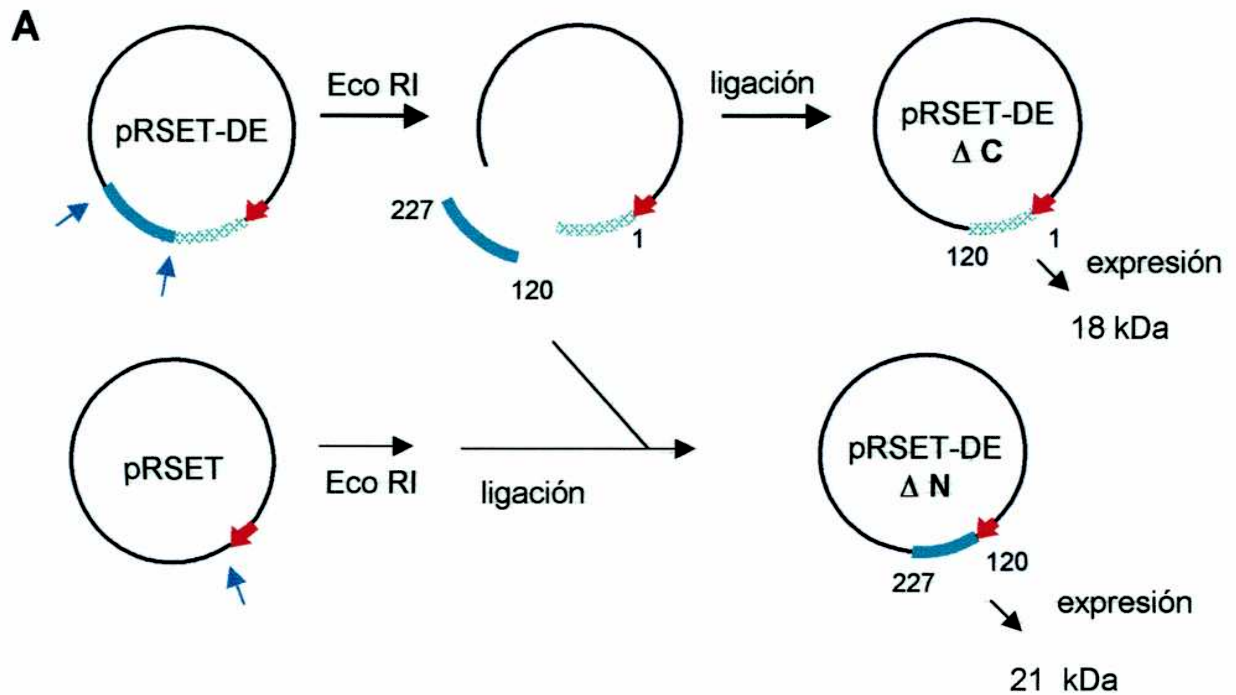


Figura 12: A) Esquema de la estrategia utilizada para producir las construcciones ΔN y ΔC . Las flechas azules señalan los sitios de corte para EcoRI, y los números indican el aminoácido inicial y terminal. **B)** Bacterias transformadas con las construcciones indicadas fueron crecidas en presencia o ausencia de IPTG. Las proteínas de estos cultivos fueron analizadas por Western blot utilizando el anticuerpo anti-DE.

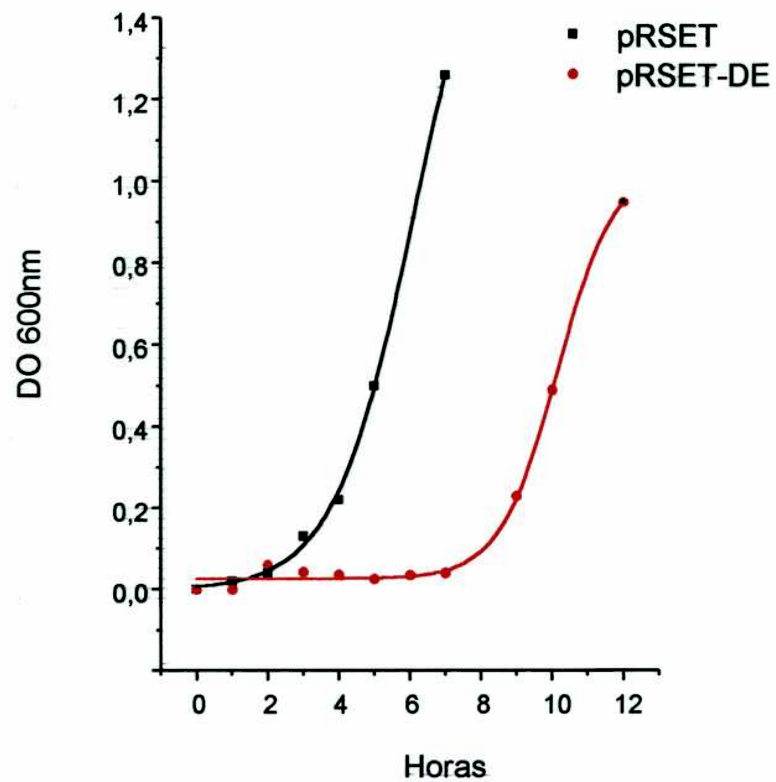


Figura 13: Curvas de crescimento em LB-ampicilina de cultivos de bactérias transformadas com pRSET ou pRSET-DE.

Para subclonar el ADNc, se utilizó una estrategia similar a la utilizada con pRSET (**Figura 14**). La construcción así obtenida fue utilizada para transformar bacterias BL21, que fueron luego crecidas en presencia o en ausencia de IPTG, analizándose las proteínas producidas por SDS-PAGE y Western blot. En la **Figura 15A** se observa que las bacterias transformadas con el plásmido sin inserto, producen una banda de aproximadamente 50 kDa, similar al tamaño esperado para la proteína MBP, en tanto que en las bacterias transformadas con el vector más el inserto, se observan dos bandas muy próximas, de aproximadamente 68 kDa. El análisis por Western blot de estas mismas muestras mostró que el doblete de 68 kDa es reconocido específicamente por el anticuerpo anti-DE (**Figura 15B**).

La proteína de fusión presenta en su extremo N-terminal un péptido líder que es capaz de conducirla al espacio periplásmico, el cual contiene una mínima cantidad de proteínas. Dado que es posible obtener fácilmente una fracción correspondiente a las proteínas periplásmicas, la expresión en este compartimento facilita la posterior purificación de la proteína recombinante. Con el fin de estudiar la localización subcelular de la proteína recombinante, se realizó una extracción de las proteínas periplásmicas mediante un tratamiento hiposmótico. Como control de expresión periplásmica, se utilizó a la MBP producida por el vector sin inserto. Mientras que esta última fue exportada correctamente al periplasma, la proteína de fusión no fue detectada en la fracción periplasmática pero sí en la citoplasmática (**Figura 16**).

El sistema de expresión utilizado permite la purificación de la proteína de fusión mediante una cromatografía de afinidad utilizando una columna de resina acoplada a amilosa (polímero de maltosa). Para este proceso, es necesario que la proteína se encuentre en forma soluble. Por lo tanto, se examinó la solubilidad de la proteína de fusión, observándose que si bien una

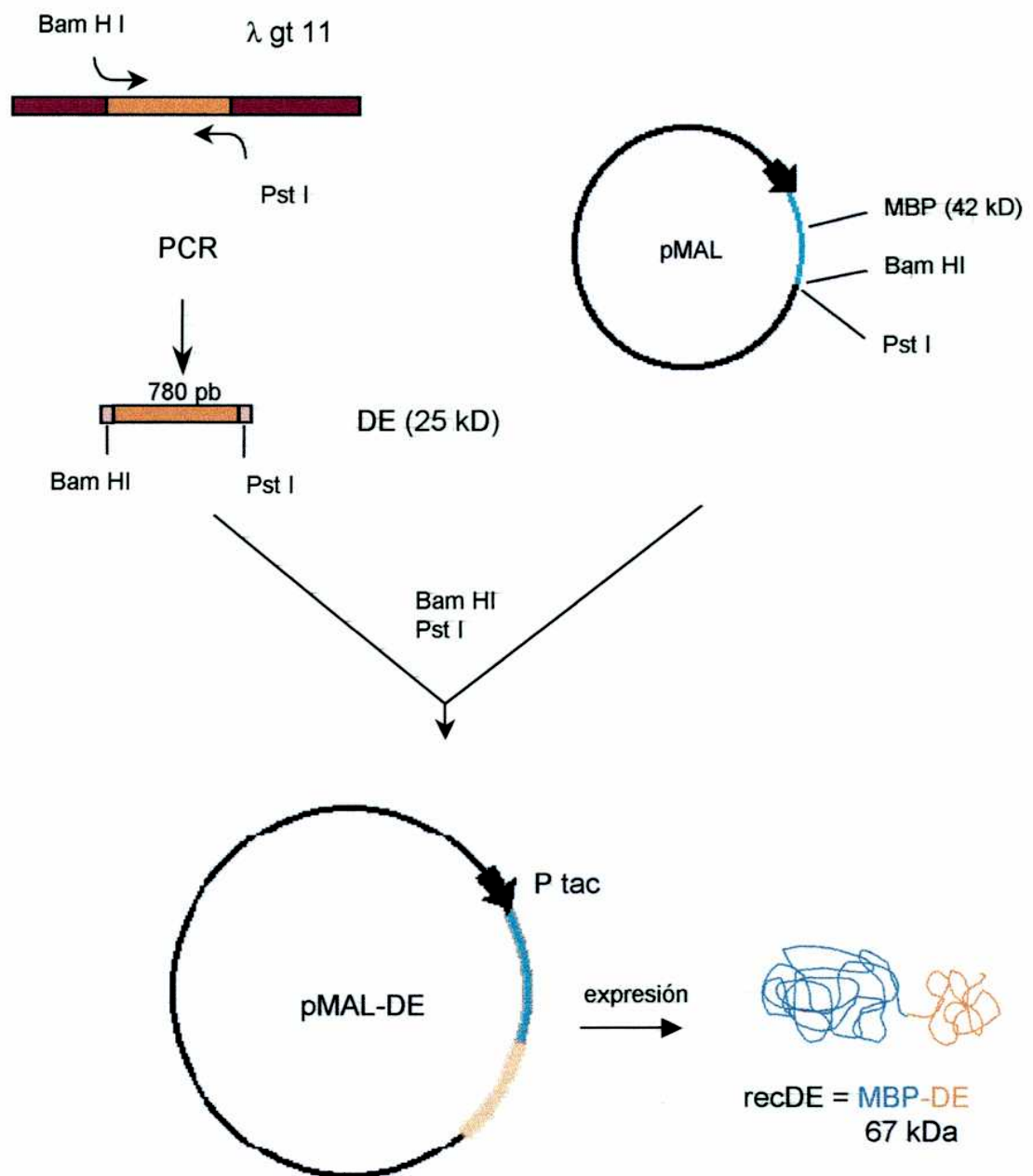


Figura 14: Estrategia de subclonado de DE al vector de expresión pMAL-p2. El promotor Ptac es inducible por IPTG.

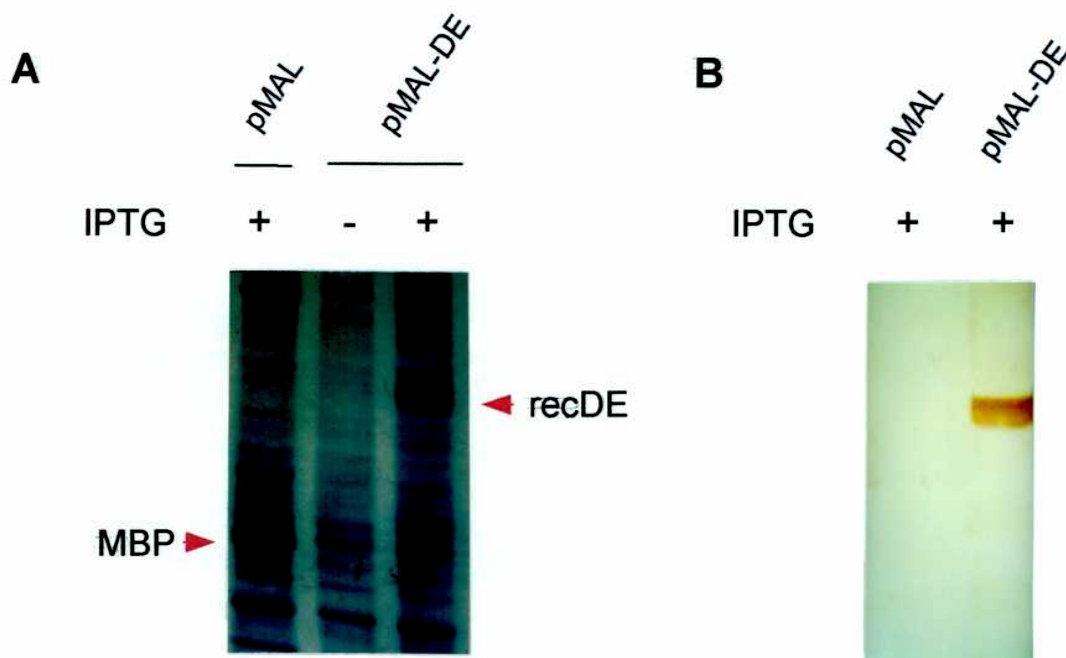


Figura 15: Expresión de DE en pMAL-p2.

Bacterias transformadas con pMAL o pMAL-DE fueron crecidas en presencia o ausencia de IPTG, y las proteínas correspondientes a las diferentes muestras fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con CBB **(A)**, o transferidas a nitrocelulosa y reveladas por Western blot utilizando el anticuerpo anti-DE **(B)**.

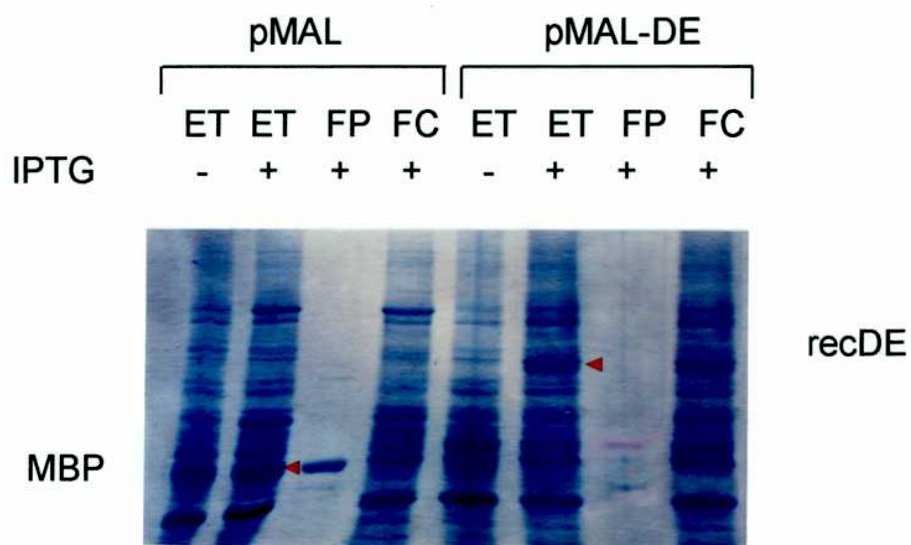


Figura 16: Bacterias transformadas con pMAL o pMAL-DE fueron crecidas en presencia de IPTG. Con estas bacterias se preparó un extracto total (ET), una fracción periplásmica por tratamiento hiposmótico (FP), y una fracción depletada de proteínas periplásmicas (FC). Los extractos fueron separados por SDS-PAGE y las proteínas teñidas con CBB. Las flechas indican la posición de MBP y recDE.

proporción de la proteína se asociaba a la fracción insoluble, una cantidad considerable se encontraba presente en la fracción soluble. Esta última, fue luego pasada a través de una columna de resina amilosa, recuperándose posteriormente de la elución con maltosa, la proteína recombinante con una pureza de aproximadamente 85% (**Figura 17**).

En conclusión, la proteína DE pudo ser expresada exitosamente como proteína de fusión en un sistema bacteriano, y posteriormente purificada. El paso siguiente consistió en estudiar la actividad biológica de la misma.

RecDE MBP

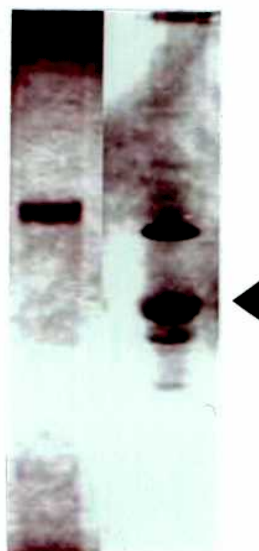


Figura 17: Tinción con nitrato de plata de las proteínas de recDE y MBP (flecha) luego de su purificación.

Capítulo 2: Actividad biológica de la proteína DE recombinante

Inhibición de la penetración de ovocitos sin ZP

Con el fin de evaluar si la proteína recombinante, al igual que la nativa, era capaz de inhibir el proceso de fusión de gametas, se realizaron ensayos de fusión *in vitro* en presencia de distintas concentraciones de recDE. Los resultados presentados en la **Figura 18** indicaron que la proteína recombinante fue capaz de inhibir significativamente el porcentaje de ovocitos penetrados, en forma dependiente de la concentración. La mínima concentración que produjo una inhibición significativa respecto al control sin proteína fue de 1.5 μM , mientras que la concentración a la que se produjo la máxima inhibición fue de 25 μM . Como controles se utilizaron la proteína MBP y la proteína ARP humana expresada en el mismo vector. Ninguna de estas dos proteínas, ensayadas a una concentración de 25 μM produjo una inhibición significativa respecto al control sin proteína (**Figura 18**).

La inhibición observada en presencia de recDE no fue debida a un efecto tóxico sobre los espermatozoides, ya que no afectó la viabilidad ni la motilidad de los mismos (**Tabla 2**).

Con el fin de controlar que la proteína no estaba afectando la penetrabilidad de los ovocitos en forma irreversible, se incubaron ovocitos de rata sin ZP con 25 μM recDE o MBP durante dos horas, luego de lo cual los mismos fueron lavados en medio fresco e inseminados con espermatozoides capacitados. Los resultados obtenidos indican que los ovocitos incubados con recDE y luego lavados, presentaron un porcentaje de fertilización similar al de los ovocitos incubados con MBP (**Tabla 3**).

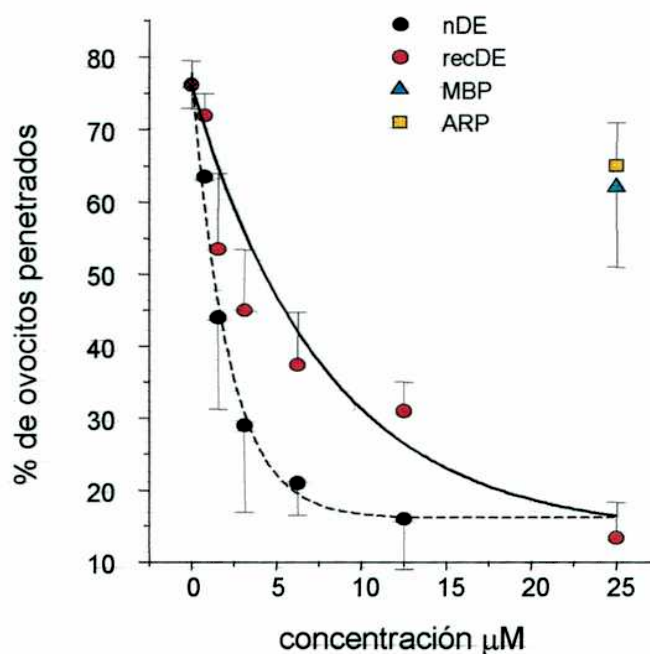


Figura 18: Curvas de efecto en función de la concentración de proteína DE nativa y recombinante.

Ovocitos de ratón sin ZP fueron preincubados durante 30 min con las proteínas DE nativa o recombinante, MBP o ARP a las concentraciones indicadas y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 3hs de coincubación, se determinó el porcentaje de ovocitos fertilizados. Los puntos representan el valor promedio de al menos tres experimentos, $\pm$ el error estándar.

Tabla 2: Efecto de recDE sobre la viabilidad y motilidad de los espermatozoides

	Porcentaje	
	Viabilidad	Motilidad
MBP	56 ± 16	52 ± 5
recDE	59 ± 18	53 ± 6

Espermatozoides capacitados fueron incubados con 25 μ M recDE o MBP durante 1 h, luego de lo cual se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos y el de espermatozoides móviles por observación al microscopio óptico. Los valores son el promedio de tres experimentos $\pm$ el error estándar

Tabla 3 Efecto de recDE sobre la penetrabilidad de los ovocitos.

	n	% de ovocitos penetrados
MBP	45	78 ± 15
recDE	51	82 ± 7

Ovocitos sin ZP fueron incubados con 25 μ M recDE o MBP durante 2 hs, lavados mediante el pasaje por tres gotas de medio fresco, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 3 hs de coincubación, se evaluó el porcentaje de ovocitos penetrados. Los valores corresponden al promedio $\pm$ el error estándar de tres experimentos.

n: número de ovocitos analizados.

La proteína DE nativa inhibe específicamente el proceso de fusión de las gametas sin afectar la unión del espermatozoide al oolema (141). Con el fin de evaluar el efecto de la presencia de recDE sobre la unión de las gametas, ovocitos preincubados en 25 μ M MBP o recDE fueron inseminados con espermatozoides capacitados, determinándose al cabo de 30 minutos, tanto el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos, como el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito. Tal como se observa en la **Tabla 4**, ninguno de estos parámetros resultó significativamente diferente entre ambos grupos.

Tabla 4 Efecto de recDE sobre la unión espermatozoide-ovocito

	% de ovocitos con espermatozoides unidos	Promedio de espermatozoides unidos por ovocito
MBP	65 $\pm$ 12 (67)	3.6 $\pm$ 0.8 (44)
recDE	68 $\pm$ 10 (63)	2.9 $\pm$ 0.4 (43)

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados en presencia de 25 μ M MBP o recDE y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Luego de 30 min de coincubación, se evaluó el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos y el número de espermatozoides unidos por ovocito. Los valores corresponden al promedio $\pm$ el error estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos. Entre paréntesis se indica el número de ovocitos analizados.

Unión de la proteína DE recombinante al ovocito

Tal como se mencionara anteriormente, la proteína DE participa en el proceso de fusión a través de sitios presentes en la superficie del ovocito. Con el fin de estudiar si recDE es capaz de reconocer dichos sitios y unirse al ovocito al igual que la proteína nativa, ovocitos de rata sin ZP fueron expuestos a 6 μ M MBP o recDE y luego sometidos a IFI utilizando anti-MBP como primer anticuerpo. Mientras que los ovocitos incubados con MBP presentaron ya sea una marcación fluorescente muy débil y en áreas aisladas del ovocito, o bien ausencia total de fluorescencia, todos los ovocitos incubados con la proteína recombinante mostraron una intensa marca fluorescente sobre la superficie del ovocito, excepto en un área discreta y bien delimitada, observada en la mayoría de los ovocitos (**Figura 19A**). Tal como se observa en una de las fotografías, la fluorescencia no presentaba una distribución uniforme, sino en pequeños puntos. Resultados similares se obtuvieron al utilizar anti-DE como primer anticuerpo.

Con el fin de investigar si la proteína DE recombinante se unía a los sitios complementarios para la proteína DE nativa en el ovocito, ovocitos sin ZP preincubados con una concentración fija de recDE fueron expuestos a distintas cantidades de DE nativa, y luego sometidos a IFI utilizando anti-MBP como primer anticuerpo. La fluorescencia asociada a los ovocitos fue finalmente cuantificada en un fluorímetro. Los resultados indican que la proteína DE nativa fue capaz de desplazar la unión de recDE al ovocito (**Figura 19B**), confirmando que la unión de la proteína recombinante a la superficie del ovocito es mediada por los sitios complementarios para la proteína DE.

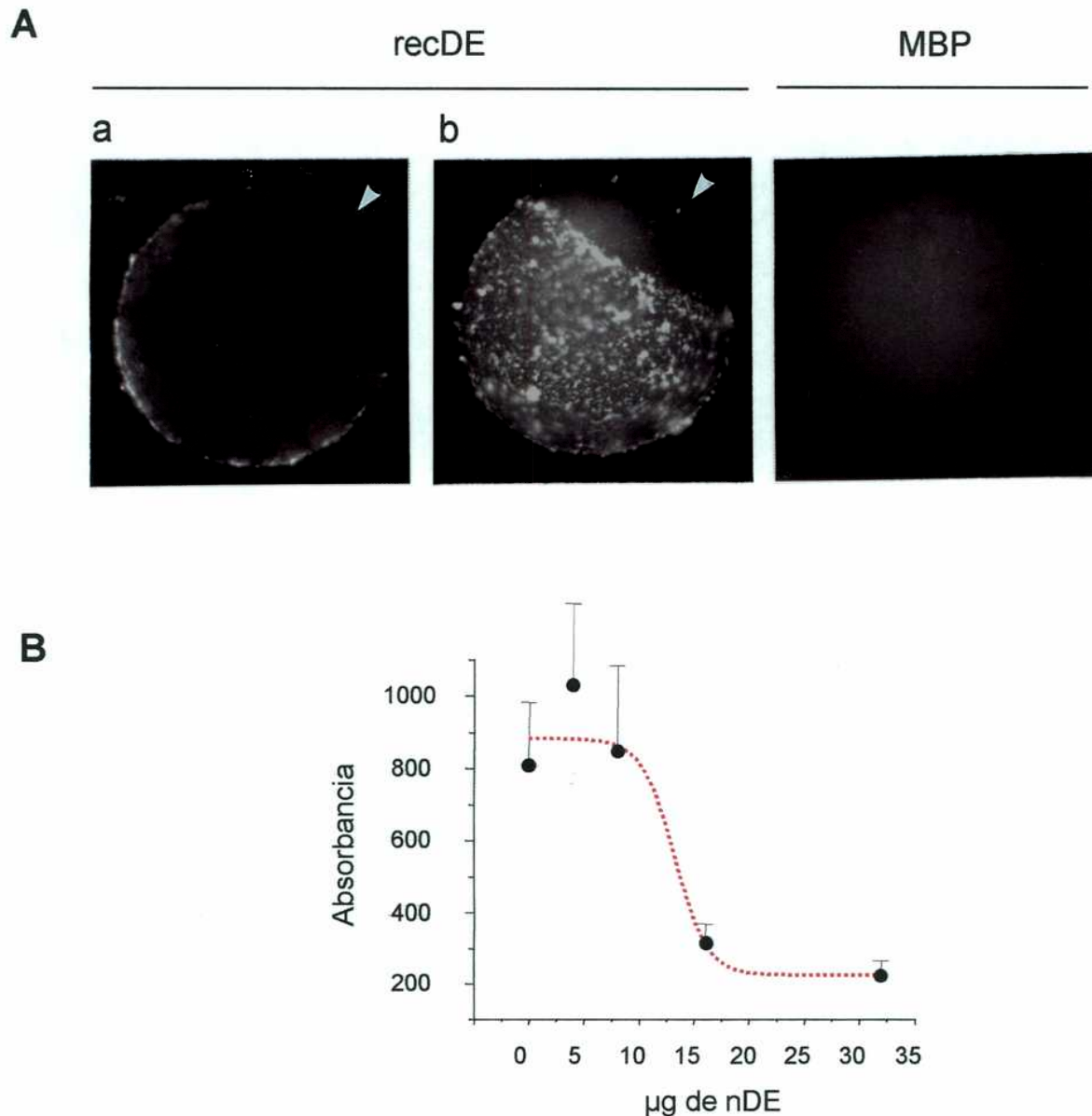


Figura 19: Unión de la proteína DE recombinante al ovocito.

A) Ovocitos sin ZP fueron incubados con 6 μ M recDE o MBP y luego fijados y sometidos a IFI utilizando anti-MBP como primer anticuerpo. Los ovocitos incubados con recDE se muestran en dos planos focales diferentes: en el ovocito **(a)** se observa la fluorescencia en el contorno de la célula, en el ovocito **(b)**, otro plano focal muestra la distribución no uniforme de la marca fluorescente. Nótese en ambos casos la presencia del área negativa, indicada por la flecha. Aumento: 590 X. **B)** Ovocitos sin ZP fueron incubados con 6 μ M recDE y las cantidades indicadas de DE nativa, y luego sometidos a IFI utilizando anti-MBP como primer anticuerpo, cuantificándose finalmente la fluorescencia asociada a los ovocitos.

Actividad de la proteína DE nativa deglicosilada

Tal como se describió en la introducción, DE es una glicoproteína que contiene un 10% de hidratos de carbono (134). Si bien las evidencias halladas por nuestro laboratorio indican que la proteína participa en el proceso de fusión de las gametas, se desconoce si la porción glicosídica es importante o no para su función. La capacidad de la proteína recombinante de inhibir la fertilización de ovocitos sin ZP sugiere que los hidratos de carbono no serían imprescindibles para la actividad de la proteína. Sin embargo, la proteína recombinante presenta una eficiencia menor en la inhibición que la proteína nativa: la concentración a la cual se produce un 50 % de inhibición (DE_{50}) de la proteína recombinante es significativamente superior a la correspondiente a la proteína nativa (10 μ M vs. 3.2 μ M) (**Figura 18**), lo cual podría deberse a la falta de hidratos de carbono en la proteína recombinante. Para esclarecer la importancia de los residuos glicosídicos para la actividad de DE, la proteína nativa fue deglicosilada por tratamiento con PNGasa F, enzima que corta la unión entre la asparagina y la N-acetilglucosamina. La deglicosilación de la proteína debería producir una reducción apreciable del peso molecular, lo cual fue evaluado por electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot. Como se observa en la **Figura 20A**, la proteína DE deglicosilada presentó efectivamente un menor peso molecular.

Habiendo corroborado la deglicosilación de la proteína, la misma fue utilizada en ensayos de fusión espermatozoide-ovocito *in vitro*. Los resultados indicaron que los porcentajes de ovocitos penetrados en presencia de la proteína deglicosilada no fueron diferentes a aquellos obtenidos en presencia de proteína sin deglicosilar (**Figura 20B**).

Estos resultados confirmarían que los hidratos de carbono no estarían directamente involucrados en la actividad de la proteína DE, sugiriendo que la menor efectividad de la proteína recombinante para inhibir el proceso de fusión no sería debida a la falta de glicosilación de la misma.

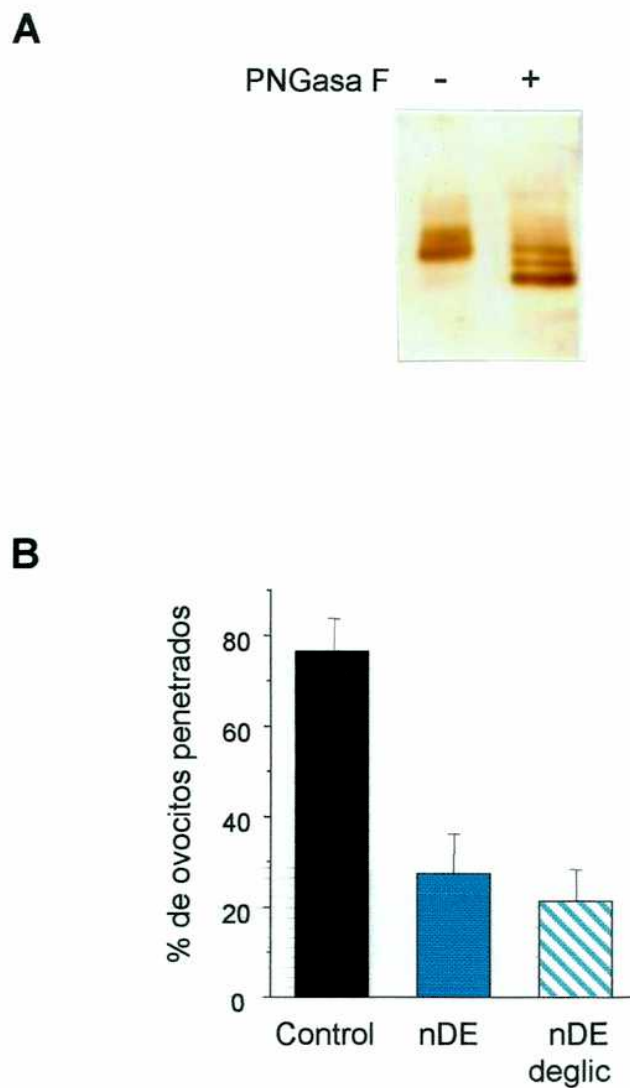


Figura 20: Efecto de la deglicosilación de la proteína DE nativa sobre su capacidad de inhibir la fusión espermatozoide-ovocito.

A) La proteína DE nativa fue deglicosilada por tratamiento con PNGasa F. Las proteínas sin tratar y tratada fueron separadas por SDS-PAGE y reveladas por Western blot utilizando el anticuerpo anti-DE. Nótese el cambio en la migración electroforética de la proteína tratada. **B)** Ensayo de fusión de gametas en presencia de 10 μ g de proteína nativa tratada con PNGasa F (nDE deglic) o sin tratar (nDE).

Importancia de los puentes disulfuro para la actividad de la proteína

Como se mencionó anteriormente, la proteína DE contiene 16 cisteínas y pertenece a la familia CRISP. Dado que todos los miembros de la familia CRISP conservan el número y la localización de sus cisteínas, se ha propuesto que las cisteínas podrían cumplir alguna función importante, aunque todavía incierta (168).

Con el fin de estudiar el estado reducido u oxidado de las cisteínas, tanto en la proteína DE nativa como en recDE, ambas proteínas fueron sometidas a tratamiento con biotina-maleimida (reactivo que se une a los grupos -SH), sometidas a electroforesis, transferidas a nitrocelulosa, y finalmente reveladas por reacción con avidina-peroxidasa. Mientras la proteína DE nativa previamente reducida con DTT, y utilizada como control positivo, presentó una clara marcación, la proteína nativa sin reducir mostró una señal apenas visible, indicando que en la misma, las cisteínas estarían mayoritariamente involucradas en la formación de puentes disulfuro (**Figura 21**). Por su parte, la proteína recombinante sin reducir presentó una señal de mayor intensidad que la proteína nativa no reducida, indicando un mayor contenido de cisteínas libres (-SH) (**Figura 21**). Esta señal no se debería a cisteínas presentes en la porción peptídica correspondiente a MBP, ya que la misma carece de tales aminoácidos en su secuencia. De todas maneras, la proteína MBP fue también tratada de la misma forma, mostrando una reacción negativa (observar la flecha que señala la posición de MBP).

Si los puentes disulfuro fueran importantes para la actividad de la proteína, la incorrecta formación de los mismos podría ser la causa de la menor capacidad para inhibir la fusión de la proteína recombinante respecto a la DE nativa.

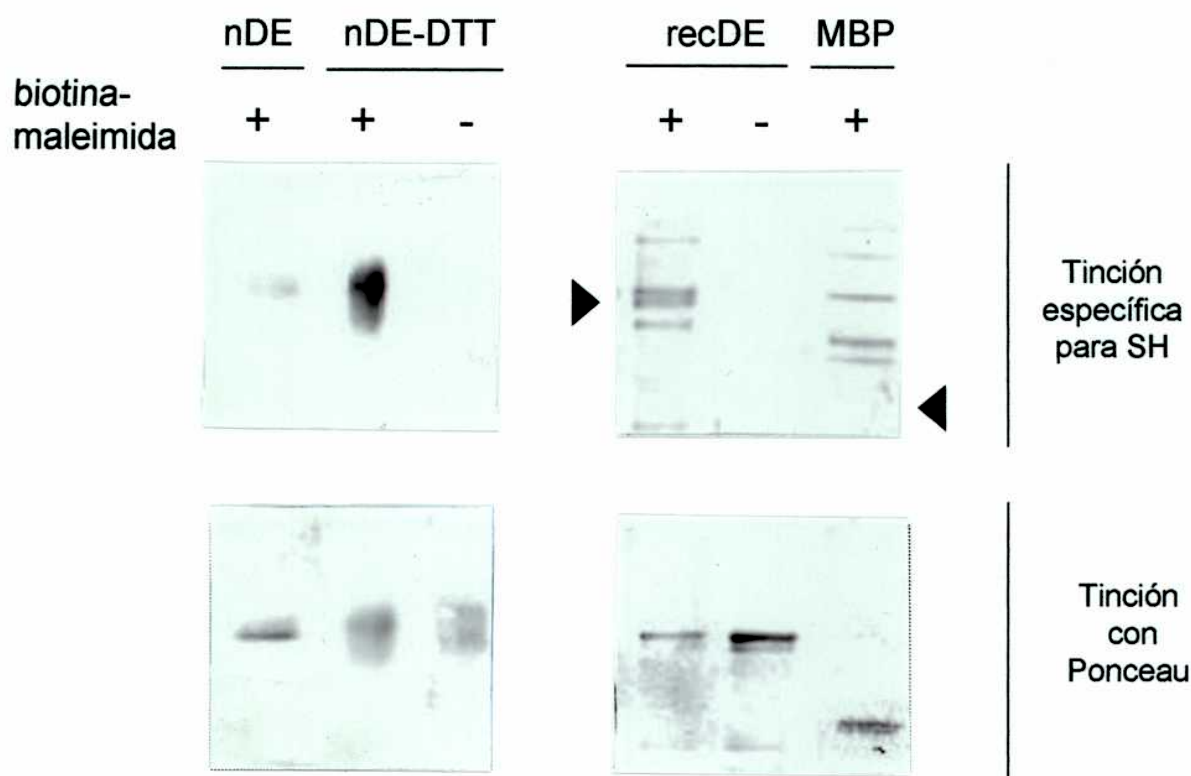


Figura 21: Presencia de grupos -SH en la proteína DE nativa y recombinante. Las proteínas indicadas fueron tratadas (+) o no (-) con biotina-maleimida, separadas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. El panel superior muestra el revelado de las proteínas con avidina-peroxidasa, y el panel inferior la tinción de las membranas con rojo Ponceau. La proteína DE nativa reducida con DTT (nDE-DTT) fue utilizada como control positivo, mientras que MBP, que no contiene cisteínas, fue utilizada como control negativo. Las flechas señalan la posición de recDE y MBP.

Con el fin de estudiar la importancia de los puentes disulfuro para la actividad de la proteína, se analizó el efecto de la reducción de los puentes disulfuro sobre la capacidad de inhibir la fusión de la proteína nativa. Para ello, la proteína DE nativa fue reducida con DTT, y luego alquilada con ácido iodoacético (AIA) para evitar la reformación de los puentes disulfuro (**Figura 22A**). Tanto el DTT como el AIA fueron eliminados de la muestra mediante diálisis. Para controlar cualquier efecto tóxico de la preparación sobre las gametas debido a una diálisis incompleta del DTT y/o el AIA, se utilizó una solución sin proteína que fue sometida al mismo tratamiento que la proteína DE. La proteína así reducida, alquilada y dializada, fue empleada en ensayos de fusión *in vitro*. Los resultados presentados en la **Figura 22B** muestran que si bien el porcentaje de ovocitos penetrados en presencia de la proteína reducida fue significativamente menor que en el control sin proteína, el mismo fue significativamente mayor que el porcentaje de ovocitos fertilizados en presencia de la proteína DE sin reducir. Estos resultados sugieren que los puentes disulfuro, si bien no esenciales, cumplirían una función importante en la actividad de la proteína.

Los resultados de este capítulo indican que la actividad de la proteína residiría en la porción peptídica de la molécula, y que, dentro de esta última, la presencia de las uniones disulfuro contribuiría a la actividad de la proteína

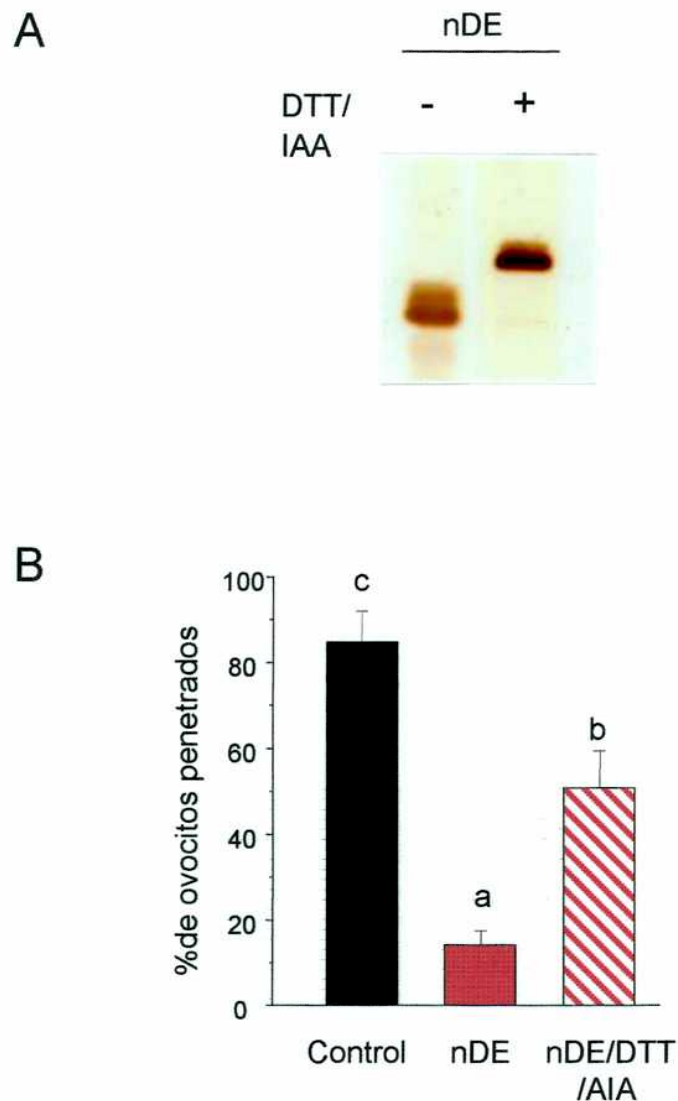


Figura 22: Efecto de la reducción de la proteína DE nativa sobre su capacidad de inhibir la fusión espermatozoide-ovocito.

A) La proteína DE nativa fue tratada con DTT, alquilada con AIA para evitar la reformación de los puentes disulfuro, y luego dializada contra medio de fertilización. Las proteínas sin tratar y tratada fueron separadas por SDS-PAGE y reveladas por Western blot utilizando el anticuerpo anti-DE. Nótese el cambio en la migración electroforética en la proteína reducida. **B)** Ensayo de fusión espermatozoide-ovocito en presencia de 20 μ g de proteína nativa sin reducir (nDE) o reducida (nDE/DTT/AIA).

a vs b: $p < 0.05$

b vs c: $p < 0.05$

Capítulo 3: Región peptídica responsable de la actividad biológica

Dado que los resultados anteriores indicaban que la actividad biológica residiría en la porción peptídica de la molécula, el paso siguiente consistió en identificar la región del polipéptido que contenía el dominio responsable de su actividad. Considerando que el análisis de la secuencia de DE no indicó la presencia de dominios conocidos que pudieran orientar el estudio, y que es común que las funciones de las proteínas recaigan en dominios estructurales bien definidos, se comenzó expresando fragmentos que abarcaran los dominios estructurales de la proteína. Si bien no hay información al respecto para la proteína completa de rata (la predicción descrita anteriormente corresponde a la región comprendida entre los aa 52-186), existe un estudio realizado con la proteína recombinante de ratón, la cual presenta un 70 % de identidad con la proteína de rata. Para la proteína de ratón, se ha descrito la presencia de dos dominios: el dominio N-terminal que comprende aproximadamente tres cuartos de la proteína y contiene tres puentes disulfuro, y el dominio C-terminal, abarcando una cuarta parte de la molécula y conteniendo las diez cisteínas restantes (**Figura 23**). Este último dominio tendría una estructura compacta debido a los numerosos puentes disulfuro intramoleculares presentes (173). Tomando como base esta estructura, se decidió entonces, expresar los siguientes fragmentos:

Fragmento 1 (F1): comprendiendo el dominio N-terminal (aa 1 –158)

Fragmento 2 (F2): comprendiendo el dominio C-terminal (aa 156-227)

Fragmento 3 (F3): comprendiendo el dominio C-terminal, más la región N-terminal que contiene todas las cisteínas (aa 62-227) (**Figura 23**)

Para la expresión de los distintos fragmentos, la región codificante de cada uno de ellos fue amplificada por PCR y ligada al vector de expresión pMAI-p2.

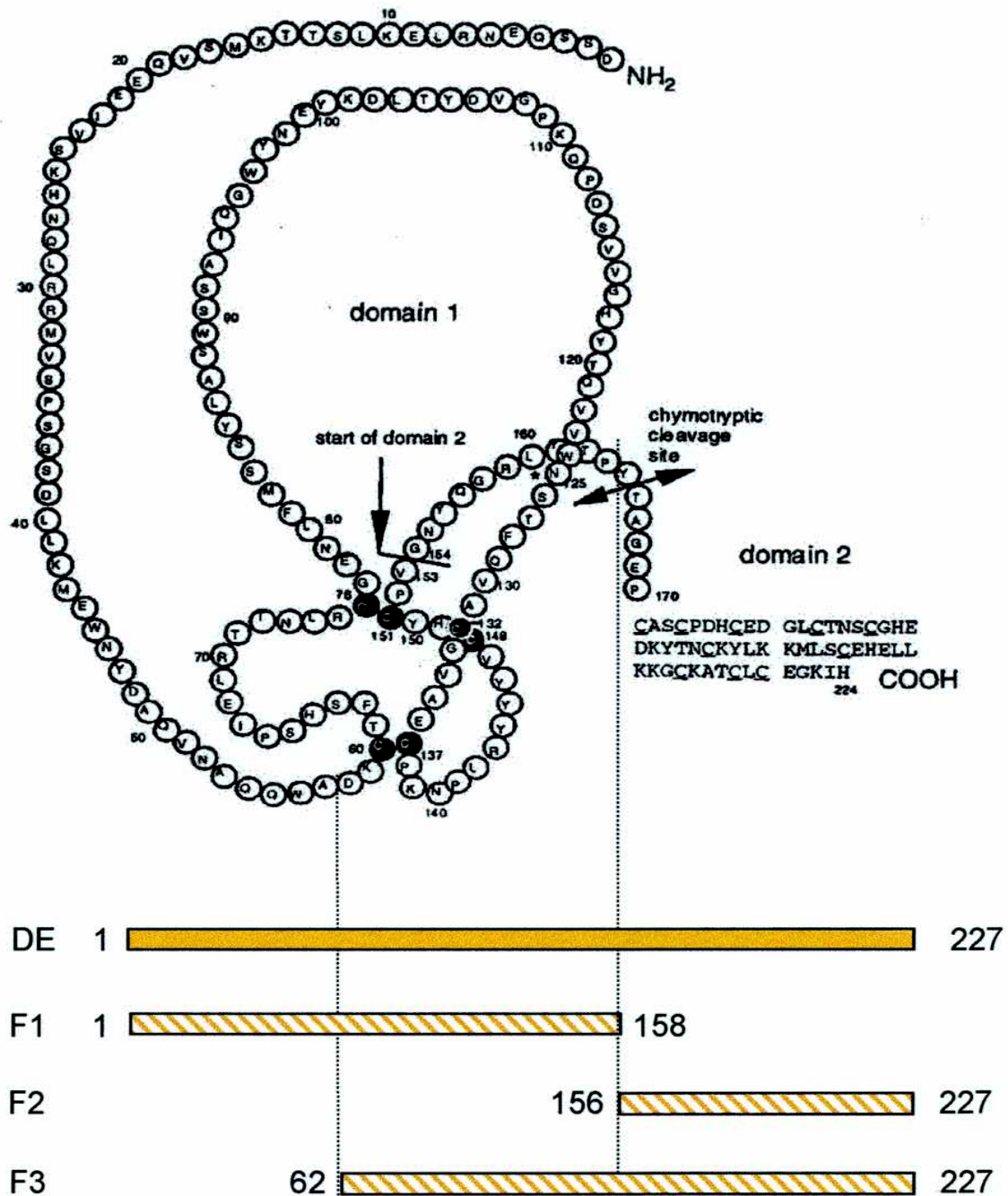


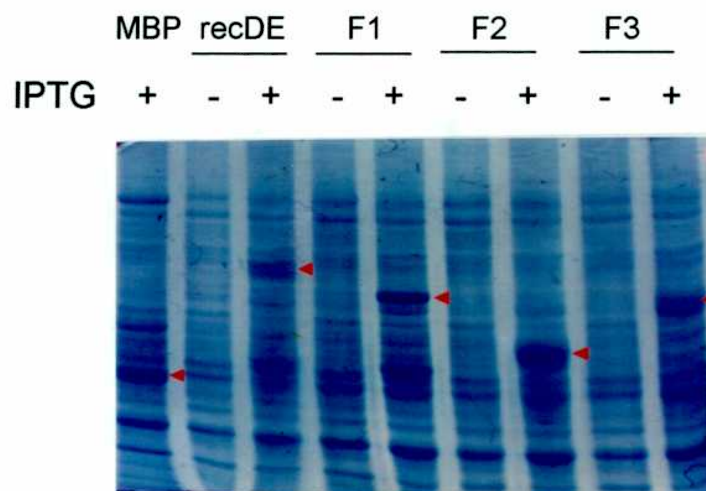
Figura 23: Estructura propuesta para la proteína DE de ratón (173), y esquema donde se indica el aminoácido inicial y final para cada uno de los fragmentos expresados.

Expresión de los fragmentos recombinantes F1, F2 y F3

En primer lugar era necesario controlar que todos los fragmentos se expresaran correctamente. El ADN de las distintas construcciones se utilizó para transformar células BL21, las que fueron crecidas en presencia o ausencia de IPTG. Los extractos de estos cultivos fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida. En las calles correspondientes a los cultivos inducidos con IPTG se observó la aparición de una banda de mayor intensidad respecto a la correspondiente al cultivo sin inducir (**Figura 24**). En cada caso, el tamaño estimado de la proteína fue similar al tamaño esperado para el fragmento recombinante fusionado a la MBP.

Para confirmar la identidad de las distintas proteínas, los extractos de los distintos cultivos fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos anti-DE y anti-MBP. Los resultados presentados en la **Figura 25** indicaron que mientras anti-DE no reconoció ninguna banda en el extracto correspondiente a bacterias que expresan MBP, el anticuerpo detectó una banda en cada uno de los cultivos correspondientes a los distintos fragmentos, cuyos tamaños fueron coincidentes con los observados anteriormente para las proteínas inducidas. Estas bandas también fueron reconocidas por el anticuerpo anti-MBP.

A continuación, se estudió la expresión citoplásmica o periplásmica de cada fragmento. Al igual que para recDE, se obtuvo de cada cultivo una fracción periplásmica y otra fracción conteniendo el resto de las proteínas bacterianas. Las proteínas de cada fracción se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con CBB. Mientras que para MBP y F2 se observó una importante cantidad de proteína en la fracción periplásmica, para F1 y F3, las proteínas se encontraron mayoritariamente en la fracción citoplásmica (**Figura 26**). Por lo tanto, mientras que F2 se purificó a partir de un extracto periplásmico, F1 y F3 fueron purificados a partir de un extracto total (**Figura 27**).



	Tamaño esperado	Tamaño observado
F1	60 kDa	62.5 kDa
F2	50.6 kDa	48 kDa
F3	61 kDa	59 kDa

Figura 24: Expresión de los fragmentos recombinantes F1, F2 y F3.

Bacterias transformadas con las construcciones correspondientes a los distintos fragmentos fueron crecidas en presencia o ausencia de IPTG. Las proteínas presentes en extractos de estos cultivos fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con CBB. Como control, se utilizaron bacterias que expresan recDE y MBP. Las flechas rojas indican la posición de las bandas inducidas. En la tabla se indican los tamaños esperados de los fragmentos y los calculados a partir del gel.

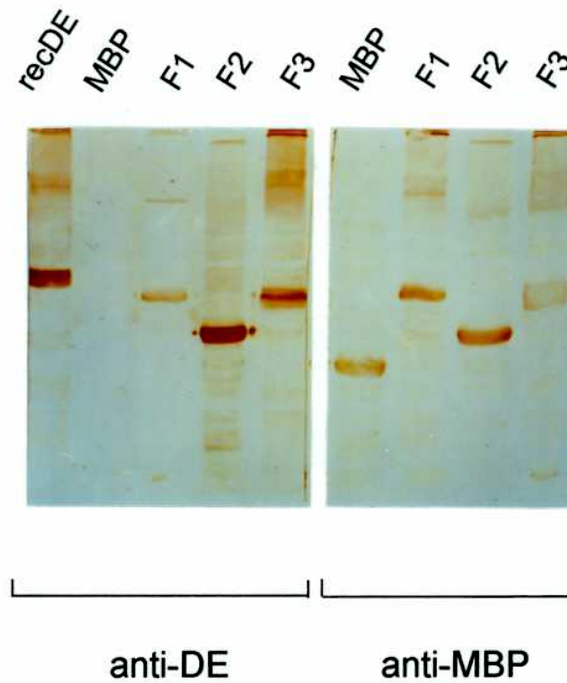


Figura 25: Reconocimiento de los fragmentos recombinantes por anti-DE y anti-MBP. Extractos de proteínas de bacterias transformadas con las construcciones para los distintos fragmentos y crecidas en presencia de IPTG, fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas por Western blot utilizando anti-DE o anti-MBP como primer anticuerpo.

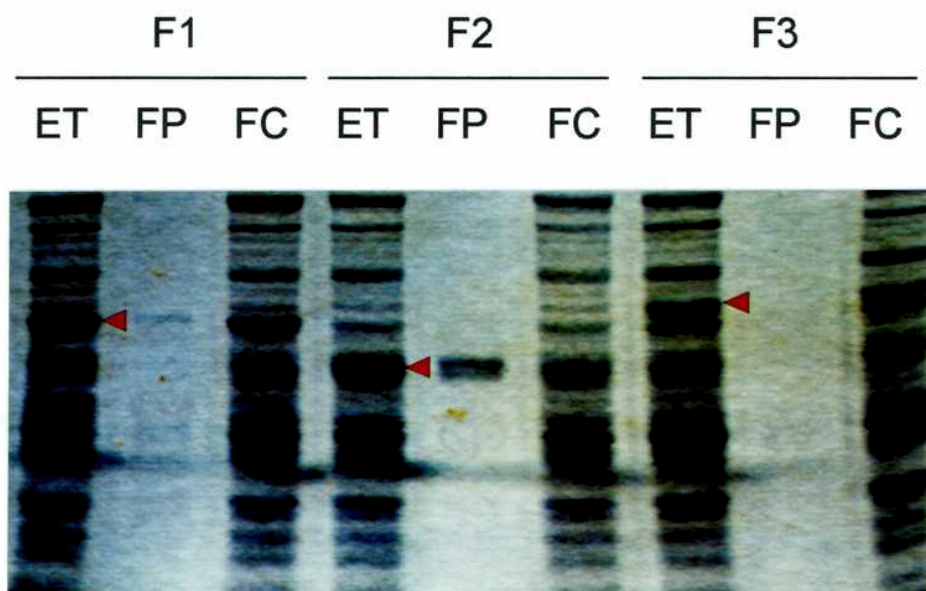


Figura 26: Expresión periplásmica o citoplásmica de los fragmentos recombinantes. Bacterias transformadas con las construcciones para los distintos fragmentos fueron crecidas en presencia de IPTG. Estas bacterias fueron utilizadas para la preparación de un extracto total (ET), una fracción periplásmica por tratamiento hiposmótico (FP), y una fracción depletada de proteínas periplásmicas (FC). Los extractos proteicos fueron separados por SDS-PAGE, y las proteínas teñidas con CBB. Las flechas indican la posición de los fragmentos F1, F2 y F3.

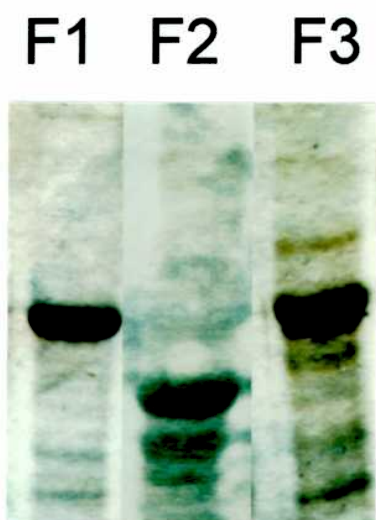


Figura 27: Tinción con nitrato de plata de los fragmentos recombinantes luego de la purificación a través de una columna de afinidad.

Actividad biológica de los fragmentos F1, F2 y F3

Con el fin de estudiar si alguno de los fragmentos generados presentaba actividad inhibitoria del proceso de fusión, en primer lugar se analizó la capacidad de los mismos de unirse al ovocito. Los resultados obtenidos por IFI indicaron que, mientras los ovocitos incubados con MBP o F2 no presentaban marcación fluorescente, tanto los ovocitos incubados con F1 como los incubados con F3 mostraban marca fluorescente sobre su superficie (**Figura 28**). Al igual que lo observado para recDE, la fluorescencia se observaba sobre toda la superficie del ovocito, con excepción de un área discreta que no presentaba fluorescencia.

Para evaluar si esta capacidad de unirse a los ovocitos era capaz de inhibir el proceso de fusión de gametas, se realizaron ensayos de fusión *in vitro* en presencia de los distintos fragmentos. Los experimentos iniciales, utilizando los fragmentos a una concentración de 6 μ M, indicaron que ninguno de ellos en forma individual, ni la combinación de los mismos, fueron capaces de inhibir el porcentaje de ovocitos fertilizados. Sin embargo, al aumentar la concentración a 60 μ M, tanto F1 como F3 produjeron una inhibición significativa, no observada para MBP ni para F2 (**Figura 29**).

Puesto que tanto F1 como F3 eran capaces de unirse al ovocito e inhibir la fusión de las gametas y, teniendo en cuenta que ambos poseen una región de su secuencia en común, resultaba lógico pensar que en esta región se encontraría el dominio responsable de la actividad. Se expresaron entonces dos nuevos fragmentos: el fragmento 4 (F4), que corresponde a la secuencia compartida entre F1 y F3, y el fragmento 5 (F5), que corresponde a la región de F1 no compartida con F3 (**Figura 30**).

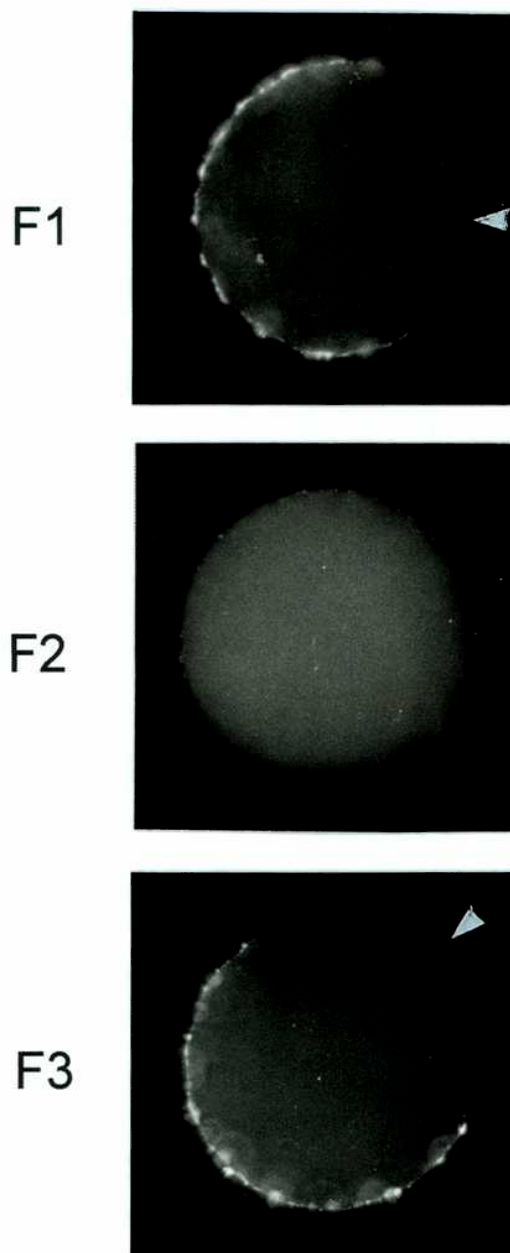


Figura 28: Capacidad de los distintos fragmentos recombinantes para unirse al ovocito.

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con 6 μ M de F1, F2 o F3 y luego fijados y sometidos a IFI utilizando anti-MBP como primer anticuerpo. La flecha señala la región del ovocito sin fluorescencia. Aumento: 590 X.

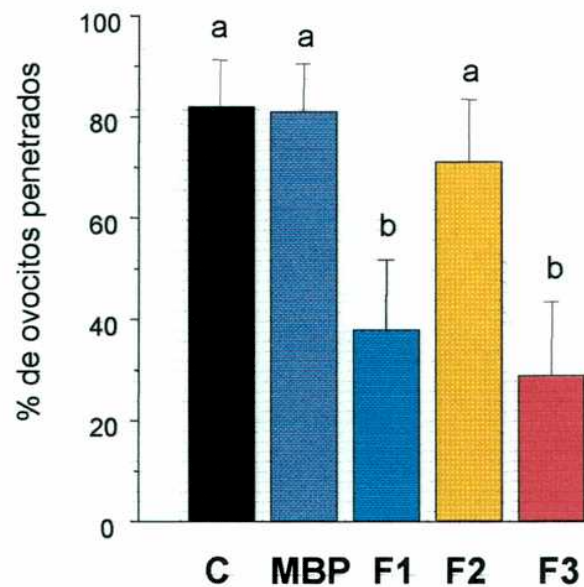
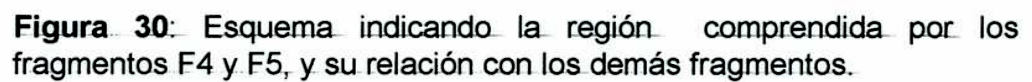


Figura 29: Capacidad de los fragmentos recombinantes F1, F2 y F3 para inhibir la fusión de gametas *in vitro*.

Ovocitos de rata sin ZP fueron preincubados en medio de fertilización (C) o en presencia de 60 μ M de MBP, F1, F2 o F3, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 3 hs de coincubación, se determinó el porcentaje de ovocitos fertilizados. Las barras representan el promedio de al menos tres experimentos, $\pm$ el error estándar.

a vs b: $p < 0.05$



Expresión de los fragmentos F4 y F5

El cultivo en presencia de IPTG de bacterias transformadas con los plásmidos para la expresión de F4 y F5, y el posterior análisis de las proteínas por SDS-PAGE, indicó la presencia de bandas coincidentes con el peso molecular esperado para los fragmentos recombinantes (**Figura 31A**). Estas proteínas inducidas por IPTG fueron reconocidas en experimentos de Western blot tanto por el anticuerpo anti-DE, como por el anticuerpo anti-MBP, indicando que se trataba efectivamente de las proteínas de fusión (**Figura 31B**). El análisis de la expresión citoplásmica o periplásmica de estos fragmentos, mostrado en la **Figura 32**, indicó que mientras F4 permanecía en el citoplasma bacteriano, F5 se transportaba eficientemente al espacio periplásmico. Seguidamente, las proteínas recombinantes fueron purificadas por una columna de afinidad, eliminándose la gran mayoría de las proteínas bacterianas (**Figura 33**). De esta manera, se logró disponer de tres fragmentos (F2, F4 y F5) que abarcan la totalidad de la molécula, y donde cada uno representa aproximadamente un tercio de la misma.

Actividad biológica de F4 y F5

En primer lugar, se ensayó la capacidad de los nuevos fragmentos para unirse a ovocitos de rata sin ZP. Los experimentos de IFI indicaron que los ovocitos incubados con F5, al igual que aquellos incubados con F2 o MBP, no presentaban fluorescencia. Por su parte, la incubación de los ovocitos con F4 resultó en una marcación fluorescente de los mismos (**Figura 34**) al igual que con F1 y F3.

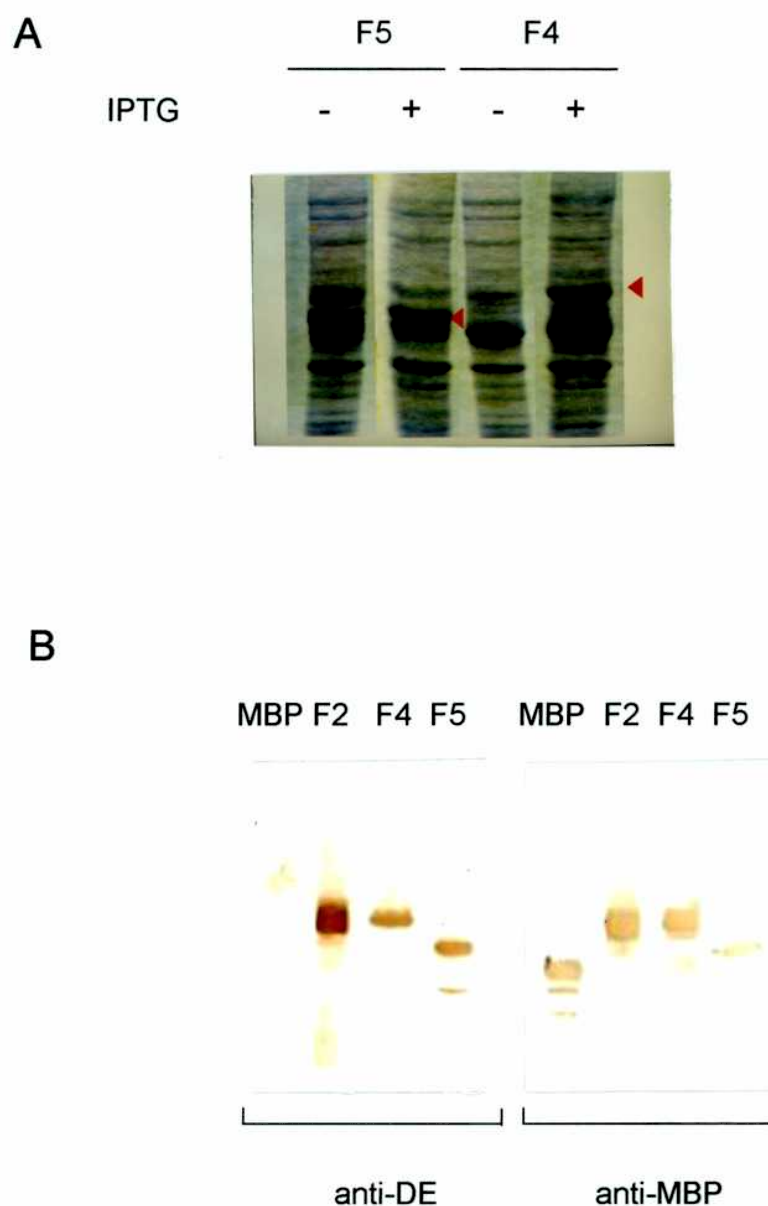


Figura 31: Expresión de los fragmentos F4 y F5.

Bacterias transformadas con pMAL-F4 (F4) o pMAL-F5 (F5) fueron crecidas en presencia o ausencia de IPTG. Las proteínas presentes en extractos de estos cultivos fueron separadas por SDS-PAGE y teñidas con CBB (**A**), o transferidas a nitrocelulosa y reveladas por Western blot utilizando anti-DE o anti-MBP como primer anticuerpo (**B**). En este último caso, se utilizaron las proteínas MBP y F2 como controles.

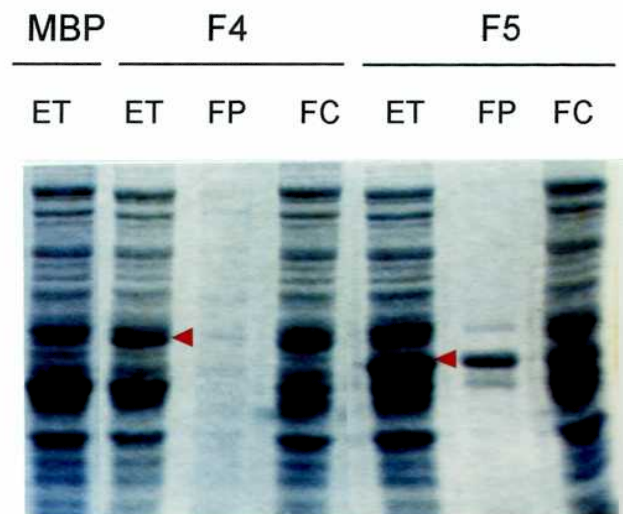


Figura 32: Análisis de la expresión citoplásmica o periplásmica de los fragmentos F4 y F5. Bacterias transformadas con pMAL-F4 o pMAL-F5 fueron crecidas en presencia de IPTG. Estas bacterias fueron utilizadas para la preparación de un extracto total (ET), una fracción periplásmica por tratamiento hiposmótico (FP), y una fracción depletada de proteínas periplásmicas (FC). Los extractos fueron separados por SDS-PAGE y las proteínas teñidas con CBB. Las flechas indican la posición de F4 y F5.

F4 F5



Figura 33: Tinción con nitrato de plata de los fragmentos F4 y F5 luego de su purificación a través de una columna de resina-amilosa.

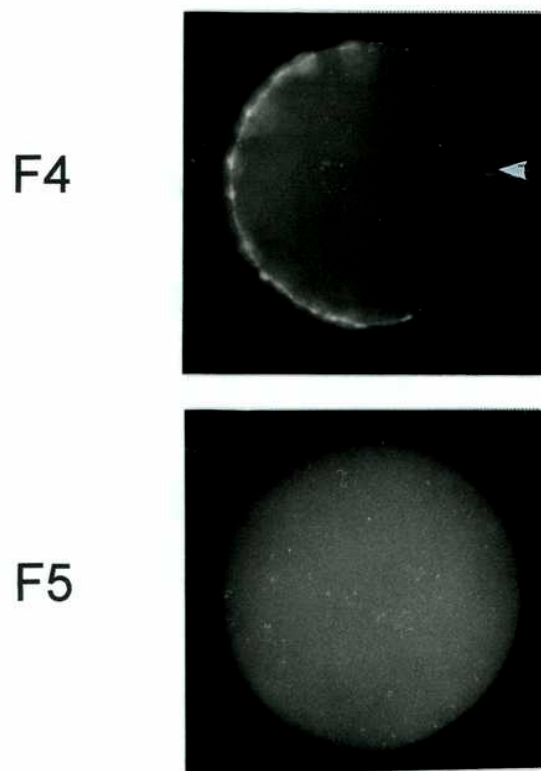


Figura 34: Capacidad de los fragmentos F4 y F5 para unirse al ovocito. Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con 6 μ M de F4 o F5 y luego fijados y sometidos a IFI utilizando anti-MBP como primer anticuerpo. La flecha señala el área sin marca fluorescente. Aumento: 590 x.

A continuación se estudió la habilidad de estos fragmentos de inhibir la fusión de las gametas *in vitro*. Tal como se observa en la **Figura 35**, los resultados indicaron que mientras la presencia de F5 no produjo una disminución del porcentaje de penetración de los ovocitos, la presencia de F4 produjo una reducción significativa, similar a la producida por F1 y F3.

Habiéndose comprobado que efectivamente el fragmento F4, que comprende la región común entre F1 y F3, contiene la actividad inhibitoria, se realizaron una serie de controles utilizando este fragmento. Como proteínas control, se utilizaron los fragmentos F2 y F5, que no inhiben la fusión de gametas *in vitro*, y tienen un tamaño similar a F4. La inhibición de fusión por F4 no se debió a un efecto tóxico de este fragmento sobre los espermatozoides ya que, ni la viabilidad ni la motilidad de los espermatozoides se encontraba afectada (**Tabla 5**).

Tabla 5: Efecto de los distintos fragmentos sobre la viabilidad y motilidad de los espermatozoides

	Porcentaje	
	Viabilidad	Motilidad
F2	79 ± 5	70 ± 5
F5	78 ± 4	67 ± 7
F4	77 ± 10	70 ± 13

Espermatozoides capacitados fueron incubados con 60 μ M de F2, F4 o F5 durante 1 h, a 37°C en estufa gaseada, determinándose luego los porcentajes de viabilidad y motilidad por observación en un microscopio óptico. Los valores corresponden al promedio de tres experimentos $\pm$ el error estándar.

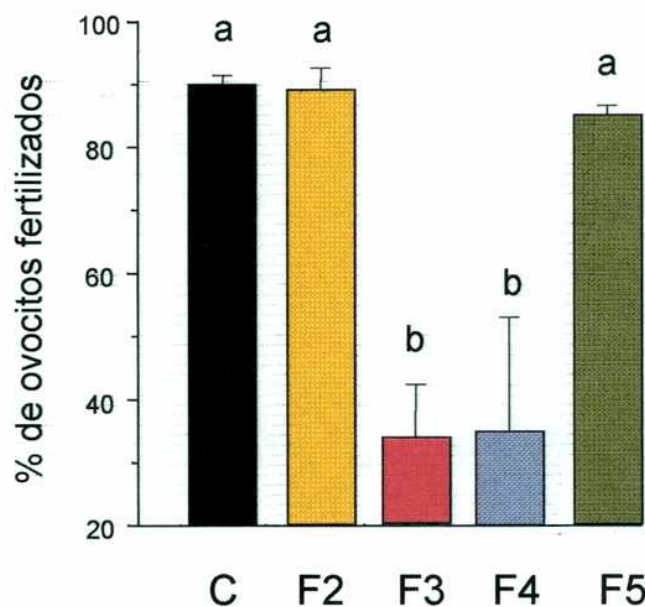


Figura 35: Capacidad de los fragmentos F4 y F5 de inhibir la fusión de gametas *in vitro*.

Ovocitos de rata sin ZP fueron preincubados en medio de fertilización (C) o en presencia de 60 μ M de F2, F3, F4 o F5 y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 3 hs de coincubación se determinó el porcentaje de ovocitos penetrados. Las barras representan el promedio de tres experimentos $\pm$ el error estándar.

a vs b: $p < 0.05$

Con el fin de controlar un posible efecto irreversible sobre la penetrabilidad de los ovocitos, ovocitos sin ZP fueron incubados durante 2 hs con los fragmentos F2, F4 y F5, luego de lo cual los mismos fueron lavados mediante sucesivos pasajes por gotas de medio de fertilización, e inseminados con espermatozoides capacitados. Tal como se observa en la **Tabla 6**, los ovocitos incubados con F4 presentaron un porcentaje de fertilización similar a aquellos ovocitos incubados con F2 y F5.

Tabla 6 Efecto de los fragmentos F2, F4 y F5 sobre la penetrabilidad de los ovocitos.

	n	% de ovocitos fertilizados
F2	37	92 ± 8
F5	48	92 ± 8
F4	60	89 ± 11

Ovocitos sin ZP fueron incubados con 60 μ M de F2, F4 o F5 durante dos horas, y luego lavados mediante tres pasajes por gotas de medio fresco. Seguidamente, los ovocitos fueron inseminados con espermatozoides capacitados, y luego de 3 hs de coincubación, se determinó el porcentaje de ovocitos fertilizados. Los valores corresponden al promedio $\pm$ el error estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos.

n: número de ovocitos analizados

Como otra manera de evaluar la reversibilidad de la inhibición, ovocitos incubados con 60 μM de F4 fueron luego inseminados con un exceso de espermatozoides (tres veces superior a la concentración habitual). En caso de que, efectivamente, el fragmento recombinante estuviera bloqueando los sitios complementarios para DE, el aumento en la cantidad de espermatozoides debería desplazarlo revirtiendo dicha inhibición. Los resultados presentados en la **Tabla 7** indican que la inhibición producida por F4 pudo ser revertida mediante el empleo de una mayor concentración de espermatozoides, resultados que señalan la reversibilidad del efecto producido.

Tabla 7 Reversión de la inhibición producida por F4 a través del aumento en la concentración de espermatozoides

	n	% de ovocitos penetrados
Control	44	88 ± 4.4
F4 (4×10^5 esp /ml)	39	41 ± 21^a
F4 (12×10^5 esp/ml)	36	95 ± 4.7^b

Ovocitos sin ZP preincubados con F4 (60 μM) fueron inseminados con dos concentraciones de espermatozoides capacitados: 4×10^5 esp /ml, o 12×10^5 esp/ml. Luego de 3 hs de coincubación, se determinó el porcentaje de ovocitos penetrados. Los números corresponden al promedio obtenido de tres experimentos independientes.

n: número total de ovocitos analizados.

^a $p < 0.05$ vs. control, ^b $p < 0.05$ vs. F4 (4×10^5 esp/ml).

Habiendo descartado un posible efecto tóxico sobre la viabilidad de ambas gametas, a continuación se investigó si la inhibición observada se debía a un efecto sobre la unión inicial de las gametas. Para ello, ovocitos sin ZP fueron preincubados con los fragmentos F2, F4 o F5 y luego inseminados con espermatozoides capacitados, determinándose al cabo de 30 minutos, tanto el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos como el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito. Los resultados obtenidos indicaron la ausencia de diferencias significativas para ambos parámetros entre los tres grupos de ovocitos (**Tabla 8**).

Tabla 8 Efecto de F4 sobre la unión espermatozoide-ovocito

	n	% de ovocitos con espermatozoides unidos	Nº promedio de espermatozoides unidos por ovocito
F2	61	68 ± 15	3.6 ± 0.4
F5	49	81 ± 15	4.1 ± 0.5
F4	61	92 ± 8	4.1 ± 0.3

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados en presencia de 60 µM de los fragmentos F2, F5 o F4, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Luego de 30 min de coincubación, se evaluaron el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos y el número de espermatozoides unidos por ovocito. Los valores corresponden al promedio ± el error estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

n: número de ovocitos examinados.

Estos resultados indican que la inhibición de la fertilización observada en presencia de F4 ocurriría en un paso posterior a la unión de las gametas, sugiriendo la especificidad de dicha inhibición.

En resumen, los resultados obtenidos en la Parte I, indican que la actividad biológica de la proteína residiría en la porción peptídica de la molécula, más precisamente en la región comprendida entre los aa 62-158, y que los puentes disulfuro serían de importancia para dicha actividad.

Parte II. Potencial uso de DE para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad.

Capítulo 1: Estudio de los mecanismos involucrados en la inhibición de la fertilidad en ratas inmunizadas con la proteína DE.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la inmunización de ratas de ambos sexos con la proteína DE es capaz de producir una respuesta inmune en la mayoría de los animales, así como una inhibición significativa de la fertilidad (144). Tal como se describe en la Introducción, experimentos realizados con los sueros de los animales inmunizados, sugirieron que los anticuerpos anti-DE estarían involucrados en dicha inhibición de la fertilidad (145). Sin embargo, estos resultados constituían evidencias indirectas, restando evaluar los mecanismos *in vivo* implicados en la inhibición de los animales inmunizados.

Determinación de anticuerpos anti-DE y su relación con la fertilidad.

Con el fin de estudiar los mecanismos responsables de la inhibición de la fertilidad, se inmunizó un grupo de animales de ambos sexos con la proteína DE, utilizando animales inmunizados con solución fisiológica como grupo control. De aquí en más, los animales inmunizados con la proteína DE serán llamados animales "inmunizados", en tanto que los animales inmunizados con solución fisiológica, animales "controles". Para confirmar el desarrollo de una respuesta inmune, se estudió la presencia de anticuerpos anti-DE en el suero, mediante la técnica de inmunoensayo (ELISA), utilizando DE purificada como antígeno, y los sueros obtenidos, como primer anticuerpo. Las extracciones de sueros fueron realizadas en los momentos indicados en la **Figura 36.**

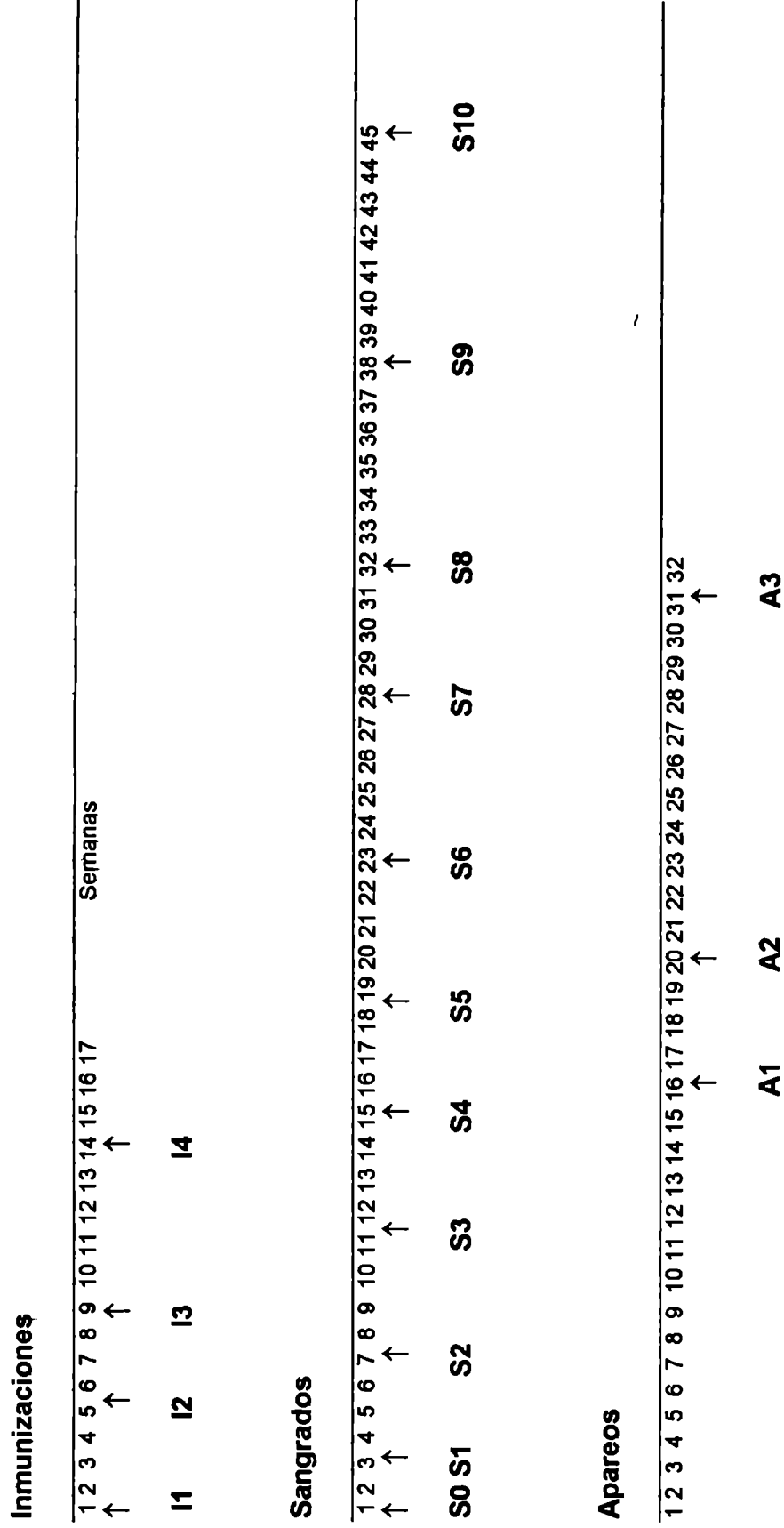


Figura 36: Cronograma experimental en donde las flechas indican los momentos en que se realizaron las inmunizaciones (I), los sangrados (S) y los apareos (A).

Un método habitualmente utilizado para la determinación del título de un anticuerpo es el llamado “de dilución final”, en el cual se realizan diluciones seriadas de la muestra, considerándose como título, la inversa de la última dilución con resultado positivo. Dado que se realizaron varios sangrados de cada animal, y que el número de animales era considerable, éste método resultaba poco práctico, decidiéndose por lo tanto, estimar el valor de los títulos a través de la absorbancia obtenida a una dilución fija para todos los sueros. Se construyó una curva estándar para determinar la correlación entre el valor de la absorbancia a una dilución fija (1:100) y el valor del título por dilución final. La curva estándar presentó un coeficiente de correlación de 0.75 (**Figura 37**), por lo que todas las determinaciones posteriores de título se realizaron midiendo la absorbancia a la dilución 1:100.

El análisis de los sueros de los animales inmunizados, indicó que los niveles de anticuerpos anti-DE se incrementaban en función del tiempo, alcanzando valores significativamente mayores que aquellos pertenecientes a sueros preinmunes o provenientes de animales control. En la **Figura 38A** se muestran los promedios de todos los animales control e inmunizados respectivamente, en tanto que en la **Figura 38B** se ilustra la evolución individual de algunos animales inmunizados.

Con el fin de analizar la evolución de la fertilidad de los animales, los mismos fueron puestos en apareo inmediatamente después de la última inmunización (semana 16) y en dos oportunidades posteriores (semana 20 y semana 31) (**Figura 36**). Cada macho fue alojado en una jaula con tres hembras fértiles durante siete días, luego de lo cual se retiró el macho y se evaluó durante 21 días los signos de preñez de las hembras. La fertilidad de cada animal se consideró como el porcentaje de hembras preñadas.

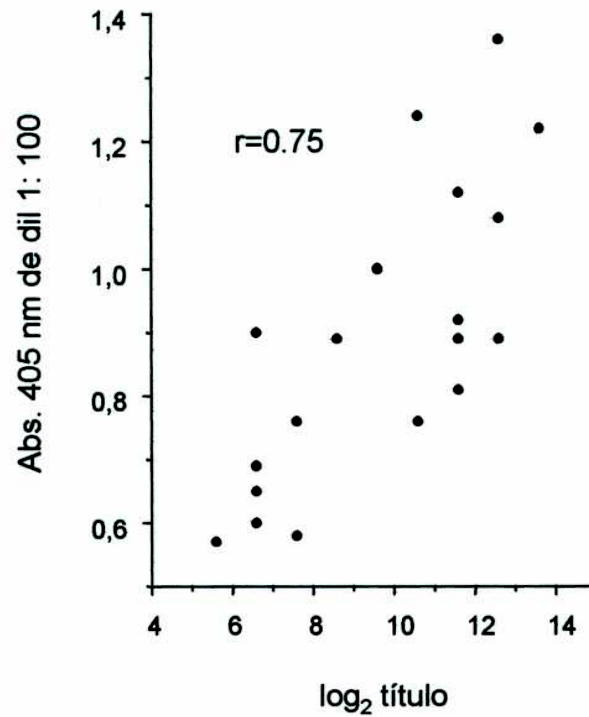


Figura 37: Correlación entre la absorbancia a 405 nm de la dilución 1:100 de los sueros, y el título obtenido por dilución final. $r=0.75$ ($p<0.005$).

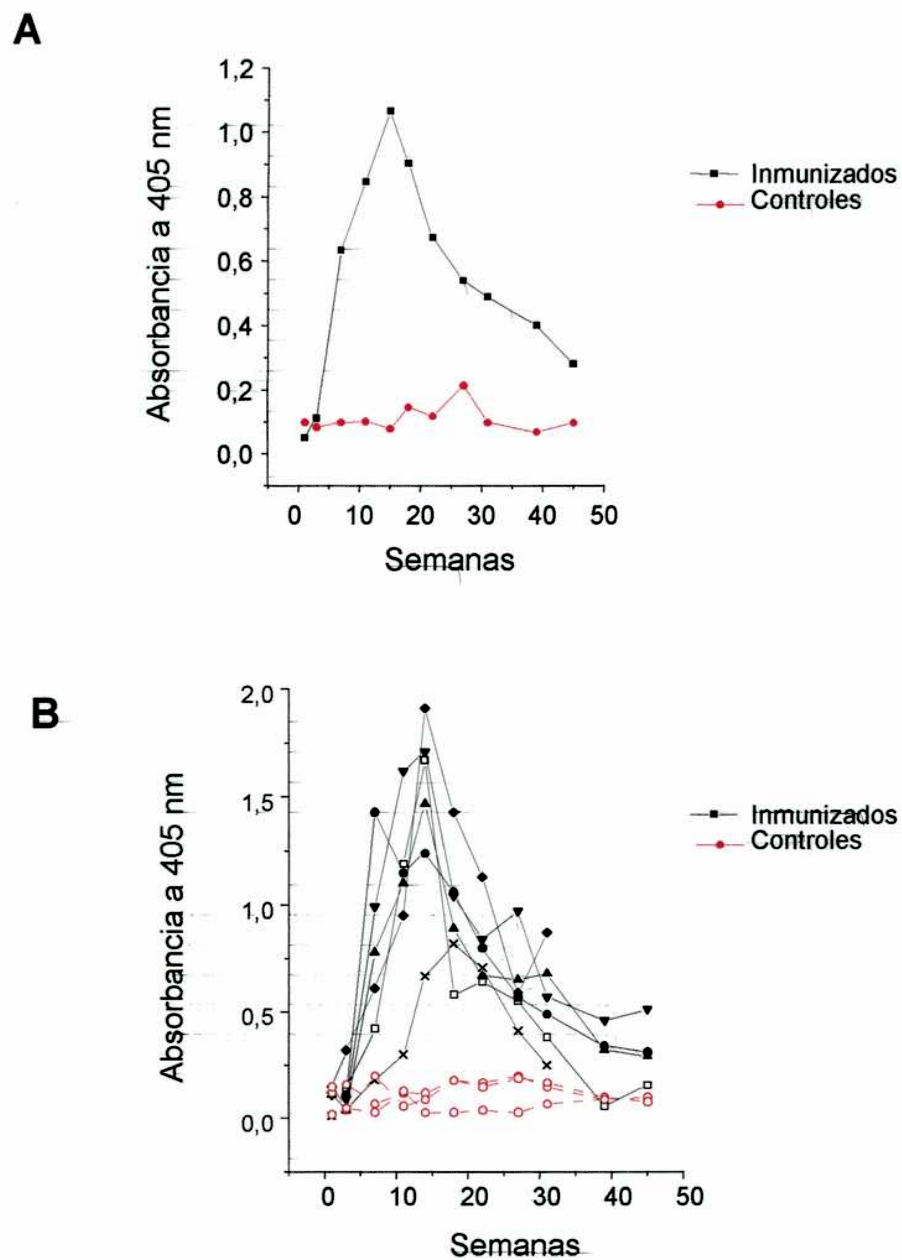


Figura 38: Respuesta inmune en animales macho inmunizados y controles. **(A)** Promedios de todos los animales inmunizados y controles. **(B)** Respuesta individual de algunos animales.

Los resultados de los tres apareos en conjunto, mostraron una inhibición significativa de la fertilidad en los machos inmunizados respecto a los controles (43% vs 72%, $p < 0.05$).

Con el fin de estudiar una posible relación entre los anticuerpos anti-DE circulantes y la fertilidad, se procedió a analizar la asociación entre el título de los anticuerpos séricos anti-DE en cada individuo y el correspondiente porcentaje de fertilidad. Los resultados de dicha comparación indicaron que la mayoría (91%) de los animales que presentaban valores de absorbancia menores a 0.5 exhibieron elevados porcentajes de fertilidad (66% y 100%) (**Figura 39**). Por el contrario, aquellos animales con valores de absorbancia superiores a 0.5, presentaron bajos porcentajes de fertilidad (0% y 33%).

El análisis de los sueros de las hembras inmunizadas con DE indicó que los títulos de anticuerpos anti-DE se incrementaban en función del tiempo, alcanzando valores significativamente mayores que aquellos correspondientes a sueros preinmunes o controles (**Figura 40A**).

En la **Figura 40B** se muestra la evolución de la respuesta inmune en forma individual, para ilustrar la variabilidad de la misma.

Con el fin de observar la evolución de la fertilidad, las hembras fueron apareadas luego de la última inmunización (una hembra inmune y una control con un macho no inmunizado). La fertilidad de los animales fue estudiada en apareos realizados en los momentos indicados en la **Figura 36**. Los resultados mostraron una reducción significativa de la fertilidad en las hembras inmunizadas respecto a las hembras control (31% vs 65%, $p < 0.05$).

La **Figura 41** muestra la relación entre los niveles de anticuerpo anti-DE y la correspondiente fertilidad de cada hembra inmunizada. Mientras que la mayoría de las hembras (71%) con títulos superiores a 0.4 manifestaban una

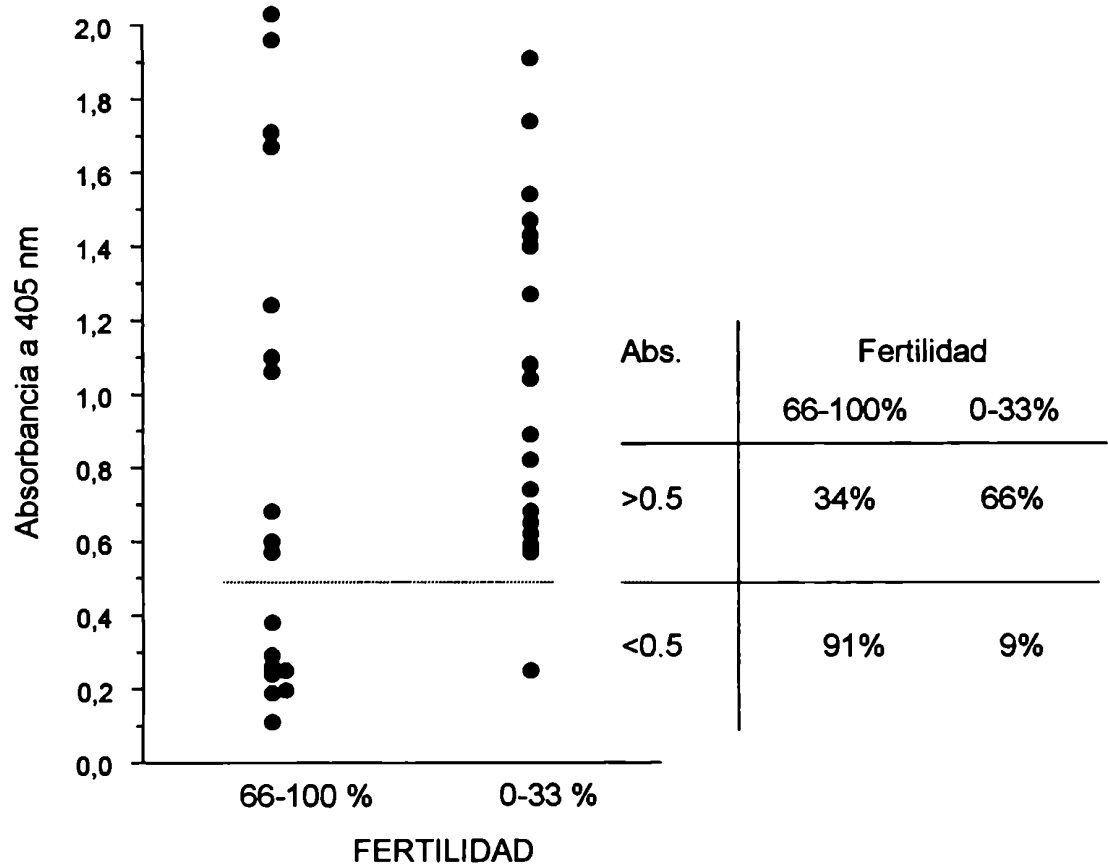


Figura 39: Relación entre los títulos de anticuerpos anti-DE y la fertilidad de los machos. Cada punto representa la fertilidad de un animal en un determinado apareo y su título sérico en ese mismo momento. Se incluyen los resultados de los tres apareos.

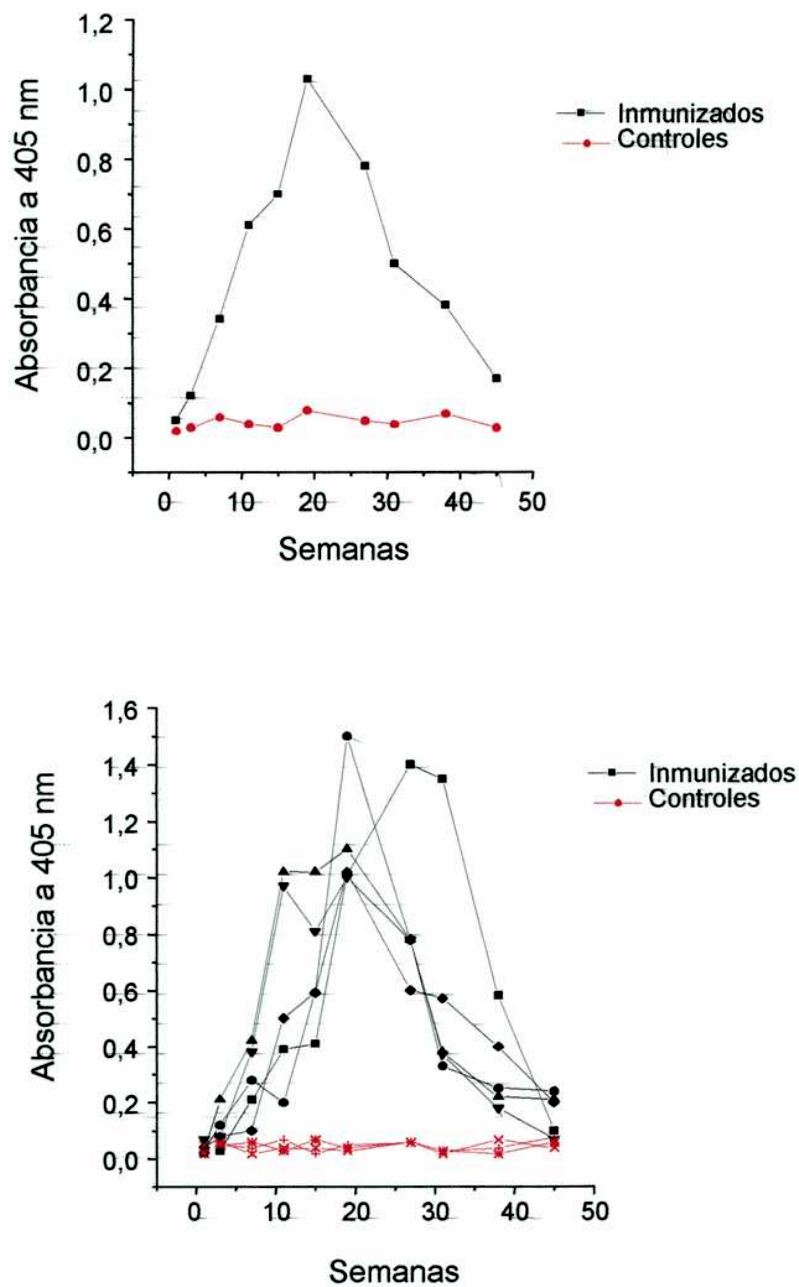


Figura 40: Respuesta inmune en animales hembra inmunizados y controles. **(A)** Promedios de todos los animales inmunizados y controles. **(B)** Respuesta individual de algunos animales.

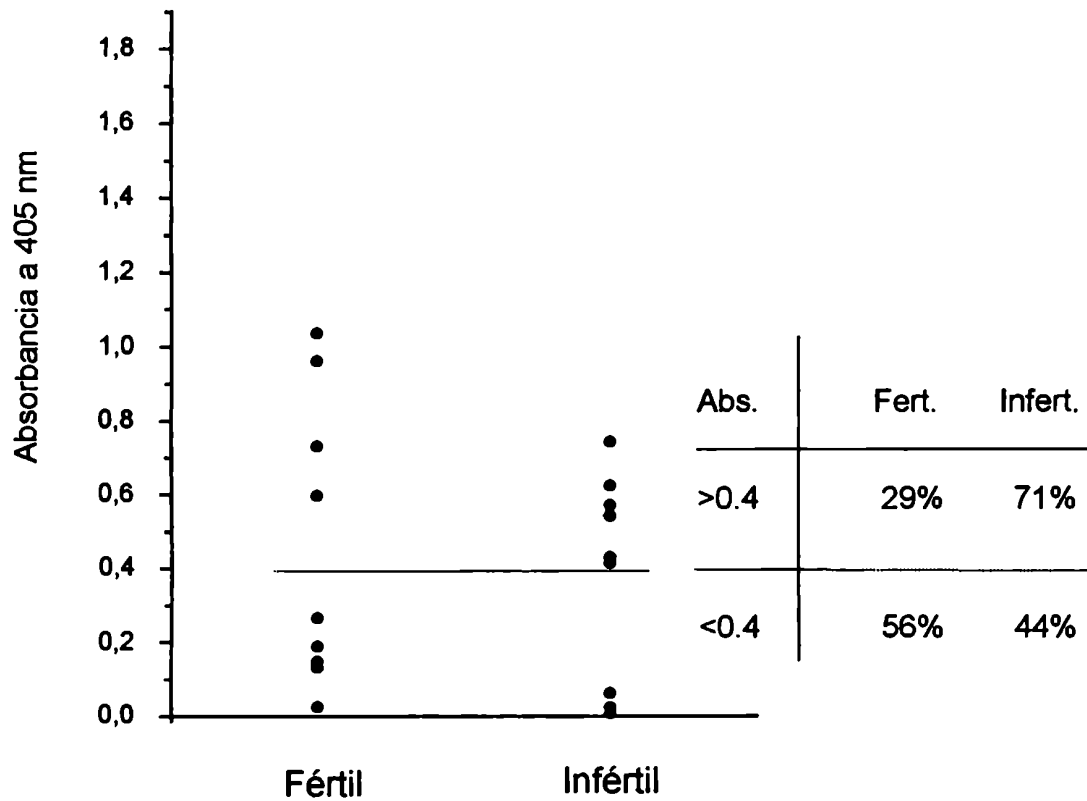


Figura 41: Relación entre los títulos de anticuerpos anti-DE y la fertilidad de las hembras. Cada punto representa la fertilidad de un animal en un determinado apareo y su título sérico en ese mismo momento. Se incluyen los resultados de los tres apareos.

inhibición de su fertilidad, aquellos individuos que mostraron un nivel de anticuerpos inferior a 0.4 presentaron porcentajes similares de fertilidad e infertilidad (56% vs 44%).

Para todos los siguientes estudios sobre mecanismos de inhibición, se utilizaron machos inmunizados que presentaran fertilidad reducida (0-33%) y hembras infértiles, y en ambos casos, animales con un alto título sérico de anticuerpos (>0.5).

Estudio histológico de los órganos reproductivos de machos y hembras

Con el fin de descartar un posible efecto deletéreo de los anticuerpos anti-DE sobre el epidídimo y vaso deferente, se realizaron cortes histológicos de dichos órganos de animales control e inmunizados. La observación de los cortes de epidídimo reveló la presencia de estructuras epididimarias normales en los cortes provenientes de ambos grupos de animales. En ningún caso se observaron agregados de células mononucleares en el tejido conectivo, u otro signo de una respuesta inflamatoria crónica. El epitelio epididimario presentaba características pseudoestratificadas, de contorno regular, mientras que el lumen tubular contenía cantidades normales de espermatozoides en su interior (**Figura 42**).

Por su parte, los cortes de vaso deferente no presentaron ninguna alteración de la estructura normal, observándose una masa de espermatozoides en el lumen.

Si bien la proteína DE no se expresa en el testículo, la proteína TPX-1 que posee una homología de 55% con DE, y también es miembro de la familia CRISP, podría reaccionar en forma cruzada con los anticuerpos formados, causando una lesión testicular. Por otro lado, se ha descrito que, alteraciones en el epidídimo pueden ocasionalmente producir efectos deletéreos sobre el testículo. Por lo tanto, se examinaron también cortes de

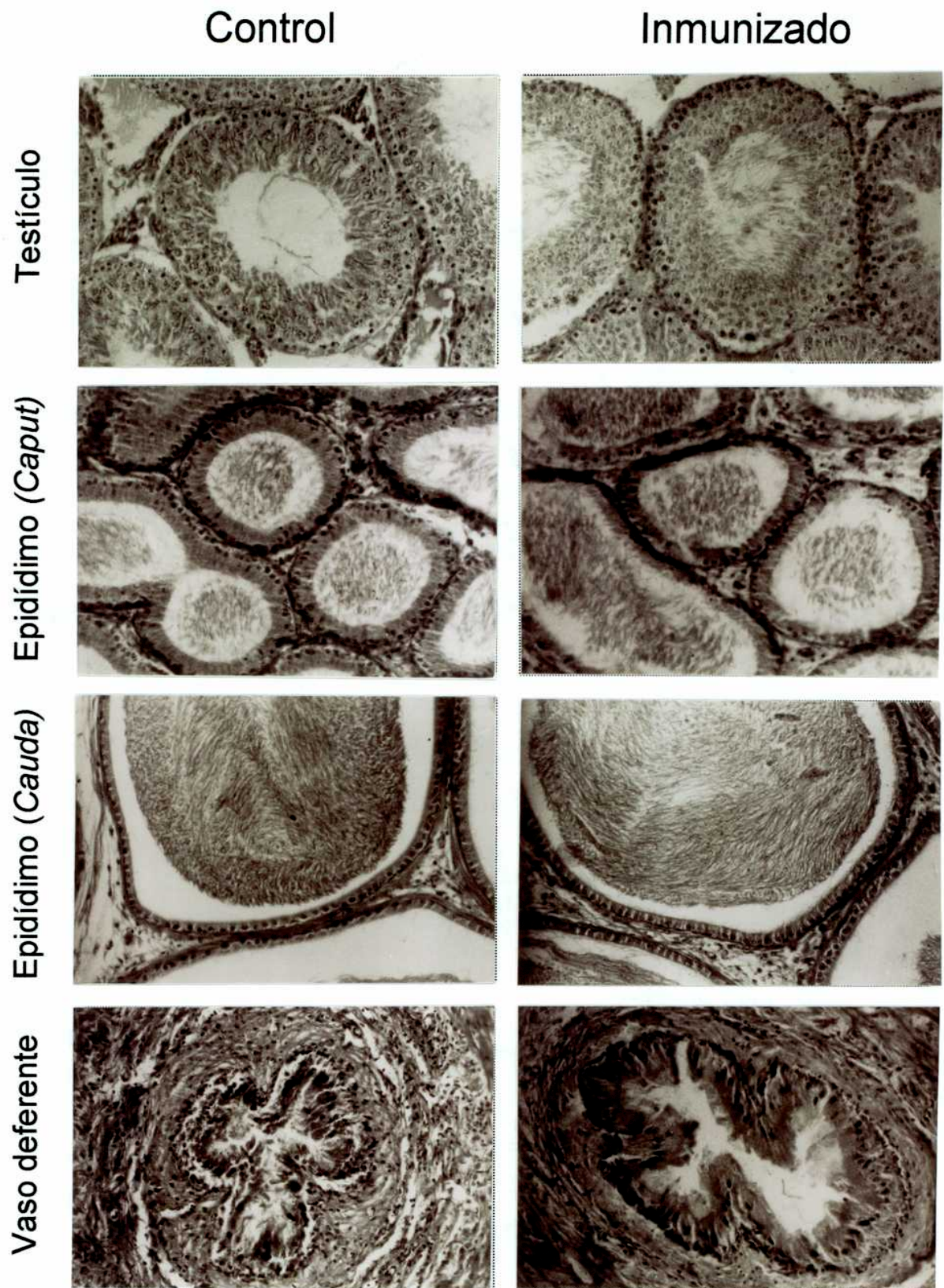


Figura 42: Microfotografías de cortes teñidos con hematoxilina-eosina de los órganos reproductivos, recuperados de animales macho controles e inmunizados. Aumento: 265 X.

testículo de ambos grupos de animales. El análisis de los cortes de testículo no mostró evidencias de infiltración de las membranas basales o descamación de células al lumen de los túbulos seminíferos, existiendo un desarrollo espermatogénico normal. Los túbulos seminíferos observados presentaban diámetros tubulares normales, y en algunos casos, la presencia de abundantes espermatozoides maduros (**Figura 42**).

Con el fin de excluir un efecto inespecífico de los anticuerpos anti-DE sobre los órganos reproductores femeninos, se examinaron cortes histológicos de ovario, útero y oviducto. En los cortes de ovario se observó la presencia de todos los tipos celulares, no detectándose evidencias de cambios degenerativos o atrésicos de los folículos (**Figura 43**). Por su parte, no se observaron estructuras alteradas en los cortes correspondientes a útero y oviducto (**Figura 43**), tanto de animales inmunes como controles.

Para excluir la posibilidad de que los anticuerpos circulantes en las hembras inmunizadas actuaran alterando el ciclo estral, se hizo un seguimiento del mismo en las hembras controles e inmunizadas. Los resultados indicaron que ambos grupos de animales mostraban un ciclo regular, presentando los tipos celulares normales correspondientes a cada día del ciclo.

Habiendo descartado un efecto deletéreo de la inmunización con la proteína sobre los órganos reproductivos del macho y de la hembra, un posible mecanismo de la inhibición consistiría en la entrada de los anticuerpos al tracto reproductivo, y su interacción con los espermatozoides, afectando el funcionamiento de los mismos (**Figura 44**).

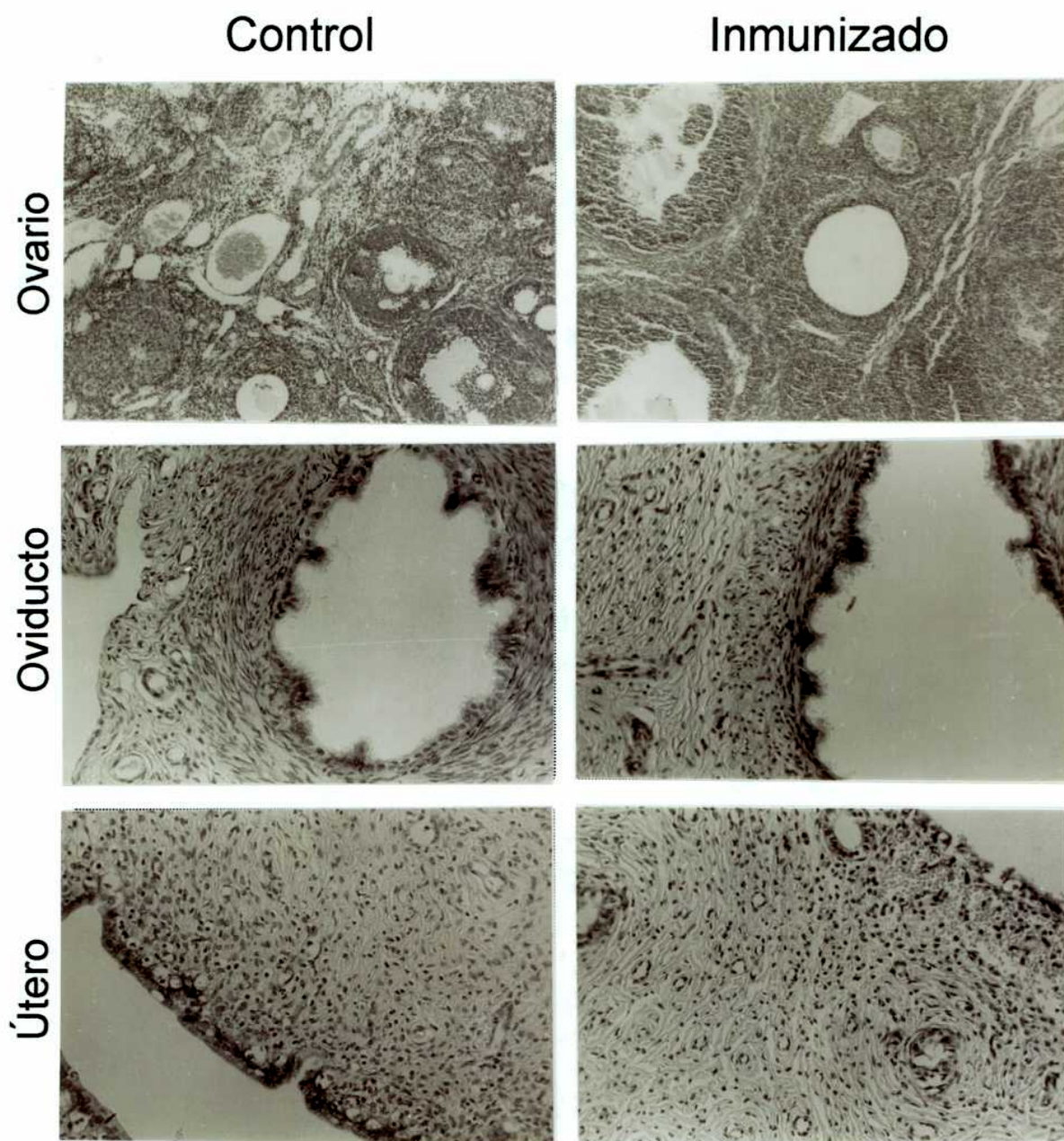


Figura 43: Microfotografías de cortes teñidos con hematoxilina-eosina de los órganos reproductivos, recuperados de animales hembras controles e inmunizados. Aumentos: Ovario: 250 X; útero y oviducto: 530 X.

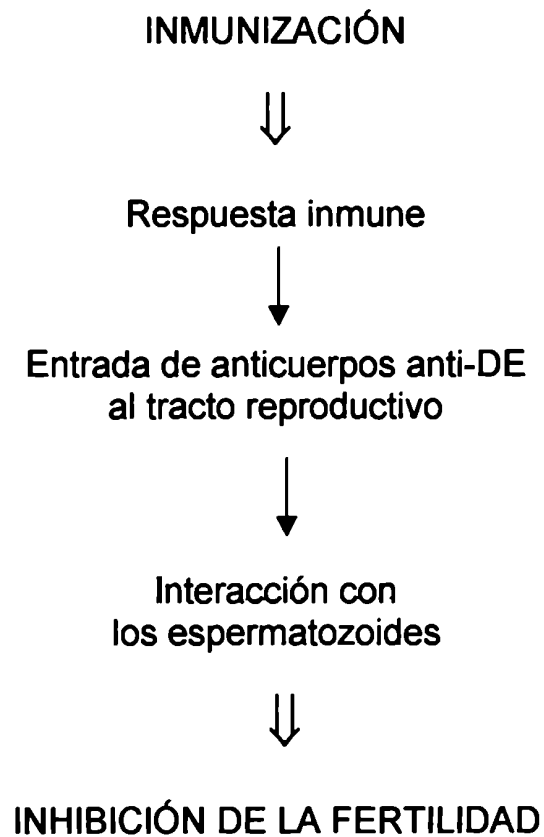


Figura 44: Esquema del posible mecanismo de inhibición de la fertilidad.

Presencia de anticuerpos anti-DE en el tracto reproductivo de machos y hembras

Con el fin de examinar si efectivamente los anticuerpos anti-DE acceden al tracto reproductivo, se recuperaron fluidos reproductivos de machos y hembras inmunizados o control, los cuales fueron utilizados como primer anticuerpo en ensayos de ELISA contra la proteína DE.

En el caso de los machos, se obtuvieron los fluidos provenientes de las distintas regiones del epidídimo, así como del vaso deferente. Tal como se observa en la **Figura 45**, los fluidos provenientes de animales inmunizados presentaron una cantidad significativamente mayor de anticuerpos anti-DE respecto a los fluidos correspondientes a animales control.

En el caso de las hembras, se obtuvieron los fluidos uterinos y oviductales, tanto de animales inmunizados como control. Los valores obtenidos en los fluidos de animales inmunizados fueron significativamente mayores que aquellos correspondientes a animales control (**Figura 46**).

Presencia de la proteína DE sobre los espermatozoides

Dado que los resultados descriptos indicaban que los anticuerpos serían capaces de acceder al lumen epididimario, un mecanismo posible de acción, esquematizado en la **Figura 47**, sería la interferencia de los mismos con la síntesis y/o secreción de la proteína, o bien con la asociación de la misma a los espermatozoides. En todos estos casos, se produciría una disminución de la cantidad de DE presente sobre la superficie del espermatozoide. Esta posibilidad sólo es válida para el caso del macho, donde ocurre la síntesis de la proteína DE y su asociación al espermatozoide. Alternativamente, los anticuerpos podrían asociarse a la proteína ya presente sobre el

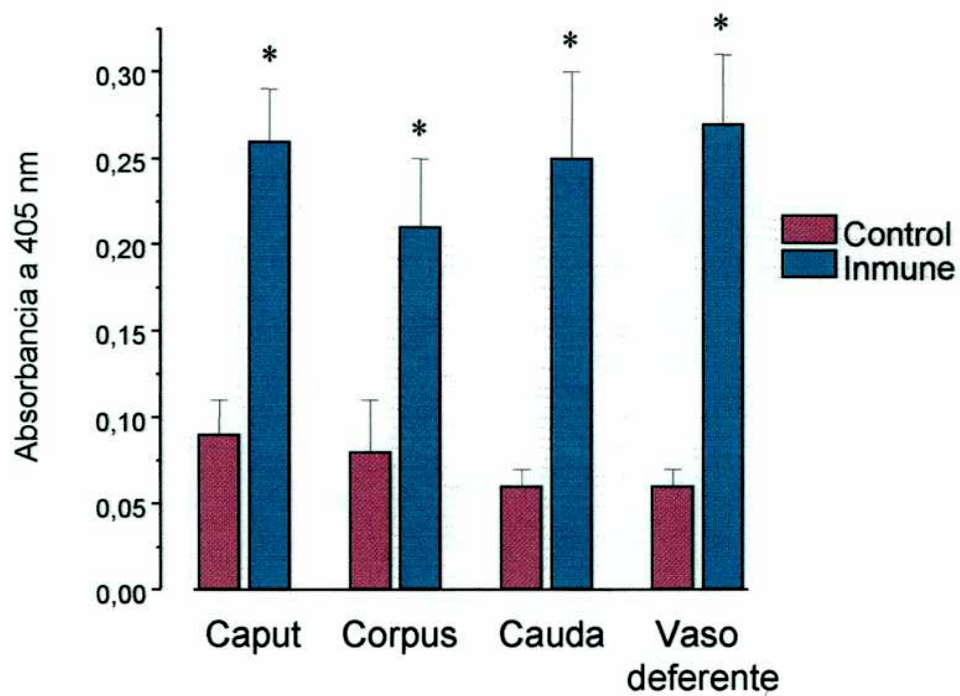


Figura 45: Presencia de anticuerpos anti-DE en los fluidos del tracto reproductivo masculino. Fluidos del *caput*, *corpus* y *cauda*, y del vaso deferente fueron utilizados como primer anticuerpo en un ELISA contra la proteína DE.

* $p < 0.05$ vs control.

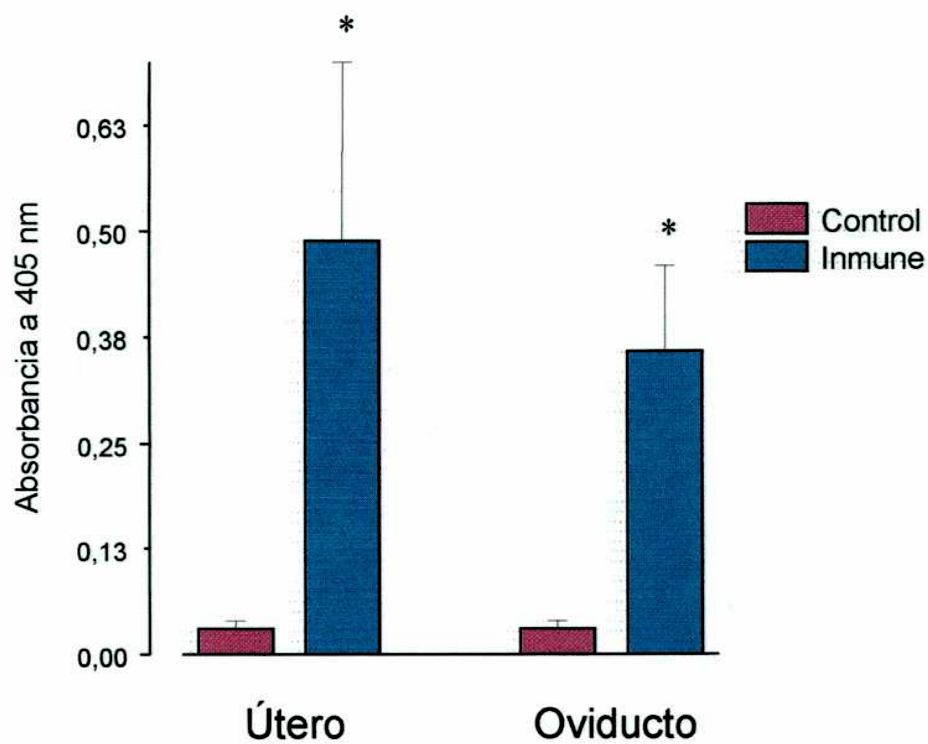


Figura 46: Presencia de anticuerpos anti-DE en los fluidos del tracto reproductivo femenino. Fluidos de útero y oviducto fueron utilizados como primer anticuerpo en ELISA contra la proteína DE.

* $p < 0.05$ vs control.

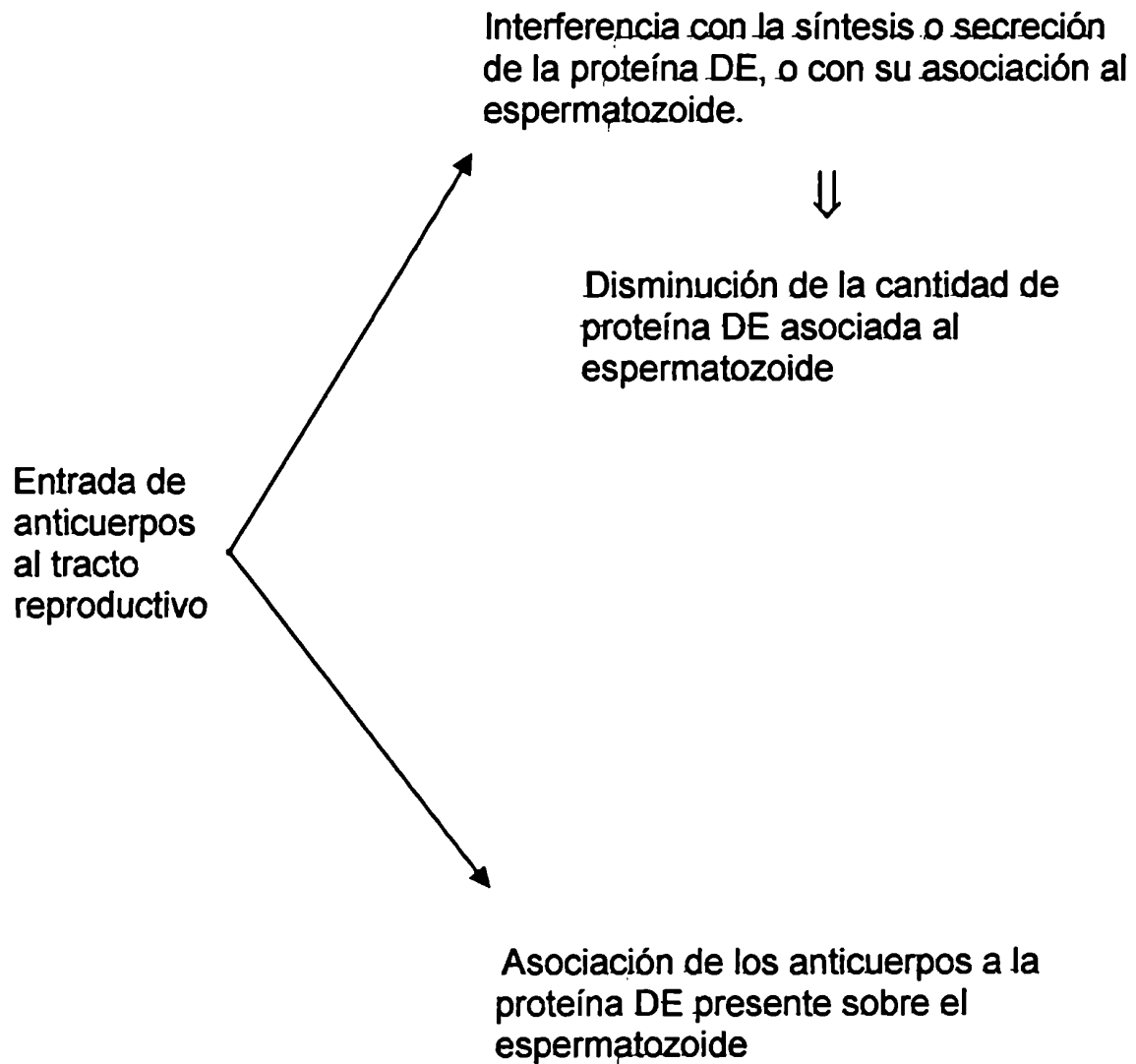


Figura 47: Diagrama de los posibles mecanismos de acción de los anticuerpos presentes en el tracto reproductivo masculino y femenino.

espermatozoide, interfiriendo con su función. Esta posibilidad se aplicaría tanto a hembras como a machos.

Con el fin de evaluar la primera de estas posibilidades, se realizó un experimento de inmunohistolocalización sobre cortes de epidídimo de animales inmunizados y control para examinar la presencia de la proteína DE ya sea en el epitelio epididimario como asociada a la superficie de los espermatozoides. Para tal fin, se utilizaron anti-DE obtenido en conejo, y anti-IgG conjugado con FITC como primer y segundo anticuerpo, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en el patrón de inmunofluorescencia de ambos grupos de animales, observándose marca fluorescente en la zona apical de las células principales, como así también en las regiones del lumen donde había espermatozoides (**Figura 48**). Si bien estos resultados cualitativos indicaban la ausencia de grandes diferencias entre los grupos, para descartar posibles diferencias no detectables por la técnica de IFI, se cuantificaron por ELISA las cantidades de DE asociada a la superficie de espermatozoides provenientes de animales inmunizados y controles. Tal como puede observarse en la **Figura 49**, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de proteína DE correspondientes a cada grupo.

Asociación de los anticuerpos a los espermatozoides en el tracto femenino y masculino

Habiendo comprobado la presencia de anticuerpos anti-DE en el tracto reproductivo tanto del macho como de la hembra, y habiendo descartado una interferencia en la síntesis, secreción o asociación de DE a los espermatozoides, seguidamente se estudió la posible unión de los anticuerpos a los espermatozoides presentes en los tractos reproductivos. Para ello, se recuperaron espermatozoides epididimarios de machos inmunizados y control, y se obtuvieron espermatozoides de la vagina y útero

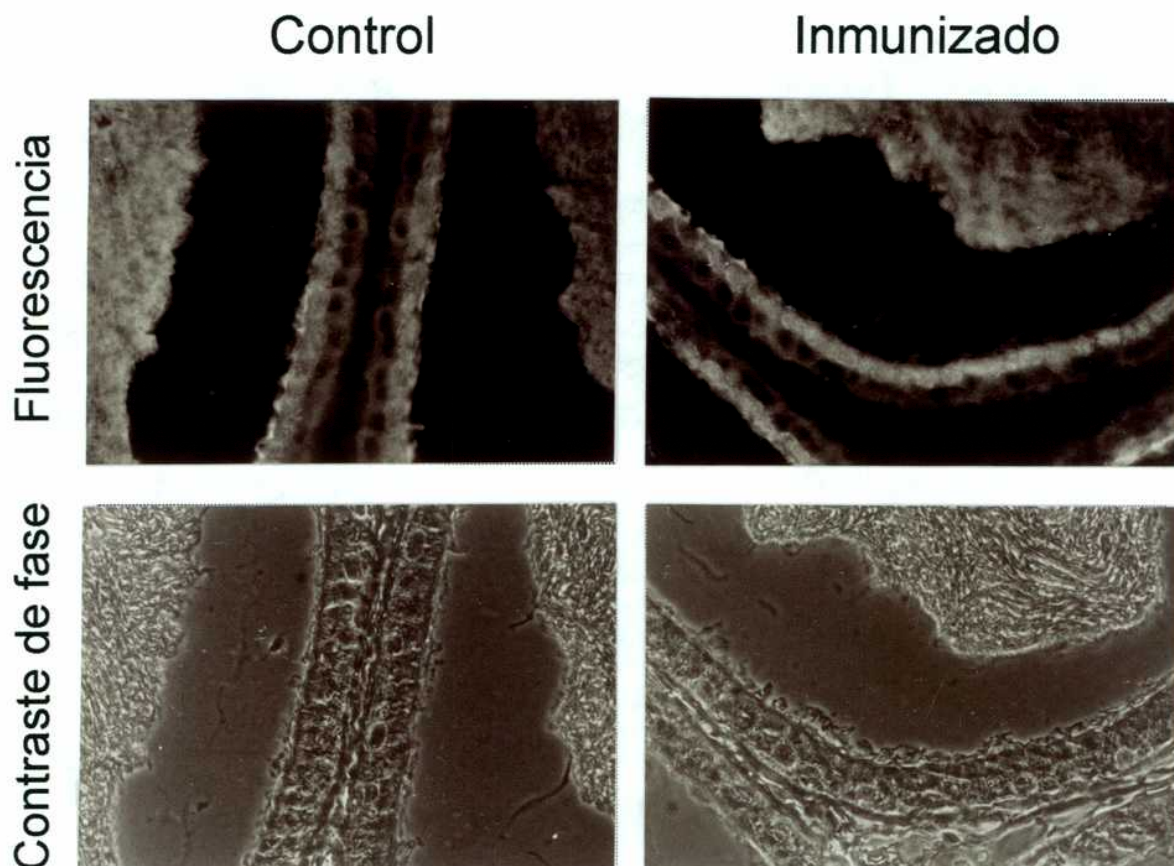


Figura 48: Presencia de la proteína DE en el tejido epididimario.

Secciones de epidídimos de animales controles o inmunizados fueron sometidos a inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-DE como primer anticuerpo. Aumento: 526 X.

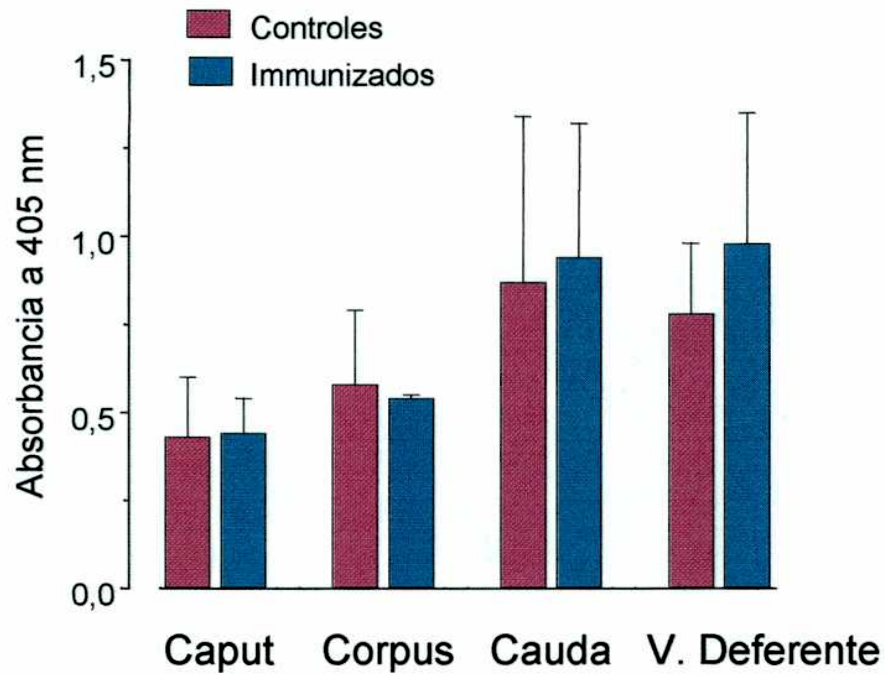


Figura 49: Presencia de la proteína DE sobre los espermatozoides. Espermatozoides epididimarios provenientes de animales control o inmunizados fueron acoplados a placas de ELISA, y la cantidad de proteína DE cuantificada utilizando anti-DE como primer anticuerpo.

de hembras inmunizadas y control apareadas con machos no inmunizados. Los espermatozoides así obtenidos fueron sometidos a IF utilizando directamente anticuerpo anti-IgG de rata acoplado a FITC. En el caso de las hembras, mientras que los espermatozoides recuperados de vagina o útero de animales control no presentaron fluorescencia, los espermatozoides recuperados de hembras inmunizadas mostraron marcación fluorescente (**Figura 50**). Mientras que los espermatozoides vaginales presentaban fluorescencia restringida a la región acrosomal de la cabeza, los espermatozoides uterinos mostraban una marcación difusa en toda la cabeza. El número de espermatozoides recuperados del oviducto fue demasiado pequeño como para realizar experimentos de inmunofluorescencia.

En el caso de los machos, no se observó marcación fluorescente ni en las muestras provenientes de animales inmunizados ni en aquellas provenientes de animales control. Dado que existía la posibilidad de que la asociación de los anticuerpos al espermatozoide no fuera detectada por inmunofluorescencia, pero estuviera afectando el funcionamiento del espermatozoide, el paso siguiente consistió en evaluar diferentes aspectos funcionales del espermatozoide en muestras provenientes de animales inmunizados y control.

Efectos de la inmunización sobre el funcionamiento de los espermatozoides

a) Viabilidad y motilidad

En primer lugar se determinó el efecto de la inmunización sobre la viabilidad y la motilidad de los espermatozoides. Los resultados indicaron que espermatozoides recuperados de las distintas regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) de animales inmunizados presentaron valores no

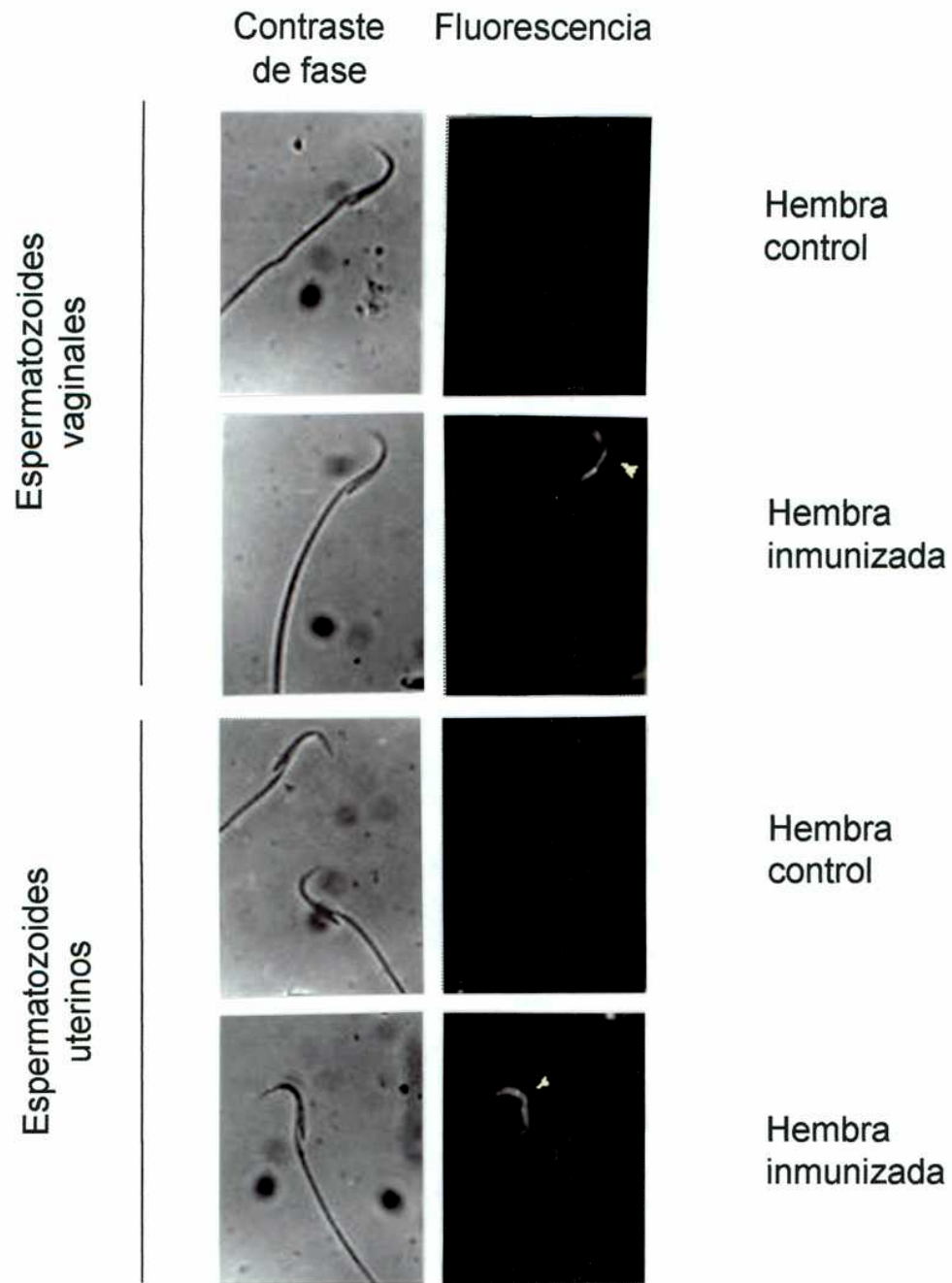


Figura 50: Asociación de los anticuerpos a los espermatozoides presentes en el tracto femenino. Espermatozoides recuperados de la vagina o del útero de hembras controles o inmunizadas fueron fijados y sometidos a inmunofluorescencia directa utilizando un anticuerpo anti-IgG de rata acoplado a FITC. Las flechas señalan la fluorescencia sobre la cabeza del espermatozoide. Aumento: 1464 X.

significativamente diferentes de aquellos correspondientes a animales control, obteniéndose en todos los casos valores superiores a 50% (**Figura 51**).

b) Efectos sobre la capacitación

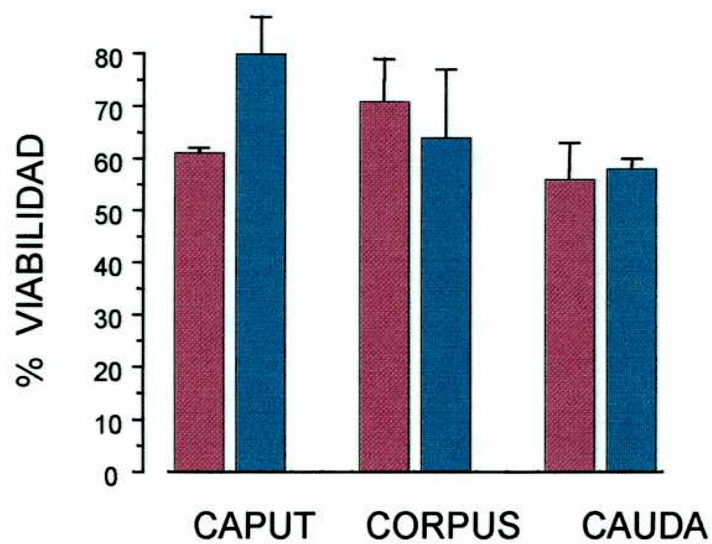
Alternativamente, la inhibición de la fertilidad podría deberse a la alteración de la capacidad de los espermatozoides para capacitarse y sufrir la reacción acrosomal. Una manera indirecta de verificar la ocurrencia de la capacitación en espermatozoides de rata, es medir el porcentaje de espermatozoides que, incubados en un medio capacitante, presentan redistribución de la proteína DE desde la región acrosomal al segmento ecuatorial ya que, dicha migración, ocurre concomitantemente con la ocurrencia de la RA (140).

De este modo, espermatozoides obtenidos de animales control e inmunizados fueron capacitados y sometidos a la técnica de IFI, analizándose el porcentaje de células que presentaban migración de la proteína DE. Los resultados se muestran en la **Figura 52** e indican la ausencia de diferencias significativas entre el grupo inmune y el control.

c) Capacidad fertilizante de los espermatozoides in vitro

Habiendo descartado cualquier efecto de la inmunización sobre la viabilidad, motilidad y capacidad de sufrir capacitación y RA y, teniendo en cuenta que DE participa en el proceso de fusión entre las gametas, el paso siguiente consistió en estudiar la capacidad fusogénica de espermatozoides recuperados de animales control o inmunizados.

Para ello, ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con espermatozoides capacitados obtenidos de epidídimos de ratas inmunizadas y control. Dado que el proceso de fusión comprende dos etapas: a) la unión de las membranas del espermatozoide y ovocito, y b) la fusión propiamente dicha de las membranas, se determinó, luego de 30 min de coincubación, el porcentaje

A

■ Controles
■ Inmunizados

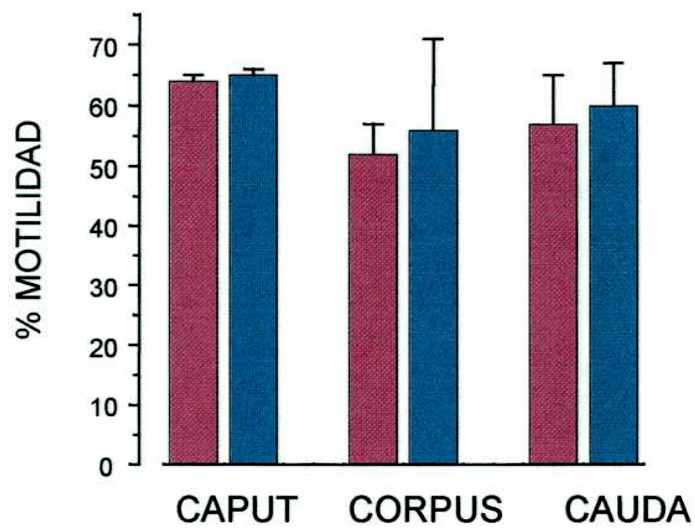
B

Figura 51: Viabilidad (A) y motilidad (B) de espermatozoides recuperados del epidídimo de animales controles e inmunizados.

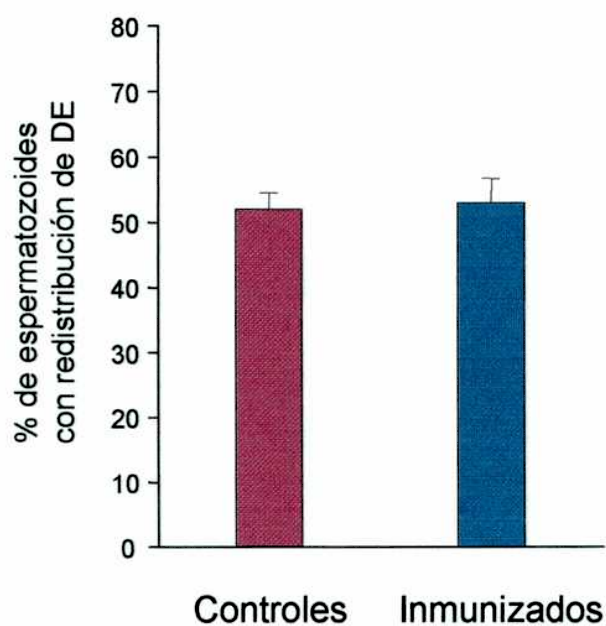


Figura 52: Efecto de la inmunización sobre la capacitación de los espermatozoides. Espermatozoides obtenidos de animales inmunizados o controles fueron incubados durante 4 hs en condiciones capacitantes *in vitro*, y luego fijados y sometidos a IFI utilizando el anticuerpo anti-DE, determinándose el porcentaje de espermatozoides con redistribución de DE al segmento ecuatorial.

de ovocitos con espermatozoides unidos, y el número de espermatozoides unidos por ovocito.

Los resultados indicaron la ausencia de diferencias significativas tanto en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos, como en el número de espermatozoides unidos por ovocito, entre animales inmunes y control (**Figura 53**).

Sin embargo, al analizar el porcentaje de ovocitos fertilizados luego de coincubar las gametas durante tres hs, se pudo observar que los espermatozoides provenientes de machos inmunes presentaban una capacidad fertilizante significativamente menor a la de los espermatozoides provenientes de machos control (**Figura 53**).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la reducción de la fertilidad luego de la inmunización de ratas macho y hembra con la proteína DE, no se debería a un efecto deletéreo sobre los órganos reproductivos, sino que involucraría la entrada de anticuerpos anti-DE al tracto reproductivo y la interferencia de los mismos con la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

La inhibición de la fertilidad en animales inmunizados con DE a través de un mecanismo específico, indica la relevancia de dicha proteína para la fertilidad de los animales, y apoyan su potencial uso para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad.

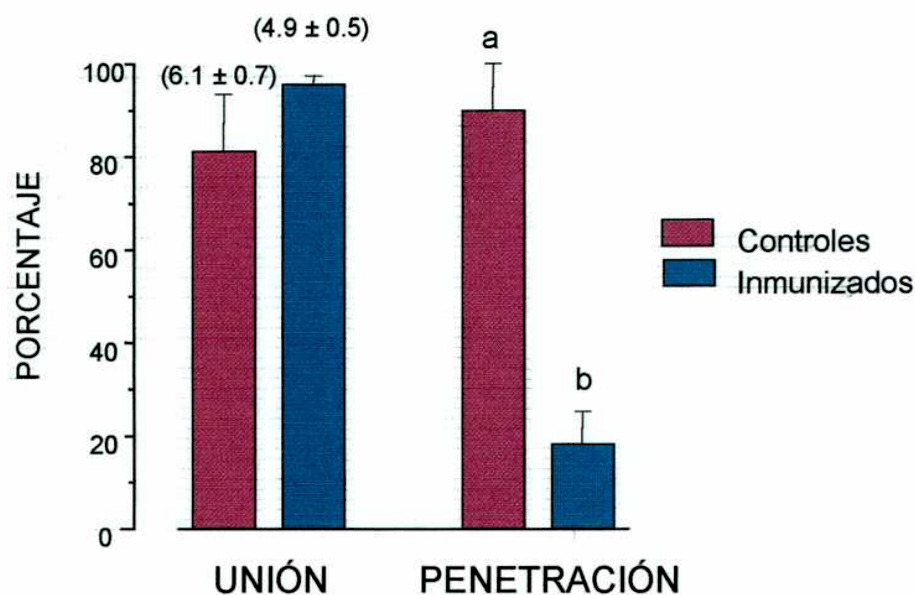


Figura 53: Efecto de la inmunización sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Ovocitos de rata sin ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados provenientes de animales control o inmunizados. Luego de 30 min de coincubación, se determinó el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos (indicado por las barras) y el número de espermatozoides unidos por ovocito (indicado entre paréntesis). Al cabo de 3 hs de coincubación, se determinó el porcentaje de ovocitos penetrados. Las barras representan el promedio $\pm$ el error estándar de tres experimentos realizados con animales diferentes.

a vs b: $p < 0.05$

Capítulo 2: Inmunización de ratas con proteína DE recombinante

El desarrollo de un método inmunológico de control de la fertilidad, requiere que el antígeno pueda ser expresado en forma recombinante, dado que difícilmente la formulación final pueda ser obtenida a partir de fuentes naturales.

Considerando que la proteína DE recombinante había sido expresada y purificada, a continuación se utilizó dicha proteína para inmunizar animales con el fin de evaluar si la misma era capaz de producir una respuesta inmune y una disminución de la fertilidad, al igual que la proteína nativa.

Inmunogenicidad de recDE

Previo a la realización de estos estudios en un número elevado de animales, se realizó una prueba piloto en un grupo reducido, con el fin de examinar la inmunogenicidad de la proteína recombinante. Dado que la misma se encontraba fusionada a la MBP, la inmunización podía realizarse tanto con la proteína de fusión como con la proteína DE previamente separada de la MBP. En este sentido, el empleo de la proteína acoplada a MBP presenta la ventaja de una obtención sencilla (un único paso de cromatografía de afinidad) y una inmunogenicidad potencialmente mayor, debido a su mayor tamaño y a la presencia de epitopes foráneos. La desventaja de la utilización de esta proteína de fusión es la generación de anticuerpos anti-MBP, que podrían provocar una reacción cruzada con otras proteínas endógenas. Asimismo, la porción correspondiente a MBP podría contener epitopes inmunodominantes que concentren la mayor parte de la producción de anticuerpos, disminuyendo la respuesta específica contra DE. La opción de utilizar la proteína DE separada de MBP, si bien permitiría obtener una respuesta específica contra DE, implicaría un paso de escisión de ambas proteínas mediante el tratamiento con una proteasa específica, seguido de un paso de purificación.

Considerando que ambas posibilidades presentan ventajas y desventajas, se decidió comenzar los estudios utilizando la opción más sencilla, es decir la proteína fusionada a MBP. Como control de posibles efectos debidos a los anticuerpos anti-MBP, un grupo de animales fue inmunizado con esta proteína.

Para poder comparar la respuesta inmune producida contra la proteína nativa con aquella producida contra la proteína recombinante, era necesario que cada grupo fuera inmunizado con la misma masa de proteína DE. En el ensayo inicial de inmunización con la proteína nativa, se utilizaron cantidades de 50 o 100 μg de proteína, encontrándose una reducción de la fertilidad con ambas dosis, siendo mayor la inhibición en el grupo inmunizado con 100 μg (144). En la prueba piloto se utilizaron dosis de 50 y 100 μg de proteína nativa, y el equivalente de proteína recombinante. Considerando que la secuencia correspondiente a DE constituye el 37.3 % de la proteína de fusión (25 kDa de un total de 67kDa), las cantidades de proteína recombinante necesarias para obtener 50 μg y 100 μg de la porción correspondiente a DE son 134 μg y 268 μg , respectivamente. Las cantidades utilizadas para los animales inmunizados con MBP, provienen de restar la masa de DE presente en las dos dosis de proteína recombinante. De esta manera, los animales inmunizados con MBP y con recDE, finalmente recibieron la misma masa de proteína MBP. La **Tabla 9** muestra la distribución de los animales en los distintos tratamientos.

Tabla 9: Distribución de los animales en los distintos grupos experimentales

Tratamiento	Dosis	Número de animales		
		Machos	Hembras	Total
Control	Sin proteína	2	4	
MBP	85 µg	1	2	
	163 µg	2	3	
nDE	50 µg	1	2	
	100 µg	2	3	
recDE	134 µg	2	3	
	(50 µg DE)	2	3	
	268 µg			
	(100 µg DE)			
		12	20	32

Los animales fueron inmunizados tres veces a intervalos de tres semanas, y sangrados aproximadamente una semana después de cada inyección para determinar los niveles de anticuerpos circulantes. En la **Figura 54** se muestra el esquema de inmunización y sangrado, así como los niveles de anticuerpos correspondientes a cada grupo medidos por ELISA, contra la proteína DE nativa.

Los resultados indicaron que la inmunización con recDE produjo anticuerpos anti-DE tanto en machos como en hembras. Más aún, la respuesta fue mayor en los animales inmunizados con recDE que en aquellos inmunizados con la proteína DE nativa. La respuesta producida en animales inmunizados con 134 µg o 268 µg de proteína recombinante no resultó significativamente diferente. Mediante un ELISA contra MBP se comprobó la presencia de una fuerte respuesta contra esta proteína en los animales inmunizados con MBP (datos no mostrados), en tanto que dichos animales no mostraron respuesta contra la

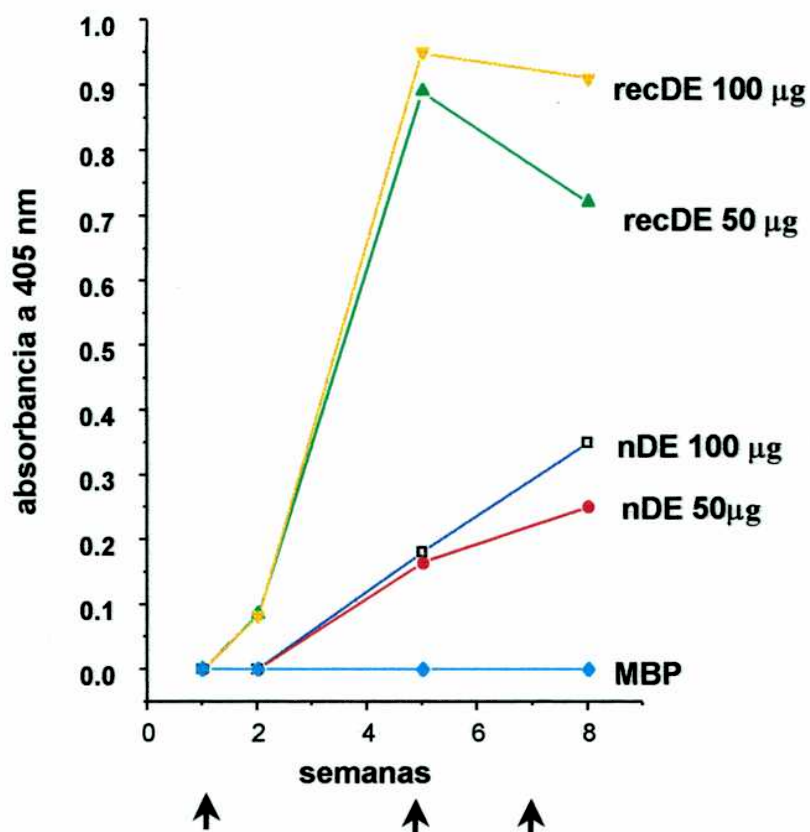


Figura 54: Esquema de inmunización, y respuesta inmune de cada grupo experimental. Las flechas indican el momento de cada inmunización. El título sérico de anticuerpos anti-DE se midió por ELISA contra la proteína DE nativa. Las curvas representan el promedio de absorbancia para cada grupo.

proteína DE, sugiriendo que los anticuerpos anti-MBP formados no reaccionarían en forma cruzada con la proteína DE, al menos en ensayos de ELISA.

Estos resultados indicaron que la proteína recDE es inmunogénica en ambos sexos, y que los anticuerpos contra la misma son capaces de reconocer la molécula nativa.

Inhibición de la fertilidad luego de la inmunización con recDE

Con el fin de investigar si esta respuesta inmune era capaz de afectar la fertilidad de los animales, un número mayor de machos (n: 42) y hembras (n: 44) fue inyectado con recDE, utilizando DE nativa, MBP, y una solución sin proteína como control. Considerando que los resultados de la prueba piloto indicaron que la inmunización con 163 µg o 268 µg de recDE producía una respuesta similar, para este nuevo grupo de animales se utilizó la menor de ambas dosis (**Tabla 10**).

Tabla 10: Distribución de los animales en los distintos grupos experimentales

Grupo	Dosis	Número de animales		
		Machos	Hembras	Total
Control	(sin proteína)	6	6	12
MBP	85 µg	10	10	20
recDE	163 µg	18	16	34
DE	100 µg	8	12	20
		42	44	86

El esquema de inmunización y sangrados se muestran en la **Figura 55**.

1) Evolución de la respuesta inmune

Con el fin de examinar la cinética de la respuesta inmune, se obtuvieron sueros de todos los animales inmunizados durante un período de 8 meses, los cuales fueron utilizados como primer anticuerpo en ELISA contra la proteína nativa (de esta manera se miden los anticuerpos producidos contra DE, excluyendo los anticuerpos contra MBP).

Los resultados, mostrados en la **Figura 55**, indican que los niveles de anticuerpos anti-DE se incrementaron en función del tiempo, alcanzando valores significativamente mayores que los correspondientes a los sueros controles o preinmunes. Luego de la tercera inyección, se alcanzaron los valores de absorbancia más altos, los cuales luego declinaron debido a la ausencia de una dosis de refuerzo. Después de una cuarta inmunización, los niveles de anticuerpos subieron nuevamente, y comenzaron a disminuir luego de la última inmunización (quinta).

2) Fertilidad de los animales

Con el fin de evaluar el efecto de la inmunización con recDE sobre la fertilidad de los animales, machos y hembras fueron apareados dos veces: el primer apareo (M1) se llevó a cabo dos semanas después de la tercera inyección, y el segundo (M2), dos semanas después de la cuarta inyección (ver **Figura 55**). Dado que previamente se había observado una asociación entre los niveles séricos de anticuerpos anti-DE y la reducción de la fertilidad, para evaluar el efecto sobre la fertilidad se utilizaron aquellos animales que presentaban los mayores títulos.

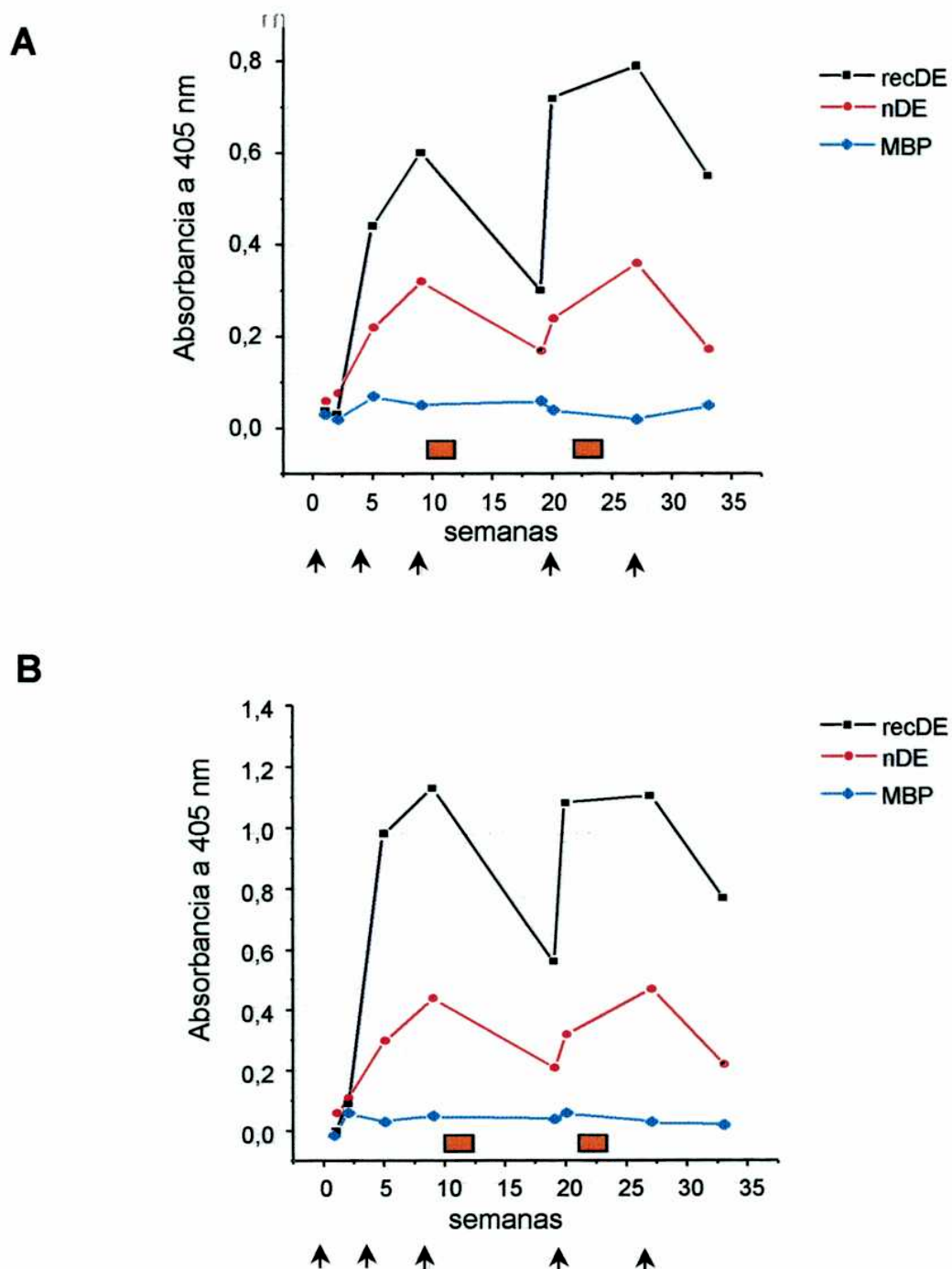


Figura 55: Esquema de inmunización y respuesta inmune en machos **(A)** y hembras **(B)**. Las flechas indican el momento de cada inmunización, y los rectángulos naranjas los momentos en que se evaluó la fertilidad. El título sérico de anticuerpos anti-DE se midió por ELISA contra la proteína DE nativa. Las curvas representan el promedio de absorbancia para cada grupo.

Los resultados correspondientes al primer apareo mostraron una disminución de la fertilidad tanto en machos como en hembras inmunizados con la proteína DE nativa. No obstante, esta disminución no fue estadísticamente significativa. Por su parte, no se observó una disminución de la fertilidad en el grupo inmunizado con recDE. Los resultados correspondientes al segundo apareo, sin embargo, mostraron una inhibición significativa de la fertilidad tanto en machos como en hembras inmunizados con la proteína recombinante o nativa respecto a los animales inmunizados con MBP (**Tabla 11**).

Tabla 11: Fertilidad de ratas macho y hembra inmunizadas con MBP, DE nativa o DE recombinante.

Grupo	Machos			Hembras		
	n	fertilidad %	inhibición %	n	fertilidad %	inhibición %
MBP	4	75		10	90	
recDE	6	33 ^a	56	10	60 ^b	33
DE	3	28 ^a	63	4	50 ^b	45

^ap<0,05 vs. MBP

^bp<0,05 vs. MBP

Los animales inmunizados con recDE presentaron una reducción de la fertilidad similar a los animales inmunizados con la proteína DE nativa, a pesar de tener títulos de anticuerpos anti-DE significativamente mayores.

La inhibición producida por la proteína nativa, en este caso, no fue muy diferente a la observada luego de la inmunización descrita en el Capítulo 1 (machos: 40% de inhibición, hembras: 52% de inhibición).

3) Especificidad de la respuesta inmune.

Para estudiar si los anticuerpos producidos eran específicos para la proteína DE, se utilizó el suero de animales inmunizados con recDE o con MBP como primer anticuerpo en ensayos de Western blot. Los resultados indicaron que los sueros de los machos y hembras inmunizados con recDE (**Figura 56A, 57A**), pero no aquellos provenientes de animales inmunizados con MBP (**Figura 56B, 57B**), fueron capaces de reconocer específicamente tanto a la proteína DE purificada, como a la proteína DE nativa presente en el citosol epididimario y en extractos de espermatozoides. Así mismo, estos sueros dieron una reacción negativa sobre una serie de tejidos esenciales (hígado, corazón, cerebro, riñón, pulmón) y reproductivos (testículo, vesícula seminal, próstata, ovario y útero) (**Figura 56A, 57A**).

La capacidad de los sueros anti-recDE de reconocer a la proteína DE nativa también fue evaluada mediante IFI de espermatozoides y de cortes de epidídimo. Los resultados indicaron que las secciones de epidídimo incubadas con suero anti-recDE presentaron una intensa marca fluorescente en la región apical de las células principales, así como también en los espermatozoides presentes en el lumen. Por su parte, los resultados de IFI sobre espermatozoides indicaron que, al igual que el anticuerpo contra DE nativa obtenido en conejo, los sueros anti-recDE fueron capaces de reconocer a la proteína ubicada en la región dorsal de espermatozoides frescos, así como a la proteína en el segmento ecuatorial de espermatozoides capacitados (no mostrado).

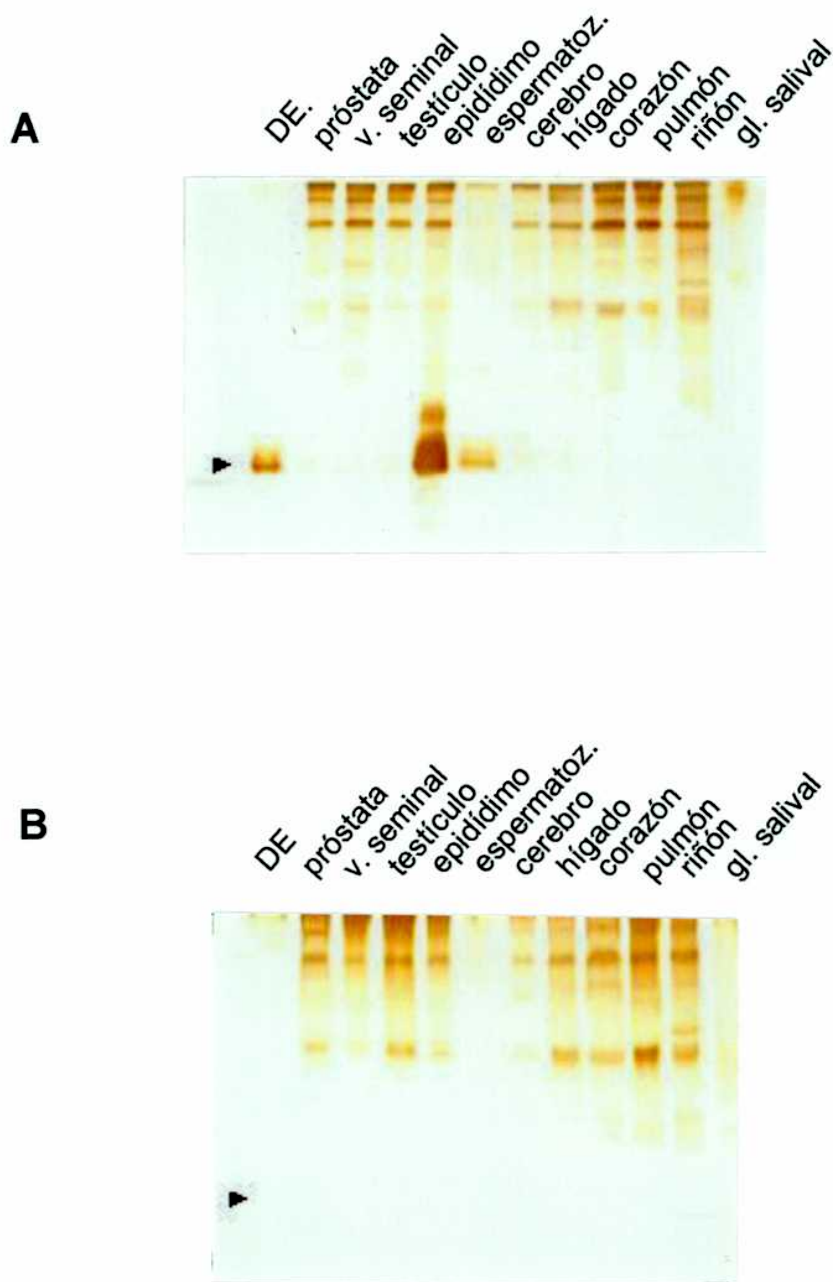


Figura 56: Especificidad de la respuesta inmune.

Proteínas de extractos de diferentes tejidos fueron separadas por SDS-PAGE y luego transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas por Western blot utilizando suero de un macho inmunizado con recDE (**A**) o con MBP (**B**) como primer anticuerpo. La flecha indica la posición de DE.

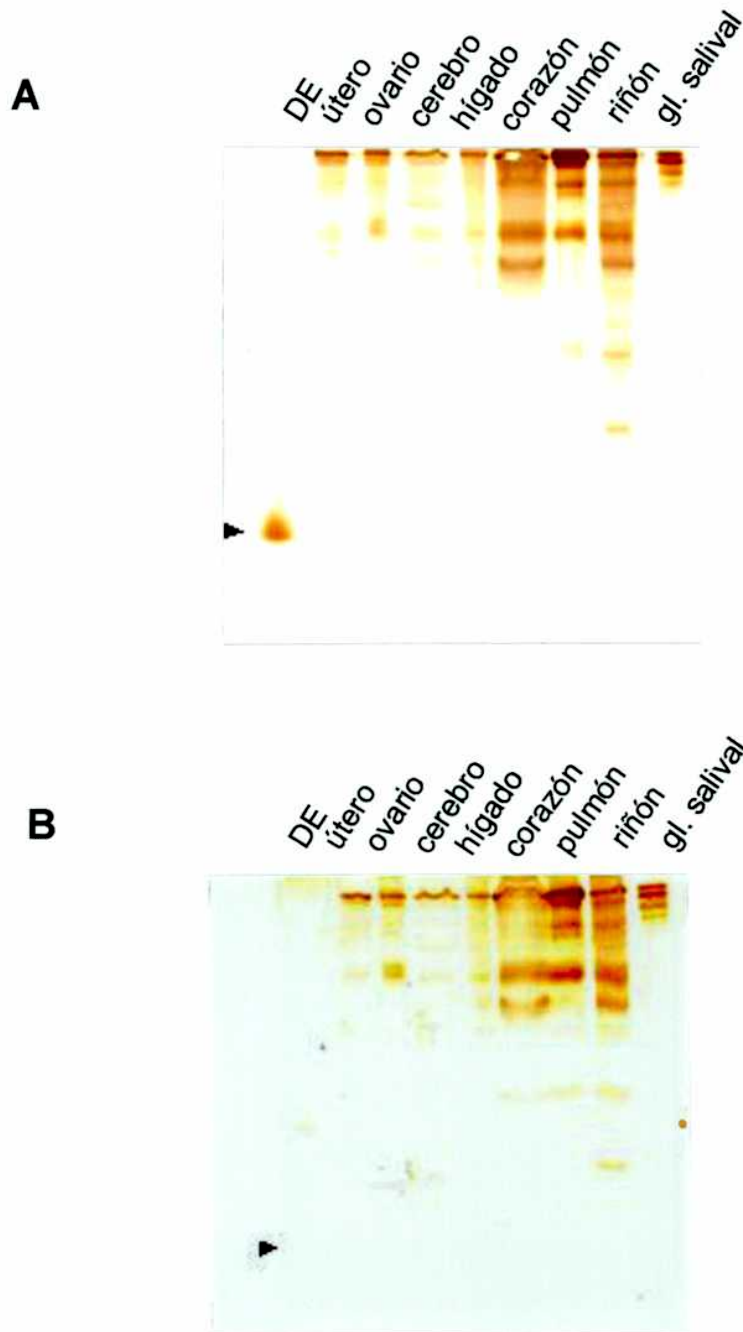


Figura 57: Especificidad de la respuesta inmune.

Proteínas de extractos de diferentes tejidos fueron separadas por SDS-PAGE y luego transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas por Western blot utilizando suero de una hembra inmunizada con recDE (**A**) o con MBP (**B**), como primer anticuerpo. La flecha indica la posición de DE.

4) Análisis histológico

Con el fin de excluir la posibilidad de que la reducción en la fertilidad observada en los machos fuera debida a un efecto deletéreo sobre los órganos reproductivos, se extrajeron testículos, epidídimos, y vasos deferentes de animales inmunizados con recDE o MBP, para su posterior examen histológico.

Los resultados obtenidos indicaron la ausencia de diferencias en los tejidos provenientes de ambos grupos de animales, observándose túbulos seminíferos con un diámetro normal, abundantes células espermatogénicas, y la ausencia de signos de infiltración en las secciones testiculares. Por su parte, los túbulos epididimarios de las sucesivas regiones del órgano no mostraban evidencias de infiltración leucocitaria, y contenían espermatozoides en el lumen (**Figura 58**).

En conjunto, estos resultados indicarían que al igual que la proteína nativa, recDE es capaz de producir una respuesta inmune contra la proteína DE, y una inhibición significativa de la fertilidad en ambos sexos.

La relevancia de DE para la fertilidad de los animales, y la capacidad de la proteína recombinante de inducir una respuesta inmune y una reducción de la fertilidad en animales inmunizados, apoyan la posible utilización de esta proteína para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad. Sin embargo, para una potencial aplicación en el humano es necesario previamente realizar ensayos de inmunización en un modelo de primates no humanos.

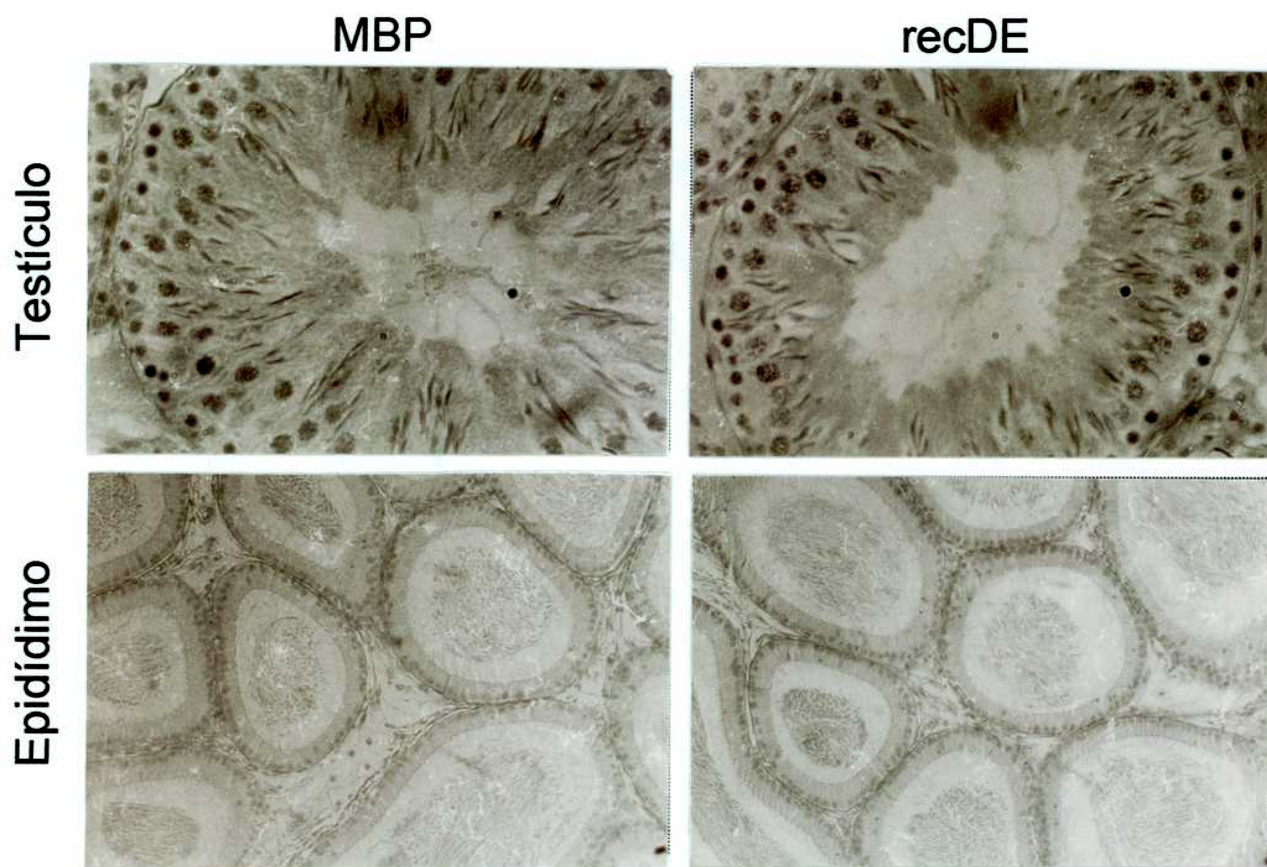


Figura 58: Microfotografías de cortes teñidos con hematoxilina-eosina de los órganos indicados, recuperados de animales inmunizados con MBP o recDE. Aumentos: Testículo: 590 X; epidídimo: 215 X.

Capítulo 3: Capacidad inmunogénica de la proteína ARP en primates no humanos

Tal como se describiera en la Introducción, en nuestro laboratorio se ha comenzado a estudiar la participación de la proteína ARP en el proceso de fertilización. Si bien la existencia de una población de la proteína fuertemente unida al espermatozoide y la capacidad de los anticuerpos anti-ARP de inhibir la penetración de ovocitos de hámster sin ZP por espermatozoides humanos sugerían la participación de ARP en la fusión espermatozoide-ovocito, restaba determinar la existencia de sitios complementarios para dicha proteína sobre el ovocito humano.

Participación de ARP en el proceso de fertilización: Presencia de sitios complementarios para ARP sobre el ovocito humano

Con el fin de estudiar la presencia de sitios complementarios para ARP sobre la superficie de ovocitos humanos, se expresó y purificó la proteína ARP recombinante a partir del plásmido (pMAL-ARP) enviado por el grupo del Dr. Kasahara (**Figura 59**). Los ovocitos humanos utilizados fueron aquellos descartados en protocolos de fertilización *in vitro* (FIV), realizados en el Instituto de Fertilidad (IFER).

Los ovocitos humanos fueron tratados con solución de Tyrod ácida para la remoción de la ZP, incubados con ARP recombinante, fijados y luego sometidos a IFI utilizando anti-MBP o anti-ARP como primer anticuerpo. Como control, se utilizaron ovocitos sin ZP incubados en diferentes condiciones: a) ovocitos incubados con MBP y anti-MBP como primer anticuerpo, b) ovocitos incubados en medio solo, utilizando anti-MBP o anti-ARP como anticuerpo primario, y c) ovocitos incubados con la proteína DE, y posteriormente con el anticuerpo anti-DE. Sobre un total de 95 ovocitos analizados, 34

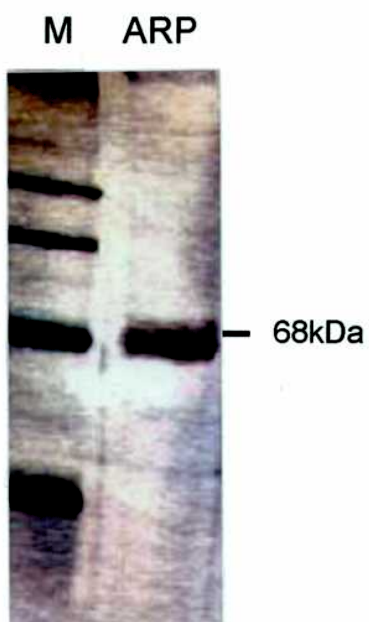
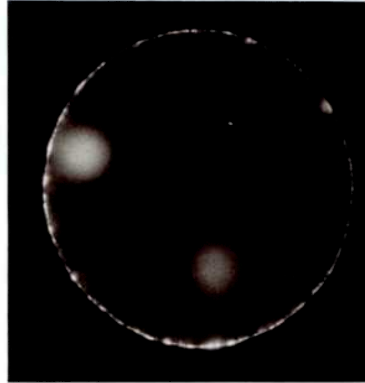


Figura 59: Tinción con nitrato de plata de la proteína ARP recombinante luego de su purificación mediante una columna de afinidad.

correspondieron a ovocitos que no progresaron a la etapa de dos pronúcleos luego de la FIV, o de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), en tanto que 61 correspondieron a ovocitos no expuestos a espermatozoides. Los resultados mostraron que todos los ovocitos incubados con ARP, tanto utilizando anti-MBP como anti-ARP como primer anticuerpo, presentaron marcación fluorescente (**Figura 60**). Dicha marcación no fue uniforme y continua, sino que se presentó pequeños puntos homogéneamente distribuidos sobre toda la superficie del ovocito. El mismo patrón de fluorescencia se observó en ovocitos no expuestos a espermatozoides y en aquellos ovocitos descartados luego de los procedimientos de FIV o ICSI. Por el contrario, los ovocitos incubados con MBP o bien mostraron la ausencia de marcación fluorescente, o bien presentaron ocasionalmente pequeñas áreas de fluorescencia de baja intensidad (**Figura 60**). Por su parte, los ovocitos incubados con medio solo, seguido de anti-ARP o anti-MBP, y los ovocitos incubados con DE y anti-DE, resultaron completamente negativos.

La existencia de sitios complementarios para ARP sobre el oolema humano apoya fuertemente la participación de esta proteína en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito en el humano, abriendo la posibilidad de utilizar esta proteína para el desarrollo de un método inmunológico de control de la fertilidad en el humano. Sin embargo, antes de cualquier estudio de inmunización en el humano es imprescindible realizar pruebas en primates no humanos. Con el fin de realizar ensayos de inmunización con ARP en monos, nuestro laboratorio estableció una colaboración con los Drs. Myles y Primakoff (Universidad de California, Davis, EE.UU.) utilizando las facilidades del "California Regional Primate Center", donde la especie mayoritaria es *Macaca fascicularis*. Al mismo tiempo, fue publicado el clonado y caracterización de la proteína homóloga a ARP en macacos (*Macaca mullata*) (174). Dicha proteína presenta un 84% de identidad con la proteína humana. Dada la alta homología entre la proteína del género *Macaca* y la proteína ARP humana, y el hecho de

ARP



MBP



Figura 60: Unión de la proteína ARP a ovocitos humanos. Ovocitos humanos sin ZP fueron incubados con 6 μ M de ARP o MBP y luego fijados y sometidos a IFI utilizando anti-MBP como primer anticuerpo. Aumento: 590 X.

que en nuestro laboratorio ya se había expresado la proteína recombinante humana acoplada a MBP, resultaba conveniente utilizar esta proteína para inmunizar a los macacos. Para ello, primeramente era necesario comprobar que ambas proteínas estuvieran antigénicamente relacionadas, para que los anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante humana fueran capaces de reconocer a proteína nativa de *Macaca*.

Antigenicidad común de las proteínas ARP humana y de macaco

Con el fin de estudiar la presencia de epitopes comunes entre ambas proteínas, el centro de primates en California envió muestras de tejido testicular y epididimario de mono, así como espermatozoides de mono eyaculados fijados. Con estos espermatozoides se realizaron ensayos de IFI con el suero contra la proteína ARP humana recombinante (hARP). Tal como se observa en la **Figura 61**, mientras que la incubación de los espermatozoides con el suero de conejo normal produjo una reacción negativa, el suero anti-ARP reconoció la pieza media de la cola y la cabeza de los espermatozoides. Para determinar si esta marcación se debía al reconocimiento específico de la proteína ARP de macaco, se realizaron experimentos de Western blot con extractos de las muestras de testículo y de epidídimo de macaco. Mientras que el suero de conejo normal dio una reacción negativa, el suero inmune fue capaz de reconocer una banda tanto en el extracto epididimario humano como en el de mono (**Figura 62**). La expresión epididimaria de la proteína detectada, junto con su peso molecular (≈ 28 kDa) similar al de la proteína ARP humana (30 kDa), indicaron que el anticuerpo es capaz de reconocer la proteína homóloga a ARP en *M. fascicularis* (mARP). Estos resultados confirmarían que ambas proteínas presentan epitopes comunes, por lo que la inmunización de macacos con la proteína humana debería producir anticuerpos capaces de reconocer a la

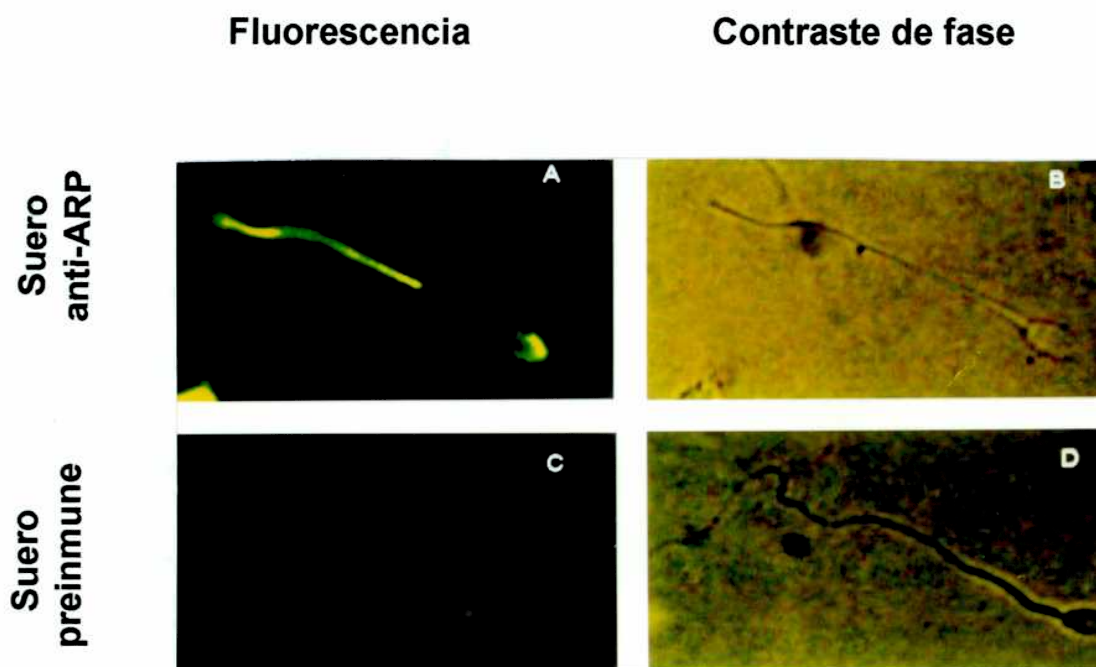


Figura 61: Inmunolocalización de espermatozoides de *Macaca fascicularis* con suero contra la proteína ARP humana. Espermatozoides eyaculados fijados de mono fueron sometidos a IFI utilizando el suero contra la proteína ARP humana (A,B) o el suero preimmune (C,D) como primer anticuerpo, y un segundo anticuerpo acoplado a FITC. Los espermatozoides fueron observados por microscopía de fluorescencia (A,C) o de contraste de fase (B,D). Aumento: 2400 X.

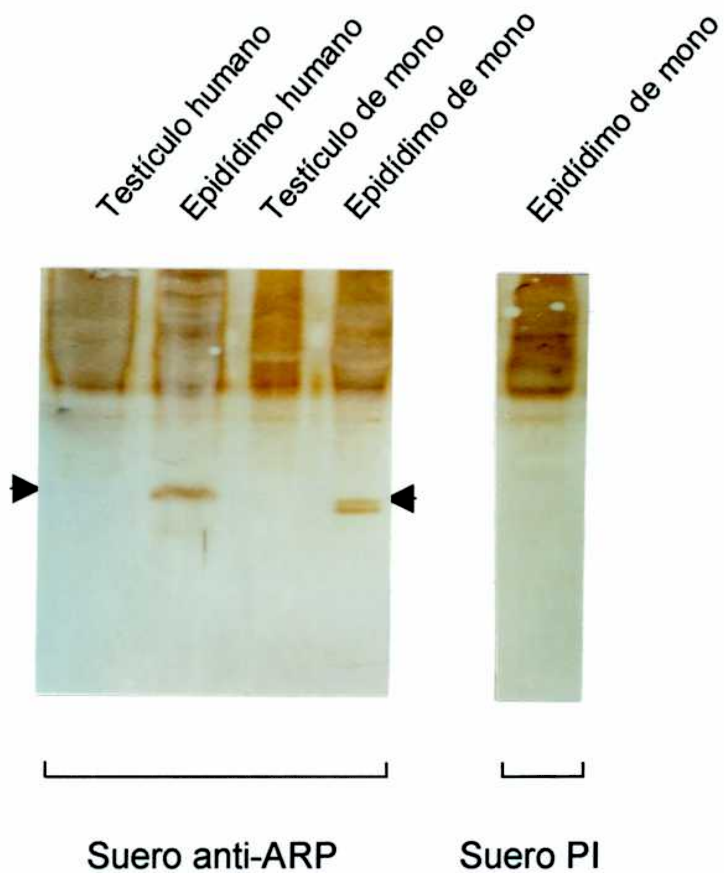


Figura 62: Especificidad del suero anti-hARP.

Las proteínas presentes en extractos testiculares o epididimarios, tanto humanos como de mono, fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a nitocelulosa. Las membranas fueron reveladas por Western blot utilizando el suero anti-ARP, o el suero preinmune (PI) como control. Las flechas señalan la posición de la proteína epididimaria ARP humana y de macaco.

proteína homóloga nativa. El paso siguiente consistió entonces, en la inmunización de monos con la proteína ARP humana.

Inmunogenicidad de ARP en macacos

Estos estudios se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Jim Overstreet, de la Universidad de California, Davis, y tuvieron como objetivo estudiar la capacidad inmunogénica de la proteína ARP en este modelo animal. Dado que el laboratorio estadounidense había expresado recientemente la proteína ARP de *M. fascicularis*, la misma fue incluida como otro antígeno, y utilizada en paralelo con la proteína recombinante humana fusionada a MBP. Se inmunizaron dos hembras y dos machos con la proteína ARP humana recombinante, y como control se inyectó una hembra y un macho con la proteína MBP. La proteína de macaco recombinante por su parte, fue inyectada en dos hembras, ya que el grupo del Dr. Overstreet se interesa especialmente en la anticoncepción femenina. La **Tabla 12** indica la distribución y sexo de los animales inmunizados.

Tabla 12: Distribución de los animales en los distintos grupos de inmunización.

Antígeno	Sexo	n
hARP	M	2
hARP	F	2
mARP	F	2
MBP	M	1
MBP	F	1

n: número de animales

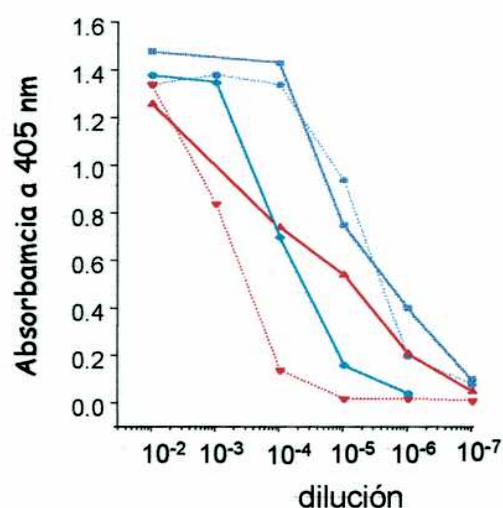
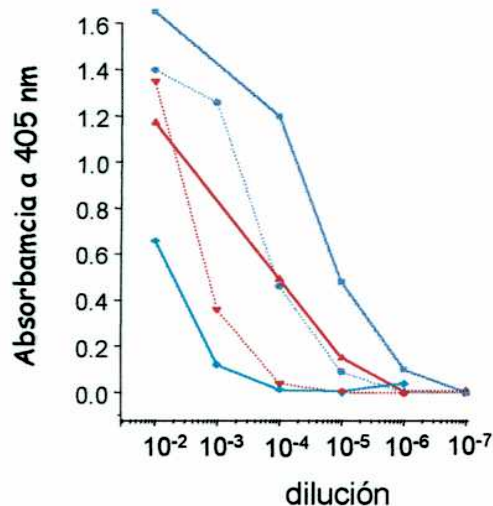
Todos los animales recibieron cuatro dosis de 200 µg del correspondiente antígeno en 1 ml del adyuvante Montanide, a intervalos de 25 días. Cada animal fue sangrado antes de la primera inmunización, y 14 días luego de cada inmunización.

En primer lugar, y con el fin de caracterizar la respuesta inmune, se realizó un ELISA utilizando diluciones seriadas de los sueros como primer anticuerpo.

Los animales inmunizados con la proteína ARP humana deberían desarrollar anticuerpos específicos contra ambos componentes de la proteína de fusión: ARP y MBP. La respuesta inmune total se midió acoplado a la placa la proteína hARP recombinante. Los anticuerpos específicos contra MBP fueron medidos mediante un ELISA contra dicha proteína. Considerando que es importante poder determinar específicamente los anticuerpos contra ARP del total de anticuerpos producidos, y no contando con la proteína libre de MBP, era importante desarrollar un método que permitiera medir los anticuerpos específicos contra ARP. Para ello, se utilizó un ELISA contra la proteína hARP recombinante, en el que los sueros fueron diluidos en presencia de un exceso (100 veces la cantidad acoplada a la placa) de proteína MBP soluble, para capturar los anticuerpos dirigidos contra esta proteína. Con el fin de controlar que la captura fuera completa, los sueros así diluidos fueron utilizados en un ELISA contra MBP. Los resultados obtenidos para el último sangrado de los cuatro animales inmunizados con hARP se muestran en la **Figura 63**, e indican que el método de competencia con la proteína MBP soluble es eficiente para capturar los anticuerpos anti-MBP a partir de la dilución $1:10^4$ - $1:10^5$.

Utilizando este sistema, en primer lugar se midió el título contra hARP recombinante en los distintos sangrados de los animales inmunizados contra dicha proteína, con el fin de caracterizar la evolución de la respuesta inmune. Los resultados mostrados en la **Tabla 13** indican que mientras no se detectaron anticuerpos anti-ARP en los sueros preinmunes, luego de la

Hembras



antígeno acoplado antígeno soluble

—●— hARP
 - - -●- hARP + MBP
 —▲— MBP
 - - -▲- MBP + MBP
 —●— mARP

Machos

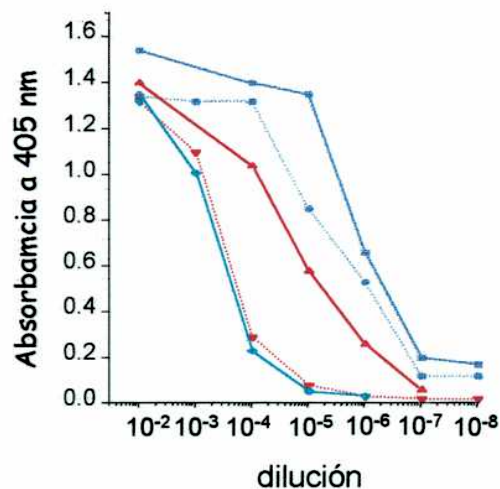
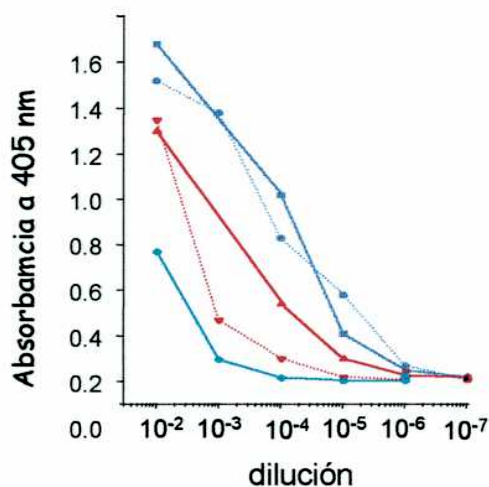


Figura 63: Curvas de dilución para el último sangrado de los animales inmunizados con hARP. Las distintas diluciones fueron utilizadas como primer anticuerpo en ensayos de ELISA contra la proteína hARP, MBP o mARP. Los sueros diluidos en presencia de un exceso de MBP soluble fueron utilizados contra hARP (hARP + MBP) para medir los anticuerpos específicos contra la porción correspondiente a ARP de la proteína de fusión, o contra MBP (MBP + MBP), para controlar la captura completa de los anticuerpos anti-MBP.

primera inmunización ya se detectó la presencia de anticuerpos específicos en dos de los cuatro animales, aunque en títulos bajos (10^2). Estos títulos se incrementaron en el segundo sangrado (S2), en tanto que comenzaron a detectarse anticuerpos en el resto de los animales. Los títulos continuaron creciendo luego de las sucesivas inmunizaciones, alcanzando su máximo valor después de la cuarta inyección.

Tabla 13 Evolución de la respuesta inmune en los animales inmunizados contra hARP.

Sexo	Antígeno	Título contra hARP				
		PI	S1	S2	S3	S4
F	hARP	nd	10^2	10^5	10^5	10^6
F	hARP	nd	nd	10^3	10^4	10^4
M	hARP	nd	nd	10^5	10^5	10^6
M	hARP	nd	10^2	10^3	10^4	10^5

Los sueros fueron diluidos al décimo en forma seriada a partir de una dilución inicial 1:100 (en presencia de un exceso de MBP soluble para capturar los anticuerpos contra esta proteína), e incubados en placas de ELISA acopladas con hARP. El título fue calculado como la inversa de la última dilución con resultado positivo. Se consideraron positivos aquellos valores mayores al promedio obtenido para sueros preinmunes a la misma dilución, más tres desvíos estándar. PI: preinmune, S1: primer sangrado. "nd": no detectable.

En cuanto a los animales inmunizados con la proteína mARP, la titulación de los sueros se realizó mediante un ELISA contra la proteína utilizada como antígeno (mARP recombinante). En la **Figura 64** se ilustran las absorbancias obtenidas para las diluciones seriadas de los sueros correspondientes al último sangrado (S4).

La cinética de la respuesta inmune en estos animales se indica en la **Tabla 14**.

Tabla 14 Evolución temporal de la respuesta inmune en los animales inmunizados contra mARP

Sexo	Título contra mARP				
	PI	S1	S2	S3	S4
F	nd	nd	10^3	10^3	10^4
F	nd	10^2	10^3	10^4	10^4

Los sueros fueron diluidos al décimo en forma seriada a partir de una dilución inicial 1:100 e incubados en placas de ELISA acopladas con mARP. Se tomó como título a la inversa de la última dilución con resultado positivo. Se consideró positivos a aquellos valores mayores al promedio obtenido para sueros preinmunes a la misma dilución más tres desvíos estándar. PI: preinmune, S1: primer sangrado. "nd ": no detectable.

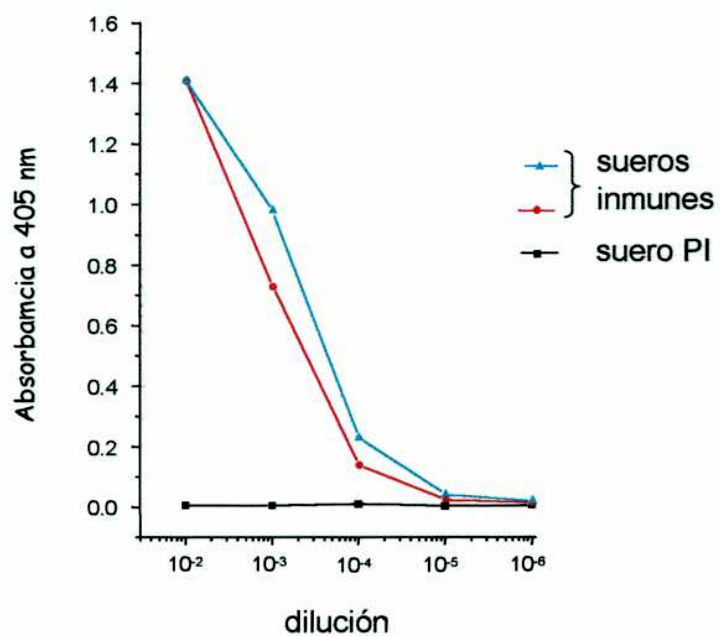


Figura 64: Curvas de dilución para los sueros correspondientes al último sangrado de los animales inmunizados con mARP. Los sueros fueron diluidos al décimo en forma seriada, y utilizados como primer anticuerpo en ELISA contra la proteína mARP.

Al igual que con los animales inmunizados con hARP, los anticuerpos comienzan a ser detectados luego de la primera inmunización, continúan incrementándose después de la inyección de una nueva dosis del antígeno, y alcanzan su nivel máximo luego de la última inmunización.

Por otro lado, con el fin de examinar la capacidad de los anticuerpos anti-hARP de reaccionar contra la proteína de mono, se determinaron los títulos contra la proteína recombinante de macaco (mARP)(Figura 63). Los resultados presentados en la **Tabla 15** indicaron que los anticuerpos dirigidos contra la proteína humana son capaces de reconocer a la proteína de macaco, aunque con menor eficiencia, a juzgar por el título entre 1 y 2 órdenes menor que el obtenido contra la proteína humana.

En cuanto a los animales control, inmunizados con MBP, se tituló por ELISA la respuesta contra este antígeno en el último sangrado, detectándose títulos elevados (10^6 - 10^7) (**Tabla 15**). Los títulos de anticuerpos anti-MBP presentes en el último sangrado de los animales inmunizados con hARP fueron determinados (**Figura 63**) con el fin de compararlos con los correspondientes a los animales inmunizados con MBP. Los resultados mostrados en la **Tabla 15** indican que ambos grupos presentaron títulos anti-MBP similares.

Los sueros de los animales inmunizados con MBP no reaccionaron con la proteína ARP recombinante de mono, indicando la ausencia de reacción cruzada con esta proteína.

Tabla 15. Títulos contra los distintos antígenos, correspondientes al último sangrado de todos los animales inmunizados.

Antígeno	sexo	Título		
		anti-MBP	anti-hARP	anti-mARP
hARP	F	10^6	10^6	10^5
	F	10^5	10^4	10^3
	M	10^6	10^6	10^4
	M	10^5	10^5	10^3
mARP	F	nd	10^3	10^4
	F	nd	10^4	10^4
MBP	F	10^7	NC	nd
	M	10^6	NC	nd

Los títulos fueron medidos por ELISA contra los respectivos antígenos. "nd": no detectable, "NC": no cuantificado.

Con el fin de estudiar la capacidad de los anticuerpos de reconocer a la proteína nativa, los mismos fueron utilizados en ensayos de Western blot contra extractos de espermatozoides de macaco. Los resultados presentados en la **Figura 65** indican que los sueros de los animales inmunizados tanto con hARP como con mARP fueron capaces de reconocer la proteína mARP nativa, a diferencia de un suero preinmune o el proveniente de un animal inmunizado con MBP.

Habiendo comprobado la existencia de anticuerpos anti-ARP en el suero de los animales inmunizados, a continuación se estudió la presencia de estos anticuerpos en el plasma seminal de los machos inyectados. Para ello, el plasma seminal de los dos machos inmunizados con hARP y el del macho inmunizado con MBP fueron utilizados como primer anticuerpo en un ensayo de ELISA contra MBP o mARP.

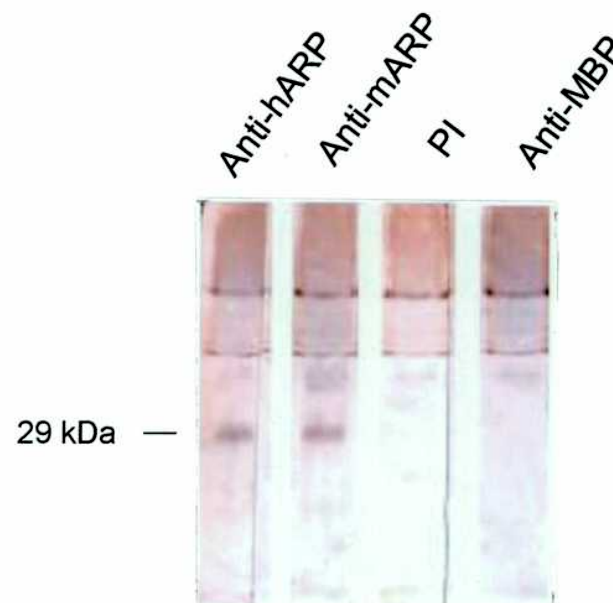


Figura 65: Capacidad de los sueros inmunes de reconocer a la proteína ARP nativa de mono. El suero correspondiente al cuarto sangrado de un animal inmunizado con mARP, MBP, hARP, o el suero preinmune del animal inmunizado con mARP, fue utilizado como primer anticuerpo en un ensayo de Western blot contra un extracto de SDS de espermatozoides de macaco.

Los resultados de la **Figura 66** indican que los anticuerpos anti-MBP fueron detectados, en distintos niveles, en los tres machos inmunizados. En cuanto a los anticuerpos anti-mARP, no se observó su presencia en el plasma seminal del macho inmunizado con MBP, y de los dos machos inmunizados con hARP, los anticuerpos sólo fueron detectados en el plasma seminal del que presentaba una mayor respuesta sérica. Estos resultados indican la presencia en el plasma seminal de anticuerpos específicos contra los antígenos administrados, y sugieren que la misma estaría relacionada con los niveles de anticuerpos circulantes en suero.

Con el fin de determinar el efecto de la inmunización sobre la cantidad y calidad de los espermatozoides, se analizó el eyaculado de dos de los machos inmunizados, antes y después de la inmunización. Los resultados presentados en la **Tabla 16** indican que los parámetros analizados, motilidad, morfología y número total de espermatozoides, no variaron significativamente luego de la inmunización.

Tabla 16: Efecto de la inmunización sobre las características de los espermatozoides eyaculados

Antígeno	Motilidad		Morfología		# esp/eyaculado	
	Pre-inm.	Post-inm	Pre-inm.	Post-inm	Pre-inm.	Post-inm
MBP	72 ± 8	70 ± 9	58% gc 20% fl	41% gc 17% fl	212 ± 34	243 ± 39
hARP	62 ± 18	73 ± 7	47% gc 50% fl	71% gc 27% fl	466 ± 155	462 ± 104

Los valores corresponden al promedio ± el error estándar de tres eyaculados diferentes obtenidos en el lapso de 20 días.

gc: gota citoplasmática; fl: flagelo en lazo (el flagelo se curva sobre sí mismo, formando un lazo al final de la cola)

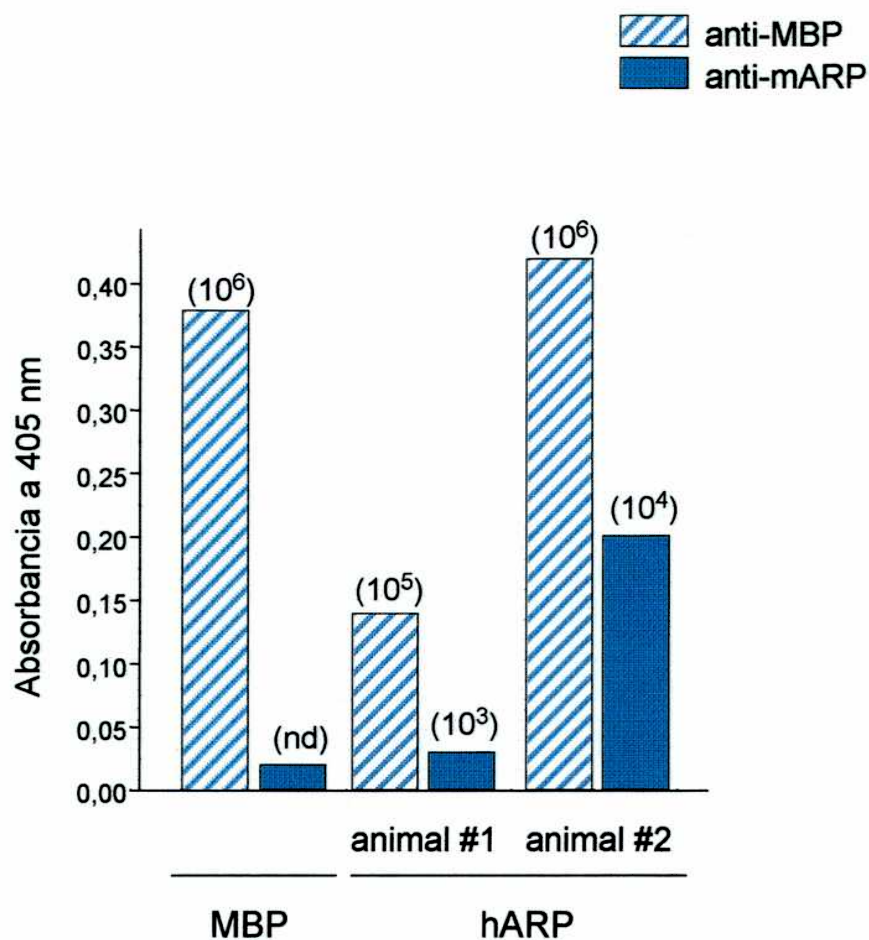


Figura 66: Presencia de anticuerpos anti-MBP o anti-mARP en el plasma seminal de los machos inmunizados. El animal inmunizado con MBP y los dos inmunizados con hARP fueron electroeyaculados, y el semen recogido en 7 ml de medio BWW. Los espermatozoides fueron separados por centrifugación, y los sobrenadantes conteniendo el plasma seminal fueron utilizados como primer anticuerpo en ELISA contra la proteína MBP o mARP. Los números entre paréntesis sobre las barras indican el título sérico anti-MBP o anti-mARP correspondiente al último sangrado. "nd": no detectable.

En conclusión, los resultados de este capítulo indican que, **1)** al igual que DE en la rata, la proteína ARP participaría en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios presentes en la superficie del ovocito humano, y **2)** la proteína ARP humana o de macaco, sería capaz de producir una respuesta inmune en primates no humanos de ambos sexos. Estos resultados apoyan fuertemente el posible empleo de la proteína epididimaria ARP para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad en el hombre.

Parte I: Estudio de la relación entre la estructura y la actividad de la proteína DE.

Si bien la participación de la proteína DE en el proceso de fusión de gametas ha sido extensamente estudiada en nuestro laboratorio, poco se sabía respecto de la relación estructura-función de la proteína. Con el fin de comenzar a estudiar la importancia de distintos componentes estructurales para la actividad biológica de la proteína, en primer lugar se realizó el clonado y secuenciación del ADNc.

Capítulo 1: Clonado y expresión de DE

Luego de la descripción inicial de DE por Cameo y Blaquier, diferentes laboratorios describieron o caracterizaron proteínas epididimarias de rata, que recibieron el mismo (126), o distintos nombres. Primeramente, el grupo del Dr Brooks (131), clonó una proteína a la que denominó DE, asumiendo que se trataba de la proteína originalmente descrita por Cameo y Blaquier (125), debido a las similitudes bioquímicas entre ambas. Un año más tarde, Charest et al (132) clonaron una proteína a la que llamaron AEG (Acidic Epididymal Protein), obteniendo una secuencia idéntica a la publicada previamente por Brooks et al. Aunque las numerosas características en común entre la proteína identificada en nuestro laboratorio y las identificadas por los Drs. Brooks y Charest sugerían que se trataba de la misma proteína, la identidad entre ellas nunca había sido confirmada.

Estudios previos de nuestro laboratorio en los cuales se secuenció un péptido interno de 13 aa de la proteína DE (138), indicaban que el mismo presentaba un 100 % de homología con la secuencia proteica deducida a partir de las secuencias nucleotídicas publicadas. Por otro lado, el "screening" de una biblioteca de ADNc de epidídimo de rata con nuestro anticuerpo anti-DE permitió obtener cuatro clones positivos, uno de los cuales presentó una

homología de 100% con la secuencia previamente publicada por Brooks (131), y por Charest (132). En conjunto, los resultados obtenidos por secuenciación aminoacídica y nucleotídica, confirman la identidad entre la proteína DE purificada en nuestro laboratorio y las proteínas descritas por los Drs. Brooks y Charest.

La secuencia de DE indica que la misma pertenece a la familia de proteínas CRISP, y a la superfamilia Scp/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7. Las proteínas CRISP se diferencian del resto de los miembros de la superfamilia por la presencia de la región C-terminal rica en cisteínas. Se cree que estas proteínas provendrían de un ancestro común, y que las CRISP habrían adquirido la región rica en cisteínas durante la evolución (194). Dada la amplia distribución biológica de los miembros de la superfamilia, y los relativamente bajos porcentajes de identidad entre ellos, es probable que la conservación de ciertos aminoácidos refleje una estructura secundaria o terciaria común, pero que estas proteínas hayan desarrollado funciones diferentes en los distintos organismos (183). En este sentido, si bien se ha postulado una actividad inhibidora de tripsina para algunos miembros de esta superfamilia (189,195), helotermina y DE son las dos únicas proteínas cuya función ha sido determinada.

A diferencia de las proteínas ADAM, en las que la presencia del dominio desintegrina permitió postular un modelo molecular que explica su participación en la interacción de gametas, el análisis de la secuencia de la proteína DE indicó la ausencia de dominios desintegrina, o de otros dominios con función conocida. No existiendo regiones de la proteína cuya importancia para la actividad sea evidente *a priori*, se comenzó el análisis de la relación estructura-función sin información sobre las probables zonas o componentes críticos de la molécula.

Para tal fin, seguidamente se procedió a expresar la proteína DE en forma recombinante. En primer lugar, se intentó expresar DE utilizando el vector de expresión pRSET, resultando en la detección de una banda sólo por Western blot y no por tinción de los geles con Azul de Coomasie. Esta situación tiene dos explicaciones posibles: a) la banda detectada no correspondía a la proteína recombinante, la cual no se expresa en absoluto debido a una mutación introducida en la PCR, o a un error en el subclonado; b) la banda detectada correspondía a la proteína recombinante y, por alguna razón, la expresión era muy inferior a la obtenida con la proteína control.

Para determinar cuál de estas alternativas era la correcta, se modificó el plásmido recombinante, construyéndose dos versiones delecionadas, de tal manera que la proteína expresada fuera de menor tamaño. Las bandas detectadas por Western blot correspondientes a estas construcciones, presentaron efectivamente un menor peso molecular, confirmando la segunda alternativa.

La observación del crecimiento en medio líquido o sólido de bacterias transformadas con pRSET-DE sugirió que la proteína podría ser tóxica para las bacterias. Dado que las causas de la toxicidad que provocaría la ineficiente expresión de DE son desconocidas, se decidió cambiar el vector y realizar la expresión utilizando el plásmido pMAL-p2. Dicho vector produce una proteína de fusión con MBP, la cual contiene un péptido líder que potencialmente conduce a la proteína híbrida al espacio periplásmico (196). Ya que la proteína expresada en el citoplasma resultaba tóxica, la exportación al espacio periplásmico de la proteína expresada en este sistema podría solucionar este problema. Por otro lado, si bien los sistemas de expresión en el periplasma presentan un rendimiento menor que aquellos de expresión en el citoplasma (197), tienen algunas ventajas considerables: 1) el compartimento periplásmico contiene sólo el 4% del total de las proteínas bacterianas (198), lo que simplifica la posterior purificación de la proteína; 2) la menor cantidad de proteasas en el periplasma respecto al citoplasma

(199,200) disminuye la probabilidad de degradación; y 3) mientras que el citoplasma bacteriano es un espacio reductor que no permite la formación de puentes disulfuro, en el periplasma es posible la formación de estas uniones covalentes (197).

Por un lado, el hecho de que la proteína recombinante sea una proteína de fusión presenta la desventaja de requerir el corte con una proteasa específica para obtener la proteína libre, paso que consume tiempo y no siempre es exitoso (197). Por otro lado, las proteínas de fusión (201-203), y en particular aquellas acopladas a MBP (204), mejoran la solubilidad de la proteína de interés, y disminuyen la probabilidad de que sufran proteólisis.

La inducción con IPTG de cultivos de bacterias transformadas con pMAL-DE, y el posterior análisis de las proteínas por SDS-PAGE, indicó la aparición de un par de bandas muy cercanas, de aproximadamente 68 kDa de peso molecular. La coincidencia entre el peso molecular observado y el esperado para la proteína de fusión, junto con el hecho de que estas bandas fueron reconocidas específicamente por el anticuerpo anti-DE, confirmó que las mismas correspondían a DE. El hecho de que la proteína aparezca como dos bandas muy próximas, sugiere que la proteína recombinante sería parcialmente degradada, sufriendo la pérdida de un pequeño péptido en un extremo.

Con el fin de evaluar la expresión citoplásmica o periplásmica de la proteína, se analizó por SDS-PAGE el contenido proteico de estos compartimentos. Los resultados indicaron que, a diferencia de la MBP, DE recombinante (recDE), se acumulaba en el citoplasma bacteriano. Esto no resultaba extraño ya que la presencia del péptido líder no garantiza la exportación al periplasma (202). Si bien el péptido líder es necesario, otros aspectos estructurales están involucrados en el transporte de proteínas a través de la membrana plasmática bacteriana (197).

La incapacidad de la proteína recombinante de exportarse al periplasma podría explicar la pequeña proteólisis observada, puesto que la mayoría de las proteínas que fallan en exportarse al periplasma forman cuerpos de inclusión o son degradadas (201,205). En algunos de estos casos, la reducción de los niveles de expresión (bajando la temperatura o disminuyendo la concentración de IPTG) mejora la eficiencia de la translocación al disminuir la sobrecarga del sistema de exportación. Sin embargo, ninguna de estas alternativas dieron resultado con recDE (datos no mostrados). Aunque se han descrito una serie de manipulaciones genéticas para mejorar la exportación en estos casos (206,207), las mismas no están disponibles a través de una cepa comercial.

Otro aspecto importante para la purificación de una proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad, es que la misma debe obtenerse en forma soluble. La expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* resulta muy frecuentemente en la formación de cuerpos de inclusión, que consisten en agregados de la proteína recombinante junto con algunas proteínas bacterianas (197). Si bien la purificación de estos cuerpos de inclusión es sencilla, es necesario realizar posteriormente varios pasos de solubilización y renaturalización de la proteína (208). Mientras que la expresión a 37°C resultó en la obtención de la proteína mayoritariamente en forma insoluble, la reducción de la temperatura de incubación a 26°C produjo la recuperación de una considerable proporción de recDE en la fracción soluble (datos no mostrados).

Luego de pasar la fracción soluble de un extracto total de bacterias por una columna de resina-amilosa, se obtuvo la proteína de fusión con una pureza aproximada de 85% junto con algunas proteínas bacterianas minoritarias que copurificaron. El rendimiento promedio luego de la purificación fue de 2.4 mg de proteína de fusión por litro de cultivo, lo que es similar al rendimiento

obtenido para otras proteínas expresadas en el mismo vector (209-211). Dado que en este caso la utilización de la versión periplásmica del vector (pMAL-p2) no sería apropiada debido a la incapacidad de recuperar a la proteína en el espacio periplásmico, sería quizás conveniente subclonar el inserto en el vector citoplásmico (pMAL-c2) que produce en general rendimientos de 10 mg de proteína recombinante por litro de cultivo.

Estos resultados muestran que la proteína DE puede ser expresada en forma soluble en un sistema bacteriano, y purificada con un rendimiento aceptable. Habiendo expresado y purificado la proteína recombinante, el paso siguiente consistió en el estudio de su actividad biológica.

Capítulo 2: Actividad de la proteína recombinante

Con el fin de estudiar la actividad biológica de la proteína recombinante, se evaluó su capacidad de inhibir el proceso de fusión de gametas *in vitro*. Como control, se utilizó a la proteína MBP, y a la proteína ARP, otro miembro de la familia CRISP, expresada en el mismo sistema. La proteína DE recombinante, a diferencia de MBP y ARP, fue capaz de inhibir significativamente la fusión de gametas *in vitro*. El hecho de que MBP no produjera una reducción del porcentaje de ovocitos fertilizados, indica que la inhibición observada no se debería a un efecto proteico inespecífico. Esto ya había sido demostrado anteriormente para la proteína nativa, al utilizarse las proteínas ovoalbúmina, anhidrasa carbónica y α -lactoalbúmina (141) como control. Por otro lado, este resultado indica que el efecto producido por recDE no sería debido a la porción correspondiente a MBP de la proteína de fusión. Más aún, la falta de inhibición en presencia de ARP, proteína que presenta un 40% de identidad con DE y también está fusionada a MBP, sugiere fuertemente que la inhibición observada depende de la presencia específica de la proteína DE.

La inhibición fue dependiente de la concentración utilizada, observándose un efecto inhibitorio a concentraciones de orden similar a las observadas para la proteína nativa (141). Esto también sugiere que el efecto es específico, ya que si la inhibición se produjera a concentraciones mucho menores que con la proteína nativa, podría deberse a la presencia de algún componente tóxico en la proteína recombinante.

La presencia de recDE no afectó la funcionalidad de los espermatozoides, dado que ni la motilidad ni la viabilidad de los mismos resultó alterada. Con respecto a los ovocitos, la inhibición pudo ser revertida por la remoción de la proteína mediante lavados previos a la fertilización, indicando que la inhibición tampoco sería debida a un efecto irreversible sobre la penetrabilidad de los ovocitos. Estos resultados en conjunto, indican que la inhibición del proceso

de fusión observada en presencia de recDE no se debería a un efecto tóxico sobre las gametas.

Teniendo en cuenta que el proceso de fusión involucra un primer evento de unión entre el espermatozoide y el ovocito y, posteriormente, la fusión de las membranas plasmáticas, se estudió el efecto de la proteína sobre la unión inicial de las gametas. Los resultados indicaron la ausencia de efecto sobre este evento, dado que en presencia de recDE, ni el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito, ni el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos, resultaron significativamente menores respecto a los valores obtenidos en presencia de MBP. De este modo y al igual que con la proteína nativa, la inhibición ocurriría a nivel de un evento posterior a la unión de las gametas y conducente a fusión.

Los ensayos de IFI indicaron la capacidad de recDE de unirse a la superficie del ovocito. El patrón de fluorescencia observado fue similar al obtenido con la proteína nativa: fluorescencia no uniforme, en forma de agregados, y presencia de un área no marcada (área negativa). La asociación de recDE al ovocito no ocurriría a través de la secuencia correspondiente a MBP, ya que esta proteína no fue capaz de asociarse a los ovocitos. Más aún, la capacidad de la proteína nativa de desplazar la unión de la proteína recombinante, indicaría que esta última se une a los mismos sitios que la proteína nativa. En conjunto, los resultados indican que recDE es capaz de unirse a los sitios complementarios para DE en la superficie del ovocito, e inhibir en forma específica la fusión de las gametas.

Es sabido que la proteína DE contiene un 10% de hidratos de carbono (134), y que las proteínas recombinantes expresadas en bacterias no sufren el proceso de glicosilación. El hecho de que recDE sea capaz de inhibir la penetración de los ovocitos indica que los hidratos de carbono no serían esenciales para esta actividad. A pesar de ello, la presencia de los azúcares

podría favorecer la actividad de la proteína. De hecho, recDE presenta una DE_{50} significativamente superior a la DE_{50} de la proteína nativa ($10\text{ }\mu\text{M}$ vs $3.2\text{ }\mu\text{M}$). Esta menor eficiencia en la inhibición podría deberse a la falta de los hidratos de carbono o, alternativamente, a otros factores. Con el fin de analizar la contribución de los hidratos de carbono a la actividad de la molécula, la proteína DE nativa fue deglicosilada mediante el tratamiento con la enzima PNGasa F, que corta la unión entre la asparagina y la N-acetil glucosamina, removiendo todo el árbol glicosídico. El efecto del tratamiento sobre la proteína se confirmó al observarse un aumento de la movilidad electroforética tanto de D como de E en SDS-PAGE.

El análisis de la secuencia aminoacídica de DE indica la presencia de cuatro sitios potenciales de N-glicosilación. Sin embargo, se desconoce cuáles de estos sitios están realmente glicosilados. Si bien la aparición de bandas de menor peso molecular indica que efectivamente la proteína fue deglicosilada, no es posible asegurar que la deglicosilación haya sido completa. De todos modos, cabe mencionar que los pesos moleculares estimados de las bandas observadas coinciden con los publicados para las proteínas D y E totalmente deglicosiladas (212), sugiriendo que la deglicosilación fue completa.

Cuando la proteína DE deglicosilada fue utilizada en ensayos de fusión, se observó una inhibición en la penetración de ovocitos comparable a la obtenida con la proteína DE sin deglicosilar, indicando que los hidratos de carbono no contribuirían a la actividad de la proteína.

Si bien la participación de los hidratos de carbono en el proceso de fusión de gametas no ha sido ampliamente estudiada, existen algunos trabajos sobre el tema en animales de laboratorio. En el hámster, la coincubación de gametas con diferentes sacáridos o glicoproteínas, así como el tratamiento de los espermatozoides con diferentes exoglicosidasas, no interfieren con el proceso de fusión espermatozoide-ovocito (213). En el ratón, si bien varios sacáridos (N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, galactosa, α -metilmanósido, D- y

L-fucosa) inhiben la fusión espermatozoide-ovocito a altas concentraciones, sólo la inhibición producida por la L-fucosa resulta específica. Asimismo, el tratamiento de los espermatozoides de ratón con fucosidasa, pero no con otras enzimas (N-acetilglucosaminidasa, galactosidasa o glucosidasa), y la coincubación de las gametas con polisacáridos que contienen fucosa, es capaz de producir una inhibición del proceso de fusión (214). Estos estudios indican que los residuos L-fucosa estarían involucrados en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito, al menos en el ratón. Un trabajo posterior, realizado por el grupo del Dr. Yanagimachi, mostró que la glucosamina, la albúmina conjugada con glucosamina o galactosamina, el fucoidán, y el dextrán sulfato fueron capaces de inhibir la fusión de gametas tanto en el ratón como en el hámster, sugiriendo la participación de una glicoproteína o de una lectina en este proceso (215). Recientemente, se ha descrito la participación de los residuos N-acetilglucosamina (Gal-Nac) en la fusión de gametas en el bovino (216,217). La adición de Gal-Nac o de una lectina específica para dicho monosacárido durante los ensayos de fertilización *in vitro*, produce una reducción del porcentaje de ovocitos clivados o fusionados. A diferencia de los trabajos anteriores, donde el efecto inhibitorio ocurriría fundamentalmente a nivel de la unión de las gametas, en este caso la inhibición ocurre en un evento posterior.

Dado que el proceso de fusión involucraría la interacción consecutiva de numerosas moléculas, es posible que algunas de ellas, como DE, no requieran los residuos glicosídicos para su función, en tanto otras, sean funcionales sólo en presencia de sus hidratos de carbono.

A pesar de que los hidratos de carbono de la proteína DE no están directamente involucrados en la fusión de las gametas, podrían estar involucrados en forma indirecta. Es sabido que en muchos casos, los hidratos de carbono contribuyen al correcto plegamiento proteico que ocurre co-traduccionalmente en el retículo endoplásmico (218). En algunos casos, la

ausencia de los residuos glicosídicos conduce a un plegamiento defectuoso, con la consecuente permanencia o degradación de la proteína en el retículo endoplásmico (219). La tunicamicina, un antibiótico que inhibe la N-glicosilación, ha sido utilizada para estudiar la función de los hidratos de carbono en distintas proteínas. Brooks (220) estudió el efecto de la presencia de tunicamicina en cultivos de tejido testicular o epididimario de rata sobre la secreción de proteínas. Mientras que la tunicamicina produjo un 40% de disminución en la secreción de proteínas y una alteración del patrón de proteínas secretadas en el cultivo *in vitro* de tejido testicular, el tratamiento similar de tejido epididimario no alteró el patrón de proteínas secretadas observadas en SDS-PAGE, a pesar de que la incorporación de manosa a las proteínas se redujo en un 50%. La proteína DE es una de las más abundantes en el fluido epididimario, por lo que su disminución debería ser fácilmente detectada. La normal secreción de DE en presencia de tunicamicina sugiere que su plegamiento sería normal en ausencia de N-glicosilación. Si bien los hidratos de carbono no serían imprescindibles para la adquisición de la correcta conformación espacial de la proteína DE en el retículo endoplasmático, los mismos podrían participar directamente en otras actividades de la proteína. En nuestro laboratorio se ha comenzado a estudiar la posible participación de la proteína DE en la interacción entre el espermatozoide y la ZP. Resultados iniciales indican que la presencia de anticuerpos anti-DE, o de la proteína purificada durante la coincubación de espermatozoides con ovocitos intactos, produce una inhibición de la unión de los espermatozoides a la ZP (221).

Por otro lado, y tal como se mencionó en la Introducción, la proteína DE secretada por las células epiteliales del epidídimo, se asocia a la superficie del espermatozoide durante la maduración epididimaria. De este modo, además de su posible participación en la interacción con la ZP, los residuos glicosídicos podrían ser importantes para la interacción de la proteína DE con la membrana plasmática del espermatozoide durante el tránsito epididimario.

Habiendo determinado que la actividad de la proteína reside en la porción peptídica de la molécula, una explicación alternativa de la menor eficiencia de recDE para inhibir el proceso de fusión, podría ser el plegamiento incorrecto de la misma, no por la ausencia de hidratos de carbono, sino por la incorrecta formación de puentes disulfuro. En este sentido, la observación del cambio en la movilidad electroforética de la proteína nativa luego de su tratamiento con DTT (138), sugiere que la presencia de puentes disulfuro intramoleculares contribuiría a la estructura espacial de la proteína. Sin embargo, se desconoce si todas las cisteínas o sólo algunas de ellas están involucradas en la formación de puentes disulfuro.

Con el fin de estudiar el grado de oxidación de las cisteínas en la proteína nativa, y compararlo con el correspondiente a la proteína recombinante, ambas proteínas fueron tratadas con el reactivo biotina-maleimida, específico para grupos -SH. El análisis de la presencia de grupos -SH libres en la proteína DE nativa indicó que, si bien la mayoría de las cisteínas se encuentran formando puentes disulfuro, existe una pequeña proporción de SH libres. Estas observaciones coinciden con resultados previamente publicados por Brooks (222), quien también detectó la presencia de grupos -SH en la proteína DE nativa, a través de la retención de la misma en una columna de sefarosa-tiol, y su posterior elución con β -mercaptoetanol. Contrariamente a lo que ocurre con DE, el estudio de la proteína homóloga de ratón expresada en células Sf9 o BHK, indicó la ausencia de grupos -SH libres (173). Esta diferencia podría reflejar una característica propia de cada proteína o, alternativamente, podría deberse a la expresión de la proteína de ratón en una célula diferente (no epitelial epididimaria) o, a la falta de algún paso de reducción propio del lumen epididimario.

El tratamiento de recDE con biotina-maleimida produjo una señal más intensa que la proteína nativa, indicando una mayor presencia de grupos -SH en la

misma. La comparación entre recDE y nDE se realizó utilizando la misma masa de cada una de las proteínas, por lo que, teniendo en cuenta sus pesos moleculares (nDE: 37 kDa, recDE: 67 kDa), resulta que el número de moléculas de nDE analizadas sería aproximadamente el doble que el correspondiente a recDE. Por lo tanto, la diferencia en la intensidad de la señal observada debería ser mayor si se comparase el mismo número de moléculas. Estos resultados indican claramente que recDE presenta un mayor contenido de grupos -SH libres respecto a la proteína nativa, lo cual estaría de acuerdo con la expresión de recDE en un espacio reductor como el citoplasma bacteriano.

Con el fin de investigar la importancia de los puentes disulfuro para la actividad de DE, la proteína DE nativa fue reducida con DTT, alquilada con ácido iodoacético para evitar la reformación de los puentes disulfuro luego de la diálisis del DTT, y finalmente utilizada en ensayos de fusión *in vitro*. La proteína DE nativa reducida presentó una actividad significativamente menor que la correspondiente a la proteína sin reducir, indicando la importancia de los puentes disulfuro para la actividad de la misma. Dado que la proteína utilizada fue reducida completamente, se desconoce si todos y cada uno de los puentes disulfuro son importantes, o si existen alguno/s más crítico/s que otros. Al mismo tiempo, estos resultados sugieren que la formación deficiente de los puentes disulfuro en la proteína recombinante podría ser responsable de su menor capacidad para inhibir el proceso de fusión *in vitro*.

Existen numerosos ejemplos de proteínas que requieren la presencia de puentes disulfuro intramoleculares para su actividad. Las desintegrinas, proteínas extraídas del veneno de diversos ofidios, se unen a las integrinas a través de una secuencia de tres aminoácidos, y presentan puentes disulfuro intramoleculares. El tratamiento de las desintegrinas con agentes reductores anula por completo su actividad biológica (223,224).

En el caso de la proteína DE, la ruptura de las uniones disulfuro no eliminó pero inhibió significativamente su capacidad de inhibir la penetración de ovocitos sin ZP. Estos resultados sugieren que la presencia de puentes disulfuro si bien no es esencial, favorecería la actividad de la proteína.

Capítulo 3: Región peptídica responsable de la actividad biológica

Dado que los resultados obtenidos con la proteína recombinante y con la proteína nativa deglicosilada indicaban que la actividad de la proteína residía en la porción peptídica de la molécula, resultaba interesante estudiar más precisamente cuál era la región responsable de la misma. Con este objetivo, se construyeron tres fragmentos recombinantes abarcando distintas regiones de la proteína. La actividad de una proteína recae, en general, sobre uno de sus dominios estructurales, por lo que para diseñar los fragmentos recombinantes, se tuvo en cuenta la estructura espacial de la misma. El hecho de que las proteínas CRISP presenten la región C-terminal característica, rica en cisteínas, y que al mismo tiempo compartan la región N-terminal con otras proteínas de origen muy diverso, sugiere que estas regiones formarían al menos dos dominios independientes. La resolución de la estructura tridimensional de la proteína Pr-1, un miembro de la misma superfamilia que carece del dominio C-terminal de las CRISP, indicó que la misma está formada por un único dominio (192). Por otro lado, existe información sobre la conformación de la proteína epididimaria homóloga de ratón, la que presenta un 70% de identidad con su contraparte en la rata (165), y también participa en el proceso de fusión de gametas (143). La estructura propuesta para la proteína de ratón, en base a la susceptibilidad de degradación por quimotripsina y a la formación de puentes disulfuro intramoleculares (173), consistiría en dos dominios: el dominio N-terminal (aa 1-153) que contiene tres puentes disulfuro, y el dominio C-terminal (aa 154-224) de naturaleza compacta, debido a la presencia de cinco puentes disulfuro. Tomando como guía la estructura propuesta para la proteína de ratón, se construyeron tres fragmentos recombinantes: el fragmento 1 (F1), comprendiendo los aa 1-158 y correspondiente al dominio N-terminal; el fragmento 2 (F2) abarcando los aa 156-227 que delimitan el dominio C-terminal, y el fragmento 3 (F3), que comprende todo el dominio C-terminal y parte del N-terminal (aa 62-227).

La expresión de estos fragmentos en el vector pMAL-p2, resultó en la acumulación de F1 y F3 en el citoplasma bacteriano, y de F2 en el periplasma celular.

Los distintos fragmentos fueron purificados por cromatografía de afinidad, y utilizados para evaluar su capacidad de unión al ovocito (por IFI), y su efecto sobre la penetración de ovocitos sin ZP *in vitro*. Inicialmente, estos ensayos se realizaron utilizando cada fragmento a una concentración de 6 μ M, a la cual recDE es capaz de unirse al ovocito e inhibir significativamente la fusión de las gametas. Los resultados obtenidos por IFI indicaron que, a diferencia de F2 y de MBP, tanto el fragmento F1 como el F3 fueron capaces de unirse al ovocito. Sin embargo, al evaluarse la capacidad de F1 y F3 de inhibir el proceso de fusión *in vitro*, ninguno de los fragmentos fue capaz de producir una inhibición significativa. El hecho de que dos de los fragmentos recombinantes sean capaces de unirse a los sitios complementarios para DE, pero que al mismo tiempo no inhiban la fusión, parece contradictorio, sugiriendo que la unión observada por IFI podría ser inespecífica. Sin embargo, las características propias de cada una de las técnicas utilizadas para determinar la capacidad de unirse al ovocito y de inhibir la fusión, podrían explicar esta diferencia. Mientras que en el ensayo de IFI, los ovocitos son fijados inmediatamente luego de la incubación con los fragmentos, permitiendo visualizar una asociación aún de baja afinidad, en el ensayo de fusión, la proteína nativa presente sobre el espermatozoide compite con los fragmentos unidos al ovocito, desplazándolos de los sitios complementarios para DE.

Si la causa de los resultados obtenidos fuera la baja afinidad de los fragmentos por sus sitios complementarios, un aumento en la concentración de los fragmentos durante la coincubación de las gametas, podría compensar su menor afinidad, disminuyendo la probabilidad de ser desplazados por la proteína presente sobre el espermatozoide. Con el fin de evaluar esta posibilidad, los fragmentos fueron utilizados en ensayos de fusión a una

concentración diez veces superior (60 μ M). Los resultados indicaron que a esta concentración, tanto F1 como F3, pero no MBP ni F2, produjeron una inhibición significativa en la penetración de ovocitos, confirmando la hipótesis planteada.

El hecho de que F1 y F3 fueran capaces de unirse al ovocito e inhibir la penetración de ovocitos sin ZP, indica que cada uno de ellos contiene la secuencia suficiente para esta actividad. Sin embargo, la mayor concentración necesaria para lograr la inhibición de la fusión respecto de la requerida por la proteína recombinante completa, sugiere que otras regiones ausentes en cada uno de los fragmentos, si bien no imprescindibles, podrían influir en la actividad del dominio activo. Un fenómeno similar se ha observado con la actividad de las desintegrinas, anteriormente descritas. Mientras que las proteínas son activas a una concentración del orden nanomolar, oligopéptidos que contienen la secuencia activa, arginina-glicina-aspartico (RGD), presentan actividad a una concentración mil veces mayor, es decir del orden micromolar (225). Los oligopéptidos de las desintegrinas representan una pequeña fracción de la proteína completa, por lo que no es sorprendente que puedan carecer de alguna porción de la molécula que influya en la actividad, y por lo tanto presenten una menor actividad biológica. En el caso de los fragmentos de DE, cada uno de los mismos representa aproximadamente un tercio de la molécula, es decir una proporción importante de la proteína. Sin embargo, mientras que la diferencia en la concentración efectiva de los oligopéptidos es de tres órdenes respecto a las desintegrinas, los fragmentos presentan una diferencia de un orden en la concentración efectiva respecto a recDE.

Considerando que los fragmentos con capacidad de unirse al ovocito y de inhibir la fusión de las gametas contienen una región en común (aa 62-158), es probable que la actividad de la proteína DE resida en esta región compartida. Con el fin de examinar esta posibilidad, se construyeron dos

nuevos fragmentos: F4, abarcando los aa 62-158, y F5, comprendiendo los aa 1-62, como control. Mientras que F4 se expresó en el citoplasma de la bacteria, F5 se exportó correctamente al espacio periplásmico.

Los dos nuevos fragmentos, F4 y F5, fueron utilizados en ensayos de IFI y de fusión de gametas *in vitro*. Como control positivo de la fertilización, se usó al fragmento F2, en tanto que como control de inhibición, se utilizó al fragmento F3. Tal como era esperado, mientras que la presencia de F2, al igual que la de F5, no produjo una reducción significativa en el porcentaje de penetración, la presencia tanto de F3 como de F4 logró disminuir significativamente el porcentaje de ovocitos penetrados. La inhibición producida por F4 fue similar a la producida por F3, por lo que en este caso, la reducción del tamaño del fragmento no afectó su actividad. Los experimentos realizados para controlar la especificidad de la inhibición producida por el fragmento F4, indicaron que el mismo no afectó la viabilidad o motilidad de los espermatozoides, no inhibió la unión inicial de las gametas, y tampoco produjo un efecto tóxico sobre los ovocitos. Por su parte, los experimentos de IFI confirmaron que la inhibición del proceso de fusión por F4 estaría mediada por la unión del fragmento a la superficie del ovocito.

En conjunto, los resultados indicarían que la actividad de la proteína residiría en la región comprendida entre los aminoácidos 62-158.

El hecho de que la actividad resida en esta región, junto a la importancia de los puentes disulfuro para la actividad de la proteína, sugeriría que los puentes disulfuro críticos son aquellos tres contenidos entre los aminoácidos 62-158. Sin embargo, es posible que la correcta conformación del dominio C-terminal (aa 158-227) conteniendo la mayoría de los puentes disulfuro, influya sobre la actividad del dominio activo.

Con el fin de evaluar la importancia de los tres puentes disulfuro comprendidos en el dominio activo, y considerando que el F4 se expresa en el citoplasma reductor de la bacteria, se podría favorecer la formación de los puentes disulfuro de F4 mediante la incubación de este fragmento en un buffer redox, y posteriormente comparar su actividad con la de F4 sin tratar. Si la formación *in vitro* de los puentes disulfuro de F4 aumentaran su actividad, esto indicaría la importancia de alguno de los tres puentes disulfuro presentes en el fragmento. La predicción de la estructura tridimensional de DE sitúa en proximidad a los pares de cisteínas 63-140, 79-154, y 135-151, lo que es coincidente con el mapa determinado experimentalmente para la proteína DE de ratón. El puente entre las cisteínas 63-140 vincularía una de las láminas β con una pequeña hélice, en tanto los dos puentes restantes (79-154 y 135-151) conectarían entre sí láminas β adyacentes, las cuales se asocian a través de numerosas uniones hidrógeno. Por lo tanto, es esperable que la ruptura de esos dos puentes disulfuro no tenga consecuencias drásticas sobre la conformación de la molécula. Por el contrario, el puente entre las cisteínas 63-140 parecería ser más importante para la estructura terciaria que los dos restantes.

Recientemente, ha sido publicado un trabajo en el que se estudia la relación estructura-función de la proteína testicular de rata TPX-1, homóloga a DE. La función propuesta por estos autores para TPX-1, es la de mediar la unión entre las células espermatogénicas con las células de Sertoli (175). Los resultados de este trabajo indican que los 101 aminoácidos del extremo N-terminal son suficientes para la actividad de adhesión celular (226). Tanto DE como TPX-1 pertenecen a la familia de proteínas CRISP, y presentan el característico dominio C-terminal rico en cisteínas. Debido a la inusual concentración de este aminoácido en esa región, y a la conservación de las cisteínas entre los miembros de esta familia, se ha sugerido que el dominio C-terminal cumpliría una función importante para la actividad de estas proteínas

(165,167). Sin embargo, el dominio C-terminal es prescindible para la actividad de TPX-1 (226), y para la interacción de la proteína DE con el oolema. Por lo tanto, los únicos estudios de estructura-función realizados con miembros de esta familia, no favorecerían esta hipótesis. No se descarta, sin embargo, que este dominio pueda ser importante para otras posibles actividades de ambas proteínas.

La mayoría de las proteínas virales de fusión contienen un péptido hidrofóbico o anfipático corto, o péptido de fusión, que es esencial para la fusión virus-célula. Los péptidos anfipáticos forman una α hélice que posee una cara con aminoácidos hidrofóbicos, y otra con aminoácidos cargados, y son capaces de interactuar con bicapas lipídicas. Los péptidos de fusión más estudiados son los correspondientes a la proteína HA del virus influenza, y a la proteína gp41 del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (227). Las proteínas de fusión HA y gp41 se sintetizan como precursores de mayor tamaño que son luego procesados proteolíticamente. Este procesamiento genera una proteína con un plegamiento metaestable, que se asemeja a un resorte comprimido (228). En este estado, los péptidos de fusión, que se disponen en el extremo N-terminal del polipéptido, se encuentran “enterrados” en el interior de la molécula. La interacción de estas proteínas con las respectivas moléculas receptoras (residuos de ácido siálico terminales para el virus de influenza, y receptores para quemoquinas y CD4 para el VIH), produce un cambio conformacional en las moléculas que expone el péptido de fusión, probablemente inyectándolo en la membrana de la célula (229).

El mecanismo molecular involucrado en la participación de la proteína DE en el proceso de fusión, es desconocido. Es sabido que la proteína no está involucrada en la unión de las gametas, sino en un evento posterior. DE podría entonces participar en una etapa conducente a la fusión de las

membranas o, alternativamente, podría ser una proteína de fusión en sí misma.

La predicción de la estructura secundaria de DE indicó la posible formación de una α hélice anfipática en la región comprendida entre los aa 111-123. La existencia de un potencial péptido de fusión en su estructura permite pensar que DE podría funcionar como una proteína de fusión. A diferencia de la mayoría de las proteínas de fusión virales, donde el péptido de fusión se ubica cerca de un extremo del polipéptido, el potencial péptido de fusión de DE tiene una ubicación interna. Sin embargo, existen algunas proteínas virales (del grupo *Paramixoviridae*) que poseen un péptido de fusión en el interior de la molécula (230). Es importante tener en cuenta, sin embargo, que la sola presencia de un potencial péptido de fusión no significa que la proteína que lo contiene funcione como una proteína de fusión. En este sentido, en nuestro laboratorio se han realizado ensayos de asociación de la proteína DE a liposomas de diferentes composiciones lipídicas, con resultados negativos en todos los casos (138). Sin embargo, es posible que en caso de funcionar como una proteína de fusión, la exposición del péptido de fusión requiera la previa interacción de la proteína con la molécula complementaria del ovocito. La formación de una α hélice no sólo depende de la existencia de una sucesión de aminoácidos favorables a esta estructura, sino que además depende del contexto tridimensional en el que se encuentre. La estructura espacial teórica de DE, no indica que la región comprendida entre los aa 111-123 presente una estructura de α hélice. Sin embargo, el péptido podría adoptar esta disposición espacial luego de un cambio en la estructura terciaria que altere el contexto conformacional en el que se encuentra. Esto podría ocurrir luego de la interacción de DE con sus sitios complementarios, y de hecho los cambios conformacionales forman parte del mecanismo de acción de las proteínas de fusión virales.

Si el potencial péptido de fusión fuera esencial para la participación de DE en el proceso de fusión de gametas, sería esperable que proteínas homólogas con la misma función, también lo contengan. El análisis de la región que contendría el péptido de fusión en las secuencias correspondientes a las proteínas DE de ratón y ARP humana, indicó que si bien estas regiones presentan una tendencia a formar α hélices, las mismas no tendrían carácter anfipático. Esto sugiere que la potencial α hélice de DE no estaría involucrada en la participación de la proteína en el proceso de fusión.

Además del potencial péptido de fusión, F4 contiene las dos secuencias típicas de la superfamilia Scp/Tpx-1/Ag5/PR-1/Sc7. La conservación de estas secuencias en todos los miembros de la superfamilia indicaría la importancia de las mismas para la función de las proteínas (155,231). Sin embargo, la real importancia de tales secuencias aún no se conoce. La construcción de fragmentos de menor tamaño abarcando distintas regiones del fragmento F4 con el fin de identificar la menor región de la proteína capaz de unirse al ovocito e inhibir el proceso de fusión, permitirá además, determinar la importancia de esta secuencia conservada para la actividad biológica. En caso de que todo el dominio F4 sea necesario para conservar la actividad, se podría evaluar la contribución de estas dos secuencias, a través de la construcción de sendos fragmentos F4 con la secuencia respectiva deletada.

Los resultados de la primera parte de este trabajo indican que la actividad biológica de la proteína DE residiría en la porción peptídica de la molécula, más específicamente en la región comprendida entre los aa 62-158, y que los puentes disulfuro serían importantes para dicha actividad. El conocimiento de la relación estructura-función no sólo contribuye al esclarecimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la participación de la proteína DE en el proceso de fusión, sino que además podría ser de utilidad para la

posible aplicación anticonceptiva de la misma. El estudio de la estructura de la proteína gp41 del VIH y su relación con la fusión virus-célula, ha permitido el reciente desarrollo de péptidos capaces de asociarse con gp41, bloqueando su actividad y, en consecuencia, la entrada del virus a la célula (232). De la misma manera, la comprensión del mecanismo molecular por el cual DE participa en el proceso de fusión de gametas, podría contribuir al diseño de fármacos sintéticos inhibidores de su actividad. Dicha información sería también de utilidad para el desarrollo de un método basado en anticuerpos que bloquee la actividad de DE, ya que permitiría dirigir el ataque inmune específicamente contra el sitio activo, disminuyendo el riesgo de una reacción cruzada con otra proteína.

Los resultados presentados en la primera parte de la Tesis constituyen una importante contribución al esclarecimiento de los mecanismos de la interacción de la proteína DE con sus sitios complementarios. La comprensión de la secuencia de moléculas y eventos involucrados en la fusión de gametas contribuirá a extender los conocimientos en otros procesos celulares que involucran la fusión de membranas, tales como la formación de la placenta, la miogénesis, la osteogénesis o la entrada de virus envueltos a la célula.

Parte II: Potencial uso de DE para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad

Capítulo 1: Mecanismos involucrados en la inhibición de la fertilidad luego de la inmunización de ratas con DE.

Con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en la inhibición de la fertilidad luego de la inmunización con DE, machos y hembras fueron inmunizados con proteína DE purificada, obteniéndose una respuesta inmune que fue, en general, similar a la observada en la inmunización previa (145). Los niveles de anticuerpos anti-DE alcanzaron su máximo valor luego de la última inyección, comenzando luego a decaer hasta alcanzar 4-6 meses más tarde, valores similares a los controles. En cuanto a la fertilidad resultante, también se obtuvo un porcentaje de inhibición similar al observado previamente (144), así como al obtenido por otro laboratorio utilizando el mismo modelo (233). Por lo tanto, los resultados obtenidos luego de la inmunización con DE son reproducibles, lo que fortalece la validez de los mismos.

El análisis de la relación entre los niveles de anticuerpos anti-DE y la fertilidad indicó la existencia de un cierto grado de asociación entre estos dos parámetros para ambos sexos.

La correlación entre la presencia de anticuerpos anti-espermatozoide (AAE) en suero y la infertilidad, es un tema controvertido. Se han publicado numerosos trabajos que indican la existencia de una asociación significativa entre estos parámetros, tanto en hombres (234-238), como en mujeres (234,236,239-241), así como otros que indican lo contrario (242-245). En forma similar a los trabajos clínicos, existen ensayos realizados en distintos modelos animales con resultados diferentes. Mientras que luego de la

inmunización con las proteínas del espermatozoide LDH-C4 (246), SP17 (247), fertilina β (248), o sp56 (249) se observó una inhibición de la fertilidad que no correlaciona con los títulos de anticuerpos, la inmunización con otros antígenos, tales como YWK-II (250,251), RSA (252), y FA-1 (253), produjo una reducción de la fertilidad que se relaciona con los niveles séricos de anticuerpos específicos contra el antígeno utilizado.

En el presente trabajo, mientras que la mayoría de los animales con títulos elevados de anticuerpos anti-DE presentaron una reducción en su fertilidad, los animales con bajos títulos de anticuerpos, mostraron mayoritariamente una fertilidad normal. Sin embargo, se observaron algunos animales que, a pesar de presentar títulos altos de anticuerpos, no presentaron una reducción de su fertilidad.

Existen diversos motivos que podrían explicar la falta de una correlación más fuerte entre los anticuerpos anti-DE presentes en el suero y la infertilidad:

1) Los títulos medidos por ELISA evalúan la capacidad de los anticuerpos de unirse a la proteína DE, pero no brindan información sobre la capacidad de los mismos de inhibir la capacidad fertilizante del espermatozoide. Por lo tanto, los títulos medidos por ELISA podrían ser distintos a los títulos de anticuerpos capaces de neutralizar la actividad de DE.

2) Los anticuerpos medidos, tanto en suero como en los fluidos, corresponden exclusivamente a las inmunoglobulinas G (IgG). Además de este isotipo, otras inmunoglobulinas podrían estar involucradas, en particular la inmunoglobulina A (IgA) secretoria. Al respecto, es sabido que tanto el tracto reproductivo del macho (254,255) como el de la hembra (255-257) forman parte del sistema inmune de mucosas. En el tracto reproductivo femenino, se encuentran presentes, desde la vagina hasta el folículo ovárico, componentes del sistema inmune de mucosas, así como inmunoglobulinas sistémicas. Las secreciones cervicales son ricas tanto en IgGs que provienen de la transudación del suero, como en IgAs secretorias de producción local (258,259). En las secreciones uterinas también se encuentran estos dos isotipos, pero ambas serían

secretadas en mayor medida por células plasmáticas locales (260). Por su parte, las inmunoglobulinas presentes en el fluido oviductal corresponden a IgGs e IgAs de origen exclusivamente sistémico (258). El fluido folicular presenta concentraciones de anticuerpos (IgGs e IGAs) similares a las plasmáticas (261), por lo que después de la ovulación, la cantidad de anticuerpos presentes en el oviducto podría incrementarse.

Con respecto al tracto reproductivo masculino, las inmunoglobulinas del tipo A están presentes en varios tejidos (262,263), incluyendo el epidídimo (264,265). En el hombre, aunque los niveles de IgA no son tan críticos como los de IgG para la inhibición de la fertilidad, la combinación de IgA sobre el espermatozoide con altos niveles de AAE en circulación, reduce la probabilidad de fertilización (264,266,267).

En general, la forma más apropiada para obtener una respuesta inmune secretoria, es mediante la inmunización a través de alguna mucosa (oral, nasal, gástrica, intestinal) (268,269). En particular, para el tracto reproductivo femenino, se ha demostrado que la inmunización sistémica no es eficiente para inducir la producción local de anticuerpos (270). En el caso de los machos, la inmunización por vía oral y rectal, a diferencia de la intramuscular, es efectiva en inducir una respuesta secretoria en el recto, la que está asociada a una respuesta secretoria en la uretra (271). Por lo tanto, dado que las vías de inmunización utilizadas en este trabajo no incluyen una mucosa, podría suponerse que el sistema inmune de mucosas no fue activado eficientemente. Sin embargo, es posible que los niveles de IgG e IgA en conjunto, presenten una asociación mayor con la infertilidad que los niveles de IgG en forma individual.

3) Además de la respuesta humoral, una respuesta celular podría estar involucrada en la inhibición de la fertilidad luego de la inmunización con la proteína DE. Este tipo de respuesta ha sido descripto luego de la inmunización con antígenos del espermatozoide (272). Además, las citoquinas liberadas por linfocitos activados y macrófagos, u otros productos

leucocitarios, podrían estar involucrados en la inhibición de la fertilidad, dado que existen evidencias que indican que estos factores solubles pueden afectar adversamente diversos aspectos funcionales del espermatozoide (273-275).

Con el fin de estudiar la existencia de posibles lesiones sobre los órganos reproductivos del macho, se analizaron testículos, epidídimos y vasos deferentes provenientes de animales control e inmunizados. Dado que DE se sintetiza mayoritariamente en epidídimo pero también existe una débil expresión en vaso deferente (132), el reconocimiento de la proteína por los anticuerpos podría producir lesiones en estos dos tejidos. En cuanto al testículo, si bien no sintetiza proteína DE, la posible reacción cruzada de los anticuerpos con la proteína testicular TPX-1, que presenta un 55% de identidad con DE, podría originar una lesión testicular. Por otro lado, se ha demostrado que la inmunización con otros antígenos del espermatozoide, cobayos con la proteína PH-20 (153) y ratones con LDH-C4 (276), es capaz de producir una reducción en la fertilidad de los animales debido a la inducción de orquitis autoinmune. Considerando que no existen muchos trabajos de inmunización en machos, y que los de mayor repercusión implican daños testiculares, resultaba importante descartar que la inmunización con DE provocara dichos efectos colaterales.

El estudio histológico de los órganos reproductivos de animales inmunizados no reveló ninguna patología testicular, epididimaria o del vaso deferente, indicando que la inhibición observada no se debería a una lesión sobre los órganos reproductivos del macho, y por lo tanto marcando una importante diferencia con los resultados obtenidos con las proteínas PH-20 y LDH-C4. En el caso de las hembras, si bien no hay expresión de la proteína DE en ningún tejido, teniendo en cuenta que la inmunización afecta la capacidad reproductiva de los animales, era importante examinar la estructura normal de los órganos reproductivos. El análisis histológico del ovario, oviducto y útero de hembras control e inmunizadas indicó la presencia de estructuras normales

en todos los casos. De esta manera, se descartó la posibilidad de que la reducción de la fertilidad observada luego de la inmunización de hembras con DE, se debiera a una lesión de los órganos reproductivos.

Dado que los resultados histológicos indicaban la ausencia de un efecto deletéreo de la inmunización, un posible mecanismo de inhibición de la fertilidad sería la entrada de los anticuerpos al tracto reproductivo tanto del macho como de la hembra. En el macho, los anticuerpos podrían interferir con la síntesis o secreción de la proteína DE, o alterar la asociación de la proteína a la superficie del espermatozoide. Por otro lado, los anticuerpos podrían asociarse a la proteína DE presente sobre los espermatozoides y alterar la capacidad fertilizante de los mismos tanto en hembras como en machos. Con el fin de investigar el mecanismo involucrado en la inhibición de la fertilidad, en primer lugar se analizó la presencia de IgGs anti-DE en las secreciones reproductivas de animales de ambos sexos. Los fluidos uterinos y oviductales de hembras inmunizadas y control, fueron utilizados como primer anticuerpo en ensayos de ELISA contra la proteína DE. Los resultados indicaron la presencia de anticuerpos específicos tanto en el fluido vaginal como en el uterino y oviductal. Debido a la ruta de inmunización utilizada (intramuscular e intradérmica), es muy probable que la gran mayoría de las inmunoglobulinas anti-DE detectadas en los fluidos reproductivos provengan del suero. Los niveles de anticuerpos anti-DE detectados en el fluido oviductal representan entre un 15-30% de los niveles presentes en suero. Oliphant et al (277) estudiaron la presencia de anticuerpos específicos en el oviducto de conejos inmunizados con la enzima alcohol deshidrogenasa, encontrando un 10-20% respecto de los niveles séricos. La inmunización de esta misma especie con la proteína LDH-C4, indicó la presencia en el oviducto de un 3-27% de anticuerpos séricos (278). Más recientemente, luego de la inmunización de macacos con las proteínas SP-10 (279) y Sp-17 (280), se detectó la presencia en el oviducto de un 0.2-22% de anticuerpos en relación a los presentes en el

suero. Los niveles de anticuerpos anti-DE encontrados en este trabajo concuerdan con los datos de la bibliografía, ya que la proporción de anticuerpos presentes en las secreciones reproductivas respecto a la hallada en suero, se ubica dentro del rango de los valores previamente informados en otros trabajos.

A diferencia de lo que ocurre en el tracto femenino, que es un espacio abierto a la cavidad peritoneal, el tracto reproductivo masculino presenta limitaciones para el acceso del sistema inmune. Tal como se describiera en la Introducción, las células de Sertoli y las células epiteliales del epidídimo están conectadas por uniones estrechas, lo que restringe el pasaje de moléculas de elevado peso molecular. Mientras que la barrera hemato-testicular es muy restrictiva, excluyendo casi completamente el pasaje de moléculas de elevado peso molecular, se ha sugerido que la barrera hemato-epididimaria sería más permeable que la hemato-testicular. Con respecto a la entrada de inmunoglobulinas al epidídimo, los resultados son controvertidos. Wong y colaboradores (281), inyectaron inmunoglobulinas marcadas radiativamente en ratas, y estudiaron su entrada al fluido del *cauda* epididimario. Los resultados indicaron la ausencia de radiactividad en el fluido epididimario, a pesar de detectarse altos niveles de radiactividad en sangre y en hígado. Los autores concluyeron que la barrera hemato-epididimaria no permite el pasaje de las inmunoglobulinas, al menos luego de su administración por inmunización pasiva. Por otro lado, Weininger et al (282) inmunizaron conejos con γ globulina bovina dinitrofenilada (γ globulina-DNP), detectando luego IgGs anti-DNP en el fluido epididimario. Tal como era esperado, los niveles de anticuerpos en el epidídimo fueron menores que los presentes en el suero, pero mayores que los detectados en el fluido cerebro-espinal, sugiriendo que la barrera hemato-epididimaria es más permeable que la hemato-encefálica. Por su parte, Lee et al (283), inyectaron ratones intraperitonealmente con anticuerpos anti-espermatozoide y luego analizaron su asociación a los

espermatozoides testiculares o epididimarios mediante IFI. Mientras que ninguno de los espermatozoides testiculares mostró marcación fluorescente, un cierto porcentaje de los espermatozoides epididimarios presentó fluorescencia. En otro experimento descrito en el mismo trabajo, se inyectaron anticuerpos marcados con ^{125}I , detectándose luego niveles de radiactividad en el epidídimo similares a los observados en otros tejidos, pero claramente mayores a los medidos en el cerebro y en el testículo. En un estudio posterior, Naz y Bhargava (284) inyectaron anticuerpos dirigidos contra un antígeno del espermatozoide, FA-1, marcados radiactivamente. Aunque no hubo diferencias entre la cantidad de anticuerpos anti-FA-1 y de una IgG control presente en numerosos tejidos (sangre, hígado, corazón, riñón, músculo, testículo, vesículas seminales), se observó una presencia significativamente mayor de anticuerpos anti-FA-1 en el epidídimo y en el vaso deferente. Los espermatozoides del *cauda* epididimario recuperados 120 horas luego de la inyección de los anticuerpos, presentaron unión de los anticuerpos a la cabeza y pieza media de la cola. Sin embargo, los anticuerpos no fueron detectados en el testículo, indicando que el epidídimo y el vaso deferente son órganos a través de los cuales los anticuerpos pueden transudar. En conjunto, estos trabajos sugieren que la barrera hemato-epididimaria es una barrera semipermeable que permitiría la entrada de las inmunoglobulinas al lumen del epidídimo.

Estas evidencias nos llevaron a estudiar la posibilidad de que los anticuerpos hayan entrado en el epidídimo e interferido con la síntesis o secreción de DE por las células epiteliales o, alternativamente, con la asociación de la proteína a la superficie del espermatozoide. Los resultados obtenidos por ELISA revelaron la presencia de niveles de IgG anti-DE significativamente mayores en los fluidos recuperados de animales inmunizados respecto a animales controles, representando aproximadamente un 1% de los valores obtenidos en suero. Si bien existe un trabajo indicando que en pacientes vasectomizados la cantidad de anticuerpos en el epidídimo es similar a la cantidad presente en

el suero (285), estudios realizados en animales indican que la cantidad de inmunoglobulinas en el lumen epididimario es sustancialmente menor. El análisis de la entrada de anticuerpos específicos al epidídimo de conejos inmunizados con γ globulina-DNP, indicó la presencia de anticuerpos en una relación de 0.3-1.1% respecto al suero (282), mientras que en ratas inmunizadas con toxoide tetánico, la proporción de inmunoglobulinas específicas respecto al suero fue entre 0.5 y 0.8% en distintas regiones del epidídimo (286). Por lo tanto, el nivel encontrado de anticuerpos anti-DE en el lumen epididimario es similar a los resultados antes descriptos. Aunque la posibilidad de que los fluidos se hayan contaminado con sangre no puede ser descartada, la perfusión previa de los animales, la cuidadosa disección de los órganos, y el hecho de que no se observaran eritrocitos al examinarse los fluidos microscópicamente, apoyan la idea de que los anticuerpos detectados provienen del transudado del suero al tracto reproductivo. Este hecho concuerda con la entrada de anticuerpos al epidídimo descrita por otros grupos, y apoya el concepto de que la barrera hemato-epididimaria es más permeable que la hemato-testicular, al menos para moléculas del tamaño de la IgG (287).

Las secreciones de las glándulas accesorias, en especial las de la próstata y las vesículas seminales, podrían también contribuir a la presencia final de anticuerpos en el plasma seminal (262,288). Por lo tanto, no se puede excluir que, además de ingresar al epidídimo, los anticuerpos entren en contacto con los espermatozoides en el momento de la eyaculación.

Los anticuerpos presentes en el lumen epididimario podrían interferir con la síntesis o secreción de la proteína DE por las células epiteliales, o con la asociación de la proteína a la superficie del espermatozoide. Estudios de IFI realizados sobre cortes de epidídimo de animales control e inmunizados indicaron la ausencia de diferencias en cuanto al patrón o intensidad de la fluorescencia. Si bien los resultados de este estudio mostraban la ausencia de

diferencias importantes entre ambos grupos, cabía la posibilidad de que existieran diferencias no detectables por una técnica cualitativa como la IFI. Con el fin de analizar esta posibilidad, la cantidad de proteína DE asociada a los espermatozoides recuperados de animales control e inmunizados fue cuantificada por ELISA. Los resultados indicaron la ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos, sugiriendo que la inmunización con la proteína DE no afectaría la cantidad de proteína que se asocia a los espermatozoides durante la maduración.

Habiendo comprobado la entrada de los anticuerpos al tracto reproductivo de ambos sexos, y la ausencia de efectos sobre la síntesis, secreción o asociación de DE al espermatozoide, a continuación se estudió la capacidad de los anticuerpos presentes en los fluidos reproductivos para unirse a los espermatozoides. Hembras inmunizadas o controles fueron apareadas con animales no inmunizados, y los espermatozoides recuperados de la vagina y del útero, fueron luego sometidos a IF utilizando directamente anti-IgG de rata acoplado a FITC. Sólo los espermatozoides recuperados de las hembras inmunizadas presentaron marcación fluorescente en la cabeza del espermatozoide, lo que es coincidente con la localización de DE sobre el espermatozoide.

La presencia de anticuerpos anti-DE en el tracto de hembras inmunizadas y su asociación a los espermatozoides allí presentes, junto con resultados previos que indican que hembras inseminadas con espermatozoides expuestos a sueros inmunes presentan una inhibición de la fertilización (145), concuerdan con el mecanismo de inhibición de la fertilidad esquematizado en la **Figura 44**.

A diferencia de lo ocurrido en las hembras, no fue posible detectar la asociación de los anticuerpos con los espermatozoides recuperados del tracto reproductivo de machos inmunizados, utilizando sólo el segundo anticuerpo en experimentos de inmunofluorescencia.

Estos resultados son similares a los obtenidos en experimentos previos, en los que túbulos epididimarios ligados en ambos extremos, fueron cultivados *in vitro* en presencia de anticuerpo anti-DE. Los espermatozoides recuperados de estos túbulos, presentaron un nivel muy bajo de marcación (8%) al ser incubados con un segundo anticuerpo fluoresceinado, a pesar de presentar una capacidad fertilizante significativamente reducida luego de una inseminación intrauterina (139). Además, se ha descripto la incapacidad de detectar por IFI anticuerpos anti-espermatozoide detectados en pacientes por otros métodos (289,290). Por lo tanto, es posible que los niveles de anticuerpos asociados a los espermatozoides, aunque no sean suficientes para ser detectados por IFI, sean capaces de afectar el funcionamiento de los mismos.

La falta de efecto de la inmunización sobre la cantidad de DE asociada a los espermatozoides, junto con la capacidad de los sueros inmunes de reconocer a la proteína DE sobre los espermatozoides (145), sugirieron la posibilidad de que los anticuerpos hayan interactuado con la proteína asociada a los espermatozoides, afectando la capacidad de fusión de los mismos. Aunque resultados previos indicaban que los sueros inmunes no afectan la viabilidad, motilidad y capacidad de sufrir la RA de los espermatozoides en condiciones *in vitro* (145), existía la posibilidad de que otros factores producidos luego de la inmunización activa, pudieran haber afectado estos parámetros. Los resultados indicaron la ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos en el porcentaje de redistribución de DE al segmento ecuatorial, sugiriendo la normal capacidad de los espermatozoides de sufrir capacitación y/o RA. Sin embargo, al ser coincubados con ovocitos de rata sin ZP, los espermatozoides epididimarios recuperados de animales inmunizados presentaron una capacidad de fusionarse significativamente menor respecto a los espermatozoides recuperados de animales controles. Esta inhibición no se debió a un efecto sobre la unión de las gametas, ya que no hubo diferencias

entre ambos grupos ni en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos, ni en el número promedio de espermatozoides unidos por ovocito. Este resultado estaría de acuerdo con una interferencia de los anticuerpos sobre la función de la proteína DE, ya que la misma participa en el proceso de fusión en un evento posterior a la unión de las gametas (141,142).

La presencia de anticuerpos en los fluidos reproductivos, la observación de que el suero inmune es capaz de reconocer a la proteína DE asociada a los espermatozoides (145), y la menor capacidad fertilizante de los espermatozoides provenientes de los animales inmunizados, sugieren que la inhibición de la fertilidad luego de la inmunización con DE podría involucrar la entrada de anticuerpos anti-DE al tracto reproductivo, y su interferencia con la capacidad del espermatozoide para fusionarse con el ovocito.

Los resultados hallados en la rata apoyan la posibilidad de que la inhibición de la fusión espermatozoide-ovocito por la presencia de anticuerpos contra el espermatozoide, podría ser responsable de algunos de los casos de infertilidad humana. En este sentido, es sabido que la inhibición de la fertilidad por anticuerpos involucra no sólo la aglutinación o inmovilización de los espermatozoides en el moco cervical (291-293), sino también un efecto inhibitorio sobre la fertilización. Si bien en este caso el paso más afectado es la interacción con la ZP, también se ha descrito la interferencia con el proceso de fusión de las gametas. Estudios de penetración de ovocitos de hámster sin ZP (HOPT), mostraron una correlación significativa entre la presencia de anticuerpos asociados al espermatozoide y la incapacidad de penetrar los ovocitos de hámster (294). Por otro lado, pudo observarse que la remoción de las inmunoglobulinas asociadas a espermatozoides de pacientes infértiles, es capaz de producir un aumento en el porcentaje de ovocitos de hámster penetrados por estos espermatozoides, mientras que la transferencia de estos anticuerpos a espermatozoides de donantes normales produce una

inhibición de la penetración en el mismo ensayo (266). Wolf et al. (267) inseminaron en el espacio perivitelino de ovocitos humanos (SUZI), espermatozoides con anticuerpos asociados a su superficie, encontrando que los espermatozoides con mayor cantidad de anticuerpos, presentaban una capacidad de fertilizar el ovocito menor que los espermatozoides con pocos anticuerpos unidos.

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo sugieren que la inhibición de la fertilidad en ratas inmunizadas con DE involucraría un bloqueo por anticuerpos de la proteína DE, afectando su función. La existencia de un mecanismo específico de inhibición de la fertilidad, permite inferir la relevancia de la proteína para la fertilidad de los animales, y por otro lado, apoya el potencial uso de la proteína DE para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad.

Capítulo 2: Inmunización con la proteína recombinante

Tal como se mencionara anteriormente, la capacidad de la proteína DE de inducir una respuesta inmune y una reducción de la fertilidad en ausencia de daños colaterales, sugiere la posibilidad de su potencial uso para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad. Un aspecto importante para la selección de moléculas para el desarrollo de dicho método, es la capacidad de las mismas de ser producidas en grandes cantidades. Teniendo en cuenta que es poco probable que el antígeno se obtenga de fuentes naturales, es necesario que el mismo pueda ser producido por síntesis química (péptidos sintéticos) o mediante la tecnología de ADN recombinante. Dado que en nuestro laboratorio se contaba con la proteína recombinante bacteriana, a continuación se estudió su capacidad de producir un efecto similar a la proteína nativa en animales inmunizados.

Los resultados obtenidos demuestran que al igual que lo observado para la proteína DE nativa, la inmunización de ratas macho y hembra con la proteína DE recombinante, es capaz de inducir la formación de anticuerpos específicos, como así también una inhibición significativa de la fertilidad en animales de ambos sexos, en ausencia de efectos secundarios.

Respecto a la formación de anticuerpos, la proteína recombinante fue capaz de producir una respuesta inmune más rápida y más elevada que la producida por la proteína nativa. Esto podría deberse a que se utilizó la proteína de fusión, acoplada a la MBP, lo que podría haber aumentado su inmunogenicidad. Sin embargo, a pesar de que los niveles séricos de anticuerpos anti-DE fueron significativamente mayores en los animales inmunizados con la proteína recombinante, no hubo diferencias en la inhibición de la fertilidad respecto a la obtenida en los animales inmunizados con la proteína nativa. Existe la posibilidad de que la proteína recombinante carezca de algunos epitopes conformacionales importantes para el bloqueo

inmunológico de la proteína presente sobre el espermatozoide. Considerando que los puentes disulfuro son importantes para la estructura de la proteína, y que la proteína recombinante presenta una deficiencia en la formación de estos puentes respecto a la proteína nativa, es posible que recDE carezca de algunos de los epitopes conformacionales de la proteína nativa. De hecho, la importancia de los puentes disulfuro y los epitopes conformacionales, ha sido descrita para la proteína de insectos "Antígeno 5", relacionada a la familia de proteínas CRISP (295,296). La falta de anticuerpos contra algunos epitopes críticos podría, por lo tanto, disminuir la capacidad inhibitoria del suero, a pesar de la presencia de una gran cantidad de anticuerpos contra otros epitopes.

Dado que para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad, es muy importante el estudio de los posibles efectos colaterales, se investigó la especificidad de la respuesta inmune. Para ello, los sueros de los animales inmunizados con recDE o MBP fueron enfrentados por Western blot a extractos de diferentes tejidos. Mientras que los sueros de los animales inmunizados con recDE reconocieron específicamente a la proteína en extractos epididimarios, los sueros anti-MBP no reconocieron ninguna proteína en ninguno de los tejidos estudiados. De esta manera, se confirma la especificidad en la respuesta inmune observada en inmunizaciones previas con la proteína nativa.

Los resultados obtenidos luego de inmunizar ratas con recDE, indican que la proteína DE recombinante, al igual que la nativa, es capaz de producir una reducción significativa de la fertilidad en animales de ambos sexos (33% en las hembras y 56% en los machos).

El empleo de proteínas recombinantes para reemplazar a la proteína nativa como inmunógeno, ha sido descripto para otros antígenos del espermatozoide en distintos modelos animales. Por un lado, la inmunización de ratones

hembra con la proteína intra-acrosomal sp56 recombinante, o con la proteína del espermatozoide FA-1 (297) recombinante fue capaz de producir una respuesta inmune, y una inhibición significativa de la fertilidad (62% (249) y 64% (253), respectivamente). Por otro lado, pese a que en su forma nativa las proteínas fertilina (248) y PH20 (152) produjeron una inhibición significativa de la fertilidad, las proteínas producidas en forma recombinante no tuvieron consecuencias sobre la fertilidad de los animales, a pesar de inducir una fuerte respuesta inmune (298,299).

La inhibición de la fertilidad producida luego de la inmunización con recDE, indica que la proteína recombinante podría sustituir a la proteína nativa en los próximos estudios de inmunización. En este sentido, y con el fin de estudiar la posible aplicación de DE para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad en el ser humano, el paso siguiente consistió en extender los estudios a un modelo animal más próximo al humano, tal como lo es el de primates no humanos.

Capítulo 3: Capacidad inmunogénica de la proteína ARP en primates no humanos

La identificación de la proteína humana homóloga a DE, denominada ARP (154,155), sugiere la potencial aplicación de la misma para el desarrollo de un método de regulación de la fertilidad en el hombre. Para tal fin, es importante que ARP, al igual que DE, participe en el proceso de fertilización y sea luego empleada en estudios de inmunización en un modelo de primates no humanos.

Respecto a la función de ARP, una serie de evidencias sugerían su participación en el proceso de fertilización: la homología existente entre ARP y DE (40%), su síntesis en el epidídimo, su asociación al espermatozoide durante la maduración y su localización en la cabeza del mismo. Resultados posteriores de nuestro laboratorio tales como 1) la permanencia de ARP sobre el espermatozoide luego del tratamiento con 2M NaCl, y 2) la inhibición de la penetración de ovocitos de hámster sin ZP por espermatozoides humanos expuestos a anticuerpos anti-ARP, apoyaban la participación de ARP en el proceso de fusión de gametas. Sin embargo, estos resultados provienen de un ensayo heterólogo, basado en la interacción de espermatozoides humanos con ovocitos de hámster. Dado que por razones éticas no es posible utilizar ovocitos humanos para ensayos de fertilización, como una aproximación al tema, se estudió la presencia de sitios complementarios para ARP en la superficie del ovocito humano. Para ello, ovocitos humanos sin ZP fueron incubados con proteína ARP recombinante o MBP, y luego sometidos a IFI. Los ovocitos expuestos a MBP, o bien no presentaron fluorescencia, u ocasionalmente mostraron una señal fluorescente muy débil y en áreas aisladas. Por su parte, los ovocitos incubados con ARP presentaron marcación fluorescente sobre toda su superficie. A diferencia de lo que ocurre

en la rata, no se observó en ningún caso la existencia de un área libre de fluorescencia. En la rata, esta área negativa coincide con la región de la membrana plasmática que recubre el huso meiótico, la cual carece de microvellosidades (141), y por la cual el espermatozoide raramente se fusiona con el ovocito (62,300). Sin embargo, el ovocito humano presenta características particulares respecto a otros mamíferos, dado que no existe un área libre de microvellosidades en la membrana plasmática (301). Esta falta de polarización estructural de la membrana se corresponde con una ausencia de polarización de la misma a nivel funcional, ya que no existirían regiones preferenciales sobre el ovocito para la fusión con el espermatozoide (301). Por lo tanto, la distribución de los sitios complementarios para ARP coincide con las propiedades fusogénicas del oolema humano. Estos resultados son importantes no sólo por las implicancias respecto de la participación de ARP en el proceso de fusión, sino porque además constituyen la primera evidencia sobre la existencia y localización de sitios complementarios específicos para una proteína del espermatozoide sobre el ovocito humano.

Como otra forma de investigar la importancia de ARP para la fertilidad humana, en nuestro laboratorio se ha iniciado un estudio con sueros de hombres inmunofértiles y con espermatozoides de pacientes infértiles sin causa aparente.

En el caso de pacientes inmunofértiles, se estudia la presencia de anticuerpos anti-ARP en suero o en plasma seminal. La presencia de dichos anticuerpos en los pacientes, a diferencia de personas de fertilidad probada, indicaría por un lado que ARP es inmunogénica e importante para la fertilidad, y por otro, que la presencia de anticuerpos anti-ARP no estaría asociada a ninguna patología, apoyando así la utilización de esta molécula para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad.

Por su parte, en el caso de pacientes infértiles por causa desconocida, el objetivo consiste en estudiar la localización y la cantidad de ARP presente

sobre los espermatozoides de estos individuos. Estudios previos han demostrado que una fracción de pacientes infértiles presenta una alteración tanto en la localización como en la cantidad de ciertos antígenos epididimarios sobre el espermatozoide (302). Un trabajo realizado para estudiar específicamente la proteína epididimaria P34H, involucrada en la unión del espermatozoide a la ZP (303,304), describió la existencia de ciertos casos de infertilidad sin causa aparente en los que existía una severa disminución en la cantidad de esta proteína unida a los espermatozoides (305). La asociación entre alguna alteración en la cantidad o localización de ARP, y la menor capacidad fertilizante de esos espermatozoides indicaría la importancia de la proteína para la fertilidad. Por otro lado, estos resultados podrían explicar algunos casos de infertilidad por causa desconocida y, al mismo tiempo, contribuir al desarrollo de una terapia para restablecer la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

Dada la alta homología existente entre la proteína ARP de macaco y la humana (84%), y la disponibilidad en nuestro laboratorio de la proteína humana recombinante, resultaba conveniente utilizar esta proteína para la inmunización de primates no humanos. Por otro lado, la inmunización con una proteína heteróloga confiere la ventaja de una inmunogenicidad mayor que la obtenida al inyectar la proteína propia de la especie inmunizada. Sin embargo, antes de inmunizar directamente los animales con la proteína humana, era importante comprobar que ambas proteínas estuvieran antigénicamente relacionadas. Para ello, se evaluó la capacidad de anticuerpos dirigidos contra la proteína humana, de reconocer a la proteína de macacos. La proteína recombinante humana fue entonces utilizada para inmunizar conejos y obtener un suero inmune contra la misma. Al mismo tiempo, nuestro laboratorio estableció una colaboración con el laboratorio de los Drs. Myles y Primakoff de la Universidad de California en Davis, que nos permitía obtener material del Centro Regional de Primates de California. Experimentos de IFI

sobre espermatozoides eyaculados de macacos (*Macaca fascicularis*) enviados desde dicho Centro de Primates, indicaron que mientras las células incubadas con el suero preinmune presentaron una marcación débil en el flagelo, los espermatozoides incubados con el suero inmune mostraron marca fluorescente en la región acrosomal de la cabeza, y en la pieza media de la cola, de mayor intensidad que la observada con el suero preinmune. Esta localización es similar a la que presenta la proteína en espermatozoides de *Macaca mullata* (174). Con el fin de examinar si la fluorescencia se debía al reconocimiento de la proteína ARP de macacos y no a una reacción cruzada con otras proteínas, se realizó un experimento de Western blot con extractos de tejido epididimario y testicular de macaco, utilizando el suero anti-ARP como primer anticuerpo. Los resultados indicaron el reconocimiento de una proteína con un peso molecular aparente de ≈ 30 kDa, presente sólo en el extracto epididimario. En conjunto, los resultados obtenidos por inmunofluorescencia y por Western blot indicarían que el suero contra la proteína ARP humana es capaz de reconocer a la proteína homóloga de macaco, sugiriendo que los anticuerpos producidos en los macacos contra la proteína humana podrían reconocer y unirse a la proteína de mono nativa. Por lo tanto, el paso siguiente consistió en estudiar la inmunogenicidad de ARP en un sistema de primates no humanos.

Para ello, macacos (*M. fascicularis*) mantenidos en el centro de primates de Davis, fueron inmunizados con la proteína ARP humana recombinante. Un grupo de cuatro animales fue inmunizado con la proteína ARP humana (hARP), mientras que dos animales inmunizados con MBP sirvieron de control, y dos animales más fueron inmunizados con la proteína ARP de *M. fascicularis* (expresada por el grupo del Dr. Overstreet, Davis)(mARP). Si bien todos los animales inmunizados desarrollaron altos títulos contra el antígeno respectivo, los títulos de los animales inyectados con la proteína humana fueron entre 1 y 2 órdenes superiores a los correspondientes a los animales inmunizados con la proteína de macaco. Tal como se discutiera anteriormente

para el caso de la inmunización con recDE, es posible que los altos títulos se deban a que la proteína humana está fusionada a MBP, que podría incrementar la inmunogenicidad del antígeno. Por otro lado, dos de los cuatro animales inmunizados con la proteína ARP humana, y uno de los dos animales inmunizados con MBP desarrollaron abscesos en el sitio de inyección, en tanto que ninguno de los dos animales inmunizados con la proteína de macaco produjo esta reacción. Si bien son pocos animales como para realizar una estadística, es probable que la presencia de la proteína bacteriana MBP produzca una reacción inmune exacerbada, responsable tanto del alto título de anticuerpos, como del absceso en el lugar de inyección. Dado que este tipo de reacciones no es aceptable para un método de aplicación humana, sería conveniente cambiar el sistema de expresión de la proteína recombinante.

La inmunización con una proteína heteróloga, tal como hARP en macacos, presenta la ventaja de una mayor inmunogenicidad que la inmunización con la proteína propia de la especie utilizada (mARP). A pesar de presentar un título mayor, los anticuerpos anti-hARP podrían reconocer a la proteína endógena con menor eficiencia que los anticuerpos anti-mARP, debido a que si bien muchos de los epitopes son compartidos entre ambas proteínas, otros, son propios de cada especie. Con el fin de comparar la eficiencia de los sueros anti-hARP y los sueros anti-mARP para reconocer a la proteína de macaco, se realizó la titulación de los sueros anti-hARP contra dicha proteína. No disponiendo de la proteína nativa purificada para utilizar en el ELISA, el ensayo se realizó con la proteína recombinante. Los títulos así obtenidos para los sueros anti-hARP resultaron entre 1 y 2 órdenes menores que aquellos obtenidos al titular los mismos sueros contra hARP, y del mismo orden (10^4) que los sueros anti-mARP. Por lo tanto, la ventaja de utilizar hARP en vez de mARP es sólo aparente, ya que la inmunización con hARP o con mARP

resulta igualmente eficiente en la inducción de anticuerpos capaces de reconocer a la proteína de macaco.

Con el fin de estudiar la capacidad de los anticuerpos inducidos de reconocer a la proteína ARP de mono nativa, dichos anticuerpos fueron enfrentados con extractos de espermatozoides en ensayos de Western blot. El reconocimiento de la proteína por los sueros de los animales inmunizados con hARP o mARP, pero no por un suero preinmune o por el proveniente de un animal inmunizado con MBP, indica que la reacción es específica, y sugiere que los anticuerpos serían capaces de reconocer a la proteína presente sobre los espermatozoides. Dado que para que ocurra esta interacción los anticuerpos deben acceder a los espermatozoides, y teniendo en cuenta que el tracto masculino no es tan permeable como el femenino al pasaje de anticuerpos, se estudió la presencia de anticuerpos en el plasma seminal. Los resultados indicaron que mientras los anticuerpos anti-MBP fueron detectados tanto en el animal inmunizado con dicha proteína como en los dos machos inyectados con hARP, los anticuerpos anti-mARP alcanzaron un valor considerable sólo en uno de los dos animales inmunizados con hARP. Respecto a la no detección de anticuerpos anti-ARP en plasma seminal de uno de los machos inmunizados con hARP, la misma podría deberse al relativamente bajo nivel sérico (10^3) de anticuerpos anti-mARP, junto con la dilución de los plasmas seminales utilizados, y el hecho de que los anticuerpos presentes en el plasma seminal representan aproximadamente un 1% de los niveles séricos (262,306).

El análisis del número, motilidad y morfología de los espermatozoides de mono obtenidos antes y después de la inmunización, indicó la ausencia de diferencias significativas, tanto en el animal inmunizado con MBP como en el inmunizado con hARP. Estos resultados sugieren la falta de efecto de la

inmunización sobre la espermatogénesis, y sobre el transporte y maduración epididimaria.

En conjunto, los resultados de este capítulo apoyan la participación de la proteína ARP en el proceso de fusión de gametas en el humano. Por otro lado, tanto la proteína ARP humana como de macaco, son capaces de producir una respuesta inmune en ambos sexos en un modelo de primates no humanos. La inmunogenicidad de la proteína en primates, junto con la capacidad de los anticuerpos anti-ARP de inhibir la fertilización *in vitro* (156), constituyen fuertes evidencias a favor de la potencial utilización de esta proteína para el desarrollo de un método para el control de la fertilidad. Para ello, se realizará una nueva inmunización en un grupo mayor de animales, evaluando la fertilidad de los mismos antes y después de la inmunización.

Los resultados previos de nuestro laboratorio junto con los obtenidos en este trabajo, indican que la proteína DE cumple con muchos de los requisitos de un candidato para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad: **1)** DE está clonada, secuenciada y caracterizada, **2)** se localiza sobre la superficie del espermatozoide, siendo accesible al bloqueo por los anticuerpos, **3)** participa del proceso de fertilización, más específicamente en la etapa de fusión de las gametas, **4)** la inmunización de ratas de ambos sexos con DE produce una respuesta inmune y una inhibición significativa y reversible de la fertilidad, **5)** esta inhibición ocurre por mecanismos específicos que no involucran daños en los órganos reproductivos, **6)** la proteína puede ser obtenida en forma recombinante, siendo dicha proteína inmunogénica y capaz de producir una reducción de la fertilidad, **7)** existe una proteína homóloga en el humano, ARP, que también participa en el proceso de fusión, y finalmente, **8)** dicha proteína es capaz de producir una respuesta inmune en un modelo de primates no humanos.

A diferencia de la inmunización de animales macho con antígenos de origen testicular como PH20 (153) y LDH-C4, (276), la inmunización con la proteína epididimaria DE no produce orquitis autoinmune. Esto sugiere que las proteínas epididimarias tendrían la especificidad necesaria para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad, apoyando la caracterización de otras proteínas epididimarias y el estudio del potencial uso de las mismas para esta aplicación.

Importancia del desarrollo de nuevos métodos de regulación de la fertilidad

Estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que el incremento constante y sostenido de la población mundial está asociado a la falta de suficientes opciones de métodos anticonceptivos, ya que un cuarto de los embarazos en todo el mundo es no deseado (307). Si bien la no utilización de métodos anticonceptivos se debe en parte a la falta de información al respecto y al acceso restringido a los mismos, una gran proporción de los casos se debe a la insatisfacción con los métodos disponibles actualmente. El número de parejas en edad reproductiva dispuesta a comenzar a utilizar métodos anticonceptivos, si sus necesidades fueran satisfechas completamente por algún método, ha sido estimado en más de 120 millones en todo el mundo (308). Se ha demostrado que la prevalencia y la continuidad en el uso de métodos anticonceptivos están directamente relacionada con el número de métodos disponibles, así como con la posibilidad de cambio del método (309). Dado que las necesidades de cada individuo están influenciadas por un gran número de factores culturales, religiosos, y personales, y que los requerimientos son diferentes en distintos momentos de la vida reproductiva, es necesario contar con una amplia variedad de métodos anticonceptivos. Esto es más crítico en el caso de la anticoncepción masculina que, a diferencia de la femenina, sólo cuenta en la

actualidad con tres opciones: *coitus interruptus*, condón, y vasectomía, con los problemas asociados de baja eficiencia o irreversibilidad. Este último es el caso de la vasectomía, ya que sólo existe un 40-50% de probabilidad de reversión de la fertilidad luego de la vaso-anastomosis. Por lo tanto, el desarrollo de un método inmunológico de control de la fertilidad, basado en una proteína del espermatozoide que participa en la fertilización, es una idea interesante con numerosas ventajas: 1) sería efectivo tanto en hombres como en mujeres, en cualquier momento de la etapa reproductiva; 2) al actuar sobre un evento tan específico y transitorio como la fertilización, no debería presentar efectos colaterales, tales como los desórdenes endócrinos y metabólicos asociados con los anticonceptivos esteroideos; 3) no requeriría procedimientos especializados de colocación o remoción, como en el caso de los dispositivos intrauterinos (DIUs); 4) sería reversible, a diferencia de la esterilización; 5) no demandaría la toma diaria de pastillas; 6) no presentaría los problemas de almacenamiento de los métodos de barrera; 7) no dependería de la estricta autodisciplina requerida por los métodos de planificación familiar "naturales".

Si un método con estas características pudiera ser desarrollado, es probable que tuviera una alta aceptación entre las personas que no desean utilizar, o que han discontinuado el uso, de alguno de los métodos ya existentes por los motivos antes señalados.

Un aspecto que ha generado desconfianza respecto a la utilización de métodos inmunológicos de regulación de la fertilidad, es la posible falta de control de la respuesta inmune, con la consecuente irreversibilidad. Sin embargo, los datos experimentales disponibles indican justamente lo contrario: las respuestas obtenidas son transitorias, necesitándose un estímulo periódico mediante inyecciones de refuerzo para mantener los títulos elevados (310). La duración pretendida del efecto anticonceptivo para estos métodos es de 6-12 meses, luego de una o dos aplicaciones (309). El

continuo avance y mejoramiento en el diseño e ingeniería de vacunas, permitirá ajustar el rendimiento de los métodos inmunológicos a dichos requerimientos.

La interacción de gametas involucra la participación de numerosas moléculas, algunas de las cuales han sido utilizadas en forma individual para inmunizar animales, produciendo una inhibición de la fertilidad en distintos grados. Sin embargo, es probable que el método de regulación de la fertilidad finalmente utilizado no se base en una única molécula, sino que requiera el uso de un "cocktail" de antígenos, para aumentar la eficiencia (293).

La utilización de antígenos involucrados en la fusión de gametas como base para un método inmunológico de regulación de la fertilidad ha sido cuestionada debido a que podría ser riesgoso intervenir sobre un evento tan tardío del proceso de fertilización (307). Sin embargo, teniendo en cuenta que la formulación utilizada probablemente consista de múltiples antígenos, resultaría conveniente dirigir el bloqueo inmunológico a distintas etapas del proceso de fertilización. Precisamente por ser el evento culminante del proceso de fertilización, la fusión de membranas representa la última instancia que puede ser inhibida antes de que el ovocito sea fertilizado. En este sentido, la presencia de anticuerpos capaces de inhibir la fusión espermatozoide-ovocito resultaría un importante mecanismo para bloquear aquellos espermatozoides que pudieran haber eludido la inhibición en etapas anteriores de la fertilización.

Aplicación del control inmunológico de la fertilidad en otras especies

Además de la posible aplicación en el humano, el control inmunológico de la fertilidad podría ser de utilidad en animales domésticos de compañía (perro, gato) o en especies salvajes. Existen especies sobreabundantes con consecuencias negativas sobre la salud humana, la agricultura o la ecología.

La epidemia de Hantavirus ocurrida entre 1992 y 1993 en sudoeste de los EE.UU. debido a la sobrepoblación del ratón reservorio del virus (*Peromyscus maniculatus*), las pérdidas económicas producidas por la gran reproducción de conejos europeos (*Oryctolagus cuniculus*) luego de su introducción en Australia, y la extinción de 15 especies de mamíferos luego de la introducción del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) en este mismo país, son algunos ejemplos de las consecuencias de la abundancia de algunas especies. El método tradicional de control de especies sobreabundantes mediante el aumento de su mortalidad no es eficiente en especies con una alta fertilidad y períodos de vida relativamente cortos. Habitualmente, las especies consideradas como plaga presentan una alta capacidad de reproducción. De este modo, una alternativa para el control de estas especies es la reducción de su fertilidad (311,312).

Si bien aún no hay datos experimentales disponibles respecto al impacto de estos métodos inmunológicos sobre el tamaño efectivo de la población, existen numerosos estudios iniciales sobre el potencial uso de esta metodología. La inmunización con antígenos del espermatozoide o de la ZP ha sido ensayada en especies tan diversas como alces (313), elefantes (314), ciervos (315), burros (316), focas (317,318), ratones (319), conejos (298,299,320), zorros rojos (321,322) y ardillas grises (323).

Los requerimientos de una vacuna anticonceptiva para su aplicación en animales sobreabundantes, son diferentes de los de una vacuna de aplicación en animales domésticos o en el humano. Mientras que en el último caso, el método debe ser reversible, esto no es un requerimiento para el control de animales considerados como peste, sino más bien una deficiencia. Otro punto que necesita ser resuelto, consiste en la forma de aplicación del inmunógeno. Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han realizado mediante la inmunización individual y, a veces, reiterada de los animales. Esto resultaría poco práctico en especies salvajes sobreabundantes, por lo que para superar este inconveniente se están desarrollando otros sistemas de distribución del

antígeno, como cepas atenuadas de bacterias (322,324) o virus (325-328) que, además de poder ser administrados en forma oral a través del alimento, sirven para proteger al antígeno y actúan como adyuvantes biológicos.

En nuestro país, esta metodología podría ser aplicable al control de las especies portadoras del virus Junín (*Arenaviridae*), agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, comúnmente conocida como “mal de los rastrojos”. Esta enfermedad afecta cada año a cientos o miles de trabajadores agrícolas, y presenta una tasa de mortalidad del 5-30 %. Los reservorios son roedores que diseminan los virus a través de la orina y la saliva, mayoritariamente de las especies *Calomys musculus* y *C. laucha*. Estas especies se distribuyen en distintos tamaños poblacionales en todo el país hacia el norte del río Negro, aunque no todos están infectados. El área endémica abarca áreas de Buenos Aires, Santa Fe, La Pampa y Córdoba.

Con el fin de disminuir la incidencia de esta enfermedad, se busca disminuir las poblaciones de roedores a valores sanitariamente aceptables, para reducir la probabilidad de que el ser humano pueda entrar en contacto con ellos, o con sus productos. Dado que estos animales son muy prolíficos, los métodos habituales para reducir el tamaño poblacional son poco eficientes a lo largo del tiempo.

Si bien recientemente, la Organización Panamericana de la Salud ha desarrollado la vacuna denominada “CANDID 1”, eficiente en un 95%, la alta tasa de mutación de los virus a ARN indica que el control de la población de roedores que sirven de reservorio sería una buena medida complementaria al uso de la vacuna. La existencia de un homólogo a DE en el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) que participa del proceso de fertilización (143), junto con la reducción de la fertilidad en ratas de ambos sexos inmunizadas con DE, y la existencia de vectores virales probados con éxito en el ratón (319,325), sugieren que la proteína DE podría ser de utilidad para el control

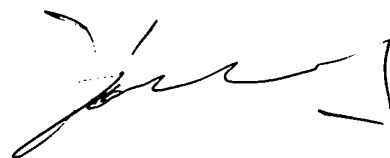
de roedores salvajes, portadores del virus Junín y de otros virus y bacterias patogénicos para el hombre.

CONCLUSIÓN

En conjunto, el presente trabajo ha tenido dos objetivos principales. La primera parte ha estado centrada en el estudio de la importancia de la estructura de la proteína DE para su función, mientras que la segunda parte ha estado dedicada al estudio del potencial uso de esta proteína para el desarrollo de un método inmunológico de regulación de la fertilidad. Los resultados obtenidos y descriptos en este trabajo de Tesis contribuirán a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de fusión de gametas, como así también al desarrollo de nuevos y más seguros métodos de regulación de la fertilidad tanto en animales como en el hombre.



Lic. Diego Ellerman



Dra. Patricia S. Cuasnicú

REFERENCIAS

1. Yanagimachi R (1994) Mammalian Fertilization. En: Knobil E, Neill JD, (eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2nd, New York: Raven Press, 189-317.
2. Byskov A (1982) Germ cells and fertilization. En: Austin CR, Short RV, (eds.) *Reproduction in Mammals*. Cambridge: Cambridge University Press, 1-16.
3. Baker TS (1982) Oogenesis and ovulation. En: Austin CR, Short RV, (eds.) *Reproduction in mammals*. Cambridge: Cambridge University Press, 17-45.
4. Setchell B (1982) Spermatogenesis and spermatozoa. En: Austin CR, Short RV, (eds.) *Reproduction in mammals*. Cambridge: Cambridge University Press, 63-101.
5. Bleil JD, Wassarman PM. (1980) Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Dev Biol* **76**, 185-202.
6. Greve JM, Wassarman PM. (1985) Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J Mol Biol* **181**, 253-264.
7. Wassarman P, Mortillo S. (1991) Structure of the mouse egg extracellular coat, the zona pellucida. *Int Rev Cytol* **109**
8. Wassarman PM (1988) Zona pellucida glycoproteins. *Annu Rev Biochem* **57**, 415-442.
9. Orgebin-Crist MC, Fournier-Delpech S. (1982) Sperm-egg interaction. Evidence for maturational changes during epididymal transit. *J Androl* **3**, 429-433.
10. Cooper TG The epididymis, sperm maturation and fertilization. Berlin: Springer Verlag; (1986)
11. Austin CR (1985) Sperm maturation in the male and female genital tracts. En: Metz CB, Monroy A, (eds.) *Biology of Fertilization*, Vol.2. New York: Academic Press, 121-155.
12. Bedford JM, Hoskins DD. (1990) The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. En: Lamming GE, (eds.) *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4th, London: Churchill Livingstone, 379
13. Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DNR. (1993) The epididymis and sperm maturation: A perspective. *Reprod Fertil Dev* **5**, 361-381.
14. Oliphant G, Reynolds AB, Thomas TS. (1985) Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am J Anat* **174**, 269-283.
15. Austin CR (1951) Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res [B]* **4**, 581-596.
16. Chang MC (1951) Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* **168**, 697-698.
17. Austin CR (1952) The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* **170**, 326
18. Zarintash RJ, Cross NL (1996) Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod* **55**, 19-24.

19. Go KJ, Wolf DP. (1985) Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* **32**, 145-153.
20. Cross NL (1998) Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod* **59**, 7-11.
21. Ravnik SE, Zarutskie PW, Muller CH. (1992) Purification and characterization of a human follicular fluid lipid transfer protein that stimulates human sperm capacitation. *Biol Reprod* **47**, 1126-1133.
22. Ravnik SE, Albers JJ, Muller CH. (1993) A novel view of albumin-supported sperm capacitation: role of lipid transfer protein-I. *Fertil Steril* **59**, 629-638.
23. Fraser LR, Harrison RAP, Herod JE. (1990) Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J Reprod Fertil* **89**, 135-148.
24. Miller DJ, Ax RL. (1990) Carbohydrates and fertilization in mammals. *Mol Reprod Dev* **26**, 184-198.
25. Oliphant G (1976) Removal of sperm-bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of acrosome reaction. *Fertil Steril* **9**, 404-414.
26. Marquant-Le Guienne B, De Almeida M. (1986) Role of guinea pig sperm autoantigens in capacitation and acrosome reaction. *J Reprod Fertil* **77**, 337-345.
27. Focarelli R, Giuffrida A, Rosati F. (1995) Changes in the sialoglycoconjugate distribution on the human sperm surface during in vitro capacitation: partial purification of a 20 kDa sialoglycoprotein of capacitated spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **2**, 2755-2759.
28. Fusi FM, Bronson RA. (1992) Sperm surface fibronectin expression following capacitation. *J Androl* **13**, 28-35.
29. Cohen-Dayag A, Eisenbach M. (1994) Potential assays for sperm capacitation in mammals. *Am J Physiol Cell Physiol* **267**, C1167-C1176.
30. De Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol Hum Reprod* **3**, 175-194.
31. Visconti PE, Kopf GS. (1998) Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod* **59**, 1-6.
32. DeMott RP, Suarez SS. (1992) Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod* **46**, 779-785.
33. Stauss CR, Votta TJ, Suarez SS. (1995) Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* **53**, 1280-1285.
34. Fraser LR (1998) Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod* **13 Suppl 1**, 9-19.
35. Bleil JD, Wassarman PM. (1980) Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing sperm receptor activity. *Cell* **20**, 873-882.

36. Bleil JD, Wassarman PM. (1983) Sperm-egg interaction in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol* **95**, 317-324.
37. Leyton L, Saling P. (1989) Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J Cell Biol* **108**, 2163-2168.
38. Yanagimachi R (1981) Mechanisms of fertilization in mammals. En: Mastroianni L, Biggers JD, (eds.) *Fertilization and embryonic development in vitro*.. New York: Plenum Press, 81-182.
39. Yanagimachi R (1988) Sperm-egg fusion. En: Duzgunes N, Bronner F, (eds.) *Current topics in membranes and transport*. Orlando, FL: Academic Press, 3-43.
40. Bleil JD, Wassarman PM. (1986) Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. *J Cell Biol* **102**, 1363-1371.
41. Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM. (1988) Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* **128**, 376-385.
42. Mortillo S, Wassarman PM. (1991) Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* **113**, 141-149.
43. Florman HM, Wassarman PM. (1985) O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. *Cell* **41**, 313-324.
44. Florman HM, Bechtol KB, Wassarman PM. (1984) Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. *Dev Biol* **106**, 243-255.
45. Shur BD, Hall NG. (1982) A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* **95**, 574-579.
46. Lopez LC, Shur BD. (1987) Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J Cell Biol* **105**, 1663-1670.
47. Lu QX, Shur BD. (1997) Sperm from β 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development* **124**, 4121-4131.
48. Bookbinder LH, Cheng A, Bleil JD. (1995) Tissue- and species-specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* **269**, 86-89.
49. Leyton L, Tomes C, Saling P. (1995) LL95 monoclonal antibody mimics functional effects of ZP3 on mouse sperm: Evidence that the antigen recognized is not hexokinase. *Mol Reprod Dev* **42**, 347-358.
50. Burks DJ, Carballada R, Moore HDM, Saling PM. (1995) Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* **269**, 83-86.
51. Gaddum-Rosse P (1985) Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs? *Am J Anat* **174**, 347-356.

52. Shalgi R, Phillips DM. (1980) Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. *J Ultrastruct Res* **71**, 154-161.
53. Myles DG (1993) Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Dev Biol* **158**, 35-45.
54. Yanagimachi R, Phillips DM. (1984) The status of acrosomal caps of hamster spermatozoa immediately before fertilization *in vitro*. *Gam Res* **9**, 1-19.
55. Yanagimachi R (1978) Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals. *Biol Reprod* **19**, 949-958.
56. Arts EGJM, Kuiken J, Jager S, Hoekstra D. (1993) Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa- -Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur J Biochem* **217**, 1001-1009.
57. Vigil P (1989) Gamete membrane fusion in hamster with reacted equatorial segment. *Gam Res* **23**, 203-213.
58. Wolf DP, Inoue M, Stark RA. (1976) Penetration of zona-free mouse ova. *Biol Reprod* **15**, 213-221.
59. Barros C, Berrios M. (1977) Is the activated spermatozoa really capacitated? *J Exp Zool* **201**, 65-72.
60. Yanagimachi R, Noda YD. (1970) Physiological changes in the post-nuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. *J Ultrastruc Res* **31**, 486-493.
61. Wolf DE, Ziomek CA. (1983) Regionalization and lateral diffusion of membrane proteins in unfertilized and fertilized mouse eggs. *J Cell Biol* **96**, 1786-1790.
62. Johnson MH, Eager D, Muggleton-Harris A, Grave HM. (1975) Mosaicism in organisation of concanavalin A receptors on surface membranes of mouse eggs. *Nature* **257**, 321-322.
63. Shalgi R, Phillips DM. (1980) Mechanics of *in vitro* fertilization in the hamster. *Biol Reprod* **71**, 154-161.
64. Phillips DM, Shalgi R. (1980) Sperm penetration into rat ova fertilized *in vivo*. *J Ultrastr Res* **72**, 1-12.
65. Bedford JM, Cooper GW. (1978) Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs. En: Poste G, Nicolson GL, (eds.) *Membrane surface reviews (Membrane fusion)*. Amsterdam: North-Holland, 65-125.
66. Hinkley RE, Wright BD, Lynn JW. (1986) Rapid visual detection of sperm-egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Dev Biol* **118**, 148-154.
67. Conover JC, Gwatkin RBL. (1988) Pre-loading of mouse oocytes with DNA-specific fluorochrome (Hoechst 33342) permits rapid detection of sperm-oocyte fusion. *J Reprod Fertil* **82**, 681-690.

68. Yanagimachi R (1984) Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gam Res* **10**, 187-232.
69. Hanada A, Chang MC. (1972) Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol Reprod* **6**, 300-309.
70. Miyazaki S, Hashimoto N, Yoshimoto Y, Kishimoto T, Igusa Y, Hiramoto Y. (1986) Temporal and spatial dynamics of the periodic increase in intracellular free calcium at fertilization in golden hamster eggs. *Dev Biol* **118**, 259-267.
71. Hatanaka Y, Nagai T, Tobita T, Nakano M. (1992) Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization *in vitro*. *J Reprod Fertil* **95**, 431-440.
72. Shabanowitz RB, O'Rand MG. (1988) Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J Reprod Fertil* **82**, 151-161.
73. Moller CC, Wassarman PM. (1989) Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev Biol* **132**, 103-112.
74. Wassarman PM (1987) The biology and chemistry of fertilization. *Science* **235**, 553-554.
75. Cherr GN, Drobnis EZ, Katz DF. (1988) Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J Exp Zool* **246**, 81-93.
76. Boldt J, Howe AM, Preble J. (1988) Enzymatic alteration of the ability of mouse egg plasma membrane to interact with sperm. *Biol Reprod* **39**, 19-27.
77. Boldt J, Gunter LE, Howe AM. (1989) Characterization of cell surface polypeptides of unfertilized, fertilized, and protease-treated zona-free mouse eggs. *Gam Res* **23**, 91-101.
78. Kellom T, Vick A, Boldt J. (1992) Recovery of penetration ability in protease-treated zona-free mouse eggs occurs coincident with recovery of a cell surface 94 kD protein. *Mol Reprod Dev* **33**, 46-52.
79. Horvath PM, Kellom T, Caulfield J, Boldt J. (1993) Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* **34**, 65-72.
80. Hirao Y, Yanagimachi R. (1978) Temperature-dependence of sperm-egg fusion and post-fusion events in hamster fertilization. *J Exp Zool* **205**, 433-438.
81. Ponce RH, Yanagimachi R, Urch UA, Yamagata T, Ito M. (1993) Retention of hamster oolemma fusibility with spermatozoa after various enzyme treatments: a search for the molecules involved in sperm-egg fusion. *Zygote* **1**, 163-171.
82. Bronson RA, Fusi FM. (1990) Sperm-oolemmal interaction: role of Arg-Gly-Asp (RGD) adhesion peptide. *Fertil Steril* **54**, 527-529.
83. Bronson RA, Fusi FM. (1990) Evidence that an Arg-Gly-Asp adhesion sequence plays a role in mammalian fertilization. *Biol Reprod* **43**, 1019-1025.

84. Fusi FM, Vignali M, Busacca M, Bronson RA. (1992) Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol Reprod Dev* **31**, 215-222.
85. Evans JP, Schultz RM, Kopf GS. (1995) Identification and localization of integrin subunits in oocytes and eggs of the mouse. *Mol Reprod Dev* **40**, 211-220.
86. Almeida EAC, Huovila A-PJ, Sutherland AE, et al. (1995) Mouse egg integrin $\alpha 6 \beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell* **81**, 1095-1104.
87. Chen MS, Tung KS, Coonrod SA, et al. (1999) Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11830-11835.
88. Maecker HT, Todd SC, Levy S. (1997) The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* **11**, 428-442.
89. Tachibana I, Hemler ME. (1999) Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol* **146**, 893-904.
90. Miyado K, Yamada G, Yamada S, et al. (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**, 321-324.
91. Le Naour F, Rubinstein E, Jasmin C, Prenant M, Boucheix C. (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* **287**, 319-321.
92. Kaji K, Oda S, Shikano T, et al. (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat Genet* **24**, 279-282.
93. Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. (2000) Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin $\alpha 6 \beta 1$ and is CD9-dependent *J Cell Biol* **149**, 1289-1296.
94. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **282**, 938-941.
95. Coonrod SA, Naaby-Hansen S, Shetty J, Shibahara H, Chen M, White JM, Herr JC. (1999) Treatment of mouse oocytes with PI-PLC releases 70-kDa (pl 5) and 35- to 45-kDa (pl 5.5) protein clusters from the egg surface and inhibits sperm-oolemma binding and fusion. *Dev Biol* **207**, 334-349.
96. Coonrod S, Naaby-Hansen S, Shetty J, Herr J. (1999) PI-PLC releases a 25-40 kDa protein cluster from the hamster oolemma and affects the sperm penetration assay *Mol Hum Reprod* **5**, 1027-33.
97. Saling PM, Irons G, Waibel R. (1985) Mouse sperm antigens that participate in fertilization. I. Inhibition of sperm fusion with the egg plasma membrane using monoclonal antibodies. *Biol Reprod* **33**, 515-526.
98. Okabe M, Yagasaki M, Oda H, Matzno S, Kohama Y, Mimura T. (1988) Effect of monoclonal anti-mouse sperm antibody (OBF13) on the interaction of mouse sperm with zona-free mouse and hamster eggs. *J Reprod Immunol* **13**, 211-219.

99. Kawai Y, Hama T, Mayumi T, et al. (1989) Flow cytometric analysis of mouse sperm using monoclonal anti-sperm antibody OBF13. *J Reprod Immunol* **16**, 71-82.
100. Okabe M, Adashi T, Takada K, et al. (1987) Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate *in vitro*. *J Reprod Immunol* **11**, 91-100.
101. Focarelli R, Giuffrida A, Capparelli S, et al. (1998) Specific localization in the equatorial region of gp20, a 20 kDa sialoglycoprotein of the capacitated human spermatozoon acquired during epididymal transit which is necessary to penetrate zona-free hamster eggs. *Mol Hum Reprod* **4**, 119-125.
102. Kirchhoff C (1996) CD52 is the "major maturation associated" sperm membrane antigen. *Mol Hum Reprod* **2**, 9-17.
103. Diekman AB, Norton EJ, Klotz KL, et al. (1999) N-linked glycan of a sperm CD52 glycoform associated with human infertility. *FASEB J* **13**, 1303-1313.
104. Toshimori K, Tanii I, Araki S, Oura C. (1992) Characterization of the antigen recognized by a monoclonal antibody MN9: Unique transport pathway to the equatorial segment of sperm head during spermiogenesis. *Cell Tissue Res* **270**, 459-468.
105. Toshimori K, Saxena DK, Tanii I, Yoshinaga K. (1998) An MN9 antigenic molecule, equatorin, is required for successful sperm- oocyte fusion in mice. *Biol Reprod* **59**, 22-29.
106. Okabe M, Nagira M, Kawai Y, Matzno S, Mimura T, Mayuni T. (1990) A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. *Fertil Steril* **54**, 1112-1120.
107. Okabe M, Ying X, Nagira M, Ikawa M, Kohama Y, Mimura T, Tanaka K. (1992) Homology of an acrosome-reacted sperm-specific antigen to CD46. *J Pharmacobio-Dyn* **15**, 455-459.
108. Primakoff P, Hyatt H, Tredick-Kline J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol* **104**, 141-149.
109. Yuan RY, Primakoff P, Myles DG. (1997) A role for the disintegrin domain of cyritestin, a sperm surface protein belonging to the ADAM family, in mouse sperm-egg plasma membrane adhesion and fusion. *J Cell Biol* **137**, 105-112.
110. Blobel CP, Wolfsberg TG, Turck CW, Myles DG, Primakoff P, White JM. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature* **356**, 248-252.
111. Wolfsberg TG, Bazan JF, Blobel CP, Myles DG, Primakoff P, White JM. (1993) The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: Structural, functional, and evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 10783-10787.
112. Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG, White JM. (1995) ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding

- membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol* **169**, 378-383.
113. Wolfsberg TG, Primakoff P, Myles DG, White JM. (1995) ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain: Multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* **131**, 275-278.
 114. Primakoff P, Myles DG. (2000) The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* **16**, 83-87.
 115. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. (1994) Germ cells and fertilization. *Molecular biology of the cell*. 3rd. New York & London: Garland Publishing, Inc. 1032-1033.
 116. Jury JA, Frayne J, Hall L. (1997) The human fertilin α gene is non-functional: Implications for its proposed role in fertilization. *Biochem J* **321**, 577-581.
 117. Jury JA, Frayne J, Hall L. (1998) Sequence analysis of a variety of primate fertilin alpha genes: evidence for non-functional genes in the gorilla and man. *Mol Reprod Dev* **51**, 92-97.
 118. Cho C, Ge H, Branciforte D, Primakoff P, Myles DG. (2000) Analysis of mouse fertilin in wild-type and fertilin beta(-/-) sperm: evidence for C-terminal modification, alpha/beta dimerization, and lack of essential role of fertilin alpha in sperm-egg fusion. *Dev Biol* **222**, 289-295.
 119. Myles DG, Kimmel LH, Blobel CP, White JM, Primakoff P. (1994) Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4195-4198.
 120. Cho C, Bunch DO, Faure JE, Goulding EH, Eddy EM, Primakoff P, Myles DG. (1998) Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta *Science* **281**, 1857-1859.
 121. Heinlein UAO, Wallat S, Senftleben A, Lemaire L. (1994) Male germ cell-expressed mouse gene *TAZ83* encodes a putative, cysteine-rich transmembrane protein (*cyrtestin*) sharing homologies with snake toxins and sperm-egg fusion proteins. *Dev Growth Diff* **36**, 49-58.
 122. Linder B, Heinlein UAO. (1997) Decreased *in vitro* fertilization efficiencies in the presence of specific cyritestin peptides. *Dev Growth Diff* **39**, 243-247.
 123. Linder B, Bammer S, Heinlein UAO. (1995) Delayed translation and posttranslational processing of cyritestin, an integral transmembrane protein of the mouse acrosome. *Exp Cell Res* **221**, 66-72.
 124. Shamsadin R, Adham IM, Nayemia K, Heinlein UA, Oberwinkler H, Engel W. (1999) Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol Reprod* **61**, 1445-1451.
 125. Cameo MS, Blaquier JA. (1976) Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J Endocr* **69**, 317-324.
 126. Brooks DE, Higgins SJ. (1980) Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J Reprod Fertil* **59**, 363-375.

127. Lea OA, Petrusz P, French FS. (1978) Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG): A sperm coating secreted by the rat epididymis. *Int Androl Supp* **2**, 592-607.
128. Faye JC, Duguet L, Mazzula M, Bayard F. (1980) Purification, radioimmunoassay, and immunohistochemical localization of a glycoprotein produced by the rat epididymis. *Biol Reprod* **23**, 423-432.
129. Jones R, Brown CR, von Glós KI, Parker MG. (1980) Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. Characterization of androgen-dependent and testicular fluid-dependent proteins. *Biochem J* **206**, 161-164.
130. Wong PYD, Tsang AYF, Lee WM. (1981) Origin of the luminal fluid proteins of the rat epididymis. *Int J Androl* **4**, 331-341.
131. Brooks DE, Means AR, Wright EJ, Singh SP, Tiver KK. (1986) Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *Eur J Biochem* **161**, 13-18.
132. Charest NJ, Joseph DR, Wilson EM, French FS. (1988) Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acid for an androgen-regulated epididymal protein: sequence homology with metalloproteins. *Mol Endo* **2**, 999-1004.
133. Garberi JC, Kohane AC, Cameo MS, Blaquier JA. (1979) Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. *Mol Cell Endocrinol* **13**, 73-82.
134. Garberi JC, Fontana JD, Blaquier JA. (1982) Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. *Int J Androl* **5**, 619-626.
135. Kohane AC, Cameo MS, Piñeiro L, Garberi JC, Blaquier JA. (1980) Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol Reprod* **23**, 181-187.
136. Kohane AC, Gonzalez Echeverria F, Piñeiro L, Blaquier JA. (1980) Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol Reprod* **23**, 737-742.
137. Cameo MS, Gonzalez Echeverria MF, Blaquier JA, Burgos MH. (1986) Immunochemical localization of epididymal protein DE on rat spermatozoa: Its fate after induced acrosome reaction. *Gam Res* **15**, 247-258.
138. Cohen DJ, Rochwerger L, Ellerman DA, Morgenfeld M, Busso D, Cuasnicu PS. (2000) Relationship between the association of rat epididymal protein DE with spermatozoa and the behavior and function of the protein. *Mol Reprod Dev* **56**, 180-188.
139. Cuasnicu PS, Gonzalez Echeverria F, Piazza A, Blaquier JA. (1984) Antibody against epididymal glycoprotein blocks fertilizing ability in rats. *J Reprod Fertil* **72**, 467-471.
140. Rochwerger L, Cuasnicu PS. (1992) Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vivo and in vitro capacitation. *Mol Reprod Dev* **31**, 34-41.
141. Rochwerger L, Cohen DJ, Cuasnicu PS. (1992) Mammalian sperm-egg fusion: The rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev Biol* **153**, 83-90.

142. Cohen DJ, Munuce MJ, Cuasnicú PS. (1996) Mammalian sperm-egg fusion: The development of rat oolemma fusibility during oogenesis involves the appearance of binding sites for sperm protein "DE". *Biol Reprod* **55**, 200-206.
143. Cohen DJ, Ellerman DA, Cuasnicú PS. (2000) Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol Reprod* **63**, 462-468.
144. Cuasnicú PS, Conesa D, Rochwerger L. (1990) Potential contraceptive use of an epididymal protein that participates in fertilization. En: Alexander NJ, Griffin D, Spieler JM, et al, editores. *Gamete interaction. Prospects for immunocontraception*. New York: Wiley-Liss, 143-153.
145. Perez Martinez S, Conesa D, Cuasnicú PS. (1995) Potential contraceptive use of epididymal proteins: evidence for the participation of specific antibodies against rat epididymal protein DE in male and female fertility inhibition. *J Reprod Immunol* **29**, 31-45.
146. Naz RK (1999) Vaccine for contraception targeting sperm. *Immunol Rev* **171**, 193-202.
147. Diekman AB, Herr JC. (1997) Sperm antigens and their use in the development of an immunocontraceptive. *Am J Reprod Immunol* **37**, 111-117.
148. Raghupathy R, Shaha C, Gupta SK. (1989) Autoimmunity to sperm antigens *Curr Opin Immunol* **2**, 757-760.
149. Kay DJ, Clifton V, Taylor JS, Boettcher B. (1993) Anti-sperm antibodies and semen profiles in re-anastomosed men *Reprod Fertil Dev* **5**, 135-139.
150. Primakoff P, Hyatt H, Myles DG. (1985) A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. *J Cell Biol* **101**, 2239-2244.
151. Hunnicutt CR, Primakoff P, Myles DG. (1996) Sperm surface protein PH-20 is bifunctional: One activity is a hyaluronidase and a second, distinct activity is required in secondary sperm-zona binding. *Biol Reprod* **55**, 80-86.
152. Primakoff P, Lathrop WF, Woolman L, Cowan A, Myles D. (1988) Fully effective contraception in male and female guinea pigs immunized with the sperm protein PH-20. *Nature* **335**, 543-546.
153. Tung KSK, Primakoff P, Woolman-Gamer L, Myles DG. (1997) Mechanism of infertility in male guinea pigs immunized with sperm PH-20. *Biol Reprod* **56**, 1133-1141.
154. Hayashi M, Fujimoto S, Takano H, et al. (1996) Characterization of a human glycoprotein with potential role in sperm-egg fusion: cDNA cloning, immunohistochemical localization, and chromosomal assignment of the gene (AEGL1). *Genomics* **32**, 367-374.
155. Kratzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning WD. (1996) The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem* **236**, 827-836.

156. Cohen DJ, Ellerman DA, Morgenfeld M, Hayashi M, Kasahara M, Cuasnicu PS. Participation of human epididymal protein "ARP" in sperm-egg fusion. [Abstract] Proc of the 8th International Symposium on Spermatology (1998) 88
157. Kohane AC, Piñeiro L, Blaquier JA. (1983) Androgen-controlled synthesis of specific protein in the rat epididymis. *Endocrinology* **112**, 1590-1596.
158. Kaplan R, Kraicer PF. (1978) Effect of elevated calcium concentration on fertilization of rat oocytes in vitro. *Gam Res* **1**, 281-285.
159. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
160. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350-4360.
161. Shalgi R, Kaplan R, Nebel L, Kraicer PF. (1981) The male factor in fertilization of rat eggs in vitro. *J Exp Zool* **217**, 319-402.
162. Nicolson G, Yanagimachi H, Yanagimachi R. (1975) Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zona pellucida and plasma membrane of mammalian egg. *J Cell Biol* **66**, 263-273.
163. Sarason RL, Vandevort CA, Mader DR, Overstreet JW. (1991) The use of nonmetal electrodes in electroejaculation of restrained but unanesthetized macaques. *J Med Primatol* **20**, 122-5.
164. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall. RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
165. Haendler B, Kratzschmar J, Theuring F, Schleuning WD. (1993) Transcripts for cysteine-rich secretory protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the novel related CRISP-3 are expressed under androgen control in the mouse salivary gland. *Endocrinology* **133**, 192-198.
166. Hardy DM, Huang TTF, Driscoll WJ, Tung KSK, Wild GC. (1988) Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* **38**, 423-437.
167. O'Bryan MK, Loveland KL, Herszfeld D, McFarlane JR, Hearn MT, De Kretser DM. (1998) Identification of a rat testis-specific gene encoding a potential rat outer dense fibre protein. *Mol Reprod Dev* **50**, 313-322.
168. Mizuki N, Kasahara M. (1992) Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol Cell Endocrinol* **89**, 25-32.
169. Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Topfer-Petersen E. (1998) Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim Biophys Acta* **1387**, 206-216.

170. Mochca-Morales J, Martin BM, Possani LD. (1990) Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (mexican beaded lizard) venom. *Toxicon* **28**, 299-309.
171. Morissette J, Kratzschmar J, Haendler B, et al. (1995) Primary structure and properties of helothermine, a peptide that blocks ryanodine receptors. *Biophys J* **68**, 2280-2288.
172. Chang TY, Mao SH, Guo YW. (1997) Cloning and expression of a cysteine-rich venom protein from *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan habu). *Toxicon* **35**, 879-888.
173. Eberspaecher U, Roosterman D, Krätzschmar J, et al. (1995) Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): Isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Mol Reprod Dev* **42**, 157-172.
174. Sivashanmugam P, Richardson RT, Hall S, Hamil KG, French FS, O'Rand MG. (1999) Cloning and characterization of an androgen-dependent acidic epididymal glycoprotein/CRISP1-like protein from the monkey. *J Androl* **20**, 384-393.
175. Maeda T, Sakashita M, Ohba Y, Nakanishi Y. (1998) Molecular cloning of the rat Tpx-1 responsible for the interaction between spermatogenic and Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 140-146.
176. Kasahara M, Gutknecht J, Brew K, Spurr N, Goodfellow PN. (1989) Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* **5**, 527-534.
177. Foster JA, Gerton GL. (1996) Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Mol Reprod Dev* **44**, 221-229.
178. Rigden J, Coutts R. (1988) Pathogenesis-related proteins in plants. *Trends Genet* **4**, 87-89.
179. Fang KS, Vitale M, Fehlner P, King TP. (1988) cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5. *Proc Natl Acad Sci USA* **62**, 247-265.
180. Lu G, Villalba M, Coscia MR, Hoffman DR, King TP. (1993) Sequence analysis and antigenic cross-reactivity of a venom allergen, antigen 5, from hornets, wasps, and yellow jackets. *J Immunol* **150**, 2823-2830.
181. Schuren FH, Asgeirsdottir SA, Kothe EM, Scheer JM, Wessels JG. (1993) The Sc7/Sc14 gene family of *S. comune* codes for extracellular proteins specifically expressed during fruit-body formation. *J Gen Microbiol* **139**, 2083-2090.
182. Hawdon JM, Jones BF, Hoffman DR, Hotez PJ. (1996) Cloning and characterization of Ancylostoma-secreted protein. A novel protein associated with the transition to parasitism by infective hookworm larvae. *J Biol Chem* **271**, 6672-6678.
183. Hawdon JM, Narasimhan S, Hotez PJ. (1999) Ancylostoma secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum*. *Mol Biochem Parasitol* **99**, 149-165.
184. Bin Z, Hawdon J, Qiang S, et al. (1999) Ancylostoma secreted protein 1 (ASP-1) homologues in human hookworms. *Mol Biochem Parasitol* **98**, 143-149.

185. Murphy EV, Zhang Y, Zhu W, Biggs J. (1995) The human glioma pathogenesis-related protein is structurally related to plant pathogenesis-related proteins and its gene is expressed specifically in brain tumors. *Gene* **159**, 131-135.
186. Rich T, Chen P, Furman F, Huynh N, Israel MA. (1996) RTVP-1, a novel human gene with sequence similarity to genes of diverse species, is expressed in tumor cell lines of glial but not neuronal origin. *Gene* **180**, 125-130.
187. Koshikawa N, Nakamura T, Tsuchiya N, Isaji M, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. (1996) Purification and identification of a novel and four known serine proteinase inhibitors secreted by human glioblastoma cells. *J Biochem (Tokyo)* **119**, 334-339.
188. Hofmann K, Bucher P, Falquet L, Bairoch A. (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res* **27**, 215-9.
189. Kaplan F, Ledoux P, Kassamali FQ, et al. (1999) A novel developmentally regulated gene in lung mesenchyme: homology to a tumor-derived trypsin inhibitor. *Am J Physiol* **276**, L1027-36.
190. Rost B, Sander C. (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* **19**, 55-72.
191. Rost B, Sander C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* **232**, 584-99.
192. Fernandez C, Szyperski T, Bruyere T, Ramage P, Mosinger E, Wuthrich K. (1997) NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. *J Mol Biol* **266**, 576-93.
193. Guex N, Peitsch MC. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-23.
194. Mizuki N, Sarapata D, García-Sanz JA, Kasahara M. (1992) The mouse male germ cell-specific gene Tpx-1: Molecular structure, mode of expression in spermatogenesis, and sequence similarity to two non-mammalian genes. *Mamm Genome* **3**, 274-280.
195. Yamakawa T, Miyata S, Ogawa N, Koshikawa N, Yasumitsu H, Kanamori T, Miyazaki K. (1998) cDNA cloning of a novel trypsin inhibitor with similarity to pathogenesis-related proteins, and its frequent expression in human brain cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1395**, 202-208.
196. Riggs P (2000) Expression and purification of recombinant proteins by fusion to maltose-binding protein. *Mol Biotechnol* **15**, 51-63.
197. Makrides SC (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**, 512-538.
198. Nossal NG, Heppel LA. (1966) The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J Biol Chem* **241**, 3055-3062.
199. Swamy KH, Goldberg AL. (1982) Subcellular distribution of various proteases in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **149**, 1027-1033.

200. Talmadge K, Gilbert W. (1982) Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 1830-1833.
201. Baneyx F (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 411-421.
202. Hannig G, Makrides SC. (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* **16**, 54-60.
203. LaVallie ER, McCoy JM. (1995) Gene fusion expression systems *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 501-506.
204. Kapust RB, Waugh DS. (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**, 1668-1674.
205. Georgiou G, Valax P. (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **7**, 190-197.
206. Wall JG, Pluckthun A. (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* **6**, 507-516.
207. Perez-Perez J, Marquez G, Barbero JL, Gutierrez J. (1994) Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* **12**, 178-180.
208. Rudolph R, Lilie H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J* **10**, 49-56.
209. Bosse M, Handl CE, Lortie LA, Harel J, Dubreuil JD. (1993) Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose-binding protein to obtain mature STb enterotoxin. *J Gen Microbiol* **139**, 631-638.
210. von Darl M, Harrison PM, Bottke W. (1994) Expression in *Escherichia coli* of a secreted invertebrate ferritin. *Eur J Biochem* **222**, 367-376.
211. Honjo E, Watanabe K. (1999) Expression of mature pokeweed antiviral protein with or without C-terminal extrapeptide in *Escherichia coli* as a fusion with maltose-binding protein. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 1291-1294.
212. Xu W, Hamilton DW. (1996) Identification of the rat epididymis-secreted 4E9 antigen as protein E: Further biochemical characterization of highly homologous epididymal secretory proteins D and E. *Mol Reprod Dev* **43**, 347-357.
213. Ahuja KK (1982) Fertilization studies in the hamster. The role of cell-surface carbohydrates. *Exp Cell Res* **140**, 353-362.
214. Boldt J, Howe AM, Parkerson JB, Gunter LE, Kuehn E. (1989) Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. *Biol Reprod* **40**, 887-896.
215. Ponce RH, Urch UA, Yanagimachi R. (1994) Inhibition of sperm-egg fusion in the hamster and mouse by carbohydrates. *Zygote* **2**, 253-262.
216. Gougoulidis T, Trounson A, Dowsing A. (1999) Inhibition of bovine sperm-oocyte fusion by the carbohydrate GalNAc. *Mol Reprod Dev* **54**, 179-185.

217. Gougoulidis T, Trounson A, Dowsing A. (1999) Inhibition of bovine sperm-oocyte fusion by a monoclonal antibody recognising the TEC-2 epitope on bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* **54**, 173-178.
218. Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130.
219. Marquardt T, Helenius A. (1992) Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **117**, 505-513.
220. Brooks DE (1981) Secretion of proteins and glycoproteins by the rat epididymis: regional differences, androgen-dependence, and effects of protease inhibitors, procaine, and tunicamycin. *Biol Reprod* **25**, 1099-1117.
221. Cohen DJ, Dematteis A, Cuasnicu PS. Participación de la proteína epididimaria DE en la etapa de la interacción espermatozoide-zona pellucida. [Abstract] *Medicina* (1997) **57**,(4) 44
222. Brooks DE (1985) Characterization of a 22 kDa protein with widespread tissue distribution but which is uniquely present in secretions of the testis and epididymis and on the surface of spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* **841**, 59-70.
223. Gan ZR, Gould RJ, Jacobs JW, Friedman PA, Polokoff MA. (1988) Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *J Biol Chem* **263**, 19827-19832.
224. Huang TF, Holt JC, Lukasiewicz H, Niewiarowski S. (1987) Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb- IIIa complex. *J Biol Chem* **262**, 16157-16163.
225. Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang TF, Holt JC, Cook JJ, Niewiarowski S. (1990) Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med* **195**, 168-171.
226. Maeda T, Nishida J, Nakanishi Y. (1999) Expression pattern, subcellular localization and structure-function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. *Dev Growth Differ* **41**, 715-722.
227. Durell SR, Martin I, Ruyschaert JM, Shai Y, Blumenthal R. (1997) What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *Mol Membr Biol* **14**, 97-112.
228. Carr CM, Kim PS. (1993) A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* **73**, 823-32.
229. Jahn R, Sudhof TC. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 863-911.
230. Ghosh JK, Peisajovich SG, Shai Y. (2000) Sendai virus internal fusion peptide: structural and functional characterization and a plausible mode of viral entry inhibition. *Biochemistry* **39**, 11581-92.

231. Kjeldsen L, Cowland JB, Johnsen AH, Borregaard N. (1996) SGP28, a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis-specific gene product and a rodent sperm-coating glycoprotein. *FEBS Lett* **380**, 246-250.
232. Root MJ, Kay MS, Kim PS. (2001) Protein design of an HIV-1 entry inhibitor *Science* **291**, 884-8.
233. Fournier-Delpech S, Courot M, Dubois MP. (1985) Decreased fertility and motility of spermatozoa from rats immunized with a prealbumin epididymal-specific glycoprotein *J Androl* **6**, 246-250.
234. Ansbacher R, Keung-Yeung K, Behrman SJ. (1973) Clinical significance of sperm antibodies in infertile couples. *Fertil Steril* **24**, 305-308.
235. Rumke P, Van Amstel N, Messer EN, Bezemer PD. (1974) Prognosis of fertility of men with sperm agglutinins in the serum. *Fertil Steril* **25**, 393-398.
236. Menge AC, Medley NE, Mangione CM, Dietrich JW. (1982) The incidence and influence of antisperm antibodies in infertile human couples on sperm-cervical mucus interactions and subsequent fertility. *Fertil Steril* **38**, 439-446.
237. Baker HW, Clarke GN, Hudson B, McBain JC, McGowan MP, Pepperell RJ. (1983) Treatment of sperm autoimmunity in men. *Clin Reprod Fertil* **2**, 55-71.
238. Vazquez-Levin MH, Notrica JA, De Fried EP, Polak de Fried E. (1997) Male immunologic infertility: sperm performance on in vitro fertilization. *Fertil Steril* **68**, 675-681.
239. Rumke P, Renckens CN, Bezemer PD, Van Amstel N. (1984) Prognosis of fertility in women with unexplained infertility and sperm agglutinins in the serum. *Fertil Steril* **42**, 561-567.
240. Blumenfeld Z, Gershon H, Makler A, Stoler J, Brandes JM. (1986) Detection of antisperm antibodies: a cytotoxicity immobilization test. *Int J Fertil* **31**, 207-212.
241. Ingerslev HJ, Ingerslev M. (1980) Clinical findings in infertile women with circulating antibodies against spermatozoa. *Fertil Steril* **33**, 514-520.
242. Witkin SS, David SS. (1988) Effect of sperm antibodies on pregnancy outcome in a subfertile population. *Am J Obstet Gynecol* **158**, 59-62.
243. Eggert-Kruse W, Christmann M, Gerhard I, Pohl S, Klinga K, Runnebaum B. (1989) Circulating antisperm antibodies and fertility prognosis: a prospective study. *Hum Reprod* **4**, 513-520.
244. Barratt CL, Dunphy BC, McLeod I, Cooke ID. (1992) The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Hum Reprod* **7**, 95-98.
245. Collins JA, Burrows EA, Yeo J, YoungLai EV. (1993) Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples. *Hum Reprod* **8**, 592-598.

246. O'Hem PA, Bambra CS, Isahakia M, Goldberg E. (1995) Reversible contraception in female baboons immunized with a synthetic epitope of sperm-specific lactate dehydrogenase. *Biol Reprod* **52**, 331-339.
247. Lea IA, van Lierop MJ, Widgren EE, Grootenhuys A, Wen Y, Van Duin M, O'Rand MG. (1998) A chimeric sperm peptide induces antibodies and strain-specific reversible infertility in mice. *Biol Reprod* **59**, 527-536.
248. Ramarao CS, Myles DG, White JM, Primakoff P. (1996) Initial evaluation of fertilin as an immunocontraceptive antigen and molecular cloning of the cynomolgus monkey fertilin β subunit. *Mol Reprod Dev* **43**, 70-75.
249. Hardy CM, Mobbs KJ. (1999) Expression of recombinant mouse sperm protein sp56 and assessment of its potential for use as an antigen in an immunocontraceptive vaccine. *Mol Reprod Dev* **52**, 216-224.
250. Vanage G, Lu YA, Tam JP, Koide SS. (1992) Infertility induced in rats by immunization with synthetic peptide segments of a sperm protein. *Biochem Biophys Res Commun* **183**, 538-543.
251. Negishi H, Jaiswal YK, Yamamoto S, Kamada M, Futaki S, Koide SS. (1996) Impaired fertility in female rats immunized with synthetic peptide segments of two sperm proteins. *Biochem Arch* **12**, 89-94.
252. O'Rand MG, Beavers J, Widgren EE, Tung KSK. (1993) Inhibition of fertility in female mice by immunization with a B-cell epitope, the synthetic sperm peptide, P10G. *J Reprod Immunol* **25**, 89-102.
253. Naz RK, Zhu X. (1998) Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol Reprod* **59**, 1095-1100.
254. Clifton VL, Husband AJ, Kay DJ. (1992) Local immunity in the male reproductive tract. *Immunol Cell Biol* **70**, 301-307.
255. Anderson DJ (1996) The importance of mucosal immunology to problems in human reproduction. *J Reprod Immunol* **31**, 3-19.
256. Kutteh WH, Mestecky J. (1994) Secretory immunity in the female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* **31**, 40-46.
257. Brandtzaeg P (1997) Mucosal immunity in the female genital tract. *J Reprod Immunol* **36**, 23-50.
258. Tourville DR, Ogra SS, Lippes J, Tomasi TB, Jr. (1970) The human female reproductive tract: immunohistological localization of gamma A, gamma G, gamma M, secretory "piece," and lactoferrin. *Am J Obstet Gynecol* **108**, 1102-1108.
259. Tjokronegoro A, Sirisinha S. (1975) Quantitative analysis of immunoglobulins and albumin in secretion of female reproductive tract. *Fertil Steril* **26**, 413-417.
260. Menge AC, Rosenberg A, Burkons DM. (1974) Effects of uterine fluids, and immunoglobulins from semen- immunized rabbits on rabbit embryos cultured in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **145**, 371-378.

261. Clarke GN, Hsieh C, Koh SH, Cauchi MN. (1984) Sperm antibodies, immunoglobulins, and complement in human follicular fluid. *Am J Reprod Immunol* **5**, 179-181.
262. Rumke P (1974) The origin of immunoglobulins in semen. *Clin Exp Immunol* **17**, 287-297.
263. Parr MB, Parr EL. (1989) Immunohistochemical localization of secretory component and immunoglobulin A in the urogenital tract of the male rodent. *J Reprod Fertil* **85**, 115-124.
264. Meinertz H, Linnet L, Wolf H, Hjort T. (1991) Antisperm antibodies on epididymal spermatozoa. *Am J Reprod Immunol* **25**, 158-162.
265. Stern JE, Gardner S, Quirk D, Wira CR. (1992) Secretory immune system of the male reproductive tract: effects of dihydrotestosterone and estradiol on IgA and secretory component levels. *J Reprod Fertil* **22**, 73-85.
266. Zouari R, De Almeida M. (1993) Effect of sperm-associated antibodies on human sperm ability to bind to zona pellucida and to penetrate zona-free hamster oocytes. *J Reprod Immunol* **24**, 175-186.
267. Wolf JP, De Almeida M, Ducot B, Rodrigues D, Jouannet P. (1995) High levels of sperm-associated antibodies impair human sperm-oolemma interaction after subzonal insemination. *Fertil Steril* **63**, 584-590.
268. Mestecky J (1987) The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* **7**, 265-276.
269. Mestecky J, Michalek SM, Moldoveanu Z, Russell MW. (1997) Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt* **33-43**.
270. Parr EL, Parr MB, Thapar M. (1988) A comparison of specific antibody responses in mouse vaginal fluid after immunization by several routes. *J Reprod Immunol* **14**, 165-176.
271. Lehner T, Brookes R, Panagiotidi C, et al. (1993) T- and B-cell functions and epitope expression in nonhuman primates immunized with simian immunodeficiency virus antigen by the rectal route. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8638-8642.
272. Naz RK, Mehta K. (1989) Cell-mediated immune responses to sperm antigens: effects on mouse sperm and embryos. *Biol Reprod* **41**, 533-542.
273. Hill JA, Cohen J, Anderson DJ. (1989) The effects of lymphokines and monokines on human sperm fertilizing ability in the zona-free hamster egg penetration test. *Am J Obstet Gynecol* **160**, 1154-1159.
274. Naz RK, Chatuverdi MM, Aggarwal BB. (1994) Role of cytokines and proto-oncogens in sperm cell function: relevance to immunologic infertility. *Am J Reprod Immunol* **32**, 26-37.
275. Dimitrov D, Petrovská M. (1996) Effects of products of activated immune cells and recombinant cytokines on spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction. *Am J Reprod Immunol* **36**, 150-156.

276. Mahi-Brown CA, Vandevoort CA, McGuinness RP, Overstreet JW, O'Hem P, Goldberg E. (1990) Immunization of male but not female mice with the sperm-specific isozyme of lactate dehydrogenase (LDH-C4) impairs fertilization in vivo. *Am J Reprod Immunol* **24**, 1-8.
277. Oliphant G, Randall P, Cabot CL. (1977) Immunological components of rabbit fallopian tube fluid. *Biol Reprod* **16**, 463-469.
278. Kille JW, Goldberg E. (1979) Female reproductive tract immunoglobulin responses to a purified sperm specific antigen (LDH-C4). *Biol Reprod* **20**, 863-871.
279. Kurth BE, Weston C, Reddi PP, Bryant D, Bhattacharya R, Flickinger CJ, Herr JC. (1997) Oviductal antibody response to a defined recombinant sperm antigen in macaques. *Biol Reprod* **57**, 981-989.
280. Lea IA, Kurth B, O'Rand MG. (1998) Immune response to immunization with sperm antigens in the macaque oviduct. *Biol Reprod* **58**, 794-800.
281. Wong PY, Tsang AY, Fu WO, Lau HK. (1983) Restricted entry of an anti-rat epididymal protein IgG into the rat epididymis. *Int J Androl* **6**, 275-282.
282. Weininger RB, Fisher S, Rifkin J, Bedford JM. (1982) Experimental studies on the passage of specific IgG to the lumen of the rabbit epididymis. *J Reprod Fertil* **66**, 251-258.
283. Lee CG, Zhang J, Wong E, Chow SN, Yang Y, Leung W. (1987) Sex differences of antifertility effect by passively immunized monoclonal sperm antibodies. *Am J Reprod Immunol* **13**, 9-14.
284. Naz RK, Bhargava KK. (1990) Antibodies to sperm surface fertilization antigen (FA-1): their specificities and site of interaction with sperm in the male genital tract. *Mol Reprod Dev* **26**, 175-183.
285. Linnet L, Fogh-Andersen P. (1979) Vasovasostomy: sperm agglutinins in operatively obtained epididymal fluid and in seminal plasma before and after operation. *J Clin Lab Immunol* **2**, 245-248.
286. Beagley KW, Wu ZL, Pomeroy M, Jones RC. (1998) Immune responses in the epididymis: implications for immunocontraception. *J Reprod Fertil Suppl* **53**, 235-245.
287. Hinton BT, Howards SS. (1981) Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymis. *J Reprod Fertil* **63**, 95-99.
288. Meinertz H (1991) Antisperm antibodies in split ejaculates. *Am J Reprod Immunol* **26**, 110-113.
289. Linnet L, Suominen JJ. (1982) A comparison of eight techniques for the evaluation of the auto-immune response to spermatozoa after vasectomy. *J Reprod Immunol* **4**, 133-144.
290. Haas GG, Jr., D'Cruz OJ, DeBault LE. (1991) Comparison of the indirect immunobead, radiolabeled, and immunofluorescence assays for the immunoglobulin G serum antibodies to human sperm. *Fertil Steril* **55**, 377-388.

291. Menge AC, Beitner O. (1989) Interrelationships among semen characteristics, antisperm antibodies, and cervical mucus penetration assays in infertile human couples. *Fertil Steril* **51**, 486-492.
292. Marshburn PB, Kuttah WH. (1994) The role of antisperm antibodies in infertility. *Fertil Steril* **61**, 799-811.
293. Frayne J, Hall L. (1999) The potential use of sperm antigens as targets for immunocontraception; past, present and future. *J Reprod Immunol* **43**, 1-33.
294. Haas GG, Jr., Ausmanus M, Culp L, Tureck RW, Blasco L. (1985) The effect of immunoglobulin occurring on human sperm in vivo on the human sperm/hamster ova penetration assay. *Am J Reprod Immunol Microbiol* **7**, 109-112.
295. King TP, Kochoumian L, Lam T. (1987) Immunochemical observations of antigen 5, a major venom allergen of hornets, yellowjackets and wasps. *Mol Immunol* **24**, 857-64.
296. King TP, Lu G, Gonzalez M, Qian N, Soldatova L. (1996) Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* **98**, 588-600.
297. Naz RK, Phillips TM, Rosenblum BB. (1986) Characterization of the fertilization antigen 1 for the development of a contraceptive vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 5713-5717.
298. Hardy CM, Clarke HG, Nixon B, Grigg JA, Hinds LA, Holland MK. (1997) Examination of the immunocontraceptive potential of recombinant rabbit fertilin subunits in rabbit. *Biol Reprod* **57**, 879-886.
299. Holland MK, Andrews J, Clarke H, Walton C, Hinds LA. (1997) Selection of antigens for use in a virus-vectored immunocontraceptive vaccine: PH-20 as a case study. *Reprod Fertil Dev* **9**, 117-124.
300. Ebensperger C, Barros C. (1984) Changes at the hamster oocyte surface from germinal vesicle stage to ovulation. *Gam Res* **9**, 387-397.
301. Santella L, Alikani M, Talansky BE, Cohen J, Dale B. (1992) Is the human oocyte plasma membrane polarized? *Hum Reprod* **7**, 999-1003.
302. Blaquier JA, Cameo MS, Stephany D, Piazza A, Tezón JG, Sherins R. (1987) Abnormal distribution of epididymal antigens on spermatozoa from infertile men. *Fertil Steril* **47**, 302-309.
303. Boué F, Bérubé B, De Lamirande E, Gagnon C, Sullivan R. (1994) Human sperm-zona pellucida interaction is inhibited by an antiserum against a hamster sperm protein *Biol Reprod* **51**, 577-587.
304. Boué F, Blais J, Sullivan R. (1996) Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. *Biol Reprod* **54**, 1009-1017.
305. Boué F, Sullivan R. (1996) Cases of human infertility are associated with the absence of P34H, an epididymal sperm antigen. *Biol Reprod* **54**, 1018-1024.

306. Clarke GN, Elliott PJ, Smaila C. (1985) Detection of sperm antibodies in semen using the immunobead test: a survey of 813 consecutive patients *Am J Reprod Immunol Microbiol* **7**, 118-23.
307. Service RF (1994) Barriers hold back new contraception strategies. *Science* **266**, 1489.
308. Bongaarts J, Bruce J. (1995) The causes of unmet need for contraception and the social content of services. *Stud Fam Plann* **26**, 57-75.
309. Griffin D (1996) The immunoregulation of fertility: changes in perspectives. *Am J Reprod Immunol* **35**, 140-147.
310. Aldhous P (1994) A booster for contraceptive vaccines. *Science* **266**, 1484-6.
311. Holland MK (1999) Fertility control in wild populations of animals. *J Androl* **20**, 579-585.
312. Bradley MP, Eade J, Penhale J, Bird P. (1999) Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *J Biotechnol* **73**, 91-101.
313. Garrott RA, Cook JG, Bemoco MM, Kirkpatrick JF, Cadwell LL, Cherry S, Tiller B. (1998) Antibody response of elk immunized with porcine zona pellucida. *J Wildl Dis* **34**, 539-546.
314. Fayrer-Hosken RA, Bertschinger HJ, Kirkpatrick JF, Grobler D, Lamberski N, Honneyman G, Ulrich T. (1999) Contraceptive potential of the porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Theriogenology* **52**, 835-846.
315. Miller LA, Johns BE, Killian GJ. (2000) Immunocontraception of white-tailed deer using native and recombinant zona pellucida vaccines. *Anim Reprod Sci* 2000 Nov 1;63(3-4):187-195 **63**, 187-195.
316. Turner JW, Jr., Liu IK, Kirkpatrick JF. (1996) Remotely delivered immunocontraception in free-roaming feral burros (*Equus asinus*). *J Reprod Fertil* **107**, 31-35.
317. Brown RG, Bowen WD, Eddington JD, Kimmins WC, Mezei M, Parsons JL, Pohajdak B. (1997) Temporal trends in antibody production in captive grey, harp and hooded seals to a single administration immunocontraceptive vaccine. *J Reprod Immunol* **35**, 53-64.
318. Brown RG, Bowen WD, Eddington JD, Kimmins WC, Mezei M, Parsons JL, Pohajdak B. (1997) Evidence for a long-lasting single administration contraceptive vaccine in wild grey seals. *J Reprod Immunol* **35**, 43-51.
319. Jackson RJ, Maguire DJ, Hinds LA, Ramshaw IA. (1998) Infertility in mice induced by a recombinant ectromelia virus expressing mouse zona pellucida glycoprotein 3. *Biol Reprod* **58**, 152-159.
320. Holland MK, Jackson RJ. (1994) Virus-vectored immunocontraception for control of wild rabbits: identification of target antigens and construction of recombinant viruses. *Reprod Fertil Dev* **6**, 631-642.
321. Bradley MP, Hinds LA, Bird PH. (1997) A bait-delivered immunocontraceptive vaccine for the European red fox (*Vulpes vulpes*) by the year 2002? *Reprod Fertil Dev* **9**, 111-116.

322. de Jersey J, Bird PH, Verma NK, Bradley MP. (1999) Antigen-specific systemic and reproductive tract antibodies in foxes immunized with *Salmonella typhimurium* expressing bacterial and sperm proteins. *Reprod Fertil Dev* **11**, 219-228.
323. Moore HD, Jenkins NM, Wong C. (1997) Immunocontraception in rodents: a review of the development of a sperm-based immunocontraceptive vaccine for the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*). *Reprod Fertil Dev* **9**, 125-129.
324. Zhang X, Lou YH, Koopman M, Doggett T, Tung KS, Curtiss R, 3rd. (1997) Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3. *Biol Reprod* **56**, 33-41.
325. Shellam GR (1994) The potential of murine cytomegalovirus as a viral vector for immunocontraception. *Reprod Fertil Dev* **6**, 401-409.
326. Tyndale-Biscoe CH (1994) Virus-vectored immunocontraception of feral mammals. *Reprod Fertil Dev* **6**, 281-287.
327. Williams CK (1997) Development and use of virus-vectored immunocontraception. *Reprod Fertil Dev* **9**, 169-178.
328. Robinson AJ, Jackson R, Kerr P, Merchant J, Parer I, Pech R. (1997) Progress towards using recombinant myxoma virus as a vector for fertility control in rabbits. *Reprod Fertil Dev* **9**, 77-83.