



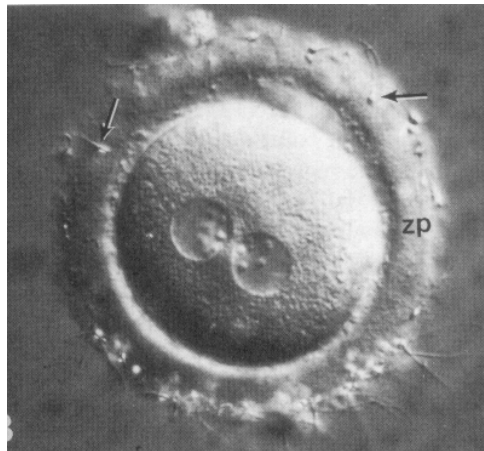
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mecanismos moleculares de la fertilización:
participación de las proteínas espermáticas
CRISP-1/DE y CRISP-2/Tpx-1 en las distintas
etapas de la interacción de gametas.**

Autor

Lic. Dolores
Busso



Director de Tesis

Dra. Patricia S.
Cuasnicú

Tesis presentada para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Buenos Aires, 2005

Resumen: Experimentos de nuestro laboratorio indican que la proteína epididimaria DE/CRISP-1 participa en el proceso de fusión de gametas, a través de sitios complementarios en el ovocito, de identidad aún desconocida. Los experimentos bioquímicos realizados con el fin de identificar a la molécula receptora para DE en el oolema permitieron detectar a un complejo DE-receptor, cuya caracterización final requerirá de tecnologías alternativas, al igual que lo descrito para los receptores espermáticos en ovocitos de invertebrados. Dado que la fusión de gametas desencadena la activación del ovocito, investigamos la posible participación de DE en dicho proceso, observándose que la proteína no cumpliría una función en etapas posteriores a la fusión. Contrariamente, nuestros resultados indicando la capacidad de DE de disgregar las células del cúmulus como así también de asociarse a la zona pelúcida sugirieron que la proteína cumpliría un rol en las etapas previas a la fusión, tales como la penetración del cúmulus y la interacción con la zona pelúcida. La alta homología de la proteína epididimaria DE/CRISP-1 con la proteína testicular Tpx-1/CRISP-2, también presente en el espermatozoide, sugería la existencia de posibles funciones comunes entre ambas moléculas. Nuestros resultados indicaron que Tpx-1 también participaría en la fusión de gametas a través de sitios complementarios en la superficie del ovocito. En conjunto, los resultados de esta tesis indicaron que, mientras que una proteína CRISP del espermatozoide (CRISP-1) podría participar en varias etapas de la fertilización, también podría existir más de una CRISP (CRISP-1 y CRISP-2) involucrada en un mismo evento. La información obtenida permitirá una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de gametas, contribuyendo así al desarrollo de futuros métodos de regulación de la fertilidad, tanto en animales como en el humano.

Palabras clave: reproducción, fertilización, espermatozoide, ovocito, cúmulus oophorus, zona pelúcida, fusión, familia de proteínas CRISP



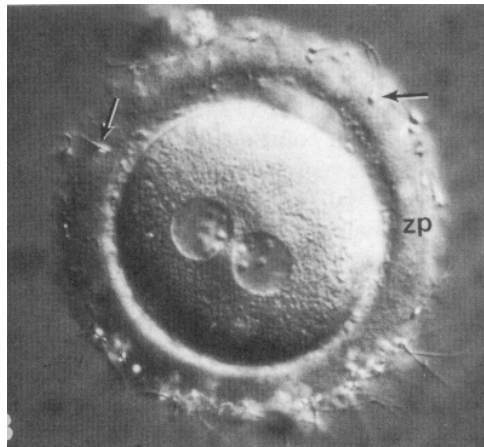
UNIVERSITY OF BUENOS AIRES

School of Exact and Natural Sciences

**Molecular mechanisms of fertilization:
participation of sperm proteins CRISP-1/DE and
CRISP-2/Tpx-1 in the different stages of gamete
interaction.**

Autor

Lic. Dolores
Busso



Thesis Director

Patricia S.
Cuasnicú, Ph.D

Thesis presented to obtain the Ph.D.
Degree from the University of Buenos Aires
in the area of Biological Sciences

Institute of Biology and Experimental Medicine

Buenos Aires, 2005

Abstract: Results from our laboratory indicate that epididymal protein DE/CRISP-1 is involved in gamete fusion through complementary binding sites in the egg, of unknown identity. While a DE-receptor complex was detected in biochemical experiments performed to identify the receptor for DE, the final characterization of this molecule will require new technologies, as described for sperm receptors in invertebrate eggs. As gamete fusion induces egg activation, we investigated the possible involvement of DE in that event. Our results indicated that DE is not involved in the process of activation that takes place before fusion. On the contrary, the results obtained in this thesis indicating that DE has the ability to disperse cumulus cells and to bind to the zona pellucida, suggested that DE could play a role in cumulus penetration and sperm-zona pellucida interaction. The high homology between epididymal protein DE/CRISP-1 and testicular protein Tpx-1/CRISP-2, also present in sperm, suggested that these two proteins could have common functions. Our results indicated that, as DE, Tpx-1 would also play a role in gamete fusion through complementary sites in the surface of the egg. Together, the results of this thesis indicated that, while one CRISP (CRISP-1) would be involved in several stages of fertilization, more than one CRISP (CRISP-1 and CRISP-2) could participate in more than one event of this process. The information obtained will allow a better understanding of the molecular mechanism of gamete interaction, contributing to the development of future methods of fertility regulation in humans and animals.

Key words: reproduction, fertilization, sperm, egg, cumulus oophorus, zona pellucida, fusion, CRISP protein family.

Dedicada a mi madre y a Víctor

Mis sinceros agradecimientos...

... a la Dra. Patricia Cuasnicú, por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta Tesis en su laboratorio, por ser la gestora de un grupo humano muy valioso, y por sus múltiples enseñanzas profesionales (y de las otras).

... a mis compañeros del laboratorio (pasados y presentes) por haber tenido el placer de haber formado con ellos un verdadero equipo, a nivel profesional y humano.

... a todos mis compañeros del IBYME, en especial a las chicas del primer piso, por innumerables momentos de trabajo, compañerismo y amistad.

... al personal del IBYME: seguridad, recepción, biblioteca, administración, bioterio y limpieza, por su permanente colaboración y amabilidad.

... a todos los investigadores que colaboraron en los estudios realizados en esta tesis, en particular a: Dr. Eduardo Charreau, Dr. Karl Swann, Dr. Rafael Fissore, Dra. Fernanda Raffo, Dr. Masanori Kasahara, Dr. Masaru Hayashi.

... al Programa Latinoamericano en Reproducción Humana (PLACIRH), el Consejo Nacional de Investigaciones (CONICET) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) por haberme otorgado el apoyo económico para la realización de esta Tesis.

... a mi familia y mis amigos, por su permanente apoyo.

Introducción.....	1
Breve historia de la biología de la fertilización.....	2
El origen evolutivo de la reproducción sexual.....	3
La gameta femenina.....	5
La gameta masculina.....	13
Maduración epidimaria.....	20
Capacitación.....	21
Reacción acrosomal.....	23
Hiperactivación.....	26
Penetración del cúmulus.....	27
Interacción espermatozoide-ZP.....	30
Unión primaria.....	31
Unión secundaria.....	33
Penetración de la ZP.....	33
Fusión espermatozoide-ovocito.....	36
Activación del ovocito.....	43
La proteína epididimaria DE.....	48
La proteína testicular Tpx-1.....	52
Otros miembros de la familia CRISP.....	55
Objetivos.....	58
Metodología.....	62
Animales.....	63
Proteína DE nativa.....	63
Proteína helotermina.....	63
Expresión de proteínas recombinantes.....	63
Anticuerpos.....	65
Superovulación de las hembras y preparación de los ovocitos.....	65
Tratamiento enzimático de ovocitos.....	66
Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de ovocitos.....	67

Biotinilación de ovocitos.....	67
Inmunoprecipitación de DE.	68
Crosslinking de DE a ovocitos.....	68
Obtención de espermatozoides de rata y ratón.....	68
Obtención de espermatozoides y muestras de tejidos humanos.....	69
Capacitación de espermatozoides de rata.....	69
Capacitación de espermatozoides de ratón.....	70
Capacitación de espermatozoides humanos.....	70
Inducción de la reacción acrosomal.....	71
Evaluación de la ocurrencia de la reacción acrosomal en ratón por tinción con Coomasie Brilliant Blue.....	71
Evaluación de la ocurrencia de la RA inducida en humano por tinción con <i>Pisum sativum agglutinin</i>	71
Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides <i>in vivo</i>	72
Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides fijados.....	72
Extracción de proteínas de espermatozoide.....	73
Separación electroforética de las proteínas.	73
Tinción de proteínas en geles.....	74
Tranferencia a nitrocelulosa.....	74
Western blot.....	74
Radiodinación de la proteína DE.....	75
Revelado por autorradiografía de DE radiactiva.....	76
Preparación de extracto de proteínas de espermatozoide porcino (pSE).....	76
Medición de los niveles de calcio intracelulares por fluorescencia.....	76
Evaluación del estadio de la meiosis.....	77
Microinyección de los ovocitos.....	77
Deglicosilación enzimática de DE.....	77
Reducción y alquilación de la proteína DE.....	78
Ensayo de fusión in vitro (ovocitos sin ZP).....	78
Ensayo de fertilización in vitro (ovocitos con ZP)	78
Ensayo de unión a la ZP.....	79
Ensayo de hemizona.....	79
Ensayo penetración de ovocitos de hamster (HOPT).....	80
Evaluación de la motilidad de los espermatozoides.....	80

Ensayo de dispersión de las células del cúmulus.....	81
Evaluación de la asociación de DE a glicosaminoglicanos (GAGs).....	81
Ensayo turbidimérico para la determinación de la actividad hialuronidasa.....	81
Análisis estadístico.....	82

Resultados.....83

CAPÍTULO 1:

Determinación de la identidad de los sitios complementarios para la proteína DE en la superficie del ovocito.....84

Tabla 1. Efecto de tratamientos enzimáticos sobre los sitios para DE en ovocitos de rata.....	86
Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la fusogenicidad del ovocito.....	88
Efecto de tratamientos enzimáticos sobre los sitios para DE y la tetraspanina CD9 en ovocitos de ratón	89
Caracterización del perfil proteico de ovocitos.....	91
Radiodinación de la proteína DE.....	94
Características de los crosslinkers DSS y Sulfo-SANPAH.....	95
Crosslinking de la proteína DE a ovocitos utilizando el agente DSS.....	98
Dimerización de la proteína DE en presencia de DSS.....	99
Crosslinking de la proteína DE radiactiva a ovocitos con DSS.....	101
Interacción de DE con la tetraspanina CD9 en el oolema.....	103

CAPÍTULO 2:

Estudio de la participación de DE en el proceso de activación del ovocito posterior a la fusión de gametas.....105

Efecto de la proteína DE sobre la liberación de calcio intracelular de los ovocitos.....	107
Efecto de la proteína DE sobre el reinicio de la meiosis.....	108
Efecto de la microinyección de DE sobre la liberación de calcio intracelular de los ovocitos.....	110
Efecto de helotermia en la fusión de gametas.....	111

CAPÍTULO 3:

Estudio del papel de DE durante las etapas de la fertilización previas a la fusión.....113

a) Participación de DE en la etapa de interacción espermatozoide-ZP...115

Ensayo de interacción de gametas *in vitro* en presencia de proteína.....116

Ensayo de interacción de gametas *in vitro* en presencia de anticuerpo.....116

Efecto de la proteína DE sobre la FIV de ratón.....119

Inmunofluorescencia indirecta de ovocitos de ratón.....120

Inmunofluorescencia indirecta comparando la asociación de DE a un ovocito de ratón fertilizado vs un ovocito no fertilizado.....122

Efecto de anti-DE sobre la FIV de ratón.....123

Efecto de DE y anti-DE sobre la unión de espermatozoides a la ZP.....125

Estudio de la participación de la proteína humana ARP en la interacción espermatozoide-ZP mediante el ensayo de hemizona en presencia de:

ARP recombinante127

Anti-ARP.....128

b) Participación de DE en la etapa de penetración del cúmulus..... 129

Efecto de la proteína DE sobre la integridad de COCs de ratón.....129

Clasificación de la integridad del cúmulus.130

Actividad de DE sobre la integridad del cúmulus de ratón.....131

Actividad de DE recombinante y helotermina sobre el cúmulus.133

Análisis electroforético de DE deglicosilada y DE reducida.....134

Relevancia de los residuos glicosídicos y la conformación de DE para su actividad sobre la integridad del cúmulus.135

Actividad de DE sobre la integridad de cúmulus inmaduros.....136

Interacción de DE con la matriz del cúmulus.137

Asociación de DE a la matriz del cúmulus luego de la fijación.138

Asociación de DE a GAGs puros componentes de la matriz del cúmulus.....140

Asociación de DE a AH.....140

Determinación de la actividad hialuronidasa de nDE.....142

CAPITULO 4:

Análisis de la posible participación de Tpx-1 en la interacción de gametas...143

Comparación entre las secuencias aminoacídicas DE y Tpx-1.....143

Análisis de la eficiencia y especificidad de anti-TPX1 para detectar a:

TPX1 humana.145

Tpx-1 de ratón146

Localización de TPX1 en espermatozoides humanos.147

Extracción diferencial de la proteína TPX1 de espermatozoides humanos... 148

Comportamiento de la proteína TPX1 durante la capacitación y la RA.....150

Efecto de anti-TPX1 sobre la habilidad de espermatozoides humanos para penetrar ovocitos de hamster sin ZP.....152

Tabla 1. Efecto de anti-TPX1 sobre la motilidad y la capacidad de sufrir la reacción acrosomal en espermatozoides humanos.....153

Localización de Tpx-1 en espermatozoides de ratón.....155

Correlación entre Tpx-1 no extraíble y la presencia del acrosoma en espermatozoides de ratón.....156

Partición en fases de Tpx-1 extraída con el detergente Tx-114.158

Comportamiento de Tpx-1 durante la capacitación y la RA en ratón.....160

Efecto de anti-TPX1 sobre la FIV de ratón.....162

Expresión y purificación de Tpx-1.....164

Presencia de sitios para Tpx-1 en ovocitos intactos.....165

Localización de los sitios para Tpx-1 en ovocitos sin ZP.165

Ensayo de competencia entre DE y Tpx-1 por los sitios en el ovocito.....166

Localización de sitios para Tpx-1 en ovocitos de rata.....167

Efecto de Tpx-1 sobre la penetración de ovocitos sin ZP de rata.....168

Discusión.....69

Esquema.....202

Bibliografía.....208

Introducción

Breve historia de la biología de la fertilización:

La propagación de la vida por medio de la reproducción sexual ha sido tema de estudio del hombre por generaciones. Las primeras teorías sobre el papel de los sexos en la concepción datan de hace más de dos mil años, y se encuentran basadas principalmente en observaciones provenientes de la medicina y en hipótesis de tipo filosófico. Las primeras líneas de pensamiento de las que se tiene conocimiento provienen de los escritos de pensadores griegos. Hipócrates asumía que los fluidos provenientes de las diferentes partes del cuerpo llegaban a los órganos reproductivos del hombre y la mujer, y que luego de la concepción, esos fluidos competían para determinar en el embrión la herencia de los caracteres de cada uno de los padres. El pensador Aristóteles (384-322 AC), por su parte, consideraba que el padre poseía una “capacidad” única de procrear, mientras que la madre sólo contribuía con la “materia” para su formación. En su libro “Historia Animalium”, Aristóteles explica: “por su capacidad, la semilla del hombre pone a la materia que está en la hembra en un estado particular”. Casi cinco siglos después, el médico griego Galeno (130-200 AD), oponiéndose a la visión de Aristóteles, sostuvo que la formación del embrión requería de elementos materiales provenientes de ambos padres.

Las ideas contenidas en estas teorías originadas en la antigua Grecia tuvieron sus seguidores y opositores entre los científicos de la Edad Media, y se vieron reflejadas en las dos escuelas de pensamiento preponderantes en ese período: la de los “ovistas”, y la de los “espermistas” (Morice et al, 1995). La primera de ellas, basada principalmente en los escritos del médico anatomista inglés William Harvey en el siglo XVII, sostenía que el embrión ya existía como un pequeño ser preformado dentro de la hembra. Las ideas de Harvey fueron resumidas por su frase “ex ovo omnia”, cuyo significado es “todo proviene de un huevo”, lo cual constituyó una gran predicción dado que el ovocito de mamíferos recién sería descubierto casi 200 años después. También en el

siglo XVII, el microscopista holandés Anton Van Leeuwenhoek descubrió en el semen la presencia de unas pequeñas células de cola transparente y ondulante, los espermatozoides. La escuela de los “espermistas”, liderada por Van Leeuwenhoek, sostenía que cada una de estas células contenía en su interior a un organismo minúsculo completamente preformado denominado “homúnculo”, el cual comenzaba su desarrollo una vez introducido en la hembra. Su compatriota Reinier De Graaf describió al ovario en la misma época en que Van Leeuwenhoek descubrió a los espermatozoides. Sin embargo, cometió un error de interpretación confundiendo al folículo por el ovocito y solo cincuenta años después, fue finalmente descubierta la gameta femenina (Gwatkin, 1977). En 1826, el embriólogo ruso Karl Von Baer describió el primer ovocito de un mamífero en el ovario de una perra. Aunque en esa época aún era descabellada la idea de que el espermatozoide pudiera “penetrar” al ovocito, en el año 1827 Martin Barry reportó la primera observación de un espermatozoide dentro del ovocito de un conejo. Recién en 1875 Oscar Hertwig, basándose en sus estudios de la reproducción en el erizo de mar, concluyó que el ovocito y el espermatozoide se unían físicamente durante el proceso hoy conocido como fertilización. Finalmente, en 1877 la fertilización fue observada mientras ocurría en ovocitos de estrella de mar.

El origen evolutivo de la reproducción sexual

Desde los primeros estudios acerca de la reproducción animal hasta la actualidad, diferentes ramas de la ciencia han aportado conocimientos sobre los varios aspectos de la reproducción sexual. Una de las cuestiones que ha despertado fundamental interés ha sido el origen de dicho sistema reproductivo, y las implicancias evolutivas que llevaron a desarrollarlo. Si se la compara con la reproducción asexual, el proceso no sólo es mucho más complejo, lento y costoso en términos metabólicos sino que además sólo deja el 50% de sus genes en la descendencia. El biólogo Mark Ridley de la

Universidad de Oxford, en su libro "El Gen Cooperativo", describe la complejidad y la inversión de energía que caracterizan a la reproducción sexual comparándola con un método hipotético para leer un libro (Ridley, 2001). Según Ridley, este método "sexual" de lectura consistiría en comprar dos copias de un libro, arrancar todas las hojas de ambas y hacer una nueva copia combinando la mitad de las hojas de cada libro, tirando una moneda para elegir de cual original elegir la hoja y descartando la del libro restante. A pesar de los altos costos que implica reproducirse sexualmente, la realidad actual demuestra que esta estrategia no solo se ha visto favorecida frente a la reproducción asexual sino que ha perdurado a lo largo del tiempo ya que, según los registro fósiles, la existencia de dos sexos habría surgido hace 2,5 a 3,5 millones de años (Dorak, 2004). En la actualidad, existen diversas teorías que intentan explicar el origen y la conservación de la reproducción sexual, en su mayor parte describiendo teóricamente de qué manera los beneficios obtenidos superan los costos asociados (Thompson & Harrub, 2002). Si bien aún existen controversias, en general se considera que los sexos se habrían desarrollado por ser beneficiosos para la adaptación de los organismos a una oferta dinámica de los recursos del medio ambiente. Mientras que en la reproducción asexual los organismos dependerían exclusivamente de la ocurrencia de las poco frecuentes mutaciones al azar para su adaptación a un ambiente cambiante y para el aprovechamiento de nuevos recursos, la reproducción sexual favorecería mecanismos rápidos de generación de diversidad genética y, como consecuencia, la producción de individuos con mayor valor adaptativo. Dicha diversidad provendría de nuevas combinaciones de genes originadas durante la recombinación homóloga y la segregación independiente de los cromosomas durante la meiosis, y de la fusión de dos gametas haploides provenientes de individuos diferentes. Según existan o no diferencias entre las gametas se habla de sexo anisogamético o isogamético respectivamente (Manning, 1975). En la anisogamia se diferencian dos sexos, el macho y la hembra. La gameta femenina (el ovocito) es generalmente grande, con una abundante reserva de nutrientes y poca motilidad. La

masculina (el espermatozoide) es, por el contrario, pequeña, sin reservas y muy mótil. Se ha postulado que como tanto macho como hembra poseen gónadas de tamaños similares, aquel sexo que produce gametas grandes podrá generar pocas (hembra), mientras que serán muchas las que produzca el sexo con gametas pequeñas (macho). El origen de la anisogamia, desde el punto de vista de la selección natural, supone que la supervivencia de una cigota se ve incrementada en función del tamaño de la misma. De esta manera, las gametas de mayor tamaño fueron capaces de originar cigotas más grandes y, por lo tanto, con mayores posibilidades de supervivencia. Las gametas grandes fueron seleccionadas positivamente y, al poseer poca motilidad, favorecieron la co-evolución de gametas pequeñas de gran motilidad capaces de encontrar a las grandes. La gameta pequeña entonces se habría desarrollado en un espermatozoide, carente de nutrientes, que debió incorporarse dentro del ovocito como un “parásito”, en busca de la energía necesaria para subsistir.

La gameta femenina

El crecimiento y la maduración de una gameta femenina, el ovocito, se producen en el ovario mediante un proceso biológico altamente especializado y regulado denominado oogénesis. Dicho proceso comienza con la formación de las células germinales en el embrión, y culmina luego de la pubertad, con la liberación de los ovocitos durante la ovulación (Austin & Short F.R.S., 1972).

Los ovarios son estructuras anatómicas pares adosadas a la pared posterior de la cavidad pélvica, compuestos por una zona periférica o corteza, donde se encuentran las estructuras que contienen a los ovocitos, y una zona central o médula, formada básicamente por tejido conjuntivo y vasos sanguíneos (Austin & Short F.R.S., 1972). Los ovarios están en estrecho contacto con las estructuras de comunicación con el útero, los oviductos en roedores y las

trompas de Fallopio en la mujer, que corresponden al lugar donde se produce la fertilización.

Los ovocitos se originan a partir de un escaso número de células totipotenciales de origen extragonadal, las cuales son re-localizadas a la gónada primitiva durante los primeros estadios de la embriogénesis (Austin & Short F.R.S., 1972; Freeman, 2003). Una vez diferenciado el ovario, las células germinales primordiales comienzan a desarrollarse para finalmente, en la vida adulta, originar los ovocitos (Wassarman, 1988a). La oogénesis, esquematizada en la **Figura 1**, comienza con la división activa de las células germinales por mitosis, las cuales pasan a denominarse oogonias. Posteriormente, en el desarrollo embrionario, estas células comienzan a sintetizar DNA en preparación para la meiosis, perdiendo su totipotencialidad y denominándose ovocitos primarios.

Al nacimiento, las hembras poseen un número finito de ovocitos, los cuales permanecen arrestados en Profase I de la meiosis hasta la pubertad, período en el que se produce el crecimiento de los ovocitos en forma coordinada con células de origen somático, en estructuras celulares llamadas folículos. Durante el período periovulatorio, el ovocito reanuda la meiosis estimulada por la acción de hormonas. La división desigual del citoplasma de la gameta femenina durante la meiosis provoca que mientras que una de las células hijas (el ovocito) recibe la mayor parte del citoplasma y es capaz de originar un embrión, la otra (el corpúsculo polar) recibe una cantidad mínima, y está destinada a la degeneración.

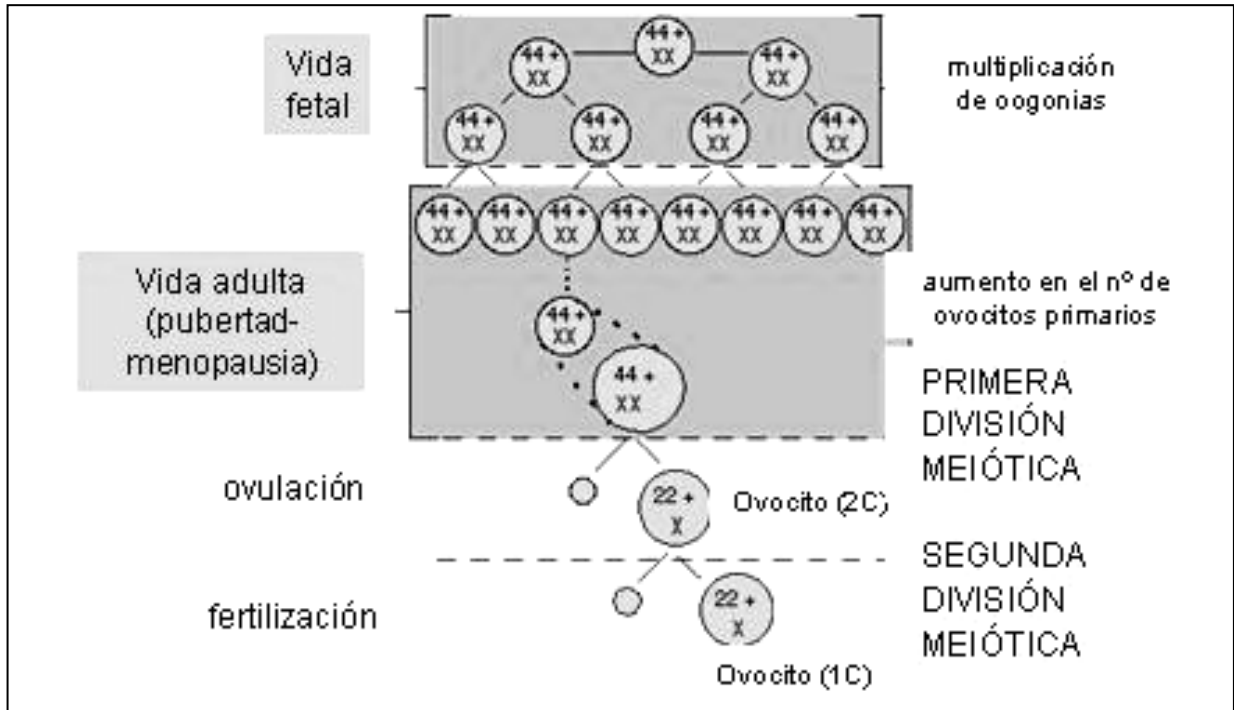


Figura 1. Esquema representativo de las etapas de la ovogénesis.

Finalmente, el ovocito se ovula arrestado en la Metafase II de la meiosis. Es una célula esférica, de diámetro variable según la especie (70-120 μM), contenida dentro de una matriz extracelular, la zona pelúcida (ZP). Entre la membrana del ovocito y la ZP, existe un espacio acelular, el espacio perivitelino. Rodeando a la ZP del ovocito ovulado se encuentran varias capas de células de la granulosa, las cuales en su conjunto conforman el *cumulus oophorus*. En la **Figura 2** se observan microfotografías de un ovocito de hamster ovulado, en las que se señalan las distintas estructuras mencionadas anteriormente.

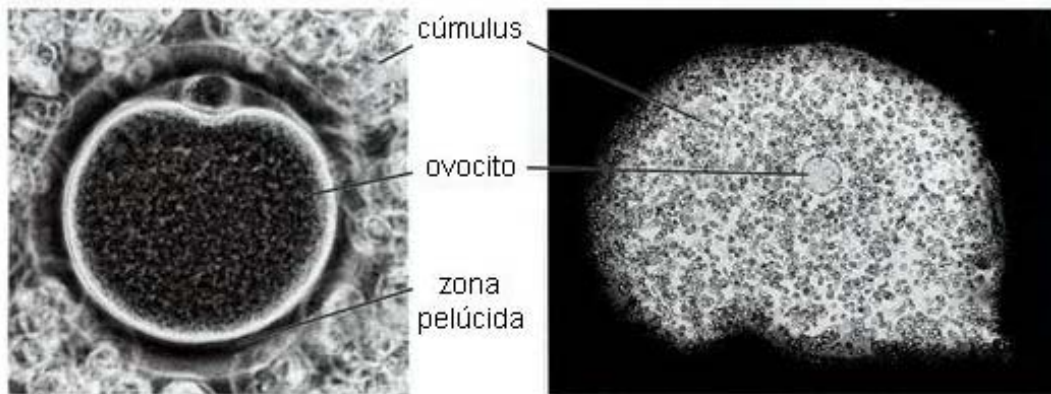


Figura 2. Microfotografías de un ovocito de hamster ovulado rodeado del cúmulus. En la fotografía de la derecha se observa el complejo cúmulus-ovocito completo, y en la de la izquierda, un detalle del ovocito rodeado de la ZP inmerso en el cúmulus.

El ovocito se encuentra conformado por la membrana plasmática (u oolema) rodeando al citoplasma (u ooplasma), el cual contiene al núcleo y una variedad de organelas. Si bien se supone que la composición del oolema es similar a la de otros tipos celulares, la dificultad en la obtención de material proveniente de ovocitos ha dificultado su estudio. Una característica particular del oolema radica en la presencia de microvellosidades en toda la superficie del ovocito, con excepción de un área libre de microvellosidades que coincide con la región que recubre al huso meiótico, y a través de la cual raramente ocurriría la fusión del espermatozoide (Johnson et al, 1975). Al igual que en otras células, dentro del ooplasma se encuentran las mitocodrias, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, organelas importantes para los diferentes procesos metabólicos que debe cumplir el ovocito. En la región cortical del ovocito maduro, por debajo de la zona de microvellosidades, se encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas rodeadas de membrana (Ducibella, 1991). La aparición de dichos gránulos se encuentra asociada a la expansión del aparato de Golgi durante el crecimiento del ovocito (Ducibella et al, 1994). El papel de los gránulos corticales sería importante para el desarrollo

de un embrión viable, ya que su liberación luego de la fertilización aseguraría la entrada de un único espermatozoide dentro del ovocito (Yanagimachi, 1994).

La ZP es una matriz transparente, relativamente gruesa, que rodea al ovocito. Si bien durante mucho tiempo no se sabía exactamente si los componentes de la ZP eran sintetizados por las células del folículo o por la misma gameta, diversas evidencias han demostrado que sería el ovocito el responsable de producir la ZP (Haddad & Nagai, 1977; Wassarman, 1988b). Dicha matriz se deposita alrededor del ovocito durante el crecimiento y aumenta su espesor a medida que la célula aumenta su diámetro (Mashiach et al, 1992). A pesar de la presencia de la ZP, las células foliculares continúa en contacto con el ovocito a través de uniones de tipo "gap", formadas entre el oolema y extensiones de las células del cúmulus (Austin & Short F.R.S., 1972). Estas uniones tendrían importancia en el mantenimiento de las funciones nutricias y regulatorias que ejercen las células foliculares sobre el ovocito. La ZP está compuesta principalmente por entre dos y cuatro glicoproteínas mayoritarias, según la especie (Wassarman, 1988b). Gran parte de la información sobre la naturaleza bioquímica, estructura, y función de la ZP provienen principalmente de los laboratorios de los Dres. Paul Wassarman y Jurrien Dean, quienes han utilizado al ratón como modelo para la mayoría de sus estudios (Wassarman, 1988b; Wassarman & Litscher, 2001; Hoodbhoy & Dean, 2004). En esta especie, tres proteínas altamente glicosiladas conforman la ZP: ZP1, ZP2 y ZP3, siendo las dos últimas las más abundantes. La glicosilación diferencial de las tres proteínas produce una alta heterogeneidad de carga en las mismas. Mientras que tanto ZP3 (83 kDa) como ZP2 (120-140 kDa) son monómeros, la proteína minoritaria ZP1 (185-200 kDa) se encuentra formando parte de un dímero de cadenas polipeptídicas asociadas por puentes disulfuro. Hace ya casi dos décadas, Wassarman postuló un modelo para explicar la estructura de la ZP de ratón, basándose en resultados provenientes de experimentos de microscopía electrónica, cross-linking químico, e inmunolocalización de

proteínas en la ZP (Wassarman, 1988b). Dicho modelo, esquematizado en la **Figura 3**, propuso que la ZP estaría compuesta por filamentos constituídos por dímeros de ZP2 y ZP3, intercomunicados por ZP1.

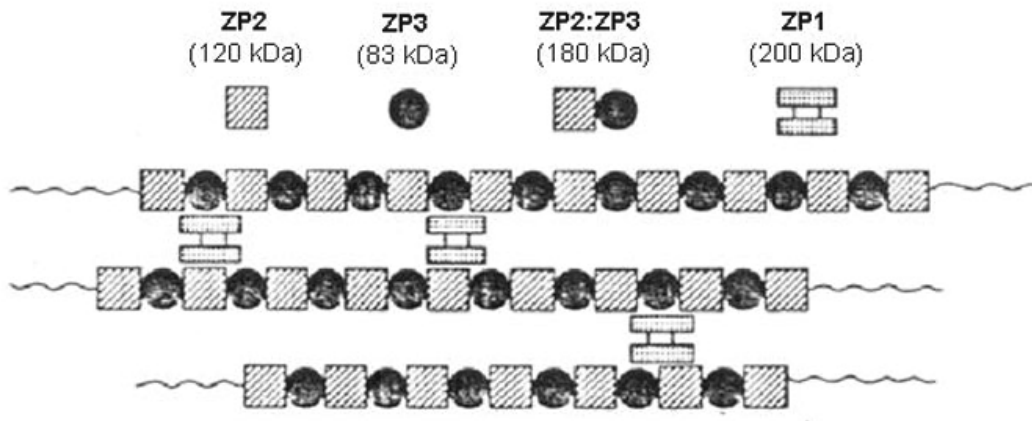


Figura 3. Representación esquemática del arreglo de glicoproteínas en los filamentos de la ZP de ratón.

La relevancia de cada una de las proteínas de la ZP y sus funciones durante la fertilización y el desarrollo fue demostrada mediante el estudio de ratones genéticamente modificados (“knock outs”) carentes de ZP1, ZP2 o ZP3. Los ratones KO para ZP3 fueron aquellos que presentaron efectos más drásticos sobre el fenotipo, los ovocitos carecieron de ZP y los animales fueron completamente infértiles (Rankin et al, 1996). En los KO para ZP1, se formó un ZP compuesta por ZP2 y ZP3, más frágil que la normal, que no afectó la foliculogénesis ni la fertilización de los ovocitos, pero produjo una reducción de la fertilidad del 50%, atribuida al hatching prematuro de los embriones (Rankin et al, 1999). Por último, el fenotipo de los KO para ZP2 fue diferente al de los dos anteriores, ya que los ovocitos formaron una ZP delgada (similar al KO para ZP1), que se perdió durante la foliculogénesis previamente a la ovulación, resultando en la esterilidad de los animales (Rankin et al, 2001). Según esos resultados, la ZP1 sería una proteína minoritaria de la matriz, con un rol

estructural que no sería indispensable para el desarrollo del ovocito ni para la fertilización. En cuanto a la relevancia de cada proteína, ZP3 sería la molécula fundamental para formar la ZP, y sólo una proteína adicional (ZP1 o ZP2) sería necesaria. Funcionalmente, la ZP sería la encargada de brindar la especie-especificidad durante la fertilización, impedir la polispermia y proteger al embrión durante el clivaje.

Entre la ZP y el oolema existe una región comúnmente denominada “espacio perivitelino” (EPV), conformada en realidad por una matriz extracelular sintetizada en parte por el ovocito durante la ovogénesis, con el agregado de fluido y moléculas provenientes del fluido folicular y del cúmulus, respectivamente (Talbot & Dandekar, 2003). El EPV se origina cuando se forma la ZP, siendo pequeño alrededor de los ovocitos foliculares y aumentando su espesor luego de la extrusión del primer corpúsculo polar, momento a partir del cual toma una forma asimétrica (**Figura 4**). Existen pocos trabajos en la literatura describiendo la composición del EPV, y la mayor parte de ellos provienen del laboratorio de los Dres Talbot y Dandekar (Dandekar et al, 1992; Talbot & Dandekar, 2003). Según estos investigadores, previamente a la fertilización, la matriz que ocupa el EPV sería similar a la matriz extracelular que rodea a las células de la granulosa en el cúmulus, ya que estaría compuesta por filamentos de ácido hialurónico (AH) y proteínas. Luego de la fertilización, la liberación del contenido de los gránulos corticales del ovocito produciría cambios microscópicos y un aumento en el espesor del EPV. Se ha sugerido que dicha transformación podría estar relacionada con los mecanismos de prevención de polispermia del ovocito (Dandekar & Talbot, 1992).

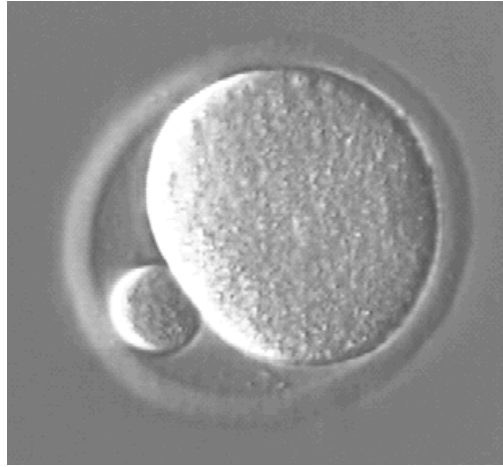


Figura 4. *Microfotografía de un ovocito de ratón con ZP en el que se observa el espacio perivitelino, de forma asimétrica por la presencia del corpúsculo polar.*

Rodeando la ZP, en la mayoría de los mamíferos, se encuentra el cumulus oophorus, conformado por un grupo de células de la granulosa, llamadas células del cúmulus. En el folículo ovárico, dichas células se encuentran asociadas entre sí por uniones de tipo gap. Como respuesta al pico de gonadotropinas que precede a la ovulación, dichas células depositan abundante matriz extracelular y, en consecuencia, los complejos cúmulus-ovocito aumentan en volumen de 20 a 40 veces respecto de su tamaño inicial. Por este motivo, se denomina a este proceso “expansión del cúmulus” (Zhuo & Kimata, 2001). Originalmente, el AH era considerado el componente principal de la matriz del cúmulus (Eppig, 1979). Estudios más recientes han descrito otros componentes de dicha matriz, particularmente glicosaminoglicanos y proteínas, sintetizados por las células de la granulosa, que también serían parte importante del cúmulus (Zhuo & Kimata, 2001) Entre los glicosaminoglicanos se encuentran el condroitin sulfato, el heparan sulfato y el dermatán sulfato, que se combinan con proteínas conformando proteoglicanos con capacidad de unión a AH. Entre las proteínas, la más conocida se denomina “link” y estaría encargada de estabilizar las uniones entre AH y

proteoglicanos. A su vez, el AH se encuentra anclado a la superficie de las células del cúmulus por su receptor, CD44 (Kimura et al, 2002; Furnus et al, 2003). Además de las moléculas antes mencionadas, todas ellas sintetizadas por las células de la granulosa, existen factores extrafolículos, de origen plasmático, cuyo papel en la composición y la estabilización de la matriz del cúmulus sería importante. En general, los diversos estudios llevados a cabo en diferentes especies de mamíferos han demostrado que las células del cúmulus y la matriz en la que están inmersas tendrían funciones biológicas relevantes durante la foliculogénesis, la ovulación y la fertilización (Tanghe et al, 2002).

La gameta masculina:

La gameta masculina, el espermatozoide, se produce en los testículos mediante un proceso conocido como espermatogénesis (Austin & Short F.R.S., 1972). Al igual que en la hembra, dicho proceso comienza con la formación de las células germinales (espermatogonias) durante la vida embrionaria, y requiere de la división meiótica para la producción de gametas haploides.

Los testículos son órganos pares en la mayoría de las especies, que consisten de una serie de tubulos seminíferos separados por tejido intersticial, rodeados por una cubierta denominada cápsula (Austin & Short F.R.S., 1972). La variabilidad entre los testículos de las distintas especies resulta llamativa, ya que mientras que el peso relativo de los dos testículos respecto del peso corporal es menor al 1% en los primates, el de un pequeño marsupial australiano llega a ser de casi el 5%. Además de la variabilidad en el tamaño, también existe diversidad en la localización de los testículos del animal adulto en las distintas especies. En varios mamíferos, durante la vida fetal o postnatal temprana, los testículos migran desde su localización intra-abdominal a un evaginación del peritoneo denominada escroto. Si bien éste no es el caso de todos los mamíferos, se supone que el descenso testicular al escroto estaría

relacionado con una menor temperatura en esa región respecto de la corporal, que de algún modo sería beneficiosa para el órgano.

La espermatogénesis comienza en la vida embrionaria con la migración de las células germinales al testículo primitivo (Austin & Short F.R.S., 1972). Como en la hembra, la gametogénesis en el macho también requiere de la meiosis para la producción de las gametas (**Figura 5**). La gran diferencia con la hembra radica en que mientras que en la ovogénesis todas las células germinales se diferencian en ovocitos durante el desarrollo embrionario, en el macho existe una población de células germinales capaces de multiplicarse por mitosis durante toda la vida adulta. De este modo, mientras que en la hembra existe un número fijo de gametas al principio de la vida fértil, en el macho la producción de espermatozoides es constante. Además, a diferencia de la hembra, en el macho la espermatogénesis comienza recién luego de la pubertad. A partir de ese momento, las espermatogonias sufren la meiosis y dan origen en primer lugar a los espermatocitos y luego a la espermatídes. En una segunda etapa, estas células redondas se diferencian morfológicamente para dar origen a los espermatozoides a través de un proceso denominado espermiogénesis, caracterizado por la pérdida de citoplasma, la condensación nuclear y la aparición de estructuras particulares como la cola y el acrosoma, relevantes para la función de la gameta.

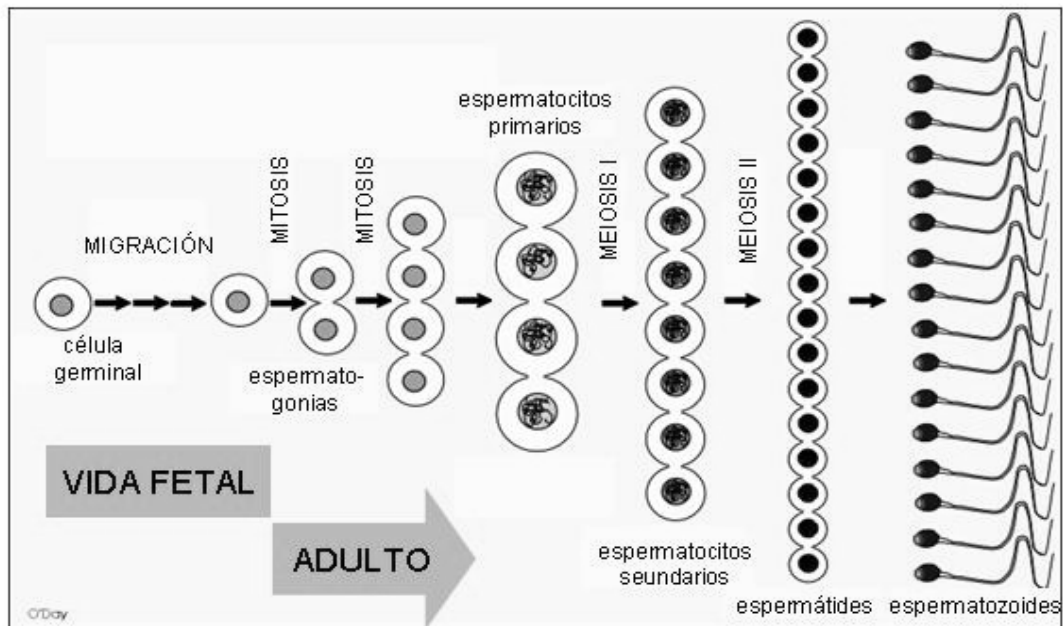


Figura 5. Esquema representativo de las etapas de la espermatogénesis.

El espermatozoide es una célula altamente especializada, con capacidad para transportarse hasta el sitio de fertilización en el tracto femenino y atravesar las cubiertas que rodean al ovocito para finalmente fertilizarlo. Existe una alta variabilidad en el tamaño de los espermatozoides de las distintas especies de mamíferos, siendo los de los roedores los de mayor tamaño, alcanzando longitudes entre tres y cinco veces mayores a las de la mayor parte de los animales domésticos y el hombre (Austin & Short F.R.S., 1972).

La cabeza del espermatozoide contiene dos elementos fundamentales: un núcleo compacto debido a la presencia de cromatina altamente condensada, y el acrosoma, estructura cuyos contenidos sería importantes para la fertilización (**Figura 6**) (Eddy & O'Brien, 1994). En la mayoría de los mamíferos, incluidos el hombre y gran parte de los animales domésticos, la cabeza del espermatozoide tiene una forma espatulada, en la que el núcleo y el acrosoma son estructuras simétricas, de forma aplanada en el sentido longitudinal de la

célula. En otros animales, como el hamster y el cobayo, existe una protrusión del acrosoma, perpendicular al plano aplanado de la cabeza. En los roedores, la cabeza es falciforme, con el acrosoma ocupando la región convexa del núcleo.

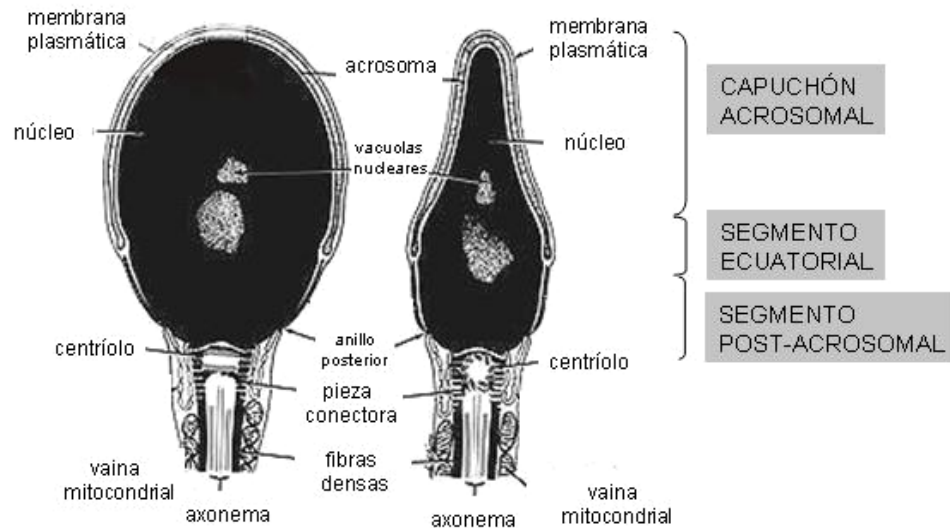


Figura 6. Esquema de la cabeza de un espermatozoide humano en el que se indican las diferentes estructuras internas.

En general, los espermatozoides son células de apariencia bastante homogénea dentro de cada especie. El hombre es una excepción, ya que aún en los individuos fértiles existe una gran variabilidad en la forma y el tamaño de la cabeza. El núcleo del espermatozoide es de un tamaño significativamente menor al del resto de los tipos celulares. El motivo de esta diferencia se debe, por un lado, a la presencia de la mitad de la información genética por tratarse de una célula haploide, pero particularmente a que el DNA se encuentra asociado a pequeñas proteínas básicas, las protaminas, que forman abundantes puentes disulfuro y permiten un alto grado de compactación de la cromatina. El núcleo se encuentra rodeado por una envoltura nuclear bastante inusual, caracterizada por la cercanía entre las dos membranas que la

conforman y la escasez de poros nucleares. El acrosoma es una estructura membranosa que rodea al núcleo en la parte anterior de la cabeza, originada en el aparato de Golgi durante la espermatogénesis. La forma y el tamaño del acrosoma es variable en las diferentes especies, relacionándose generalmente a la forma de la cabeza. Si bien la membrana que rodea al acrosoma es única y continua, se ha definido como “membrana acrosomal interna” a aquella que envuelve a la membrana nuclear externa, y como “membrana acrosomal externa” a la que se encuentra por debajo de la membrana plasmática, en la parte anterior de la cabeza. El acrosoma, a su vez está constituido por dos segmentos denominados capuchón acrosomal y segmento ecuatorial, definidos principalmente por diferencias funcionales entre ellos. En cuanto a la composición del acrosoma, el mismo contiene en su interior varias moléculas con actividad enzimática, las cuales se han relacionado a la capacidad del espermatozoide de penetrar las cubiertas que rodean al ovocito durante la fertilización. Estudios de microscopía y extracción diferencial de proteínas han sugerido que esta organela no sería simplemente un reservorio de enzimas solubles, sino que existiría una organización funcional de moléculas dada por la presencia de una matriz intra-acrosomal (Yanagimachi, 1988a; Kim & Gerton, 2003). Entre las numerosas enzimas contenidas dentro del acrosoma, se encuentran las hidrolasas ácidas comúnmente halladas en lisosomas, y otras enzimas específicas del espermatozoide. Los dos componentes mejor caracterizados del acrosoma son acrosina, una proteína perteneciente a la familia de las serin-proteasas y hialuronidasa, ambas con expresión específica en las células espermatogénicas. Si bien por su estructura y contenidos, el acrosoma se ha descrito como un lisosoma especializado, esta organela del espermatozoide tendría además algunas características de una vesícula de secreción, ya que como se verá más adelante, libera sus contenidos mediante exocitosis en respuesta a señales específicas que se producen durante la interacción del espermatozoide con el ovocito.

La cola o flagelo del espermatozoide de los mamíferos está compuesto por cuatro segmentos diferentes: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal (**Figura 7**) (Eddy & O'Brien, 1994). El componente estructural común en los diferentes segmentos es el axonema, filamento axial cuya estructura es similar a la de los flagelos y cilias de la mayoría de los animales y plantas, compuesta por microtúbulos siguiendo la disposición característica de "9+2". Rodeando al axonema desde la región de la pieza conectora hasta el final de la pieza principal se encuentran nueve fibras densas conteniendo proteínas similares a la queratina. La estabilización de estas fibras por un gran número de puentes disulfuro entre sus componentes sugiere que dichas estructuras estarían involucradas en otorgar al espermatozoide la elasticidad y flexibilidad necesarias para el batido de la cola. Además de las fibras densas, en la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, estructura compuesta por mitocondrias organizadas extremo con extremo, que envuelven a la cola en forma helicoidal y cumplirían un papel en la provisión de energía para el espermatozoide. En la pieza principal reemplazando a la vaina mitocondrial se encuentra la vaina fibrosa, conformada por dos columnas longitudinales asociadas entre sí por columnas transversales. El alto grado de compactación y la orientación de las fibras en la vaina fibrosa serían importantes para modular el plano de batido de la cola del espermatozoide. Por último, la pieza terminal está formada por el axonema como único componente estructural.

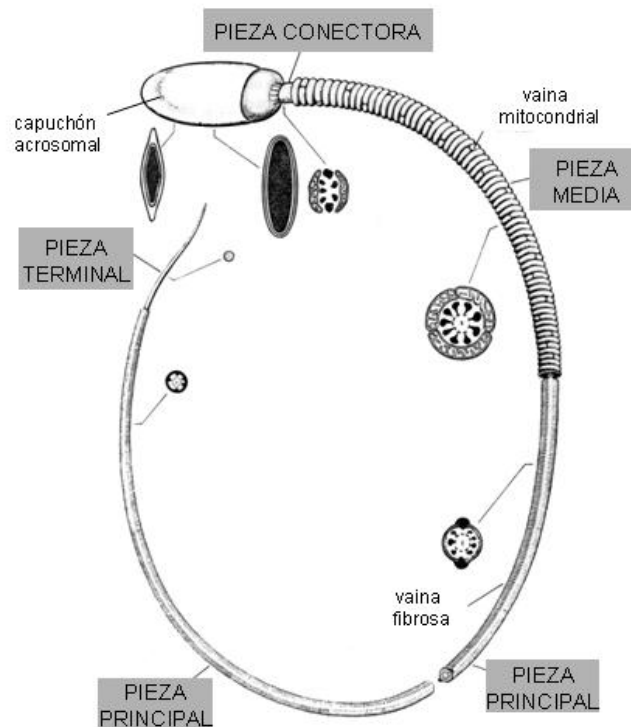


Figura 7. Esquema de un espermatozoide humano en el que se indican las diferentes estructuras internas de la cola.

Al igual que en cualquier otro tipo celular, una membrana plasmática rodea a la totalidad del espermatozoide. A diferencia de otras células, la membrana del espermatozoide se encuentra subdividida en dominios o regiones independientes, coincidentes en general con estructuras internas, diferentes entre sí no sólo en la composición sino también a nivel funcional. Estos dominios son estructuras dinámicas que sufren cambios en organización y composición durante la vida de la célula. Los dominios principales de la cabeza del espermatozoide son la región acrosomal y la región postacrosomal. La región acrosomal se subdivide a su vez en el segmento principal o capuchón acrosomal, y el segmento ecuatorial. En la cola, los dominios de la membrana plasmática se denominan pieza media y cola posterior, abarcando la región de la pieza media estructural y las otras regiones más terminales, respectivamente.

Maduración epididimaria

En los mamíferos, los espermatozoides testiculares no tienen la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito. Adquieren esta capacidad durante su pasaje por el epidídimo, en un proceso conocido como maduración epididimaria (Bedford, 1979; Hinrichsen & Blaquier, 1980; Austin, 1985; Cooper, 1986). El epidídimo es un conducto único, largo y muy replegado, que cubre el borde posterior del testículo. Convencionalmente, y si bien no existen límites anatómicos definidos, el epidídimo se divide en tres regiones: caput (cabeza), corpus (cuerpo) y cauda (cola), siendo a su vez divididas cada una de ellas en proximal y distal. Aunque no todos los espermatozoides adquieren la capacidad fertilizante simultáneamente, y existe variación entre las distintas especies, la gran mayoría de los espermatozoides obtiene el potencial fertilizante al llegar a la porción distal del epidídimo.

El proceso de maduración es dependiente de andrógenos y consiste en una serie de cambios bioquímicos y funcionales entre los que se incluyen el desarrollo de la motilidad progresiva y direccional, cambios estructurales tales como la pérdida de la gota citoplasmática y la estabilización de la cromatina, y cambios metabólicos como el aumento de la tasa de glucólisis y del consumo de oxígeno (Dyson & Orgebin-Crist, 1973; Blaquier et al, 1973);(Chevrier & Dacheux, 1992; Girija Devi & Shivaji, 1994). Pero sin lugar a dudas, la mayor parte de los cambios ocurre a nivel de la membrana plasmática, como el procesamiento, la migración y la liberación de proteínas existentes en la superficie del espermatozoide, y la adquisición de nuevas proteínas secretadas por el epidídimo. Mientras que algunas de estas proteínas mediarían la interacción del espermatozoide con el ovocito (Cuasnicú et al, 2002) otras, que reciben el nombre de factores decapacitantes, estabilizarían la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia de un proceso que debe ocurrir en las inmediaciones del ovocito y que será descrito más adelante, denominado la reacción acrosomal (Oliphant et al, 1985; Fraser et al, 1990).

Capacitación

Los espermatozoides maduros que salen del epidídimo son móviles y tienen la capacidad potencial de fertilizar al ovocito. Para poder expresar dicha capacidad, los espermatozoides deben permanecer durante cierto período en el tracto femenino. Este fenómeno fue originalmente descrito en 1951 (Austin, 1951) y ha recibido el nombre de “capacitación” (Chang, 1951; Austin, 1952). Se ha propuesto que, dado que el eyaculado estaría conformado por poblaciones heterogéneas de espermatozoides, la capacitación podría ser importante para seleccionar subpoblaciones óptimas de espermatozoides para la fertilización en forma regulada, y así extender la “capacidad fertilizante” del eyaculado (Bedford, 1983).

Uno de los principales eventos involucrados en la capacitación es la disminución del contenido de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Go & Wolf, 1985; Cross, 1998; Osheroff et al, 1999; Visconti et al, 1999). Este proceso se origina por la captura del colesterol por albúmina y lipoproteínas de alta densidad presentes en el tracto femenino que produce un aumento en la fluidez de la membrana. Además de la disminución del contenido de colesterol, se han detectado cambios en las proteínas de la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación. Existen proteínas débilmente asociadas a la superficie del espermatozoide, las cuales inhiben la capacitación y son conocidas como factores decapacitantes, que son removidas durante el tránsito por el tracto femenino (Oliphant & Brackett, 1973; Oliphant, 1976; Oliphant et al, 1985; Fraser et al, 1990). Se ha sugerido que estas proteínas actuarían entrecruzando a proteínas intrínsecas de la membrana plasmática e impidiendo su movimiento lateral dentro de la bicapa lipídica. De este modo, podrían explicarse algunos fenómenos de redistribución de proteínas que se han asociado con la capacitación, entre los que puede mencionarse a la proteína PH-20 de cobayo (Primakoff et al, 1985), la galactosiltransferasa de ratón (Lopez & Shur, 1987), el antígeno 2B1 de rata

(Jones et al, 1990) y la proteína epididimaria de rata DE (Rochwerger & Cuasnicu, 1992). Tanto el aumento de la fluidez de la membrana como la relocalización de proteínas de membrana estarían relacionados a eventos intracelulares involucrados en la adquisición de la capacitación. Se ha sugerido que además de regular la fluidez de la membrana, el colesterol podría directamente afectar la función de canales y enzimas en la membrana del espermatozoide, que tendrían efectos sobre diferentes mecanismos de traducción de señales en el espermatozoide (Kopf et al, 2002).

Numerosos estudios en diferentes especies han demostrado que además de un aceptor de colesterol, como la albúmina, la capacitación sería altamente dependiente de los iones bicarbonato (HCO_3^-) (Boatman & Robbins, 1991; Visconti et al, 1995a; Da Ros et al, 2004) y calcio (DasGupta et al, 1993; Visconti et al, 1995b). El movimiento de dichos iones a través de transportadores específicos en la membrana estaría relacionado con la regulación del metabolismo del AMP cíclico (AMPc) a través de la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) del espermatozoide (Kopf et al, 2002). Se ha correlacionado un aumento en la actividad de la AC durante la capacitación con la fosforilación de proteínas del espermatozoide en residuos tirosina (Visconti et al, 1995b).

A pesar de que fisiológicamente el espermatozoide debe atravesar el tracto femenino para capacitarse y adquirir la habilidad de fertilizar al ovocito, la capacitación puede llevarse a cabo en condiciones *in vitro* si se coloca a los espermatozoides en un medio definido. Este medio puede ser variable de una especie a otra, pero en general debe contar con una composición similar a la del fluido oviductal, e incluir fuentes de energía (tales como los sustratos piruvato, lactato, y glucosa) y de proteína (como por ejemplo, albúmina) y los iones HCO_3^- y calcio.

Las modificaciones que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación traen como consecuencia cambios tanto en la cabeza como en la cola del espermatozoide. En el primer caso, los cambios permiten que el espermatozoide pueda sufrir la denominada **reacción acrosomal (RA)**. Los cambios producidos en la membrana plasmática de la cola, por su parte, permiten al espermatozoide desarrollar el fenómeno de **hiperactivación**.

Reacción acrosomal

La RA consiste en la vesiculización del capuchón acrosomal del espermatozoide, que ocurre mediante un mecanismo similar al proceso de exocitosis. El proceso comienza con la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos de la región acrosomal, con excepción del segmento ecuatorial (**Figura 8**).

En los sitios de fusión, la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa forman vesículas mixtas, que se desprenden en un fenómeno conocido con el nombre de "pérdida del capuchón acrosomal". Entre las vesículas se crean poros por los que se libera el contenido del acrosoma. Al final de la RA, la membrana acrosomal interna se encuentra expuesta al medio extracelular, y adquiere continuidad con la membrana plasmática del segmento ecuatorial (Yanagimachi, 1994). Se denomina *intacto* a aquel acrosoma que no presenta ningún tipo de alteraciones en su morfología, *modificado* a aquel que presenta alteraciones morfológicas tales como hinchamiento o rugosidades, y *reaccionado* a aquel que presenta ya sea vesiculización del acrosoma o pérdida total del capuchón acrosomal.

La liberación del contenido del acrosoma durante la RA tiene dos consecuencias principales, que resultan fundamentales para la ocurrencia de la fertilización. Una de ellas es la exposición de moléculas intraacrosomales

que permiten al espermatozoide penetrar la ZP, mientras que la segunda y no menos importante, es la adquisición de la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial.

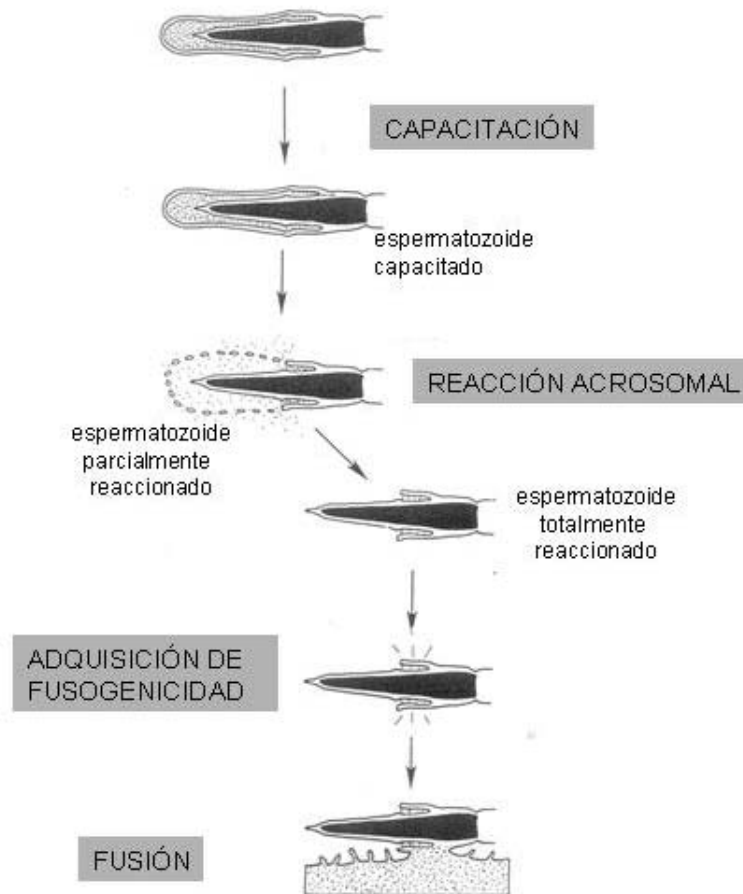


Figura 8. Esquema de la progresión de la reacción acrosomal.

La RA es el proceso fisiológico que ocurre en los espermatozoides vivos, capacitados, de vital importancia para la interacción con el ovocito. Es importante diferenciar la RA fisiológica o verdadera de la RA falsa, que consiste en la pérdida del capuchón acrosomal por muerte de los espermatozoides. Existen dos tipos de RA verdadera, una inducida por el ovocito y una espontánea, que se produce en ausencia del ovocito. El principal

inductor de la RA, y el que ha sido más estudiado en numerosas especies, es la ZP (Florman & Storey, 1982; Uto et al, 1988). Se ha demostrado que sus componentes solubilizados también son eficientes inductores de la reacción acrosomal (Florman & Storey, 1982; Bleil & Wassarman, 1983; Cherr et al, 1986; O'Rand & Fisher, 1987; Florman & First, 1988; Berger et al, 1988; Cross et al, 1988). Es ampliamente aceptado que la glicoproteína ZP3 sería el receptor para el espermatozoide en la ZP responsable de la reacción acrosomal inducida (Yanagimachi, 1994). La actividad de receptor sería ejercida por los residuos glicosílicos que se unirían a componente/s de la membrana del espermatozoide. La unión de los oligosacáridos de ZP3 a distintos sitios en el espermatozoide produciría la agregación de dichos sitios, lo cual induciría la reacción acrosomal (Leyton & Saling, 1989). Si bien la ZP sería el inductor principal de la RA, existen evidencias de que la progesterona que se encuentra en el fluido folicular que acompaña a las células del cúmulus también tiene la capacidad de inducirla (Parinaud et al, 1992; Blackmore, 1993; Roldan et al, 1994). Se ha postulado un efecto sinérgico entre elementos presentes en el cumulus y la ZP sobre el espermatozoide para completar la reacción (Cherr et al, 1986). Por lo tanto, no existiría en el medio de fertilización un único componente crucial para el desencadenamiento de la reacción acrosomal. Resulta más probable que el espermatozoide capacitado se encontrara listo para sufrir la reacción acrosomal, y que su inducción se produjera a medida que avanza a través de concentraciones crecientes de factores estimulantes, durante su acercamiento al ovocito. Durante la inducción de la RA, la entrada de calcio extracelular sería un paso esencial (Yanagimachi, 1994). Al respecto, se demostró que el ionóforo A23187, que provoca la entrada masiva de calcio a la célula, es capaz de inducir la reacción acrosomal (Green, 1978).

Tradicionalmente, se pensaba que las enzimas contenidas dentro del acrosoma eran las encargadas de digerir tanto a la matriz extracelular de las células del cúmulus como a la ZP durante la RA, y permitir al espermatozoide

abrirse camino hasta el ovocito (Yanagimachi, 1994). Esta hipótesis se vio modificada por evidencias demostrando que, al menos en el ratón, la RA ocurría principalmente cuando el espermatozoide contactaba la ZP (Saling & Storey, 1979; Wassarman et al, 1985), y que los espermatozoides reaccionados eran incapaces de penetrar el cúmulus (Talbot, 1985). En los últimos años, se afirmaba que sólo los espermatozoides intactos eran capaces de unirse a la ZP. De acuerdo a este modelo, una vez unidos a la ZP, los espermatozoides sufrirían la RA, produciéndose la liberación de los contenidos del acrosoma, los cuales serían importantes para la penetración de la ZP. Recientemente, los Dres. Kim y Gerton (2003) propusieron un nuevo modelo, denominado “de exocitosis acrosomal”, en el que replantearon el mecanismo de la RA y el papel de las moléculas acrosomales en la interacción con las cubiertas del ovocito (Kim & Gerton, 2003). Según estos autores, la RA sería un proceso gradual, espontáneo, que sería acelerado por la ZP pero no iniciado por la misma. Según este modelo reciente, los espermatozoides no deben estar intactos para unirse a la ZP.

Además de ser importante para la unión/penetración de la ZP, la RA sería un evento crucial para la fusión de las gametas. Los espermatozoides con acrosomas intactos pueden unirse al oolema, pero son incapaces de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Yanagimachi, 1994). Existen evidencias indicando que ciertas enzimas acrosomales como la acrosina y las metaloproteasas, liberadas durante la RA, afectarían a la membrana del segmento ecuatorial otorgándole fusogenicidad (Diaz-Perez et al, 1988; Diaz-Perez & Meizel, 1992; Takano et al, 1993).

Hiperactivación

Un fenómeno íntimamente relacionado con la capacitación, observado tanto *in vivo* como *in vitro* en todas las especies estudiadas, es la hiperactivación. Este

fenómeno, descrito por primera vez en el hamster (Yanagimachi, 1969), consiste en el tipo de movimiento típico que presentan los espermatozoides capacitados en el lugar de la fertilización (Yanagimachi, 1994). El movimiento hiperactivado se caracteriza por un incremento en la velocidad, una disminución de la linealidad, y un aumento de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, sumados a movimientos del flagelo similares a latigazos (Suarez, 1996; Suarez et al, 1991). El patrón de motilidad durante la hiperactivación es variable en las diferentes especies de mamíferos estudiadas; en algunas de ellas, se observa a la cabeza de los espermatozoides trazar una figura que se asemeja a un ocho durante el estado hiperactivado (Yanagimachi, 1994). Si bien se supone que existen señales en el oviducto que inician la hiperactivación en el momento adecuado, no se han identificado con certeza moléculas relevantes para este proceso (Suarez & Ho, 2003). Asimismo, la cascada de señales que regulan la hiperactivación tampoco se haya completamente descrita, aunque se sabe que el calcio sería fundamental, y que la interacción de este ion con el axonema de la cola del espermatozoide sería capaz de desencadenar la hiperactivación. Además del calcio, tanto el cAMP como el ATP serían requisitos fundamentales para el mantenimiento del movimiento hiperactivado. En cuanto a los fundamentos fisiológicos de la hiperactivación, la misma sería crítica para el éxito de la fertilización, ya que favorecería la capacidad de los espermatozoides de desprenderse de la pared del oviducto, y penetrar el cúmulus y la ZP del ovocito (Suarez & Dai, 1992; Wang et al, 1993; Yanagimachi, 1994).

Penetración del cúmulus

En la mayoría de las especies de mamíferos, los espermatozoides que llegan al oviducto encuentran al ovocito rodeado de células de la granulosa formando el cúmulus (Zhuo & Kimata, 2001). Como se describiera anteriormente, el componente predominante de la matriz del cúmulus es el AH,

glicosaminoglicano que le proveería a dicha estructura celular las propiedades viscoelásticas que lo caracterizan. Por lo tanto, los espermatozoides que se aproximan al ovocito durante la fertilización deben avanzar a través de la matriz existente entre las células del cúmulus para atravesar el cúmulus (**Figura 9**).

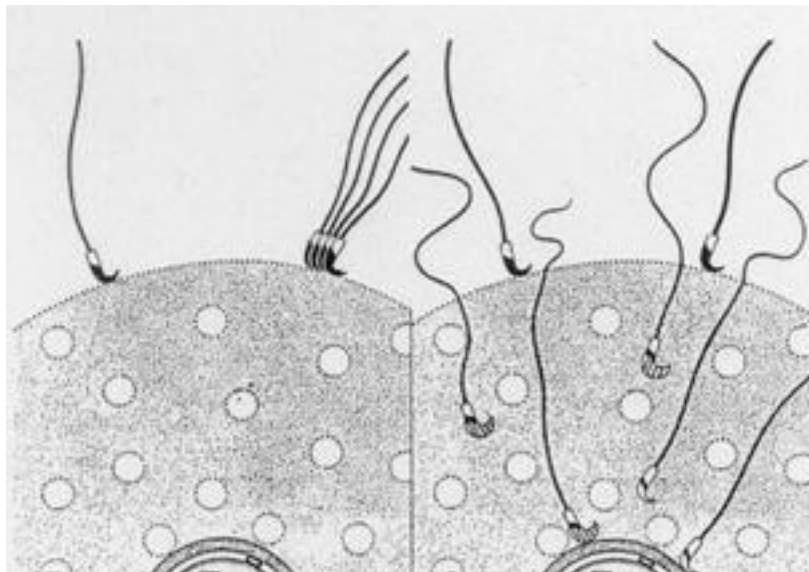


Figura 9. Esquema de la penetración de los espermatozoides a través de la matriz del cúmulus.

El hecho de que los ovocitos de algunas especies de animales euterianos no sólo tengan cúmulus vestigiales, y que los ovocitos puedan ser fertilizados *in vitro* en ausencia del cúmulus, ha llevado a algunos investigadores a sugerir que el mismo sería una estructura no esencial para la fertilización (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, evidencias provenientes de experiencias de fertilización *in vitro* en diferentes especies como el ratón (Pomeroy et al, 1988), el cerdo (Mattioli et al, 1988), y el bovino (Younis et al, 1991), indican que la presencia del cúmulus sería favorable para la interacción espermatozoide ovocito. Se ha propuesto que existirían factores solubles en el

cúmulus que estimularían tanto la motilidad de los espermatozoides como la ocurrencia de la reacción acrosomal (Roblero et al, 1990; Schroer et al, 2000). Además, se ha sugerido que el cúmulus tendría otras funciones tales como aumentar el tamaño del blanco a ser ubicado por los espermatozoides en el oviducto (Bedford & Kim, 1993), favorecer la penetración de la ZP (Yudin et al, 1988), prolongar la vida fértil de los espermatozoides, seleccionar aquellos con mayor capacidad fertilizante (Roblero et al, 1990; Tanghe et al, 2002) y favorecer el desarrollo embrionario (Zhang et al, 1995).

Aún existe controversia respecto de los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar durante la penetración del cúmulus. Una hipótesis postula que durante el avance de los espermatozoides se produciría una liberación parcial de enzimas acrosomales, previa a la vesiculización completa del acrosoma, responsable de degradar a la matriz y permitir al espermatozoide avanzar entre las células. Aunque esta teoría resulta atractiva fundamentalmente por el hecho de que existe una gran cantidad de enzimas dentro del acrosoma de la mayoría de las especies de mamíferos, no existen aún evidencias inequívocas que favorezcan esta hipótesis (Bedford, 2004). Otra hipótesis sugiere que los espermatozoides poseerían hialuronidasa asociada a la superficie de los mismos y que, sería esta enzima la que ayudaría en el pasaje a través de las células del cúmulus (Talbot, 1985). En este sentido, ha sido descrito que PH-20, una proteína testicular identificada por primera vez en la superficie del espermatozoide de cobayo (Primakoff et al, 1985), presenta actividad de hialuronidasa en las diferentes especies en las que ha sido detectada (Cherr et al, 1996; Gmachl et al, 1993; Lin et al, 1994). La relevancia de esta proteína para la penetración del cúmulus ha sido replanteada recientemente en vista de que los ratones KO para PH-20 son fértiles, a pesar de sufrir un retardo en la dispersión de las células del cúmulus respecto de los animales normales (Baba et al, 2002). En ese trabajo, se reveló la presencia de otras proteínas con actividad hialuronidasa, aún no caracterizadas. Sin embargo, dada la localización intraacrosomal de las mismas y teniendo en cuenta que los

espermatozoides de ratón no reaccionan hasta contactar con la ZP, los autores del trabajo proponen que probablemente estas proteínas cumplan un papel en la interacción con la ZP y no en la penetración del cúmulus. Según ellos, otras actividades enzimáticas y/o la motilidad podrían ser más importantes que la actividad hialuronidasa para la penetración del cúmulus, y por eso dicho evento no se ve afectado en los KO para PH-20. En este sentido, se ha observado que espermatozoides móviles de erizo de mar y de *Xenopus*, los cuales carecen de actividad hialuronidasa, son capaces de penetrar el cúmulus de hamster (Talbot et al, 1985).

Interacción espermatozoide-ZP

La unión de los espermatozoides capacitados a la ZP estaría mediada por la interacción de moléculas presentes tanto en la superficie del espermatozoide como en la ZP. Los primeros resultados respaldando esta teoría provinieron de un trabajo de Gwatkin & Williams (1977), en el que la incubación de espermatozoides capacitados con ZP solubilizada produjo una inhibición en la unión de espermatozoides a ovocitos con ZP *in vitro* (Gwatkin & Williams, 1977). Se concluyó entonces que el espermatozoide debía tener en su superficie receptores para la ZP que, al verse saturados por sus ligandos en la ZP solubilizada, eran incapaces de mediar la unión entre las gametas.

Las moléculas de la ZP responsables de la unión al espermatozoide han sido mayormente estudiadas en el ratón. Basándose en evidencias provenientes de esa especie, se ha propuesto un modelo de interacción entre el espermatozoide y la ZP, según el cual existirían dos etapas (**Figura 10**) (Wassarman, 1988b). En la primera o de “unión primaria” el espermatozoide intacto se uniría fuertemente a carbohidratos específicos de ZP3 (ligando primario). Como consecuencia, la glicoproteína ZP3 induciría la RA en el espermatozoide. Una vez ocurrida la RA, tendría lugar la etapa de “unión

secundaria”, en la cual el espermatozoide se uniría fuertemente a la ZP para penetrar a la ZP y finalmente interactuar con la membrana plasmática del ovocito.

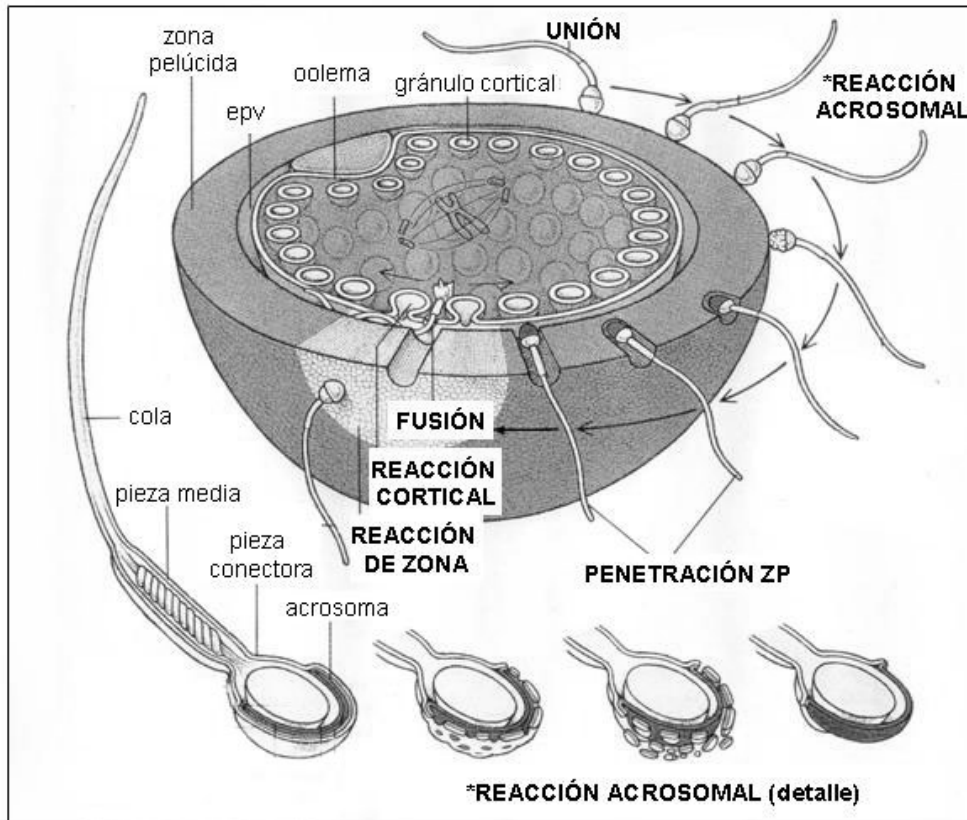


Figura 10. Esquema de los diferentes eventos de la interacción del espermatozoide con la ZP y el oolema.

Unión primaria

Numerosas moléculas del espermatozoide han sido postuladas como mediadoras de la interacción con la ZP. En cuanto a los receptores para la unión primaria, uno de los candidatos más extensamente estudiados ha sido la β 1,4-galactosiltransferasa I (GalT I). Diversas evidencias han demostrado que la unión de GalT I a ZP3 induciría la agregación de ésta molécula en la superficie de la cabeza del espermatozoide y, como consecuencia, la

liberación del contenido acrosomal (Miller et al, 1992; Gong et al, 1995). Contrariamente a lo esperado para el receptor de la ZP, los espermatozoides de los animales KO para GalT I conservan la capacidad de unirse a la ZP y de fertilizar al ovocito (Lu & Shur, 1997). Esos espermatozoides no sufren la RA inducida por ZP3, y poseen una unión deficiente a ZP3 solubilizada, por lo que se ha determinado que GalT I sería una proteína esencial para la inducción de la RA mediada por ZP3, pero no sería requerida para la unión primaria del espermatozoide a la ZP. Otros candidatos alternativos propuestos como receptores primarios de la ZP fueron obtenidos a través de ensayos bioquímicos en los que se aislaron proteínas de espermatozoide con afinidad para ZP3. De esta forma se identificaron proteínas tales como sp56 (Bleil & Wassarman, 1990), zonadhesina (Hardy & Garbers, 1995) y P47 (Ensslin et al, 1998). Estudios posteriores de localización demostraron que tanto sp56 como zonadhesina se encuentran formando parte del contenido acrosomal, por lo que, según el modelo tradicional, no serían responsables de la unión del espermatozoide intacto a ZP3 durante la unión primaria (Foster et al, 1997; Lea et al, 2001; Kim et al, 2001b). Esta controversia llevó a Gerton y colaboradores a intentar explicar la interacción de moléculas intraacrosomales como sp56 con la ZP3, mediante el Modelo de Exocitosis Acrosomal descrito anteriormente (ver sección Reacción acrosomal) (Kim & Gerton, 2003). Según este nuevo modelo los espermatozoides pasarían por estadios intermedios de liberación del contenido acrosomal durante la RA espontánea, y por lo tanto las moléculas de la matriz acrosomal podrían asociarse a la ZP. Respecto a p47, la tercera proteína aislada por su afinidad a ZP3, se ha reportado recientemente la identificación de un homólogo para esta proteína en ratón, denominado SED1, relevante para la etapa de unión del espermatozoide a la ZP (Ensslin & Shur, 2003). SED1 se localiza en la membrana plasmática del espermatozoide, en la región dorsal del acrosoma, considerada el área responsable de la unión primaria (Wassarman et al, 2001). La proteína se une específicamente a la ZP, y a ZP2 y ZP3 aisladas. Además, tanto el anticuerpo contra SED1 como la proteína recombinante son capaces de inhibir la unión de

los espermatozoides de ratón a la ZP. Los animales KO para SED1 son subfértiles *in vivo* e incapaces de unirse a la ZP de ovocitos *in vitro*.

Unión secundaria

Tal como se describiera para la unión primaria a ZP3, se han postulado diferentes moléculas como mediadoras de la unión secundaria a la ZP, es decir de la interacción del espermatozoide reaccionado con ZP2. Si bien la unión secundaria es un proceso poco comprendido aún, se ha sugerido que proteínas como PH-20 y proacrosina (y su forma activa acrosina) podrían estar involucradas en esta etapa. PH-20 se localiza en la membrana acrosomal interna (MAI) en espermatozoides reaccionados e interactúa con ZP2 mediante una actividad independiente de la hialuronidasa, mediada por el dominio C-terminal, el cual es clivado durante la RA (Myles & Primakoff, 1997; Yudin et al, 1999). Proacrosina/acrosina también se encuentra asociada a la MAI de los espermatozoides reaccionados y es capaz de asociarse a ZP2 (y sus proteínas homólogas) en diferentes especies (Richardson & O'Rand, 1996; Crosby et al, 1998; Furlong et al, 2000; Howes et al, 2001). Se ha sugerido que la unión de proacrosina/ acrosina a la ZP a través de uniones iónicas respondería a las características bioquímicas esperadas para un receptor en el espermatozoide, es decir a través de una unión lo suficientemente fuerte como para mantener al espermatozoide reaccionado unido a la ZP, pero reversible de forma tal de permitir que el mismo avance para penetrar la ZP (Howes et al, 2001).

Penetración de la ZP

Dos hipótesis han sido propuestas para intentar explicar el mecanismo de penetración de la ZP (Yanagimachi, 1994). Una de ellas, la hipótesis enzimática, sostiene que el pasaje a través de la ZP sería dependiente de la acción de enzimas presentes en el acrosoma. Esta teoría postula que la mayoría de dichas enzimas serían liberadas sobre la superficie de la ZP durante la RA (Saling, 1981, Shur y Hall, 1982), provocando hidrólisis en la porción de la zona que rodea al espermatozoide e induciendo así el

"ablandamiento" de la misma (Urch *et al.*, 1985). Otras enzimas, como la hexosaminidasa y la acrosina, permanecerían unidas a la membrana acrosomal interna y serían las responsables de clivar las moléculas de ZP2 a las que el espermatozoide se haya unido, permitiendo así el avance a través de la ZP (Urch *et al.*, 1985; Miller *et al.*, 1993; Howes *et al.*, 2001). La segunda hipótesis, denominada hipótesis mecánica, sostiene que el espermatozoide se abriría paso a través de la zona en forma independiente de la actividad de las enzimas acrosomales. En este caso, la reacción acrosomal permitiría la exposición del perforatorium, una estructura rígida, que cortaría la zona y que, conjuntamente con la motilidad hiperactivada presente en los espermatozoides, favorecerían la penetración de la ZP. Esta hipótesis ha sido respaldada fuertemente por el Dr. Bedford, quien sostiene que la penetración mecánica de la ZP en los mamíferos euterianos estaría respaldada por las características estructurales y funcionales de la cabeza de los espermatozoides, incluyendo la rigidez del núcleo, la forma aplanada de la cabeza, el perfil filoso del perforatorium y la rigidez de la membrana acrosomal interna (Bedford, 2003). O'Rand y colaboradores (1986) han propuesto una hipótesis que involucraría ambos mecanismos. En primer lugar, el espermatozoide se asociaría a la ZP a través de una unión de alta afinidad. Se produciría entonces la degradación de las moléculas de la ZP involucradas en esa interacción, dejando libres como consecuencia a las proteínas del espermatozoide, las que quedarían disponibles para interactuar con nuevas moléculas de la ZP. En este punto jugaría un papel importante la motilidad, ya que si el espermatozoide no se moviera en forma progresiva, la probabilidad de encontrar nuevas moléculas para interactuar sería muy baja y la penetración no se produciría.

Además de proteger al ovocito y al embrión estructuralmente, la ZP tendría una función adicional importante: impedir la fertilización cruzada entre especies. Si bien se conoce la existencia de casos de mamíferos híbridos provenientes de dos especies diferentes, en general los animales se aseguran

de evitar la reproducción inter-específica mediante mecanismos comportamentales y anatómicos. Sin embargo, si se co-incubaban las gametas de dos especies diferentes *in vitro*, es decir habiendo salteado otras barreras interespecíficas, en general tampoco ocurre la fertilización, sugiriendo la existencia de mecanismos celulares adicionales. Se ha demostrado que una de las barreras más eficientes para impedir la fertilización inter-específica es la ZP (Hanada & Chang, 1972). En este sentido, luego de la remoción de la ZP, los ovocitos de varias especies se vuelven “fertilizables” por los espermatozoides capacitados de especies diferentes. Históricamente, se consideraba a ZP3 como la molécula responsable de la especie-especificidad de la ZP. Recientemente, el análisis de los datos provenientes de animales con modificaciones genéticas en sus ZPs ha llevado a una re-evaluación de la teoría de la especie-especificidad dada por una única molécula (Hoodbhoy & Dean, 2004). En estos animales, el reemplazo de ZP2 o ZP3 de ratón por las proteínas homólogas humanas no se vio reflejado en la unión de espermatozoides humanos a la ZP (Rankin et al, 1998; Rankin et al, 2003). Contrariamente a lo esperado, los ovocitos de estos animales transgénicos fueron capaces de unir espermatozoides de ratón normalmente, y su fertilidad no se vio afectada. En un principio se postuló que la falta de una glicosilación especie-específica podría ser la causa de dichos resultados. Sin embargo, tanto ZP2 como ZP3 presentes en las ZPs “humanizadas” presentaron glicosilación similar a la humana. Si bien se han sugerido algunas explicaciones alternativas para intentar explicar el fenotipo de los animales transgénicos con ZP2/ZP3 humanas, tales como la falta de ZP1 humana o de una proteína adicional a la de la ZP humana recientemente clonada (Hoodbhoy et al, 2005), aún ninguna de ellas ha resultado completamente convincente.

Fusión espermatozoide-ovocito

Habiéndose unido y atravesado la ZP, el espermatozoide se encuentra en el espacio perivitelino y alcanza la proximidad del oolema. A continuación, ocurre un evento raro en lo que respecta a la biología celular, ya que se produce la fusión de dos células diferentes. El proceso de fusión del espermatozoide con el ovocito comprende dos fases de interacción entre las membranas de ambas gametas: una primera de unión o adhesión al oolema, y una segunda de fusión propiamente dicha.

La secuencia de eventos celulares que comprenden la fusión podría delinearse de la siguiente forma: en primer lugar, la cabeza del espermatozoide se une al oolema y luego de un breve período, que varía según la especie, se produce una abrupta declinación o cesación del movimiento de la cola que coincide con la fusión propiamente dicha (Gaddum-Rosse, 1985). Finalmente, el espermatozoide entero es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi & Phillips, 1980b). Mientras que la parte posterior de la cabeza y la cola son incorporadas a través de fusión de membranas, la región anterior de la cabeza es incorporada al citoplasma de un modo similar a la fagocitosis (**Figura 11**).

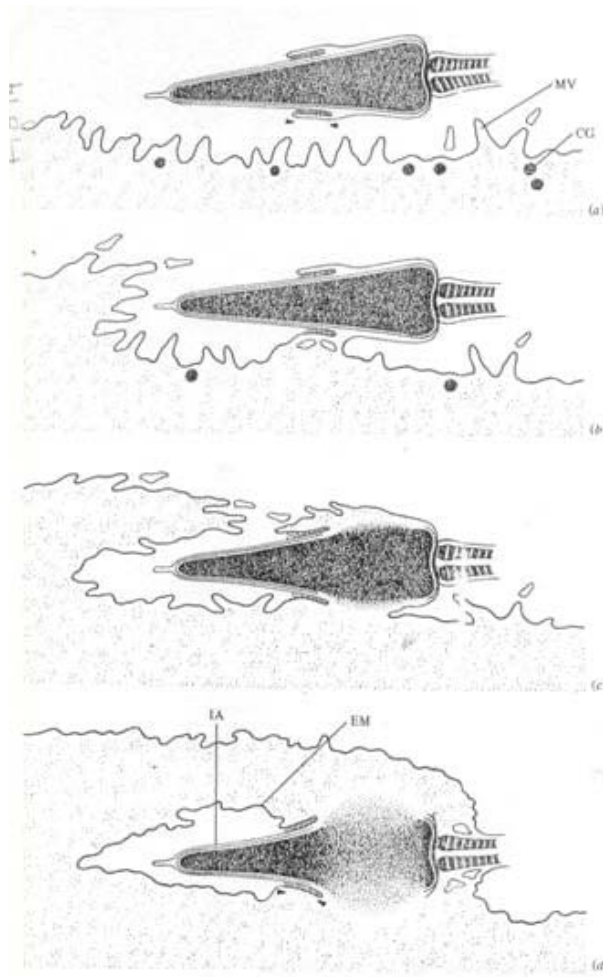


Figura 11. Esquema de eventos que ocurren durante la fusión espermatozoide-ovocito. a) inicio de interacción entre el segmento ecuatorial y el oolema, b) fusión de algunos puntos, c) la membrana del ovocito rodea la parte anterior de la cabeza, d) se incorpora el espermatozoide al ooplasma mediante fusión de la parte posterior de cabeza y la cola, y "fagocitosis" de la parte anterior.

No toda la membrana plasmática del espermatozoide y el ovocito tiene la capacidad de fusionarse con el oolema ya que los dominios de membrana involucrados en fusión son restringidos en ambos tipos celulares. En el espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial es la que primero se fusiona con el ovocito (Arts et al, 1993; Yanagimachi, 1994). 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 (Yanagimachi, 1994). Por el contrario, la RA es un requisito fundamental para la ocurrencia de la fusión, ya que los espermatozoides no reaccionados (intactos) son incapaces de fusionarse con el oolema. Esta observación demuestra que los componentes del segmento ecuatorial responsables de otorgar la fusogenicidad a dicho dominio se encontrarían ausentes en el espermatozoide intacto, o bien requerirían de activación luego de la RA (Arts et al, 1997; Yanagimachi, 1988a; Arts et al, 1993). Se ha sugerido que la unión y la fusión al oolema serían eventos independientes, ya que los espermatozoides intactos pueden unirse al oolema. Asimismo, se ha determinado que la presencia de Ca^{2+} es necesaria para la ocurrencia de la fusión pero no para la unión y que en ausencia de Ca^{2+} los espermatozoides pueden unirse sin fusionarse (Yanagimachi, 1978).

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. La fusión raramente ocurre por la región de la membrana libre de microvellosidades (Shalgi & Phillips, 1980a; O'Rand et al, 1986; Matsudaira, 1990; Ducibella, 1991). 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.

Existe consenso respecto a que la fusión ocurre a través de la interacción de moléculas complementarias localizadas en los dominios fusogénicos específicos de las membranas de ambas gametas. Si bien existe abundante información sobre los aspectos estructurales de la fusión de gametas en mamíferos (Yanagimachi, 1988b), sólo en la última década se ha comenzado a identificar los componentes moleculares involucrados en este evento (Myles,

1993; Evans, 1999; Cuasnicu et al, 2001; Alfieri et al, 2003; Kaji & Kudo, 2004). Durante muchos años, las moléculas del espermatozoide implicadas en fusión se veían limitadas principalmente a las proteínas de la familia ADAM (a disintegrin and a metalloprotease domain) y a la proteína epididimaria DE o CRISP-1. Recientemente, una nueva proteína denominada "Izumo", implicada en fusión, también fue identificada por el laboratorio del Dr. Okabe (Inoue et al, 2005).

Entre los diversos miembros que componen la familia ADAM (Wolfsberg et al, 1995), tres de ellos han sido descritos como mediadores importantes del proceso de fusión espermatozoide-ovocito: fertilina α (ADAM 1), fertilina β (ADAM 2) y cyritestina (ADAM 3). Estas proteínas se expresan en el testículo y se localizan en la cabeza del espermatozoide. Mientras que la proteína fertilina es un heterodímero entre las subunidades α y β (Blobel et al, 1992), cyritestina está compuesta por un único polipéptido (Heinlein et al, 1994). La presencia en el oolema de integrinas, moléculas con capacidad de unir a las ADAM a través de una secuencia desintegrina, junto con experimentos de fertilización *in vitro* en los cuales tanto las formas recombinantes de fertilina β y cyritestina como péptidos conteniendo el sitio desintegrina fueron capaces de inhibir la unión de los espermatozoides con el ovocito, sugirieron que estas proteínas mediarían la primera etapa de adhesión entre espermatozoide-ovocito (Linder & Heinlein, 1997; Yuan et al, 1997; Myles et al, 1994). La generación de ratones KO confirmó que fertilina β y cyritestina serían relevantes para la fertilidad, pero no exclusivamente a través de defectos en fusión (Cho et al, 1998; Shamsadin et al, 1999; Nishimura et al, 2001). El análisis de los KOs indicó que, si bien los espermatozoides de los KO para ambas ADAM presentaban una unión al oolema deficiente en ensayos de fusión *in vitro*, los mismos también tenían defectos en el transporte a través del oviducto y en la etapa de unión a la ZP. Dichos defectos, adicionales a los esperados, resultaron ser los principales responsables de la infertilidad en los animales modificados. Estudios posteriores indicaron que el fenotipo de los KOs podría estar dado por la falta o

la incorrecta formación de complejos multimoleculares de ADAMs en la superficie de los espermatozoides, provocada por defectos en la localización de otras ADAMs, además de la modificada, en la membrana de los espermatozoides (Nishimura et al, 2001; Nishimura et al, 2004). Respecto de la subunidad α de fertlina, si bien originalmente se sugirió que dicha molécula podría participar en el paso de fusión propiamente dicho a través de un péptido fusogénico putativo presente en la secuencia de la molécula (Martin & Ruyschaert, 1997; Muga et al, 1994; Martin et al, 1998; Wolfe et al, 1999), evidencias posteriores obtenidas en distintos laboratorios (Jury et al, 1997; Jury et al, 1998; Cho et al, 2000), han puesto en duda estos resultados.

La otra proteína implicada en fusión es la proteína epididimaria de rata DE, descrita por primera vez en nuestro laboratorio por los Dres. Cameo y Blaquier. Numerosas evidencias han demostrado que dicha molécula cumpliría una función en un evento de la fusión de gametas posterior a la unión de las membranas, y previo a la fusión propiamente dicha (Cohen et al, 1996; Rochwerger et al, 1992; Rochwerger & Cuasnicu, 1992; Cuasnicu et al, 2001). La presencia de homólogos funcionales para esta proteína en otras especies como el ratón y el humano ha respaldado su relevancia para la fertilización (Cohen et al, 2000a; Cohen et al, 2001). Dado que el estudio de la participación de la proteína DE durante la interacción de gametas constituye parte de los objetivos de esta tesis, estos temas serán desarrollados con mayor profundidad más adelante en la introducción.

Respecto a la proteína Izumo, si bien la misma fue aislada a partir de un anticuerpo monoclonal que había demostrado ser inhibitorio en estudios de fusión *in vitro* realizados años atrás (Okabe et al, 1988), su identificación recién fue reportada este año. Izumo corresponde a un miembro de expresión testicular de una nueva familia de inmunoglobulinas, denominadas IgSF. Estudios de IFI demostraron que la proteína es detectable en la región acrosomal solamente luego de la ocurrencia de la RA. En cuanto a la

relevancia de la proteína para la función espermática, el análisis de los animales KO para Izumo demostró que la misma sería fundamental para la fertilidad de los machos ya que si bien todos los animales KO fueron sanos, y las hembras presentaron una fertilidad normal, los machos fueron estériles. El estudio de los diferentes parámetros espermáticos *in vitro* demostró que la capacidad de los espermatozoides de fusionarse con el oolema estaba afectada en los animales KO. El efecto estaba restringido a la fusión, ya que otros parámetros tales como la motilidad, la migración por el oviducto, la penetración de la ZP y la unión a los ovocitos eran normales en esos espermatozoides.

La existencia de componentes moleculares en la membrana del ovocito involucrados en fusión fue sugerida por primera vez por Boldt y colaboradores (1989, 1988), quienes demostraron que el tratamiento de ovocitos de ratón con proteasas afectaba la habilidad de dichos ovocitos de fusionarse con el espermatozoide. Estudios posteriores mostraron que una proteína de 94 kDa que desaparecía de ovocitos tratados enzimáticamente era regenerada luego de varias h de terminado el tratamiento, en paralelo con una recuperación de la fusogenicidad (Kellom et al, 1992; Horvath et al, 1993). En el hámster, la situación parece ser distinta ya que el oolema en esta especie sería resistente al tratamiento proteolítico (Hirao & Yanagimachi, 1978; Ponce et al, 1993).

Las integrinas fueron las primeras moléculas postuladas como mediadoras del proceso de fusión, por tratarse de los ligandos en el oolema de las ADAMs del espermatozoide (Fusi et al, 1992). La integrina $\alpha 6\beta 1$, una de las principales en la superficie del ovocito, fue originalmente propuesta como la contraparte de fertilina β y, por lo tanto, como la responsable de la unión espermatozoide-ovocito (Almeida et al, 1995; Bigler et al, 2000). Sin embargo, el estudio de los ovocitos de animales KO para la integrina $\alpha 6\beta 1$ indicó que los mismos presentaban unión y fusión de gametas normales, descartando que esta integrina fuera fundamental para la fertilización (Miller et al, 2000). Si bien se

postulaba que otras integrinas presentes en el oolema pudieran ser funcionales durante la interacción espermatozoide-ovocito, un estudio reciente realizado en el laboratorio de los Dres. Myles y Primakoff utilizando diferentes combinaciones de animales KO para integrinas en ensayos de fusión *in vitro* en presencia de anticuerpos, demostró que ninguna de las integrinas conocidas en la superficie del ovocito (integrina $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, αV , $\beta 3$ y $\beta 5$) sería esencial para fusión (He et al, 2003).

La asociación entre la integrina $\alpha 6\beta 1$ y la tetraspanina CD9 durante la fusión en otros sistemas celulares, sugirió que CD9 también podría cumplir alguna función en el proceso de fusión de gametas (Chen et al, 1999b). Esta hipótesis fue confirmada a través de la generación de animales KO para este miembro de la superfamilia Transmembrane 4 Superfamily (Miyado et al, 2000; Le Naour et al, 2000; Kaji et al, 2000). A pesar ser una molécula expresada en varios tejidos, los KOs de CD9 presentaban un fenotipo general normal. Sin embargo, las hembras mutantes eran estériles, mientras que los machos no presentaban defectos en la fertilidad. Efectivamente, ensayos *in vitro* determinaron que los ovocitos de los animales KO para CD9 unían espermatozoides normalmente, pero eran incapaces de fusionarse con los mismos. De acuerdo a los resultados anteriores, CD9 sería la molécula del ovocito responsable, por sí sola o en cooperación con otras proteínas del oolema aún no identificadas, del proceso de fusión entre el espermatozoide y el ovocito. Estos estudios tuvieron gran importancia en el área de la biología molecular de las gametas, ya que consistieron en los primeros en los que se identificó a una molécula del ovocito esencial para la fertilidad femenina.

Resultados más recientes indicaron, además, que los animales KO para proteínas del ovocito unidas al oolema vía glicosilfosfatidilinositol (GPI) también presentaban ovocitos con la fusogenicidad altamente afectada (Alfieri et al, 2003), confirmando observaciones previas que indicaban que la remoción de proteínas unidas al ovocito por GPI provocaba un bloqueo de su capacidad

de fusión (Coonrod et al, 1999b). La identificación y caracterización de proteínas ancladas al oolema via GPI, que pudieran ser relevantes para la fusión, no han sido exitosas hasta el momento.

Activación del ovocito

Luego de la fusión, el ovocito inicia una serie de eventos conocidos conjuntamente como “activación”, que incluyen el reinicio de la meiosis detenida en metafase II desde la ovulación, la extrusión del segundo corpúsculo polar conteniendo la mitad del contenido cromosómico, la replicación del ADN y, finalmente, la primera división mitótica (Kurokawa et al, 2004). Dichos cambios son de vital importancia, ya que darán origen a un individuo nuevo y, a su vez, desencadenarán mecanismos tendientes a evitar la entrada de más de un espermatozoide al ovocito, impidiendo la polispermia y asegurando así la viabilidad del embrión. En todos los animales, la señal universal responsable de la activación del ovocito es el aumento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) en el citoplasma de la gameta. En los mamíferos, el Ca^{2+} aumenta en forma de repeticiones transitorias (oscilaciones), que se producen por la liberación de dicho ion de los depósitos intracelulares del ovocito. Si bien se conoce que el papel del Ca^{2+} es relevante en el proceso de activación, el mecanismo a través del cual el espermatozoide inicia la liberación de Ca^{2+} luego de la fusión con el ovocito aún no ha sido completamente dilucidado.

Se han propuesto tres hipótesis para intentar explicar el proceso de activación del ovocito. La primera de ellas, conocida como la “**hipótesis de la conductancia**”, presume que el espermatozoide introduce Ca^{2+} dentro del ovocito durante la fusión, estimulando la maquinaria del ovocito para iniciar las oscilaciones de Ca^{2+} . Esta hipótesis se ha visto objetada por evidencias indicando que el espermatozoide es capaz de inducir oscilaciones en medio

libre de Ca^{2+} (Jones, 1998) y que la inyección de Ca^{2+} dentro del citoplasma del ovocito no induce la activación (Swann & Ozil, 1994).

La segunda hipótesis, conocida como la “**hipótesis del receptor**”, se basa en la idea de que, al unirse al ovocito, una molécula del espermatozoide activa un receptor en el oolema que inicia una cascada de señales que culmina con la liberación de Ca^{2+} (**Figura 12A**). Se ha demostrado que péptidos con la secuencia desintegrina son capaces de producir oscilaciones de Ca^{2+} en ovocitos de *Xenopus* (Shilling et al, 1998) y bovino (Campbell et al, 2000). Sin embargo, hasta el presente no se han identificado moléculas en el espermatozoide o en el oolema capaces de mediar la activación del ovocito.

En tercer lugar, la “**hipótesis de la fusión**” sugiere que una sustancia soluble del espermatozoide, llamada “factor espermático”, es la responsable de inducir la activación luego de ser introducida en el ooplasma (**Figura 12B**). A favor de esta teoría, los resultados de numerosos experimentos han demostrado que la microinyección de extractos de espermatozoides, y no de otros tejidos, es capaz de provocar oscilaciones de Ca^{2+} en el ovocito y hasta en células somáticas (Kurokawa et al, 2004). Este mecanismo estaría muy conservado evolutivamente, ya que se ha visto que el espermatozoide conserva la capacidad de inducir oscilaciones aún en ovocitos de especies diferentes. Notablemente, los espermatozoides de plantas son capaces de inducir la liberación de Ca^{2+} en ovocitos de ratón (Li et al, 2001). A pesar de todas estas evidencias, si bien se ha postulado que el factor espermático tendría una naturaleza proteica, y se han propuesto algunos candidatos interesantes, aún no se ha logrado una demostración inequívoca de la identidad de dicha molécula.

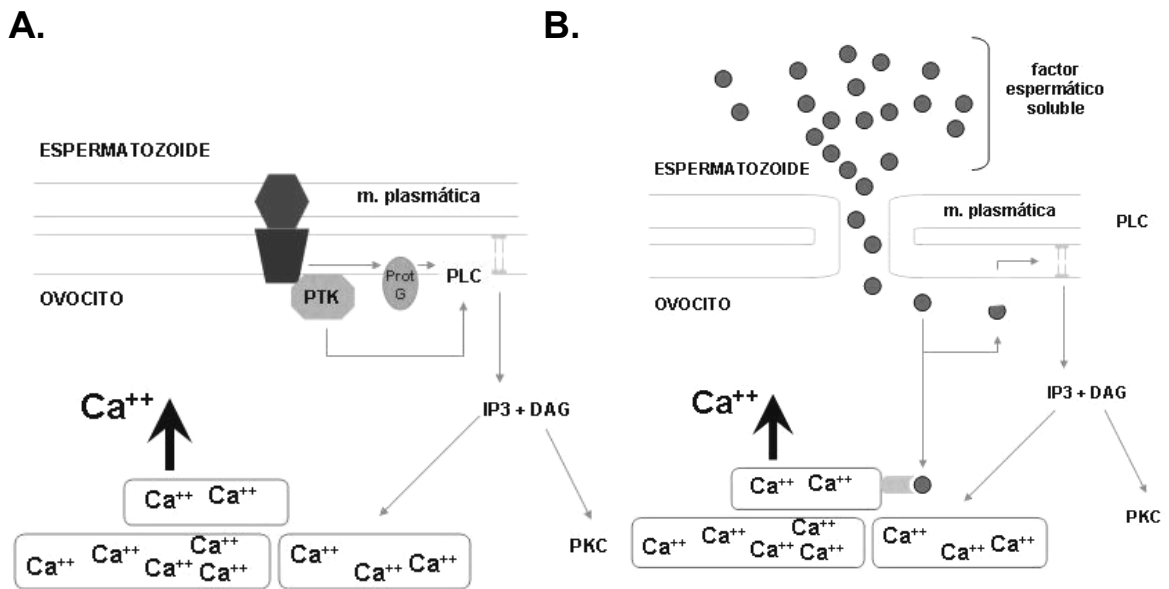


Figura 12. Dos principales hipótesis de los mecanismos moleculares de la activación del ovocito. **A.** Hipótesis del receptor, **B.** Hipótesis de la fusión o del factor espermático soluble.

A diferencia de la controversia que existe para explicar la inducción de la activación, existe consenso respecto del mecanismo de liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares del ovocito. El papel del inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) en este proceso sería fundamental (Xu et al, 1994). Dicha molécula induciría la apertura de canales de Ca^{2+} al unirse a su receptor (IP3R), canal ligando-dependiente localizado principalmente en el retículo endoplasmático. Se ha demostrado la expresión de tres tipos de IP3R en los ovocitos de mamíferos, localizados preferencialmente a la región cortical del ooplasma, coincidente con el lugar donde se observan las primeras oscilaciones luego de la fusión. Junto con los depósitos dependientes de IP3R co-existen en el ovocito depósitos insensibles a IP3 y sensibles a agonistas de rianodina (Swann, 1992). Los receptores de rianodina (RyR), responsables principales de la liberación de Ca^{2+} durante la contracción muscular (Connelly & Coronado, 1994), cumplirían en el ovocito un papel adicional al de los IP3R durante la liberación del Ca^{2+} .

Dado que las consecuencias de la incorporación de más de un espermatozoide dentro del ovocito (polispermia) son generalmente fatales para el embrión, como resultado de la fertilización se producen en el ovocito modificaciones tanto en la ZP (reacción de zona) como en el oolema (reacción vitelina), denominadas en su conjunto **mecanismos de prevención de polispermia** (Yanagimachi, 1994).

A los pocos segundos de ocurrida la activación del ovocito se produce la liberación masiva del contenido de los gránulos corticales localizados en la corteza del ooplasma por debajo de la región fusogénica del oolema (Ducibella, 1991; Hoodbhoy & Talbot, 1994). La liberación de dichos gránulos se produce mediante un mecanismo excitotónico, dependiente de calcio y de energía. En numerosas especies, las proteasas liberadas de los gránulos corticales provocan la hidrólisis parcial de proteínas de la ZP (Shabanowitz & O'Rand, 1988; Hatanaka et al, 1992; Ducibella et al, 1993). En el ratón, por ejemplo, la ZP2 es hidrolizada como consecuencia de la activación del ovocito, resultando en una proteína de menor peso molecular a la que se denomina ZP2_f (Moller & Wassarman, 1989). La hidrólisis de ZP2 se relacionó al bloqueo de la penetración de la ZP que se observa luego de la fertilización, ya que ambos eventos se correlacionan temporalmente. Sin embargo, resultados recientes provenientes del análisis de ratones transgénicos conteniendo ZP "humanizada", reportados por Rankin y colaboradores (2003), han replanteado esta hipótesis (Rankin et al, 2003). En los ovocitos de estos animales transgénicos, la ZP2 humana no es clivada luego de la fertilización y, si bien se observa una unión aumentada de espermatozoides a la ZP, no se produce un incremento de la polispermia, y los embriones se desarrollan normalmente. Estos estudios han determinado, por un lado, que el clivado de ZP2 no sería el único mecanismo responsable de la prevención de la polispermia. Por otro lado, han llevado a los autores del trabajo a postular que la estructura supramolecular de la ZP y no sus componentes aislados, sería la responsable de unir a los espermatozoides. La modificación de dicha estructura luego de la

fertilización, producida por el clivado de ZP2, tendría como consecuencia la incapacidad de los espermatozoides de unirse al ovocito. Otro componente de la ZP, ZP3, también es modificada por el contenido de los gránulos corticales, pero en este caso se modifica el patrón de glicosilación de dicha proteína y no se observan cambios en el tamaño (Wassarman, 1987).

Cuando ovocitos sin ZP son fertilizados por espermatozoides capacitados y luego re-inseminados, los mismos pueden ser re-fertilizados si los espermatozoides adicionales son agregados como máximo una hora después de la primera fertilización (Maleszewski et al, 1996). Después de ese período, los ovocitos no permiten la fusión de nuevos espermatozoides. Se ha determinado que durante la liberación de los gránulos corticales, las membranas de estas estructuras se fusionan con el oolema, afectando la composición de dicha membrana en los ovocitos fertilizados (Stewart-Savage & Bavister, 1988; Horvath et al, 1993). Además, el contenido liberado de los gránulos afectaría componentes del oolema, en particular a aquellos involucrados en la unión y la fusión de las gametas (Hoodbhoy & Talbot, 1994). Por otro lado, existen evidencias de que la adición de componentes del espermatozoide al oolema durante la fusión también sería relevante para la reacción cortical, ya que tanto los ovocitos activados artificialmente como aquellos fertilizados mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (o ICSI: intracytoplasmatic sperm injection), son penetrables por espermatozoides adicionales (Maleszewski et al, 1996).

La contribución de la ZP y el oolema al bloqueo de la polispermia es variable según la especie. En algunos animales, 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 ocurre a ambos niveles.

La proteína epididimaria DE

La proteína DE (32 kDa) fue descrita por primera vez en 1976 por Cameo y Blaquier, como una de las principales secreciones del epidídimo de rata (Cameo & Blaquier, 1976). DE está constituida por las proteínas D y E, las cuales se detectan como dos bandas claramente distinguibles en geles de poliacrilamida nativos. D y E provienen del mismo gen (Klemme et al, 1999) y no pueden ser separadas por su solubilidad, peso molecular o carga (Garberi et al, 1979), por lo que se las considera como una entidad única. La caracterización de DE mostró que se trata de una glicoproteína ácida (pI = 4.95 - 5.13) que contiene un 10% de residuos glicosílicos constituidos por D-manosa, D-galacotosa, N-acetil-D-glucosamina, ácido N-acetil-neuramínico y D-glucosa (Garberi et al, 1982). DE se sintetiza en forma andrógeno-dependiente en las regiones proximales del epidídimo y se asocia a la superficie del espermatozoide durante la maduración (Kohane et al, 1980a; Kohane et al, 1980b). Originalmente localizada en la región dorsal del acrosoma, DE migra al segmento ecuatorial concomitantemente con la ocurrencia de la reacción acrosomal (Rochwerger & Cuasnicu, 1992).

Numerosos estudios han sido llevados a cabo en nuestro laboratorio para determinar la función biológica de la proteína DE. La relocalización de DE hacia el segmento ecuatorial, región por la cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito (Bedford et al, 1979; Yanagimachi, 1988b), conjuntamente con los resultados de experimentos en los que la exposición de espermatozoides al anticuerpo policlonal anti-DE produjo una inhibición significativa en la penetración de ovocitos sin zona pelúcida de rata (Cuasnicú et al, 1990) indicaron un papel específico para DE en la interacción del espermatozoide

con el oolema. Estudios posteriores demostraron que el agregado de proteína DE purificada al medio conteniendo ovocitos sin ZP provocaba una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados, sin afectar la etapa inicial de unión. La participación de DE en un evento posterior a la unión de gametas, y conducente a la fusión, fue confirmada por resultados indicando que aquellos espermatozoides capaces de unirse al ovocito en presencia de DE, lograban fusionarse con el oolema luego de la remoción de la proteína del medio de incubación (Rochwerger et al, 1992). Mientras que los ensayos anteriores indicaban la existencia de sitios de unión para DE en la membrana del ovocito, experimentos de IFI mostraron que dichos sitios se localizaban en forma de agregados sobre toda la superficie del ovocito, exceptuando el área libre de microvellosidades que cubre el huso meiótico, por la cual raramente ocurre la fusión (Rochwerger et al, 1992). Por lo tanto, así como la proteína DE se localizaba sobre la región fusogénica de la membrana plasmática del espermatozoide, sus sitios complementarios se encontraban localizados en la región fusogénica de la superficie del ovocito. Con el fin de estudiar la relevancia de los sitios complementarios para DE en la adquisición de fusogenicidad de la membrana plasmática del ovocito, se investigó tanto la presencia de sitios para DE como la fusogenicidad del oolema en las distintas etapas de la ovogénesis. Los resultados indicaron que mientras la fusogenicidad de membrana (evaluada por la técnica de transferencia del colorante de Hoescht) se encontraba presente en etapas tempranas de la ovogénesis (etapa de crecimiento) y se relacionaba con la aparición de los sitios complementarios para DE sobre la superficie del ovocito (Cohen et al, 1996).

La extracción secuencial de proteínas de espermatozoides epididimarios reveló la existencia de dos poblaciones de DE asociadas al espermatozoide: una población mayoritaria que se asocia débilmente y se libera de las células durante la capacitación, y una población de proteína fuertemente asociada, que sería la que persiste luego de la capacitación y migra al segmento

ecuatorial (Cohen et al, 2000b). Recientemente, se ha sugerido que la población de DE liberada durante la capacitación podría cumplir una función como “factor decapacitante”, participando en la regulación de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina que ocurre durante la capacitación (Roberts et al, 2003).

La relevancia de DE para la fertilidad fue demostrada por experimentos de nuestro laboratorio indicando que la inmunización de ratas hembras y machos con DE era capaz de producir anticuerpos específicos contra la proteína en más del 90% de los animales, como así también una inhibición significativa de la fertilidad en ambos sexos (Cuasnicú et al, 1990; Perez Martinez et al, 1995). Estudios posteriores indicaron que dicho efecto ocurriría a través de un mecanismo específico que involucra la entrada de los anticuerpos al lumen epididimario, su asociación a los espermatozoides y la posterior inhibición de su capacidad fertilizante (Ellerman et al, 1998a).

La secuenciación de un péptido interno de DE y de un clon positivo de una biblioteca de epidídimo (Cohen et al, 2000b) indicaron que DE presentaba un 100% de homología con la glicoproteína secretora epididimaria de rata previamente clonada por Brooks y colaboradores (Cohen et al, 2000a), y Charest y colaboradores (Charest et al, 1988), y que pertenece a la familia de proteínas CRISP (Cysteine Rich Secretory Protein). DE, también denominada CRISP-1, presenta una gran homología con otras dos proteínas epididimarias en otras especies: la proteína de ratón AEG/CRISP-1 (70%) (Mizuki & Kasahara, 1992; Haendler et al, 1993), y la proteína humana ARP/CRISP-1 (40%) (Hayashi et al, 1996; Kratzschmar et al, 1996). Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que AEG de ratón se encuentra presente en la superficie del espermatozoide y participa de la fusión espermatozoide-ovocito en esa especie a través de sitios complementarios para la proteína en la región fusogénica del ovocito, tal como previamente se había observado para la rata (Cohen et al, 2000a). La existencia de la proteína epididimaria humana ARP

(AEG-Related Protein) o hCRISP-1 fue reportada el mismo año por dos laboratorios independientes (Krätzschar et al, 1996; Hayashi et al, 1996). En colaboración con uno de estos laboratorios, hemos demostrado que ARP cumpliría un papel en la fusión de gametas en el humano (Cohen et al, 2001). La proteína ARP se asociaría con alta afinidad al espermatozoide humano y permanecería asociada al mismo luego del proceso de capacitación. Además, mientras que un anticuerpo específico contra ARP es capaz de inhibir significativamente la penetración de ovocitos de hámster por espermatozoides humanos, la proteína recombinante ARP posee sitios de unión en la superficie del ovocito humano (Cohen et al, 2001).

Con el fin de estudiar la relevancia de ARP para la fertilidad humana, recientemente hemos evaluado si la inmunización con ARP humana recombinante (hARP) generaba una respuesta inmune específica en monos hembra y macho *M.fascicularis* (Ellerman et al, 2003a). Los resultados indicaron que la inmunización con hARP produjo una respuesta inmune específica en ambos sexos. Dichos sueros eran capaces de reconocer a la proteína nativa de mono (mARP) tanto en extractos de espermatozoides de mono, por western blot, como sobre espermatozoides frescos, por IFI. Además, ensayos de ELISA e inmunodetección indicaron la presencia de anti-ARP en el plasma seminal y sobre espermatozoides provenientes de animales inmunizados con hARP. El número, morfología y motilidad de dichos espermatozoides no se vieron afectados, excluyendo posibles efectos deletéreos de la inmunización. Estos resultados sugieren la posibilidad de emplear a hARP en un modelo de primates no humanos, tanto para el estudio de la relevancia de ARP para la fertilidad como para el desarrollo de futuros métodos de regulación de la fertilidad humana.

La proteína testicular Tpx-1

En el año 1987, se reportó la identificación de una secuencia en el cromosoma 17 de ratón, de expresión testicular (Kasahara et al, 1987), cuyo producto resultó tener una alta homología (67%) con la proteína de rata DE (Kasahara et al, 1989). La secuencia codificante predecía una proteína secretoria, rica en residuos cysteína en su porción C-terminal, a la que se denominó Testicular Protein 1 (Tpx-1). Dada la similitud de Tpx-1 con DE/CRISP-1, posteriormente se propuso denominar a esa proteína testicular CRISP-2 (Haendler et al, 1993). A lo largo de los años, la proteína ha sido identificada en varias especies diferentes, con un alto grado de conservación entre las secuencias aminoacídicas de todas ellas (**ver tabla**).

CRISP-2	CRISP-2				
		Guinea pig (AA1) ¹	Mouse (Tpx-1) ¹	Rat (Tpx-1) ¹	Human (TPX1) ¹
	G. pig	100 (100)	66 (81)	66 (80)	78 (88)
	Mouse	-	100 (100)	85 (91)	70 (85)
	Rat	-	-	100 (100)	68 (83)
	Human	-	-	-	100 (100)

Homologías e identidades (entre paréntesis) entre las proteínas Tpx-1 de diferentes especies. ¹Nombre que se ha otorgado a CRISP-2 en cada caso.

Casi en forma simultánea a la identificación del gen para Tpx-1, se identificaba en cobayo a una proteína que posteriormente resultó corresponder al homólogo de Tpx-1 en esa especie (Foster & Gerton, 1996; Hardy et al, 1988; Kasahara et al, 1989). Los resultados de ese trabajo postulaban que dicha proteína, denominada AA1 (autoantígeno 1) (25 kDa), se encontraba localizada en el acrosoma, y estaba involucrada en la aparición de autoanticuerpos contra el espermatozoide en un modelo de orquitis experimental, por lo que se sugirió que podría ser relevante para la fertilidad (Hardy et al, 1988). Si bien los autores reportaron que la presencia de anticuerpos anti-AA no afectaba los porcentajes de fertilización *in vitro* de cobayo, se sugirió que la especificidad y abundancia de AA1 indicaban que la proteína debería ser funcionalmente importante para el espermatozoide. En un trabajo posterior, se confirmó por microscopía electrónica la localización de AA1 en el interior del acrosoma del espermatozoide maduro de cobayo (Hardy et al, 1991). AA1 fue detectada en todo el acrosoma, con excepción de la región correspondiente al segmento ecuatorial. Como fuera mencionado anteriormente, casi 10 años después del primer trabajo en el que se menciona a AA1, su clonado y secuenciación permitieron determinar que correspondía al homólogo de la proteína testicular Tpx-1/CRISP-2, cuyo gen había sido ya descrito en ratón y humano (Foster & Gerton, 1996; Kasahara et al, 1989). En ese trabajo, además de reportarse que AA1 correspondía a Tpx-1 de cobayo, se determinó el inicio de su expresión en células espermátogénicas haploides (Foster & Gerton, 1996; Hardy et al, 1988).

En ratón, experimentos de hibridización *in situ* determinaron que Tpx-1 se expresaba, al igual que en el cobayo, en células espermátogénicas haploides (Mizuki et al, 1992). Los autores de ese trabajo sugirieron que Tpx-1 se encontraba localizada en el acrosoma ya que, si bien la proteína tenía un péptido señal, característico de las proteínas secretorias, el hecho de que se expresara en espermátides, incapaces de realizar procesos secretorios,

indicaba que la proteína sería transportada a la vesícula acrosomal en ese tipo celular.

Aproximadamente en la misma época que se postulaba a Tpx-1 como uno de los componentes mayoritarios del acrosoma en el cobayo, un trabajo proveniente de otro laboratorio la proponía como una de las proteínas estructurales de las fibras densas de la cola en la rata (O'Bryan et al, 1998). En ese trabajo, se aisló a Tpx-1 de una biblioteca de expresión de testículo de rata mediante un anticuerpo generado contra proteínas totales de las fibras densas, por lo que se propuso que la misma correspondería a una de las proteínas mayoritarias de dicha estructura. En un trabajo publicado posteriormente, los mismos autores detectaron a Tpx-1 en el acrosoma y la cola de rata por microscopía electrónica, y sugirieron que la proteína podría estar involucrada en la conformación y la función de ambas estructuras (O'Bryan et al, 2001).

En forma casi simultánea a los trabajos de localización de Tpx-1 en el acrosoma y/o la cola del espermatozoide maduro, se presentaron en la bibliografía evidencias de la localización de Tpx-1 en la superficie de las células espermátogénicas en el testículo (Maeda et al, 1998). Dichas evidencias provinieron de un estudio desarrollado para identificar proteínas de las células espermátogénicas que participaban de la interacción con las células de Sertoli. Con ese fin, células Jurkat fueron transfectadas con una biblioteca de cDNA de células espermátogénicas, y luego co-cultivadas *in vitro* con células de Sertoli. Posteriormente, aquellas colonias que adquirían la capacidad de asociarse a células de Sertoli fueron seleccionadas y los plásmidos en las mismas recuperados para su secuenciación. Entre los clones secuenciados, se identificó una secuencia altamente homóloga a Tpx-1. El anticuerpo específico contra la proteína recombinante expresada a partir de la secuencia identificada, inhibió la asociación de células espermátogénicas con células de Sertoli *in vitro*. En un trabajo posterior del mismo grupo, se determinó que Tpx-1 sería secretada al medio de cultivo tanto por las células

Jurkat transfectadas como por las células espermatogénicas (Maeda et al, 1999). Tomando en cuenta estos resultados y la participación de Tpx-1 en la adhesión a las células de Sertoli, los autores postularon que la proteína se encontraría localizada en la superficie de las células espermatogénicas.

En cuanto a la proteína humana, designada TPX1 (Kasahara et al, 1989), sólo existen en la bibliografía estudios describiendo su expresión. Experimentos de Northern blot indicaron que, al igual que en otras especies, TPX1 se expresa en el testículo en humano (Kratzschmar et al, 1996). Además de la abundante expresión testicular, se detectó una baja cantidad de mRNA para TPX1 en epididídimio humano la cual, según los autores, podría provenir de espermatozoides epididimarios procesados junto con el tejido.

Otros miembros de la familia CRISP

Hace pocos años, la familia CRISP comenzó a ampliarse significativamente gracias a la incorporación de nuevos miembros, lo que la llevó a estar actualmente conformada por más de 70 proteínas, agrupadas por una estructura única y común que sugiere la existencia de un dominio funcional conservado. Además de CRISP-1 y CRISP-2, también se han identificado otros miembros de la familia CRISP tanto en el tracto reproductor masculino como en otros sistemas de mamíferos. El tercer miembro de la familia (CRISP-3) se expresa en la próstata, y se encuentra en el plasma seminal, y además forma parte de otras secreciones exócrinas como el plasma sanguíneo, la saliva, el sudor, y el contenido de gránulos secretorios de fagocitos (Haendler et al, 1993; Krätzschmar et al, 1996; Haendler et al, 1999; Udby et al, 2002a; Udby et al, 2002b; Udby et al, 2005). Se ha determinado que la proteína CRISP-3 de plasma seminal se asocia a los espermatozoides eyaculados en humano y caballo (Magdaleno et al, 1997; Udby et al, 2005).

Estudios más recientes, en los cuales se secuenciaron proteínas ancladas por glicosilfosfatidilinositol al espermatozoide de mono, permitieron identificar a una proteína llamada MAK248, la cual correspondería a un miembro de la familia CRISP (Yudin et al, 2002). También se ha reportado la expresión andrógeno-dependiente de una proteína, a la que se ha denominado CRISP-4, en epidídimo de ratón (Jalkanen et al, 2005).

Otras CRISPs (GliPR-1, RTVP-1 y P25TI) han sido identificadas en tumores de tejido nervioso, especilamente en cánceres de glia (Murphy et al, 1995; Rich et al, 1996; Yamakawa et al, 1998). Llamativamente, proteínas reguladoras de canales iónicos, presentes en el veneno de ciertos reptiles, también presentan una alta homología con DE y han sido incluídas en la familia CRISP (Mochca-Morales et al, 1990; Nobile et al, 1994; Yamazaki et al, 2003). Una de estas proteínas, denominada helotermina, identificada en la glándula salival de la lagartija *H. Horrendum*, corresponde a uno de los pocos miembros de la familia con función conocida, además de DE (Morrissette et al, 1995). Helotermina es capaz de bloquear canales rianodínicos de Ca^{2+} en células de músculo esquelético y cardíaco. Recientemente se ha descrito la existencia de otro miembro de las CRISP, denominado allurina, que se expresa en oviducto de *Xenopus laevis*, se asocia a las cubiertas de los ovocitos mientras transitan por el oviducto y podría actuar como quemoattractante para los espermatozoides una vez que los mismos son depositados (Olson et al, 2001). Las proteínas de la familia CRISP poseen además similitud con moléculas en especies más alejadas evolutivamente las cuales, junto con las CRISPs, componen la supefamilia de proteínas CAP (Cysteine-Rich, Antigen-5, Pathogenesis related). Éstas proteínas corresponden a alergenosen insectos, y a proteínas denominadas PR (pathogenesis-related) de plantas (Lu et al, 1993; Schreiber et al, 1997).

Tal como se describiera anteriormente, mientras que cerca de treinta años atrás se describía a la proteína epididmaria DE, primer miembro de la familia

CRISP, ésta familia ha sido posteriormente ampliada por la identificación de numerosos miembros, expresados en diversos sistemas y organismos. La presencia de CRISPs tanto en el tracto reproductor masculino como femenino sugiere que estas proteínas podrían corresponder a moléculas con función de “escultas” para el espermatozoide y cumplir funciones diversas durante el proceso de fertilización. Teniendo en cuenta esa hipótesis, nuestro laboratorio se encuentra actualmente estudiando la participación de proteínas CRISP presentes en el sistema reproductor durante el proceso de fertilización. Los estudios realizados en esta tesis se han centrado en dos proteínas expresadas en el tracto masculino: DE/CRISP-1, de epidídimo, y Tpx-1/CRISP-2, de testículo.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis de Doctorado ha sido aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en la interacción entre un espermatozoide y un ovocito durante la fertilización.

En particular, los estudios realizados se han centrado en dos proteínas caracterizadas por una expresión restringida al tracto reproductivo masculino, su presencia en el espermatozoide y su pertenencia a la familia CRISP. Estas proteínas son la proteína epididimaria DE y la proteína testicular Tpx-1.

Estudios previos de nuestro laboratorio han determinado que DE se asocia al espermatozoide durante la maduración epididimaria y cumple un rol en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios presentes en la superficie del ovocito. Si bien dichos sitios han sido descritos en la región fusogénica de los ovocitos de rata (Rochwerger et al, 1992), ratón (Cohen et al, 2000a) y humano (Cohen et al, 2001), y su aparición se ha correlacionado con la adquisición de la fusogenicidad del ovocito durante la ovogénesis (Cohen et al, 1996), la identidad de la molécula receptora para DE aún no ha sido establecida. **Por este motivo, el primer objetivo de esta tesis ha sido la identificación de los sitios complementarios para DE en la superficie del ovocito.**

Como consecuencia de la fusión de gametas se produce la activación del ovocito, un conjunto de eventos tendientes a evitar la entrada de espermatozoides adicionales y a iniciar el desarrollo del embrión. A pesar de los numerosos estudios realizados con el fin de intentar comprender los mecanismos moleculares de la activación, las moléculas espermáticas responsables de iniciar este proceso en el ovocito no han sido identificadas. Dos evidencias fundamentales han sugerido que DE podría participar en la activación del ovocito. Por un lado, DE se asocia a sus sitios complementarios en el oolema durante la fusión de gametas. Por lo tanto, podría corresponder al “ligando activador” según el modelo que propone que la activación ocurriría

como consecuencia de la interacción de una proteína del espermatozoide con su receptor en el ovocito. Por otra parte, DE presenta alta homología con una proteína reguladora de canales de calcio (Morrissette et al, 1995), ion fundamental para la activación, por lo cual podría ser incorporada al ooplasma luego de la fusión y cumplir una función en la regulación de dichos canales. **En base a estas evidencias, el segundo objetivo de esta tesis ha sido estudiar si DE participa en la activación del ovocito que ocurre luego de la fusión de gametas.**

Siendo DE una proteína relevante para el proceso de la fertilización, la misma ha sido considerada un potencial candidato para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad. En este sentido, la inhibición de la fertilidad en ratas por la presencia de anticuerpos generados contra la proteína DE sugirió el posible uso de esta proteína como inmunógeno para la producción de una vacuna anticonceptiva (Cuasnicú et al, 1990; Perez Martinez et al, 1995; Ellerman et al, 1998a). El análisis de los resultados de esos estudios sugirió que DE podría cumplir funciones adicionales a la de fusión durante etapas previas de la fertilización, tales como la penetración del cúmulus y la interacción con la ZP. Estos experimentos no fueron continuados dado que la fertilización *in vitro* con ovocitos intactos de rata ha demostrado ser un procedimiento de baja eficiencia y poco reproducible. **Teniendo en cuenta esas observaciones, el tercer objetivo de esta tesis consistió en estudiar el rol de DE durante las etapas de la fertilización previas a la fusión (penetración del cúmulus e interacción con la ZP) utilizando como modelo al ratón.**

Entre los numerosos miembros de la familia CRISP identificados en diferentes tejidos de vertebrados, además de en invertebrados y plantas (Mochca-Morales et al, 1990; Haendler et al, 1993; Lu et al, 1993; Nobile et al, 1994; Morrissette et al, 1995; Murphy et al, 1995; Kjeldsen et al, 1996; Rich et al, 1996; Kratzschmar et al, 1996; Magdaleno et al, 1997; Schreiber et al, 1997;

Yamakawa et al, 1998; Haendler et al, 1999; Yudin et al, 2002; Yamazaki et al, 2003), CRISP-1/DE y CRISP-2/Tpx-1 eran dos proteínas expresadas en el tracto reproductor masculino y presentes en el espermatozoide (Brooks et al, 1986; Kasahara et al, 1989; Cohen et al, 2000b). La alta homología entre ambas, de alrededor del 70% según la especie, resulta interesante ya que podría indicar la existencia de posibles mecanismos comunes de acción. Las evidencias en la bibliografía respecto de Tpx-1 provienen básicamente de tres laboratorios. En cada uno de ellos se ha presentado evidencia diferente sobre la localización subcelular y las funciones de la proteína, sugiriendo que la misma estaría involucrada en procesos como la formación del acrosoma y de la cola del espermatozoide, y la interacción entre las células espermatogénicas y las de Sertoli. Si bien se ha postulado que Tpx-1 podría ser relevante para la capacidad fertilizante del espermatozoide, hasta esta tesis no existían evidencias al respecto. **Teniendo en cuenta la presencia de Tpx-1 en el espermatozoide y su similitud con la proteína DE, el cuarto objetivo de esta tesis ha sido analizar la posible participación de dicha proteína en el proceso de fertilización en humano y en roedores.**

Metodología

Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley (machos adultos de 3 a 12 meses y hembras prepúberes de 26 a 29 días de edad), ratones de la cepa CF1 (machos adultos de 3 a 12 meses y hembras de entre 30 y 60 días), y hamsters (hembras de 30-45 días). Los animales fueron mantenidos en el bioterio del IBYME, con alimento y agua ad libitum y con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Proteína DE nativa

La proteína DE utilizada en este trabajo fue purificada de acuerdo a lo descrito por Garberi y colaboradores (Garberi et al, 1979; Garberi et al, 1982). 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 y un paso final de cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-Concanavalina A (Farmacia LKB, Uppsala, Suecia). Cuando este material es sometido a electroforesis y tinción con plata, sólo se detectan las bandas correspondientes a DE.

Proteína helotermina

La proteína helotermina fue gentilmente cedida por el Dr. Lourival Possani (Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México). Dicha proteína fue purificada en el laboratorio de ese investigador, a partir del veneno de la lagartija *Heloderma horrendum horrendum*, utilizando los procedimientos descritos anteriormente (Mochca-Morales et al, 1990).

Expresión de proteínas recombinantes

RecDE: la secuencia codificante de la proteína DE fue clonada anteriormente en nuestro laboratorio (cita) en el vector de expresión pMAL-C2

(New England Biolabs, EEUU), a partir de una biblioteca de ADNc de epidídimo de rata en λ gt11, cedida por el Dr. D. Hamilton (Universidad de Minnesota, EE.UU.). Dicho sistema produce una proteína de fusión con la proteína unidora de maltosa MBP (“maltose binding protein”).

RecARP: el plásmido pMAL-C2 conteniendo la secuencia codificante de la proteína epididimaria humana ARP fue gentilmente cedido por los Dres. M. Kasahara y M. Hayashi (Universidad de Hokkaido, Japon).

RecTpx-1: al igual que para recARP, el vector pMAL-C2 conteniendo la secuencia codificante de la proteína testicular Tpx-1 de ratón fue cedido por los Dres. Kasahara y Hayashi.

MBP: el plásmido comercial (New England Biolabs) pMAL-C2 sin inserto fue utilizado para expresar a la proteína de fusión MBP en forma aislada, para controlar posibles efectos de la proteína formando parte de las proteínas de fusión.

Para la expresión de cada una de las proteínas, los plásmidos respectivos fueron utilizados para transformar bacterias *E. coli* BL21, las cuales 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 4-5 h a 26°C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación durante 20 minutos (min) a 4000 x g, resuspendidas en buffer 20 mM Tris (pH 7,4), 1M NaCl, 1mM EDTA, y finalmente sonicadas. 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 analizadas por DO_{280} o por Bradford, y luego dializadas 24 h contra H₂O y liofilizadas.

Anticuerpos

Anti-DE: este anticuerpo policlonal (concentración: 7,2 mg/ml) fue desarrollado anteriormente en el laboratorio mediante la inmunización de conejos con la proteína epididimaria de rata DE purificada (Kohane et al, 1983). El mismo fue utilizado en técnicas de inmunodetección de la proteína DE nativa, tanto en su forma purificada como sobre extractos de proteínas y tejidos/células de rata y ratón.

Anti-ARP y anti-TPX1: estos anticuerpos (concentraciones: 3,8 mg/ml y 4,9 mg/ml) fueron desarrollados contra las proteínas humanas recombinantes ARP y TPX1 respectivamente (ambas expresada en el sistema pMAL-C2 según se describiera anteriormente) y gentilmente donados por los Dres. Kasahara y Hayashi. Anti-ARP fue utilizado para la inmunodetección de recARP y de su forma nativa presente en extractos de proteínas y tejidos/células humanas. Anti-TPX1 fue utilizado para la inmunodetección de Tpx-1 recombinante y nativa, tanto de humano como de rata y ratón.

Anti-MBP: este anticuerpo comercial (NEB) fue utilizado para inmunodetectar a la proteína MBP y a las proteínas de fusión conteniendo dicha molécula (recDE, recARP, recTPX1).

Anti-CD9: el anticuerpo monoclonal generado en rata contra la tetraspanina del ovocito CD9 fue generosamente cedido por la Dra. Diana Myles (Universidad de Davis, California).

IgG de conejo normal: este anticuerpo comercial (5 mg/ml, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU) fue utilizado como control negativo en algunos experimentos.

Superovulación de las hembras y preparación de los ovocitos

Las hembras de rata, ratón y hamster de las edades descritas anteriormente fueron superovuladas con una inyección de gonadotropina coriónica equina (eCG) (Syntex), seguida, a las 48 -72 h, por una inyección de gonadotropina

coriónica humana (hCG) (Sigma). Las dosis de cada hormona fueron diferentes para cada especie, siendo la cantidad de eCG y hGC 20 UI y 25 UI para la rata, 5 UI y 5 UI para el ratón y 25 UI y 25 UI el hamster, respectivamente. Los medios utilizados para la obtención de los ovocitos de cada especie fueron diferentes, y correspondieron a los medios de capacitación de los espermatozoides con los cuales fueron inseminados. Se utilizó el medio denominado "rat fertilization médium" (RFM) (Kaplan & Kraicer, 1978) para los ovocitos de rata, el medio Fraser y Drury para los de ratón (Fraser & Drury, 1975), y el medio BWW (Biggers et al, 1971) para los de hámster. Las hembras fueron sacrificadas a las 12-15 h luego de la inyección de hCG, y ambos oviductos fueron extraídos cuidadosamente en el medio correspondiente. Los complejos ovocito-cúmulus fueron obtenidos mediante punción de la ampulla. En los casos en que se requirieron ovocitos sin cúmulus, los mismos fueron tratados con hialuronidasa 0,1% (type IV, Sigma) a temperatura ambiente, para la disociación de las células del cúmulus. Para la obtención de ovocitos sin ZP, la misma fue removida por tratamiento con solución ácida de Tyrode (pH 2,5) durante 10-20 segundos, en rata y ratón, o con 0,1% tripsina (Sigma) en BWW, en hámster. Luego de cada tratamiento, los ovocitos fueron rápidamente lavados en el medio correspondiente, y utilizados en los diferentes ensayos.

Tratamiento enzimático de ovocitos

Ovocitos de rata o ratón sin ZP fueron incubados con las enzimas (Sigma) descritas en la sección resultados, del capítulo 1, en diferentes concentraciones y condiciones experimentales. Al cabo de la incubación, los ovocitos fueron lavados exhaustivamente y utilizados en ensayos de fusión in vitro o inmunofluorescencia indirecta.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de ovocitos

Para la localización de los sitios para DE nativa, DE recombinante y Tpx-1 en los ovocitos, los mismos fueron incubados con las proteínas durante 1 h a 37°C, y luego fijados en paraformaldehído (PFA) 2% durante 45 min a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS-BSA 4 mg/ml los ovocitos fueron incubados en suero de cabra normal (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 el primer anticuerpo (anti-DE en el caso de DE nativa, y anti-MBP para detectar a la proteína de fusión MBP en las proteínas recombinantes) en SCAN 1% en PBS conteniendo 4 mg/ml de BSA (PBS-BSA4), los ovocitos fueron lavados en PBS-BSA4 e incubados durante 30 min a 37°C con un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína isotiocianato (FITC) en PBS-BSA4. Para la detección de CD9, posteriormente a la incubación los ovocitos fueron incubados sucesivamente en solución de bloqueo, anti-CD9, y un segundo anticuerpo acoplado a FITC. Al finalizar, los ovocitos fueron lavados con PBS-BSA4, montados en portas en cuyas esquinas se colocaron gotas de vaselina:parafina 9:1, y finalmente observados bajo microscopio de fluorescencia. (Nikon Optiphot), acoplado a una cámara digital. Se tomaron microfotografías de los ovocitos utilizando los objetivos de 10X, 20X y 40X.

Biotinilación de ovocitos

Esta técnica fue desarrollada siguiendo la descrita por Flaherty y Swann (Flaherty & Swann, 1993). Para la biotinilación de los ovocitos sin ZP de rata, los mismos fueron incubados en una solución de 2 mg/ml de NHS-biotina (Sigma) en buffer Hepes pH 7,5 conteniendo Polivinilpirrolidona 1% (Hepes-PVP). Al cabo de 15 min a 37°C, los ovocitos fueron lavados por pasajes sucesivos en Hepes-PVP, previamente a ser utilizados en los experimentos.

Inmunoprecipitación de DE

Las soluciones conteniendo a) 2 μg de proteína DE o b) proteínas solubilizadas provenientes de ovocitos biotinilados e incubados con DE, fueron incubadas durante 2 h a 4°C en presencia de anti-DE. Al cabo de ese período, se agregó a cada tubo 30 μl de proteína A-sefarosa (Sigma) previamente lavada, y se realizó una incubación de 1 h a 4°C. Se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm y 4°C durante 10 min. Luego de tres lavados con PBS, las proteínas precipitadas fueron separadas de la proteína A-sefarosa por incubación en buffer de siembra con SDS a 100°C por 5 min, y luego analizadas por electroforesis.

Crosslinking de DE a ovocitos

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con 6 μM DE en presencia de uno de los tres crosslinkers utilizados (ver descripción en la sección resultados, capítulo 1, figura 5) a una concentración de 0,1 mM, y luego separados del medio por decantación en el fondo de un tubo eppendorf. Los ovocitos fueron lavados y solubilizados en buffer de lisis (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, conteniendo el detergente Nonidet P40 1%). Posteriormente, las proteínas presentes tanto en el medio de crosslinking como en los ovocitos fueron analizadas por electroforesis y western blot, usando anti-DE.

Obtención de espermatozoides de rata y ratón

Para la obtención de espermatozoides epididimarios de las distintas especies utilizadas, los animales adultos fueron anestesiados, y cada epidídimo expuesto a través de un corte efectuado en la región escrotal. Los mismos se limpiaron de grasa y sangre, manteniéndose permanentemente humedecidos con solución fisiológica. Para la delimitación de las distintas regiones del epidídimo de rata, se utilizó la definición anteriormente propuesta (Fournier-Delpech et al, 1984). Los espermatozoides de cauda epididimario se

obtuvieron por punción o por cortes en los túbulos correspondientes a dicha región.

Obtención de espermatozoides y muestras de tejidos humanos

Los espermatozoides humanos provinieron de eyaculados de donantes adultos (21-35 años) cuyas características seminales iniciales concordaban con el criterio de normalidad de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 1999). En todos los casos, se solicitó un período de 48 h de abstinencia sexual previo a la donación de la muestra.

Los extractos de testículo y epidídimo humano fueron obtenidos por orchidectomía en pacientes con diagnóstico de cáncer prostático, y fueron gentilmente cedidos por el Dr. Scorticati, del Instituto de Oncología Angel Roffo, Buenos Aires.

Capacitación de espermatozoides de rata

El medio utilizado para la recuperación y capacitación de los espermatozoides de rata correspondió al medio de fertilización de rata RFM. (Kaplan & Kraicer, 1978) Con el fin de obtener una muestra rica en espermatozoides móviles del cauda se efectuó un sistema de selección que consiste en una modificación de una técnica descrita anteriormente (Shalgi et al, 1981). Para ello, los espermatozoides obtenidos por punción de los túbulos del cauda fueron colocados en el fondo de un tubo cónico Falcon y cubiertos de 2 ml de RFM, y luego incubados por un período de 15 min a 37°C y 5% CO₂ para permitir que los espermatozoides móviles asciendan hacia la superficie libre ("swim up"). Sólo fueron utilizadas aquellas suspensiones que, al cabo del período mencionado, presentaran una concentración mayor a 5×10^6 esp/ml en los 100 µl superiores de la misma. La concentración de espermatozoides se determinó mediante la utilización de un hemocitómetro. La capacitación fue realizada en placas de cultivo de 24 hoyos conteniendo 400 µl de RFM cubiertos por 300 µl

de aceite de parafina por hoyo (Sigma) previamente equilibrados durante 1 h en el incubador con gaseo automático (Forma Scientific). La capacitación se llevó a cabo a una concentración final de $0.5-1 \times 10^6$ esp/ml por incubación de los espermatozoides en las mismas condiciones de temperatura y CO_2 durante 5 h.

Capacitación de espermatozoides de ratón

La obtención y capacitación de espermatozoides de ratón se realizó en el medio de Fraser y Drury (Fraser & Drury, 1975), suplementado con 3% BSA. Los espermatozoides fueron obtenidos del cauda epidimario, el cual fue cortado y colocado en una gota de 200 μl de medio equilibrado, bajo aceite de parafina. La concentración de espermatozoides fue evaluada tal como se describiera para la rata. La capacitación fue llevada cabo en gotas de 200 μl de medio bajo aceite a una concentración final de espermatozoides de $0,1-1 \times 10^7$ esp/ml, los cuales fueron incubados por un período de 90-120 min a 37°C en una estufa con gaseo automático.

Capacitación de espermatozoides humanos

Luego de la licuefacción, el semen fue diluido con 6 vol de medio Biggers, Whitten, Whittingham (BWW) (Biggers et al, 1971). Los espermatozoides fueron centrifugados 10 min a $300 \times g$, y luego lavados una vez más con 1 ml de BWW conteniendo 3,5% de albúmina sérica humana (BWW-ASH) (Sigma). Una vez lavada, la suspensión de espermatozoides concentrados fue colocada en el fondo de un tubo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de BWW-ASH y el mismo fue incubado durante 1 h a 37°C . Los espermatozoides móviles recuperados de la superficie del medio luego de una hora ("swim up") fueron diluidos en BWW-ASH a una concentración final de $0,5-1 \times 10^7$ cels/ml e incubados por 18-22 h a 37°C , en una atmósfera de 5% CO_2 .

Inducción de la reacción acrosomal

La reacción acrosomal fue inducida por el agregado de una milésima parte de una solución 10 mM de ionóforo de calcio A23187, resuspendido en dimetilsulfóxido (DMSO), a los espermatozoides capacitados de las diferentes especies utilizadas, media hora antes del final del período de capacitación. La concentración final de ionóforo, por lo tanto, fue de 10 μ M.

Evaluación de la ocurrencia de la reacción acrosomal (RA) en ratón por tinción con Coomassie Brilliant Blue

Los espermatozoides fueron fijados en un volumen de PFA 8% en PBS durante 1 h a 4° C, y luego lavados 3 veces con acetato de amonio 0,1M pH 9, por centrifugación y extendidos sobre portaobjetos. Los portaobjetos fueron lavados por inmersión en agua, metanol y agua (5 min en cada uno), y posteriormente incubados en una solución de 0,22% Coomassie Brilliant Blue en 50% metanol, 10% ácido acético. Al cabo de esa incubación, los portaobjetos fueron lavados con agua destilada, montados y observados inmediatamente para evitar la difusión del colorante. Los espermatozoides fueron cuantificados como intactos cuando presentaban una coloración azul intensa en la región acrosomal, y reaccionados cuando esa región no presentaba color.

Evaluación de la ocurrencia de la RA inducida en humano por tinción con *Pisum sativum agglutinin*

La evaluación de la RA en los espermatozoides humanos se realizó mediante la tinción del contenido acrosomal con la lectina fluorescente *Pisum sativum agglutinin* conjugada a FITC (Pisum-FITC) (Sigma) según fuera descrito anteriormente (Cross et al, 1986). Previamente, los espermatozoides fueron fijados en 2% PFA en PBS, extendidos sobre portaobjetos y luego permeabilizados por inmersión en metanol a -20°C por 5 min. Luego, los espermatozoides fueron incubados con 50 μ g/ml de Pisum-FITC por 30 min a

temperatura ambiente, en la oscuridad. Posteriormente, los portas fueron lavados con PBS, montados en 90% glicerol y observados bajo un microscopio de epifluorescencia. Los espermatozoides fueron cuantificados como intactos cuando presentaban una marca brillante en la región acrosomal completa, y reaccionados cuando la fluorescencia estaba restringida al segmento ecuatorial (SE) o ausente.

Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides *in vivo*

Para conservar la viabilidad de los espermatozoides, todas las incubaciones y manipulaciones de dichas células en ésta técnica fueron realizadas a 37°C. Los espermatozoides fueron lavados del plasma seminal o el fluido epididimario, y luego resuspendidos en PBS-BSA4 conteniendo el anticuerpo primario a una dilución de 1/50 o 1/10. Luego de una incubación de 30 min, los espermatozoides fueron lavados dos veces por centrifugación con un volumen de 300 µl de medio, e incubados con el anti-IgG correspondiente acoplado a FITC (1/50) por 30 min. Finalmente, los espermatozoides fueron montados en medio sobre portaobjetos pre-calentados a 37°C, y luego examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot) con los objetivos de 40 o 100x.

Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides fijados

Los espermatozoides fueron fijados por el agregado de un volumen de PFA 4% durante 10 min, lavados tres veces por centrifugación con PBS conteniendo 4 mg/ml de BSA, y finalmente extendidos sobre portaobjetos. Para la permeabilización de los espermatozoides, los extendidos fueron sumergidos en metanol a -20°C durante 5 min. Las muestras fueron bloqueadas con SCAN 5% en PBS, por un período de 30 min a 37°C, seguida por una incubación con el anticuerpo primario a la concentración indicada durante 2 h a 37°C. Luego de tres lavados con PBS, las muestras fueron

incubadas con el anti-IgG correspondiente acoplado a FITC (1:100 en PBS) por 30 min a 37°C. Terminada la incubación las muestras fueron nuevamente lavadas tres veces con PBS y montadas con glicerol 90% y el cubreobjetos sellado con esmalte. Los preparados fueron examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot) con los objetivos de 40 o 100x.

Extracción de proteínas de espermatozoide

Las suspensiones de espermatozoides provenientes de cauda epididimario de rata o ratón, o de muestras de semen humanas, fueron lavadas tres veces por centrifugación y resuspensión en PBS. Los espermatozoides fueron separados en diferentes alícuotas y cada una de ellas fue incubada en 1 ml de la solución de extracción conteniendo las diferentes soluciones de extracción (NaCl, detergente, etc), durante 30 min con agitación. Terminado el tratamiento, las suspensiones fueron centrifugadas a 13000 xg durante 10 min. Con el fin de concentrar los extractos proteicos para su análisis electroforético, los sobrenadantes fueron dializados contra agua deionizada y liofilizados, o bien tratados con un vol de ácido tricloroacético (TCA) 10% y luego centrifugados, para la precipitación de las proteínas.

Separación electroforética de las proteínas

Para llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS de 8% a 12% según el caso, de 1,5 mm de espesor, preparados siguiendo la técnica descrita (Laemmli, 1970). Las muestras fueron diluidas en buffer de siembra conteniendo SDS con 10% glicerol y azul de bromofenol (BPB). La corrida se realizó bajo condiciones de corriente constante (25 mA por gel) a temperatura ambiente.

Tinción de proteínas en 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 h a temperatura ambiente. El exceso de colorante fue eliminado mediante sucesivas incubaciones en desteñidor (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 min en 10% etanol 5% ácido acético, y a una incubación de 10 min en 0,1% $K_2Cr_2O_7$, 0,03% HNO_3 . Luego de tres lavados con agua, los geles fueron incubados durante 30 min con 0.2% $AgNO_3$ y luego lavados con agua durante 10 min. 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, después de ambas tinciones los geles fueron secados mediante vacío y calor, sobre un papel de filtro.

Tranferencia a nitrocelulosa

Para la inmovilización de proteínas sobre nitrocelulosa se siguió la técnica descrita por Towbin y colaboradores (Towbin et al, 1979). Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron sumergidos en buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%, pH = 8,3 por 30 min. La transferencia fue llevada a cabo en el mismo buffer, a 4°C ya sea durante toda la noche utilizando voltaje constante de 35 V o durante una hora a 100 V.

Western blot

Ocasionalmente, previo al western blot, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar la correcta transferencia de las proteínas. Para ello,

las membranas fueron incubadas durante 5 min en Ponceau 0,1% en ácido acético 5%, y el exceso de colorante removido mediante lavados con agua deionizada. Para la detección inmunológica de las proteínas mediante la técnica de western blot, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con una solución 20 mg/ml de leche en polvo descremada en PBS 0,02% Tween 20 (PBST), seguida de una incubación con anticuerpo primario, a las diluciones indicadas, en solución de bloqueo. Luego se realizaron 3 lavados en PBST y las membranas fueron posteriormente incubadas con anti-IgG de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario, acoplado a biotina, 1:500 en solución de bloqueo. Finalizada la incubación se repitió el procedimiento de lavado. Las membranas fueron luego incubadas con una solución de extravidina-peroxidasa 1:1000 en una solución 1 mg/ml de BSA en PBS y nuevamente lavadas con PBST. Con el fin de eliminar el Tween 20, se realizó un lavado adicional con Tris 0,1 M, pH 7.5. Por último, se realizó la reacción de revelado con el sustrato diaminobencidina (DAB) (50 µg/ml, H₂O₂ 0,01% en Tris 0,1 M pH 7,5). La reacción se detuvo con un exceso de agua. Todas las incubaciones fueron realizadas por un período de 60 min a temperatura ambiente, con agitación. En casos aislados, las bandas reactivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial "ECL plus" (Amersham Life Science Inc., Oakville, ON, Canada).

Radiodinación de la proteína DE

Esta técnica fue realizada con la colaboración del Dr. Eduardo Charreau (IBYME), según fuera descripto anteriormente (Molinolo et al, 1987). Para la marcación de DE, 30 µg de proteína nativa fueron resuspendidos en 20 µl de buffer fosfato 0,25M. Posteriormente, se agregaron a la solución de proteína: 1 mCi de iodo radiomarcado (¹²⁵I) (Migliore-Laclaustra, Buenos Aires) y 1,2 µg de Cloramina T (Sigma). La mezcla fue incubada durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, DE marcada (*DE) fue purificada mediante una columna

de Sehadex G50 (Amersham Pharmacia, Botech, Buenos Aires) obteniéndose una proteína con una actividad específica de 36 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Revelado por autorradiografía de DE radiactiva

Luego de la electroforesis, los geles conteniendo a DE radiactiva fueron secados y expuestos a placas Kodax X-Omat (Sigma) durante 24-48 h. Las placas fueron reveladas por pasajes sucesivos en soluciones de fijación, revelado y lavado.

Preparación de extracto de proteínas de espermatozoide porcino (pSE)

Dicho extracto fue preparado en el laboratorio del Dr. Rafael Fissore (University of Massachusetts, Amherst, USA) a partir de semen de cerdo según fuera descrito anteriormente (Wu et al, 1998). Brevemente, las muestras fueron lavadas dos veces con medio Tyrode's Lactato (TL)-HEPES, y el pellet de espermatozoides fue resuspendido en una solución 75 mmol/l KCl, 20 mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA, 10 mmol/l glicerofosfato, 1 mmol/l ditioneitol, 200 $\mu\text{mol/l}$ PMSF, 10 $\mu\text{g/l}$ pepstatina y 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina. La suspensión resultante se sonicó a 4°C, y el lisado se centrifugó dos veces a 10.000 g. Los sobrenadantes se ultracentrifugaron a 100.000 g por 1 h a 4°C. Finalmente, los extractos fueron concentrados a 60 mg/ml por ultrafiltración, precipitados con 50% sulfato de amonio y conservados a -80°C hasta su utilización.

Medición de los niveles de calcio intracelulares por fluorescencia

Esta técnica fue realizada en colaboración con el Dr. Karl Swann (St. George's Hospital Medical School, Londres, UK) en el caso de la incubación de ovocitos con DE, y el Dr. Rafael Fissore (University of Massachusetts) en el caso de la microinyección de ovocitos con DE. Con pequeñas modificaciones, en ambos casos los ovocitos fueron cargados con el colorante fluorescente Fura-2 AM y monitoreados individualmente para evaluar la liberación de Ca^{2+} mediante un

microscopio adaptado a mediciones de emisión de fluorescencia. Las concentraciones de calcio intracelular fueron calculadas según Wu et al (Wu et al, 1998) o bien expresadas como la razón entre las emisiones de fluorescencia a 340 y 380 nm.

Evaluación del estadio de la meiosis

Los ovocitos sin ZP fueron fijados por 5 min con 4% glutaraldehído en PBS, lavados, montados y teñidos con una solución de acetocarmín (1% rojo carmín en 45% ácido acético) bajo la lupa. Los ovocitos fueron catalogados como metafase II, anafase II o telofase II de acuerdo a la posición de los cromosomas en la placa metafásica.

Microinyección de los ovocitos

Esta técnica fue realizada con la colaboración con el Dr. Rafael Fissore (University of Massachusetts). Los ovocitos fueron microinyectados en gotas de 50 μ l de TL-HEPES suplementado con 2,5% sacarosa, en un microscopio con micromanipulador. Micropipetas de vidrio fueron llenadas con las soluciones de pSE (1 μ g/ml) o DE (0.5 μ g) por succión desde una microgota. Un picoinyector fue utilizado para administrar las soluciones mediante presión neumática. El volumen inyectado fue de 5-10 pl, resultando en una concentración de 1.5-3% respecto de la concentración original de la solución en la pipeta de inyección (Lee, 1989).

Deglicosilación enzimática de DE

La proteína DE nativa fue resuspendida en buffer 50 mM Na_3PO_4 (pH 7,5) y luego incubada a 37°C durante 2 h con PNGasaF (NEB) en distintas condiciones. Luego de este período, la proteína fue dializada contra medio de

fertilización RFM durante 16 h a 4°C, previo a su utilización y la eficiencia del tratamiento analizado mediante western blot.

Reducción y alquilación de la proteína DE

La proteína DE fue resuspendida en Tris 50 mM (pH 8,5) y luego incubada con DTT 250 mM durante 2 h a 37°C. Al cabo de ese período se agregó a la solución un 10% del volumen de ácido iodoacético 1,5 M, seguido de una incubación de 2 h a T° amb en oscuridad. Finalmente, la proteína fue dializada durante 24 h contra agua deionizada, y la eficiencia del tratamiento analizado mediante western blot.

Ensayo de fusión in vitro (ovocitos sin ZP)

Ovocitos de rata o ratón sin ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados de la misma especie, y las gametas fueron co-incubadas durante 2,5 y 3,5 h, respectivamente en una estufa a 37°C y 5% CO₂. Al cabo de ese período, los ovocitos fueron lavados, montados y observados individualmente al microscopio óptico, determinándose el porcentaje fusión en cada tratamiento. Los ovocitos se consideraron fusionados si presentaban en el citoplasma dos pronúcleos y la cola del espermatozoide.

Ensayo de fertilización in vitro (ovocitos con ZP)

Ovocitos de ratón intactos, con ZP, fueron inseminados con espermatozoides previamente capacitados, e incubados a 37°C y 5% CO₂ durante 7 h. Al cabo de ese período los ovocitos fueron lavados, montados, y observados al microscopio óptico evaluándose el porcentaje de ovocitos fertilizados (dos pronúcleos y cola) y de ovocitos con espermatozoides perivitelinos, y el número de espermatozoides perivitelinos por ovocito.

Ensayo de unión a la ZP

Ovocitos intactos de ratón fueron inseminados con espermatozoides capacitados, y las gametas fueron co-incubadas a 37°C y 5% CO₂ por 30 min. Luego, los ovocitos fueron lavados por pasajes sucesivos en tres gotas de medio, utilizando la misma pipeta (de diámetro ancho) para todos los ovocitos del experimento. Finalmente, los ovocitos fueron fijados en PFA 2%, montados, y observados al microscopio óptico, determinándose el número de espermatozoides unidos a la ZP a los ovocitos.

Ensayo de hemizona

Estos ensayos fueron realizados con la colaboración de la Dra. Fernanda Raffo (Fertilab, Buenos Aires), según fuera descripto (Burkman et al, 1988). Los ovocitos humanos fueron obtenidos por aspiración folicular de pacientes estimuladas hormonalmente para la realización de ciclos de fertilización asistida. Se utilizaron los ovocitos sobrantes de los ciclos, con el consentimiento de las pacientes. Los ovocitos fueron madurados in vitro en medio HTF (Irving Scientific, Santa Ana, California, EEUU). Posteriormente las células del cúmulus fueron removidas mediante el agregado de 80 UI de hialuronidasa a las gotas de incubación de los ovocitos. Los ovocitos en metafase II fueron conservados hasta su utilización en una solución de Tris 0,1 M, SO₄(NH₄)₂ 1,5 M, dextrán 5% pH 7 (Fayrer-Hosken & Brackett, 1987). El almacenamiento en estas condiciones logra que los ovocitos no sean viables, pero que sus ZPs conserven la capacidad de unir espermatozoides. Para el ensayo de hemizona, los ovocitos fueron seccionados en dos mitades utilizando un micromanipulador (Narishige, Tokio, Japón). Los espermatozoides humanos fueron seleccionados por "swim up" al igual que se describiera anteriormente, y luego capacitados durante 18 h a temperatura ambiente. Las hemizonas se colocaron en gotas de 100 µl de medio HTF, suplementado con 35 mg/ml de albúmina sérica humana, y se agregaron 3 x 10⁴ espermatozoides a cada gota. Luego de 4 h, las hemizonas fueron lavadas

por pasajes repetidos en gotas de medio, montadas, evaluándose el número de espermatozoides unidos a cada una.

Ensayo penetración de ovocitos de hamster (HOPT: hamster oocyte penetration test)

El HOPT fue realizado según se describe en el Manual de Laboratorio para la evaluación de semen humano (WHO, 1999). Los ovocitos de hamster sin ZP fueron obtenidos como se describiera anteriormente. Sólo las muestras humanas con una motilidad superior al 70% fueron utilizadas para estos ensayos. Alícuotas de 100 μ l de BWW-ASH conteniendo $3,5 \times 10^5$ espermatozoides móviles fueron pre-incubadas con los distintos anticuerpos durante 30 min a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂, y luego 10-15 ovocitos fueron agregados a cada gota y las gametas co-incubadas durante 2-3 h en las mismas condiciones. Al cabo de ese período, los ovocitos fueron lavados por aspiración para remover los espermatozoides no unidos o débilmente unidos, fijados en glutaraldehído 4% y montados en portaobjetos. Para la observación de los ovocitos, los mismos fueron teñidos con una solución de 1% aceto carmin, cuyo fin es colorear al DNA y por lo tanto al núcleo de los espermatozoides. Los ovocitos fueron observados en el microscopio con un aumento de 400X determinándose la presencia de espermatozoides unidos y penetrados en cada ovocito. Se consideraron espermatozoides penetrados aquellos que presentaron cabezas descondensadas o pronúcleos, y colas de espermatozoides en su citoplasma.

Evaluación de la motilidad de los espermatozoides

Los espermatozoides incubados en presencia de las proteínas y los anticuerpos correspondientes, según cada experimento, fueron concentrados por centrifugación, resuspendidos en una gota de 10 μ l de medio a 37°C, montados sobre portaobjetos pre-calentados a 37°C, y finalmente examinados

en un microscopio para evaluar su motilidad. Para cada tratamiento se contó un número igual o superior a 100 células, por duplicado.

Ensayo de dispersión de las células del cúmulus

Complejos cúmulus-ovocitos (COCs) de ratón fueron obtenidos por ruptura de la ampulla de hembras superovuladas (maduros) o por punción de folículos ováricos de hembras estimuladas con eCH (imaduros), lavados en medio Fraser y Drury y colocados en gotas de 100 μ l de medio sólo o conteniendo diferentes proteínas según se indica en cada caso. Al cabo del 15, 30 o 60 min, la integridad del cúmulus en cada COC fue determinada siguiendo el esquema de clasificación descrito en la sección resultados (ver sección resultados, capítulo 3, figura 8).

Evaluación de la asociación de DE a glicosaminoglicanos (GAGs)

Diferentes GAGs comerciales puros (Sigma), gentilmente donados por la Dra. Lucrecia Calvo, IBYME, fueron acoplados a una membrana de nitrocelulosa en las concentraciones indicadas en cada caso. Luego, las membranas fueron incubadas en medio conteniendo 6 μ M DE o medio solo como control negativo. Finalmente, las membranas fueron reveladas por western blot con anti-DE.

Ensayo turbidimérico para la determinación de la actividad hialuronidasa

La determinación de la actividad hialuronidasa fue realizada según el método de Dorfman (Dorfman, 1955). Dicho método permite determinar la actividad de una proteína, en este caso DE, por comparación con una curva patrón de actividad de la enzima hialuronidasa. Las proteínas [DE o hialuronidasa de testículo bovino, (Sigma), a diferentes concentraciones], fueron resuspendidas en 0,5 ml de PBS conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) 0,01%. Un volumen de una solución de ácido hialurónico (AH) 0,15 mg/ml fue agregado a la solución de proteína en cada tubo, y la mezcla fue incubada a 37°C por 45

min. Al cabo de ese período, se agregaron a cada tubo de reacción 5 ml de buffer ácido de albúmina (AA) (Acetato de Na 24 mM, ácido acético 0,5%, BSA 1%). La turbidez de cada solución, dada por el AH no hidrolizado en la solución precipitada por el buffer AA, fue determinada por absorbancia a 600 nm.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar para cada serie de experimentos. Los porcentajes (ovocitos penetrados, ovocitos con espermatozoides perivitelinos o unidos, motilidad y reacción acrosomal de los espermatozoides) fueron analizados con el test de Chi cuadrado (χ^2). Los números de espermatozoides unidos, perivitelinos o fusionados a los ovocitos fueron analizados mediante el test de Student. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes a un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa "GraphPad Prism" (versión 3,02, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

CAPÍTULO 1

Determinación de la identidad de los sitios complementarios para la proteína DE en la superficie del ovocito.

Si bien existe considerable información respecto de los aspectos celulares y estructurales de la fusión de gametas, las evidencias sobre los mecanismos moleculares de este proceso aún son escasas. Se ha sugerido que la fusión ocurriría mediante la interacción de moléculas complementarias localizadas en dominios específicos de las membranas del espermatozoide y el ovocito. La participación de proteínas involucradas en fusión fue inicialmente sugerida por el efecto observado sobre la fusogenicidad de ovocitos de ratón luego del tratamiento con proteasas (Hirao & Yanagimachi, 1978; Boldt et al, 1988). La presencia de las integrinas en el ovocito fue determinada como consecuencia de la complementariedad que existía entre esas moléculas y los dominios de desintegrina en varios tipos celulares, entre los cuales se encontraban los espermatozoides. Aunque durante algunos años las integrinas fueron consideradas los componentes moleculares del ovocito responsables de la fusión (Bigler et al, 1997; Almeida et al, 1995; Bigler et al, 2000), estudios más recientes demostraron que ninguna integrina identificada en el oolema sería esencial para dicho proceso (Miller et al, 2000; He et al, 2003). Resultados provenientes de animales KO, así como de ensayos *in vitro*, han demostrado que la tetraspanina CD9 se encontraría en el oolema y sería esencial para el proceso de fusión de gametas (Miyado et al, 2000; Le Naour et al, 2000; Miller et al, 2000; Kaji et al, 2000). Por otro lado, evidencias recientes indicaron que animales KO para proteínas del ovocito unidas al oolema vía GPI presentaban ovocitos con la fusogenicidad afectada, confirmando observaciones previas que indicaban que el tratamiento de ovocitos con PLC-PI tenía un efecto sobre la capacidad de fusión de los ovocitos de animales normales (Coonrod et al, 1999a; Coonrod et al, 1999b; Alfieri et al, 2003). Hasta el momento, no se conoce la identidad de las proteínas ancladas al oolema vía GPI que sean

relevantes para el proceso de fusión. Además de las moléculas de naturaleza proteica, existen estudios indicando que diferentes residuos glicosídicos también podrían tener una función durante la interacción de las membranas del espermatozoide y el ovocito (Boldt et al, 1989b; Ponce et al, 1994; Gougoulidis et al, 1999).

Los sitios complementarios para la proteína epididimaria DE en el ovocito fueron los primeros descritos para una proteína del espermatozoide en la membrana de la gameta femenina (Rochwerger et al, 1992). Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que tanto DE, como sus homólogos en otras especies, se asociaba a la región fusogénica del oolema en la rata (Rochwerger et al, 1992), el ratón (Cohen et al, 2000a) y el humano (Cohen et al, 2001). La aparición de dichos sitios complementarios se correlacionaba con la adquisición de la fusogenicidad del ovocito en etapas tempranas de la ovogénesis (Cohen et al, 1996). Con el fin de comprender el mecanismo molecular por el cual DE participa en el proceso de fusión de gametas, el primer objetivo de esta tesis ha sido la caracterización e identificación de los sitios para la proteína DE en la superficie del ovocito.

Como primer paso se realizó una serie de experimentos para determinar la naturaleza bioquímica del receptor. Ovocitos sin ZP de rata fueron tratados con enzimas específicas con acción sobre proteínas, carbohidratos o lípidos y, luego del tratamiento, los mismos fueron incubados con proteína DE y sometidos a IFI utilizando anti-DE. La idea de estos experimentos consistió en evaluar si alguno de los tratamientos enzimáticos provocaba una disminución en la unión de DE al oolema, respecto de la unión a ovocitos no tratados, que permitiera determinar si el receptor se trataba de una proteína, un hidrato de carbono o un residuo lípidico. Las concentraciones y condiciones de incubación para cada enzima se detallan en la **Tabla 1**, y fueron seleccionadas de acuerdo a las instrucciones de los proveedores y de datos existentes en la bibliografía sobre la utilización de esas enzimas sobre ovocitos. Como se

muestra en la tabla, en todos los casos, la intensidad y localización de la marca para DE fue similar a la detectada en ovocitos no tratados. En algunos tratamientos, las concentraciones más elevadas de enzima fueron perjudiciales para los ovocitos, los cuales presentaban un aspecto diferente al de los controles luego de la incubación. En el caso de PLC y PLC-PI, en algunos ovocitos se observó un leve aumento en la intensidad de la marca de DE sobre la superficie, sin efectos sobre el patrón de la misma.

Tabla 1.

	ENZIMA	CONC.	TIEMPO	PH	T°	RESULTADO
proteasas	Tripsina	0,1 mg/ml	30 min	7,4	37°C	ND
		1 mg/ml	30 min	7,4	37°C	ND
		5 mg/ml	30 min	7,4	37°C	ND
		10 mg/ml	30 min	7,4	37°C	perjudicial
	Quimotripsina	1 mg/ml	30 min	7,4	37°C	ND
lipasas	PLD	100 µg/ml	30 min	6	37°C	ND
		500 µg/ml	30 min	6	37°C	perjudicial
	PLA₂	100 µg/ml	30 min	7,4	37°C	ND
		500 µg/ml	30 min	7,4	37°C	perjudicial
	PLC	50 µg/ml	10 min	7,4	T° amb	aumento
		100 µg/ml	10 min	7,4	T° amb	perjudicial
	PLC-PI	0,5 U/ml	30 min	7,4	37°C	ND
		1 U/ml	30 min	7,4	37°C	aumento
		5 U/ml	30 min	7,4	37°C	aumento
10 U/ml		30 min	7,4	37°C	perjudicial	
glicosidasas	α-fucosidasa	1 U/ml	30 min	7,4	37°C	ND
	β-glucuronidasa	500 U/ml	5 min	4,5	T° amb	ND

PLD: fosfolipasa D; PLA₂: fosfolipasa A₂; PLC: fosfolipasa C; PLC-PI: fosfolipasa C específica para fosfatidil inositol (PI).

ND: no se detectaron cambios en la marca fluorescente para DE respecto de la de los ovocitos no tratados.

En los experimentos descritos anteriormente, los ovocitos fueron sometidos a diferentes tratamientos enzimáticos con el objetivo de analizar el efecto de un amplio rango de enzimas, utilizadas en diversas condiciones, sobre la unión de DE al oolema de rata. Sin embargo, una desventaja del diseño de esos experimentos consistió en que, dado que solamente analizábamos el efecto de las enzimas sobre la presencia del sitio para DE, no podíamos discernir si las enzimas habían efectivamente actuado sobre el oolema sin afectar dicho sitio o si, en realidad, las condiciones no habían sido las adecuadas para que las enzimas afectaran al oolema.

Como se mencionara anteriormente, existían evidencias en la bibliografía indicando que el tratamiento de ovocitos de ratón con proteasas o PLC-PI resultaba en una deficiencia en su fusogenicidad. Tomando en cuenta estos datos, como así también la participación de DE en la etapa de fusión de gametas de ratón (Cohen et al, 2000a), decidimos repetir los ensayos de tratamiento enzimático de ovocitos en esa especie, realizando esta vez experimentos de fusión *in vitro* en paralelo a los de IFI para DE. Al igual que había sido reportado en la bibliografía, el tratamiento de los ovocitos de ratón con la proteasa proteinasa K, la glicosidasa PNGasa F y la fosfolipasa PLC-I afectó significativamente la fusogenicidad de los ovocitos (**Figura 1**), confirmando que existía un efecto de las enzimas sobre el oolema.

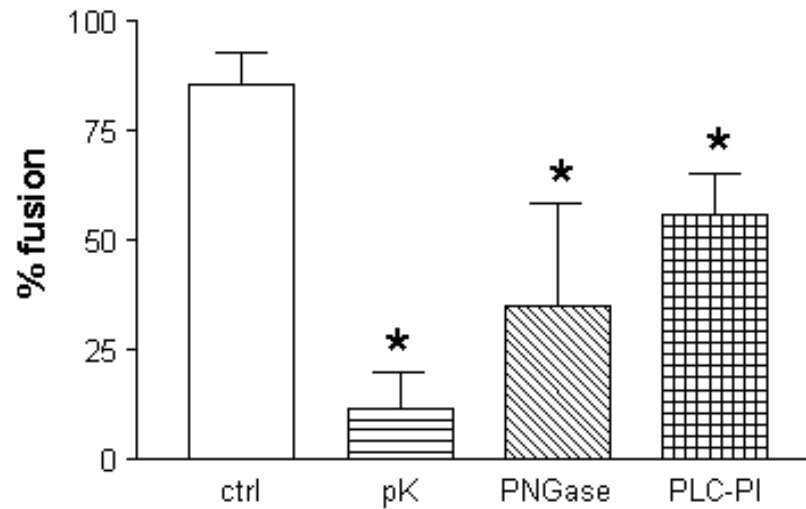


Figura 1. Efecto de tratamientos enzimáticos sobre la fusogenicidad del ovocito. Ovocitos de ratón fueron incubados con las enzimas señaladas, y luego inseminados, evaluándose el porcentaje de ovocitos con espermatozoides fusionados (% fusión). * $p < 0,05$ (n=6).

El efecto de proteinasa K sobre el oolema fue estudiado además mediante inmunolocalización de la proteína CD9 utilizando un anticuerpo específico contra la región extracelular de la molécula, gentilmente cedido por la Dra. Diana Myles (Universidad de California, Davis). De acuerdo a lo esperado, los ovocitos tratados con la proteasa demostraron una clara desaparición de la marca para la proteína CD9 en su superficie, mientras que aquellos tratados con PNGasa o PLC-PI, en los cuales CD9 no debería haberse afectado, no mostraron cambios en la intensidad de la marca fluorescente respecto de los controles sin tratar (**Figura 2**).

Mientras que tanto los resultados de los ensayos de fusión como los de IFI para CD9 comprobaron que las enzimas habían actuado sobre el oolema, los sitios para DE no se vieron afectados por ninguno de los tratamientos enzimáticos realizados, ya que tanto la IFI de ovocitos tratados e incubados con DE nativa como con DE recombinante resultaron similares a las obtenidas en los ovocitos sin tratamiento (**Figura 2**).

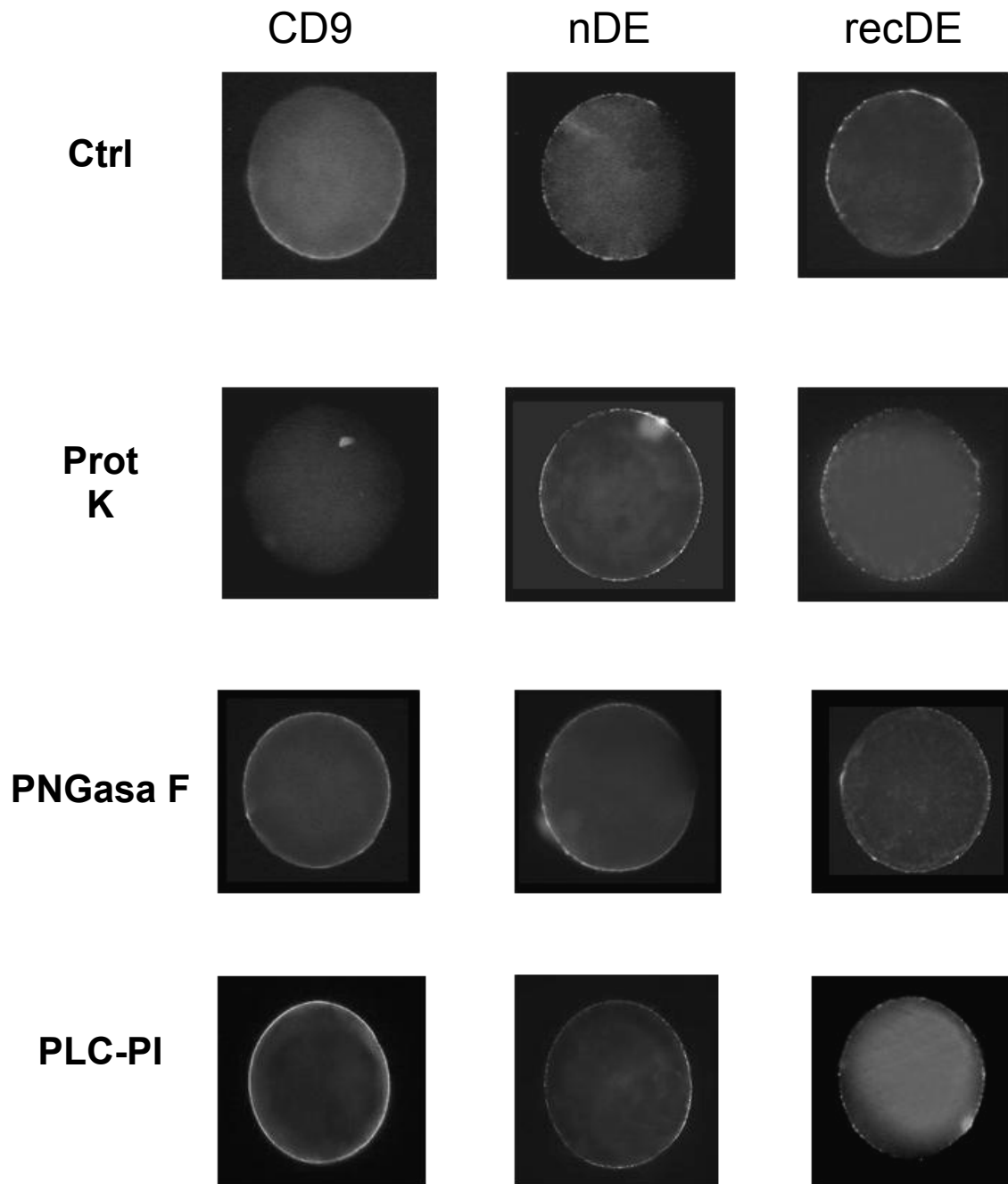


Figura 2. Efecto de tratamientos enzimáticos sobre los sitios para DE y la tetraspanina CD9 en ovocitos de ratón. La presencia de CD9 y la unión de DE nativa (nDE) y DE recombinante (recDE) a la superficie de ovocitos de ratón sin ZP fueron evaluadas mediante inmunofluorescencia indirecta.

Teniendo en cuenta la posibilidad de que los sitios para DE estuvieran estéricamente protegidos de la acción enzimática en el oolema decidimos continuar con la identificación de los mismos mediante la realización de ensayos de tipo bioquímico. Como primera alternativa, realizamos estudios con el fin de intentar aislar un posible receptor de tipo proteico. En primer lugar, las proteínas de los ovocitos fueron cuantificadas mediante la técnica de Bradford, determinándose una cantidad de proteína promedio de 0,15 $\mu\text{g}/\text{célula}$, luego de lo cual se caracterizó el perfil proteico de los ovocitos mediante el análisis electroforético. Para conocer el patrón de proteínas totales de ovocitos de rata, incluyendo las de membrana y las citoplasmáticas, las células fueron lisadas y luego las proteínas separadas en geles de acrilamida, y reveladas por la técnica de tinción con plata. El patrón de bandas detectadas en el gel determinó la presencia de proteínas de diferentes pesos moleculares, siendo las mayoritarias: tres de un tamaño superior a 200 kDa, dos de aproximadamente 60 kDa y 40 kDa, y dos algo menos abundantes de 25 y 30 kDa (**Figura 3A**).

Para caracterizar a las proteínas de membrana, 200 ovocitos fueron tratados con Biotina Hidrazida, reactivo que, al ser impermeable, agrega moléculas de biotina sólo a proteínas extracelulares. Luego, las proteínas totales fueron separadas electroforéticamente y transferidas a nitrocelulosa y, aquellas correspondientes a las de membrana de los ovocitos fueron detectadas mediante el revelado con extravidina peroxidasa y quimioluminiscencia. Todas las bandas identificadas detectadas por este método presentaron pesos moleculares superiores a 50 kDa (**Figura 3B**).

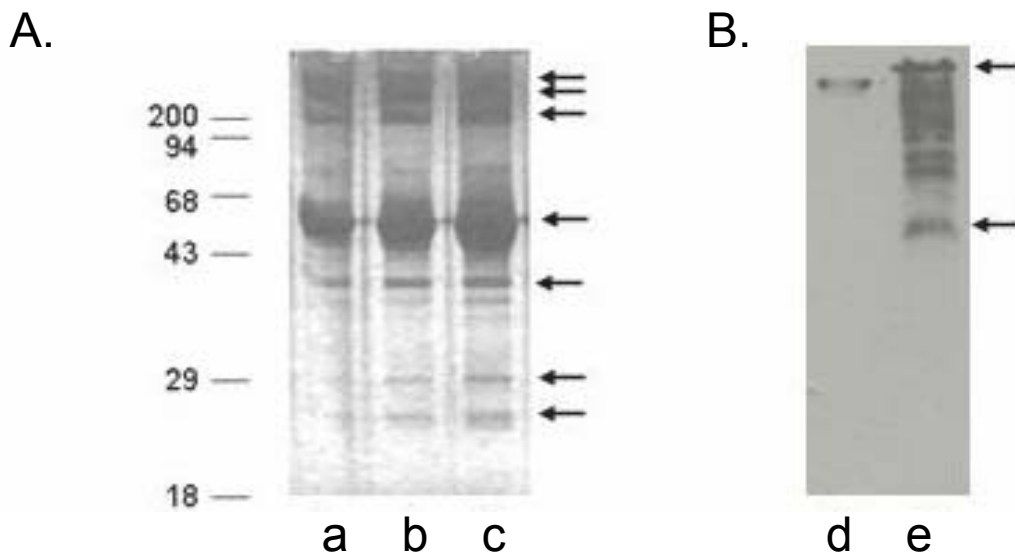


Figura 3. Caracterización del perfil proteico de ovocitos. **A.** Proteínas totales de 5 (a), 10 (b) y 20 (c) ovocitos de rata fueron separadas electroforéticamente y reveladas mediante la técnica de plata. **B.** Ovocitos de rata (n=210) fueron biotinilados y luego las proteínas separadas electroforéticamente, transferidas a nitrocelulosa y reveladas con extravidina peroxidasa y quimioluminiscencia (e). Una alícuota de anticuerpo anti-rata biotinilado fue sembrado en el gel como control positivo del revelado (d).

El paso siguiente consistió en aislar al complejo DE-receptor de ovocitos utilizando la técnica de inmunoprecipitación. Extractos proteicos de 200 ovocitos biotinilados e incubados con DE fueron inmunoprecipitados con anti-DE, y luego las proteínas biotiniladas que co-precipitaron con DE fueron separadas por electroforesis, transferidas a nitrocelulosa y reveladas mediante la incubación con extravidina peroxidasa y quimioluminiscencia. Una solución de proteína DE fue inmunoprecipitada en paralelo, y luego el precipitado fue analizado por electroforesis y western blot con anti-DE para corroborar que el procedimiento de inmunoprecipitación hubiera sido efectivo. Si bien DE en solución fue precipitada correctamente, no se detectaron bandas en la calle correspondiente a la inmunoprecipitación de ovocitos biotinilados, en dos experimentos independientes (resultados no mostrados). Una posible explicación para estos resultados sería que DE se disociara del oolema durante la solubilización de los ovocitos o los sucesivos pasos del procedimiento de inmunoprecipitación. Estudios de inmunofluorescencia

indirecta (IFI) apoyaron esta posibilidad, ya que la proteína se dissociaba de los ovocitos si los mismos eran lavados exhaustivamente previamente a su fijación.

Como otra alternativa para la identificación del receptor para DE en el oolema, en paralelo a los ensayos de inmunoprecipitación se diseñaron experimentos para evaluar si la proteína DE era capaz de asociarse a proteínas del ovocito separadas electroforéticamente y transferidas a nitrocelulosa. Para estos experimentos se utilizó la técnica conocida como "ligand blot", en la que proteínas de ovocitos fueron separadas en geles de acrilamida, transferidas a nitrocelulosa, renaturalizadas y finalmente incubadas con una solución conteniendo a la proteína DE. La presencia de DE asociada a alguna de las proteínas en la nitrocelulosa fue posteriormente evaluada por western blot usando anti-DE. Los resultados no fueron favorables, ya que no se obtuvo marca en la membrana utilizando proteínas provenientes de 120 ovocitos (resultados no mostrados). Dado que una posibilidad era que el resultado negativo se debiera a la disociación de DE de la membrana durante las sucesivas incubaciones y lavados del western blot, las membranas fueron fijadas por inmersión en PFA 2% luego de la incubación con DE, previo al revelado. Tampoco se observó marca por la asociación de DE a proteínas de 150 ovocitos en esas condiciones. Como última posibilidad, para descartar que la imposibilidad de observar la unión de DE a proteínas de ovocitos mediante "ligand blot" se debiera a la poca abundancia de las proteínas y a la baja sensibilidad del método de detección, se repitió el ensayo utilizando proteínas provenientes de 1600 ovocitos (cantidad más de 13 veces superior a la utilizada anteriormente), obteniéndose nuevamente resultados negativos.

Teniendo en cuenta esos estudios previos, se diseñaron nuevos experimentos en los que se intentó, por un lado, aumentar la sensibilidad de los métodos de detección para sortear la dificultad dada por la poca abundancia de material de

ovocitos y, por otro, impedir que DE se disociara de su receptor durante el procesamiento.

Para aumentar la sensibilidad en la detección del complejo DE-receptor se marcó radiactivamente a la proteína DE. De esta forma se abría la posibilidad de detectar a la proteína por autorradiografía, método altamente sensible comparado con los de inmunodetección utilizados previamente. La radioiodinación de DE fue realizada en el laboratorio del Dr. Charreau, en el IBYME, quién colaboró no sólo proveyendo la técnica sino también supervisando el procedimiento. La proteína DE (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) fue incubada con iodo¹²⁵ en presencia de Cloramina T, y luego la proteína marcada (*DE) fue separada del iodo libre mediante una columna de Sephadex G50. Se midió la emisión de cada fracción eluída de la columna, detectándose dos picos de radiactividad. El primer pico correspondió a *DE, mientras que el segundo correspondió al iodo libre no incorporado a la proteína. Como puede observarse en la **Figura 4**, el método de marcación fue altamente eficiente, ya que el 70% de la radiactividad inicial fue incorporada en la proteína. El procedimiento permitió obtener una solución de *DE 0,06 μM con una actividad específica de 36 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, la cual fue utilizada en algunos de los experimentos que se describirán a continuación.

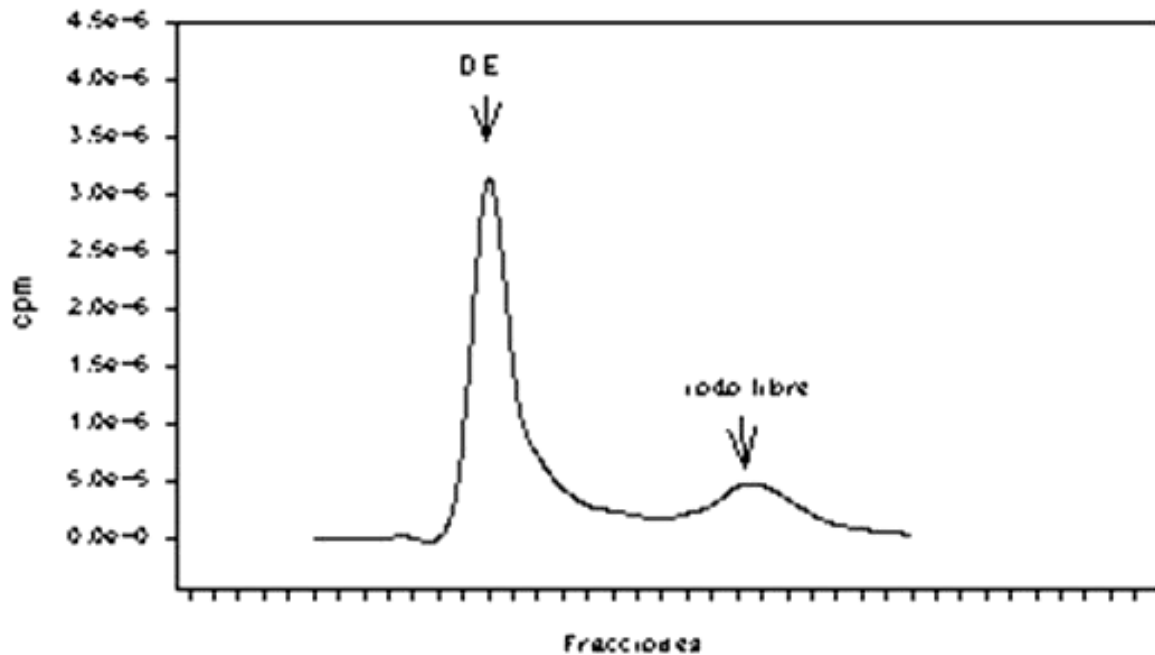


Figura 4. Radiodinación de la proteína DE. Emisión radiactiva correspondiente a las fracciones de elución de la columna de purificación de DE posterior a la marcación, en la que se observa la separación de la proteína marcada del yodo radiactivo libre.

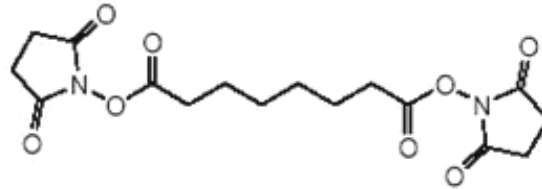
Teniendo en cuenta que la identificación del receptor para DE mediante inmunoprecipitación o ligand blot pudiera haberse visto impedida por la disociación del complejo durante dichos procedimientos, en los experimentos realizados a continuación se utilizaron agentes químicos denominados “crosslinkers”, los cuales tienen la capacidad de unir covalentemente a moléculas asociadas entre sí por fuerza iónica. En la **Figura 5** se indican las características, la estructura molecular y el mecanismo de acción para cada uno de los tres crosslinkers utilizados.

Disuccinimidil suberato (DSS)

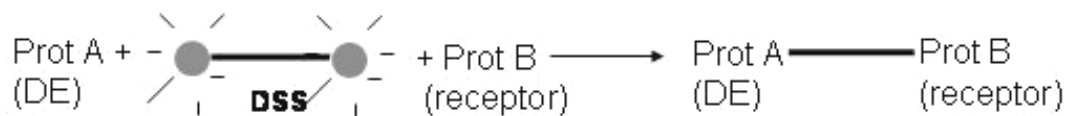
368 Da.

•Homobifuncional (grupos idénticos, con reactividad hacia aminas primarias)

•Fórmula:



•Mecanismo de acción:

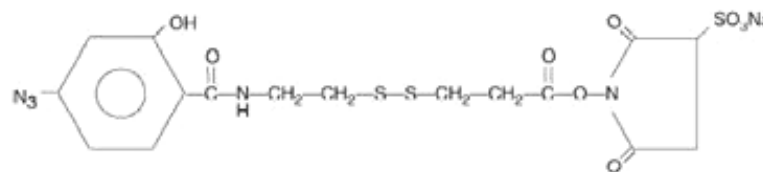


Sulfosuccinimidil 6-4-azido-2-nitrofenilamino hexosanato (Sulfo-SANPAH)

309 Da.

•Heterobifuncional (un grupo con reactividad hacia aminas primarias, el otro fotoactivable por luz UV).

•Fórmula:



•Mecanismo de acción:

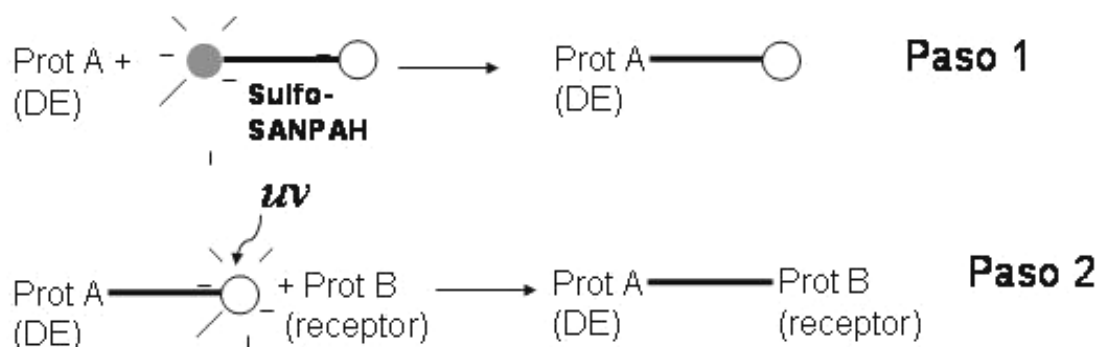
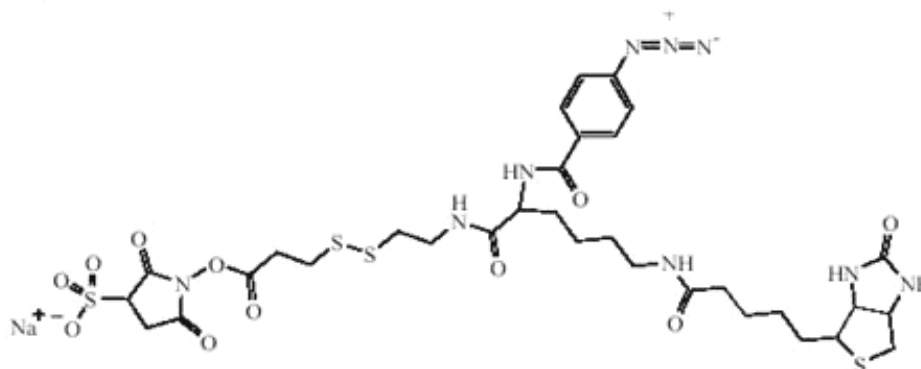


Figura 5. Características de los crosslinkers DSS y Sulfo-SANPAH (continúa en la próxima página).

Sulfosuccinimidil-2-(6-biotinamido-2-p-azidobenamido hexanoamido) etil-1,3-ditiopropionato (Sulfo-SBED)

890 Da.

- Heterobifuncional: un grupo reactivo h/aminas primarias, otro fotoactivable con UV.
- Biotinilado, clivable mediante agentes reductores.
- Fórmula:



- Mecanismo de acción:

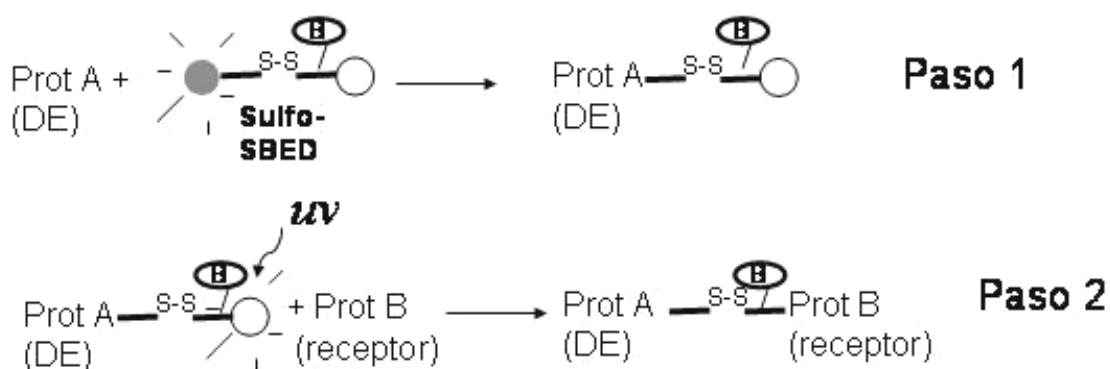


Figura 5 (continuación). Características del crosslinker Sulfo-SBED.

El primer agente utilizado fue el **disuccinimidil suberato (DSS)**, un crosslinker homobifuncional con dos grupos reactivos idénticos, cuyo mecanismo de acción consiste en formar enlaces covalentes entre grupos amino primarios. Estos grupos se encuentran generalmente presentes en residuos lisina y en la región N-terminal de las proteínas. Como primer paso, con el fin de evaluar si DSS era eficiente asociando a DE con su sitio en el oolema, se realizaron ensayos de IFI en los cuales se comparó la unión de DE en la superficie de ovocitos: a) incubados con DE, lavados extensivamente, y luego fijados, b) incubados con DE en presencia del crosslinker y luego lavados y fijados, y c) incubados con DE y fijados inmediatamente sin lavados previos. De acuerdo a lo esperado, mientras que la mitad de los ovocitos lavados luego de la incubación con DE presentaron sólo una marca fluorescente suave, el 100% de los ovocitos incubados con DE en presencia de DSS tuvieron la marca característica para DE en su superficie, idéntica a la observada en los ovocitos fijados inmediatamente luego de la incubación. Una vez corroborado que la presencia de DSS era capaz de mantener a DE asociado a la superficie de los ovocitos, se realizaron los ensayos bioquímicos para aislar al receptor de DE utilizando dicho crosslinker. Para ello, ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con 6 μ M DE y 0,1 mM DSS, y luego separados del medio por decantación en el fondo de un tubo eppendorf, lavados y solubilizados. Posteriormente, las proteínas presentes tanto en el medio de crosslinking como en los ovocitos fueron analizadas por electroforesis y western blot, usando anti-DE. Este experimento fue realizado dos veces, siendo el número de ovocitos utilizados en cada caso de 1100 y 840. En ambas oportunidades los resultados fueron idénticos. Como puede observarse en la **Figura 6**, en la calle conteniendo a las proteínas de ovocitos a los que se acopló DE covalentemente, se obtuvo una banda de alto peso molecular (superior a 200 kDa) y una banda más suave de aproximadamente 60 kDa, además de la banda correspondiente a DE libre, de 32 kDa.

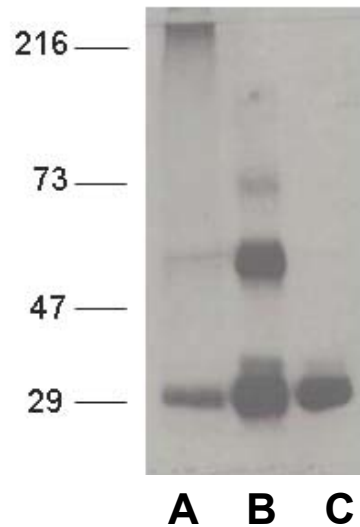


Figura 6. Crosslinking de la proteína DE a ovocitos utilizando el agente DSS. Ovocitos de rata (n=1100) fueron incubados con proteína DE (20 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$) en presencia del crosslinker DSS, y luego las proteínas fueron separadas electroforéticamente y reveladas mediante western blot y quimioluminiscencia. **A.** Proteínas de ovocitos sometidos a crosslinking con DE, **B.** Solución de crosslinking libre de ovocitos (0,1 μg), **C.** Proteína DE (0,1 μg).

La abundancia de la banda de 60 kDa en la calle en la cual se analizó el medio de crosslinking conteniendo a DE y DSS sin ovocitos, junto con el hecho de que el tamaño molecular de dicha banda fuera aproximadamente el doble que el de DE, sugería que la misma podía corresponder a un dímero de DE. Dicha posibilidad fue evaluada mediante un ensayo en el que se incubó 6 μM DE en ausencia de ovocitos con concentraciones crecientes de DSS, analizándose posteriormente la presencia de la banda de 60 kDa mediante electroforesis y western blot. La incubación de la solución conteniendo a DE y DSS resultó en un aumento en la aparición de la banda de 60 kDa, confirmando que la misma podría corresponder a un dímero de DE (**Figura 7**). Las instrucciones del proveedor del DSS indicaban que una de las desventajas de los crosslinkers homobifuncionales sería la formación de dímeros o polímeros, dependiendo de la cantidad y localización de los grupos amino en las proteínas a conjugar.

Dado que en los ensayos anteriores existía una proporción de moléculas de DE alta, probablemente mayor a de su receptor en el ovocito, sería probable que se formaran enlaces covalentes entre los grupos amino de las moléculas de DE. Por lo tanto, mientras que la banda de 32 kDa correspondería a DE libre, la de 60 kDa podría corresponder a dímeros de DE. La tercera banda, de un peso molecular mayor a 200 kDa, ausente en la reacción de DE y DSS en ausencia de ovocitos, podría corresponder entonces al complejo DE-receptor.

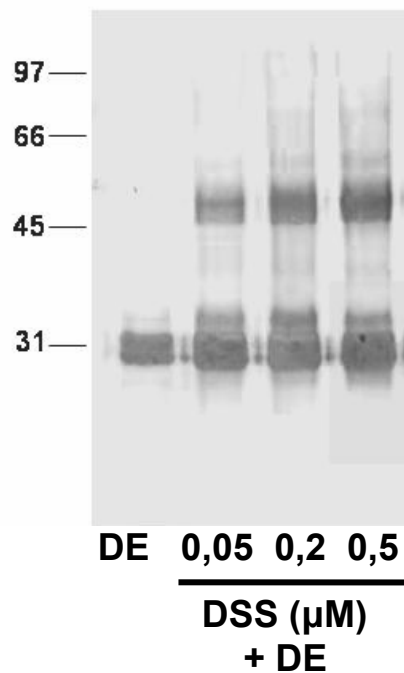


Figura 7. Dimerización de la proteína DE en presencia de DSS. Soluciones de proteína DE 20 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ fueron incubadas con concentraciones crecientes de DSS (0,05; 0,2 y 0,5 μM , según se indica en la figura), y luego separadas en un gel de acrilamida 12% y reveladas mediante western blot. En la primera calle se sembró DE sin tratar (0,3 μg) como control del revelado. Obsérvese el aumento en la intensidad de la banda correspondiente al dímero de DE a concentraciones crecientes de DSS.

Como una manera alternativa de visualizar el posible complejo DE-receptor, se repitió el procedimiento de crosslinking con DSS, pero esta vez utilizando *DE y revelando los geles mediante autorradiografía. La ventaja de utilizar a la

proteína marcada consistía básicamente en que, al aumentar la sensibilidad en la detección de la proteína, podía usarse una concentración reducida de la misma durante el crosslinking, situación que en principio no favorecería la formación de dímeros. Para este experimento se obtuvieron 930 ovocitos, los cuales fueron divididos en dos partes iguales. Una parte se incubó con 2 μ g de *DE y DSS 0,1mM, mientras que la segunda parte se incubó con la misma cantidad de DE en ausencia del crosslinker. Los ovocitos fueron lavados y lisados, y la presencia de DE asociada a algún componente de los mismos fue analizada mediante electroforesis y autorradiografía. La presencia del DSS en el medio de incubación de los ovocitos con *DE dio como resultado una banda radiactiva de alto peso molecular, ausente en la calle conteniendo el extracto de ovocitos y *DE sin crosslinker (**Figura 8A**). Para confirmar que el contenido proteico de ambas calles fuera similar, previo a la autorradiografía las proteínas en el gel fueron reveladas mediante la técnica de plata (**Figura 8B**). Este experimento fue repetido en las mismas condiciones, utilizando 900 ovocitos, con resultados idénticos a los anteriores. En conjunto, los ensayos de crosslinker utilizando DSS confirmaron que la incubación de DE con ovocitos de rata sin ZP en presencia del crosslinker permitió obtener una banda de alto peso molecular en geles de acrilamida con SDS, que podría corresponder al complejo DE-receptor. Dado que en ninguno de los casos había podido determinarse el tamaño molecular del supuesto complejo que daba origen a la banda, se repitió el ensayo de crosslinking de *DE a 800 ovocitos en presencia de DSS, pero esta vez las muestras fueron corridas en geles de bajo contenido de acrilamida (8%) y se dejó salir el frente de la corrida electroforética, de manera que las proteínas de alto peso molecular, las cuales anteriormente quedaban fuera del gel separador, pudieran ser resueltas. Este ensayo no permitió determinar el tamaño de la banda de alto peso molecular, ya que la misma siguió detectándose, al igual que anteriormente, en el margen superior del gel, entre los geles concentrador y separador (resultados no mostrados).

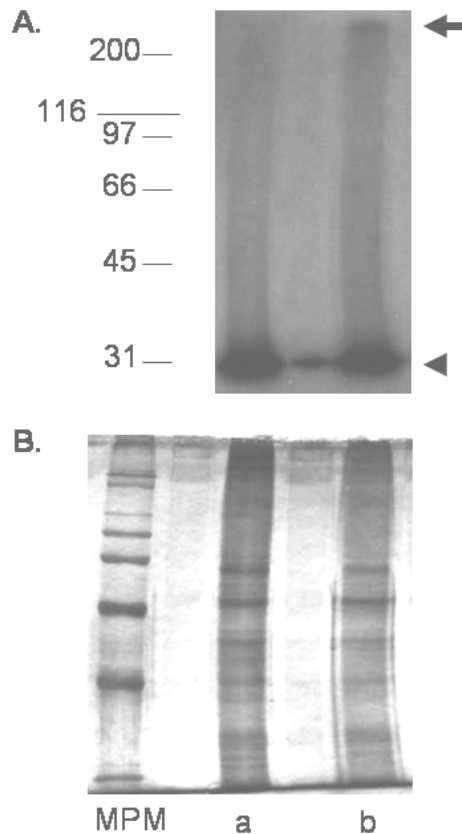


Figura 8. Crosslinking de la proteína DE radiactiva a ovocitos utilizando el agente DSS. Proteína *DE (2 µg/ 100µl) en presencia del crosslinker DSS 0,1 mM fue incubada en presencia (a) o ausencia de ovocitos de rata sin ZP (n=930), y luego las proteínas fueron separadas electroforéticamente y los geles sometidos a autorradiografía (A) o revelados por la técnica de plata (B). MPM: marcadores de peso molecular.

Con el fin de corroborar si la banda de alto peso molecular detectada por el crosslinking de DE a los ovocitos mediante DSS correspondía realmente a un complejo proteico y no a una asociación inespecífica de moléculas dada por las características del crosslinker, se utilizaron otros agentes para repetir los ensayos. El segundo crosslinker utilizado fue el **sulfosuccinimidil 6-4-azido-2-nitrofenilamino hexosanato (Sulfo-SANPAH)** un agente heterobifuncional, con capacidad de acoplarse en dos etapas diferentes a las dos proteínas a conjugar (Figura 5). La ventaja de usar el SANPAH en nuestro caso es que podíamos acoplarlo a DE, luego separar el complejo DE-SANPAH del crosslinker libre, y al activarlo mediante luz UV, inducir su asociación al

receptor independientemente de la presencia y/o localización de los grupos amino en el mismo. El tercer crosslinker utilizado fue el **sulfosuccinimidil-2-(6-biotinamido-2-p-azidobenamido hexanoamido) etil-1,3-ditiopropionato (Sulfo-SBED)**, similar en su mecanismo de acción al Sulfo-SANPAH, pero con dos características adicionales. La primera de ellas es que el reactivo actúa de manera de transferir una molécula de biotina de una proteína a su ligando. La segunda, es que es clivable por agentes que separan puentes disulfuro. Se seleccionaron ambos reactivos con la esperanza de obtener una reacción de crosslinking más específica, y que permitiera además aislar al complejo conteniendo a DE estimando el peso molecular del receptor. Sin embargo, con ninguno de los crosslinkers se obtuvieron bandas por la incubación en presencia de los ovocitos. Estos resultados no fueron del todo sorprendentes ya que, si bien ambos crosslinkers tienen como ventaja su versatilidad porque no dependen de las características de las moléculas a ser conjugadas, a su vez tienen la desventaja de contar con una baja eficiencia de reacción. Según la empresa proveedora, la eficiencia de la reacción aproximada de ambos reactivos sería de un 10% de la máxima posible utilizando otros agentes más eficientes. Por lo tanto, la utilización de crosslinkers más complejos no brindó información adicional a la obtenida mediante los ensayos en los que se utilizó al DSS, probablemente debido a la baja eficiencia de esos reactivos en un sistema en el que el material utilizado es escaso, como en el caso de las proteínas de ovocitos.

Posteriormente a la realización de los ensayos bioquímicos para identificar al receptor de DE, surgieron evidencias en la bibliografía indicando que la proteína CD9 presente en el oolema sería relevante para la fusión de gametas (Chen et al, 1999a). Se postulaba que esa proteína, al igual que otros miembros de la familia de las tetraspaninas, participaría en la formación de complejos intermoleculares en las membranas celulares. Suponiendo que la banda de alto peso molecular obtenida en los experimentos de crosslinking se tratara efectivamente de un complejo de DE con su receptor en el oolema,

decidimos evaluar la posibilidad de que DE interactuara con CD9 en el oolema. Para analizar dicha posibilidad realizamos ensayos de IFI en los cuales se analizaba si anti-CD9 y DE competían por CD9 en el oolema. Se realizaron dos tipos de experimentos. En los primeros, ovocitos sin ZP eran incubados con anti-CD9, fijados, y luego incubados con DE y revelados mediante anti-DE según se describiera anteriormente. En el segundo caso, los ovocitos eran incubados en primer lugar con DE, fijados y luego revelados con anti-CD9. Cabe aclarar que la posibilidad de detectar anti-CD9 y anti-DE en forma independiente se debía a que los anticuerpos estaban producidos en dos especies independientes (rata y conejo, respectivamente), por lo que podían detectarse mediante diferentes anticuerpos secundarios fluoresceinados. Los resultados indicaron que mientras anti-CD9 no lograba impedir la asociación de DE a la superficie de los ovocitos, la unión de DE a sus sitios tampoco afectaba la interacción entre CD9 y anti-CD9, sugiriendo que no existiría una asociación directa entre DE y CD9 (**Figura 9**).

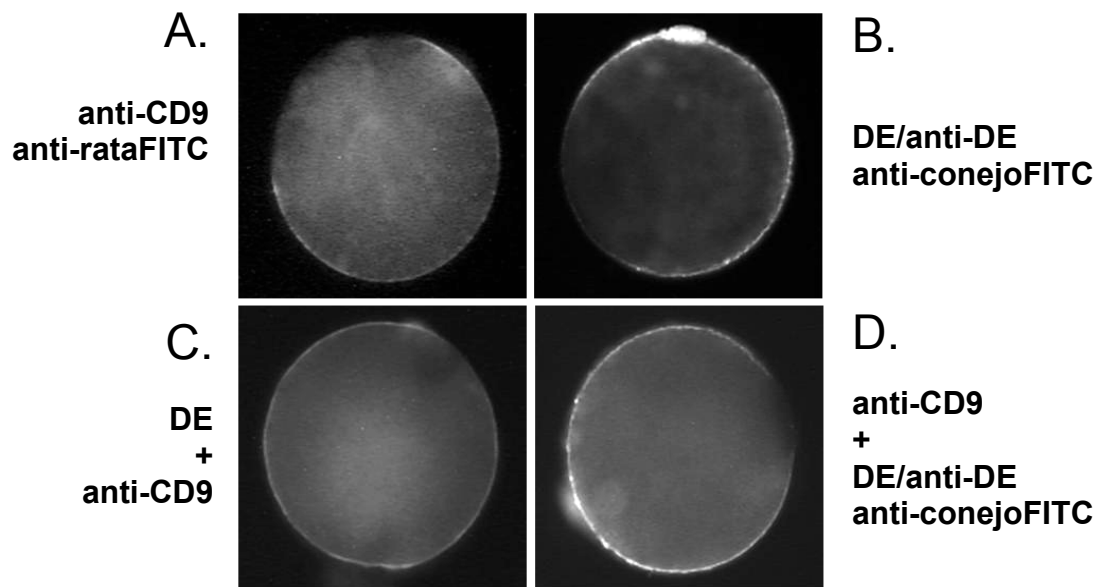


Figura 9. Interacción de DE con la tetraspanina CD9 en el oolema. Se detectó la marca fluorescente para CD9 (**A**) y la asociación de DE (**B**) en el oolema mediante IFI, utilizando anticuerpos específicos al igual que se describiera anteriormente. En paralelo, se estudió si la incubación de los ovocitos (**C**) con DE previo a la detección de CD9, o (**D**) con anti-CD9 previo a la incubación con DE/anti-DE afectaba la marca característica de cada proteína en el oolema.

En resumen, la unión covalente de DE a los ovocitos mediante la utilización del crosslinker DSS permitió detectar en geles de acrilamida una banda de peso molecular elevado, que podría corresponder al complejo de DE y su receptor en el ovocito. El hecho de que ni el peso molecular de dicho complejo ni la identidad del receptor pudieran ser determinados por técnicas bioquímicas radica básicamente en la escasez del material proveniente de ovocitos con el que se cuenta para la realización de esos ensayos. Esta dificultad no solamente provoca que los experimentos sean extremadamente laboriosos, sino que además trae aparejada la imposibilidad de incluir condiciones y controles adecuados en cada experimento, fundamentales para lograr resultados reproducibles e informativos. En este sentido, cabe aclarar que para cada ensayo bioquímico de ovocitos se sacrificaron al menos 20 hembras, de las que se aislaron un promedio de 800 ovocitos, los cuales fueron pipeteados en forma individual para ser liberados del cúmulus y la ZP. Más específicamente, el total de ovocitos utilizados en los experimentos de crosslinking presentados en esta tesis fue de 5670. Por estos motivos, la realización de estos estudios nos ha llevado a re-evaluar si los procedimientos bioquímicos serían los más adecuados para identificar al receptor de DE en la superficie del ovocito, y a pensar en nuevas alternativas. En este sentido, el reciente surgimiento de la tecnología de identificación de proteínas, denominada “proteómica”, como herramienta para conocer la biología molecular del ovocito ha abierto la posibilidad de idear nuevos diseños experimentales, los cuales serán descritos en la sección discusión de esta tesis.

CAPÍTULO 2

Estudio de la participación de DE en el proceso de activación del ovocito posterior a la fusión de gametas.

Tal como se describiera en la introducción, la activación del ovocito es un evento fundamental para el desarrollo de un nuevo individuo. El hecho de que DE participara en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito a través de sitios específicos localizados en la superficie del ovocito (Rochwerger et al, 1992), abría la posibilidad de que DE fuera una de las moléculas involucradas en este evento, ya sea a través de la unión a su receptor en el oolema, o bien siendo incorporada al ooplasma luego de la fusión, y actuando como factor espermático activador.

En primer lugar se investigó si DE estaba involucrada en la activación del ovocito a través del mecanismo postulado por la hipótesis del receptor. En ese modelo, como se describiera anteriormente, una molécula del espermatozoide actuaría como ligando activador al unirse a sus sitios complementarios en el oolema. Con el fin de analizar si DE podía corresponder al ligando activador del espermatozoide a través de la unión a sus sitios en el oolema, se estudió si la presencia de DE en el medio de incubación de ovocitos sin ZP, y la consecuente unión de la proteína a sus sitios, era capaz de inducir la activación. Dos parámetros fueron utilizados como indicadores de activación: uno temprano, el inicio de las oscilaciones de Ca^{2+} , y otro más tardío, el reinicio de la meiosis. La liberación de Ca^{2+} de los ovocitos fue analizada en colaboración con los laboratorios de los Dres. Karl Swann (St. George's Hospital Medical School, Londres, UK) y Rafael Fissore (University of Massachusetts, Amherst, USA), quienes lideran dos de los grupos más importantes dedicados a identificar a las moléculas del espermatozoide responsables de inducir la activación del ovocito. En todos los estudios que se describirán a continuación, la concentración de Ca^{2+} en los ovocitos fue

determinada mediante la emisión fluorescente del colorante Fura AM, el cual tiene la propiedad de emitir fluorescencia ante la presencia de Ca^{2+} . Por lo tanto, la cuantificación de dicha fluorescencia permitió determinar la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares del ovocito. Ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados en presencia de tres concentraciones (50, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$) de DE purificada, monitoreándose la liberación de calcio individualmente para cada ovocito. Como control positivo se monitorearon las oscilaciones provenientes de ovocitos inseminados con espermatozoides capacitados de la misma especie. Los resultados indicaron que, mientras los ovocitos inseminados mostraron las oscilaciones de Ca^{2+} características de la activación provocada por la fusión de las gametas (**Figura 1A**), los ovocitos incubados con DE en paralelo no presentaron modificaciones en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (**Figura 1B**). Estos resultados fueron idénticos para todas las concentraciones de DE utilizadas.

Como segunda estrategia para analizar la participación de DE en la activación del ovocito mediante el modelo del receptor, se analizó el efecto de dicha proteína sobre el reinicio de la meiosis, evento más tardío que las oscilaciones de Ca^{2+} en el proceso de activación. En estos estudios, ovocitos de rata sin ZP fueron incubados en presencia de medio solo, o medio conteniendo 200 $\mu\text{g/ml}$ de DE. Luego de la incubación, los ovocitos fueron fijados y sus cromosomas teñidos para evaluar el estadio de la meiosis. Al igual que para la liberación de Ca^{2+} , no se observó un efecto de la proteína DE sobre el reinicio de la meiosis (**Figura 2**).

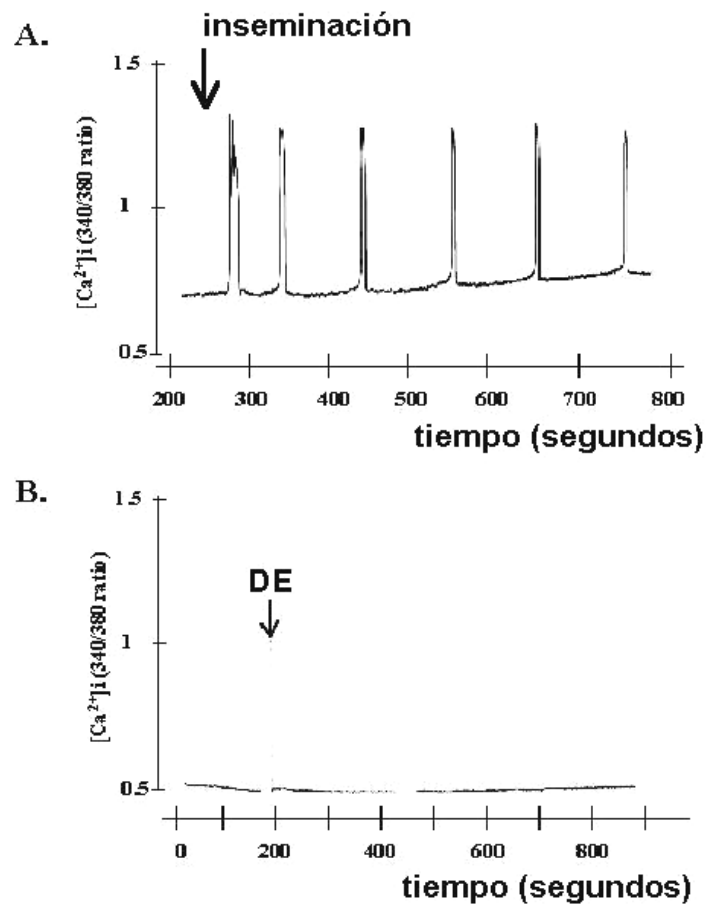


Figura 1. Efecto de la proteína DE sobre la liberación de calcio intracelular de los ovocitos. Ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados en presencia de espermatozoides previamente capacitados o de proteína DE soluble, determinándose posteriormente la emisión de fluorescencia del colorante Fura 2-AM (unidades arbitrarias). **A.** Emisión de fluorescencia correspondiente a un ovocito inseminado con espermatozoides capacitados (n=7). Nótese las oscilaciones de Ca^{2+} características de la fertilización. **B.** Emisión fluorescente correspondiente a un ovocito incubado en medio conteniendo 500 $\mu\text{g/ml}$ de proteína DE (n=12).

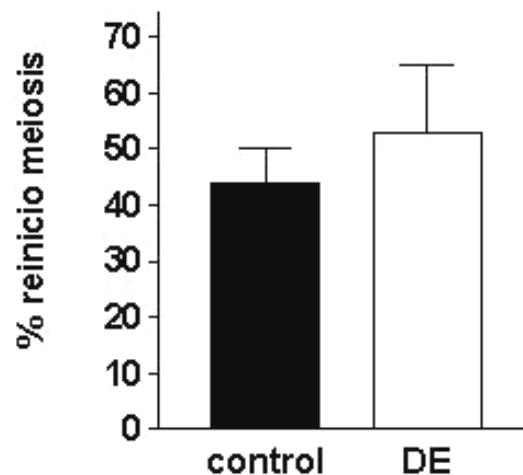


Figura 2. Efecto de la proteína DE sobre el reinicio de la meiosis. Ovocitos sin ZP de rata fueron incubados en medio solo (-) o conteniendo 200 ug/ml de DE (DE), luego fijados y teñidos con aceto Carmin para determinar el estadio de la meiosis. La figura muestra el porcentaje de ovocitos que reiniciaron la meiosis en cada tratamiento. DE vs control: NS. (n=3)

En conjunto, los resultados anteriores indicaron que la unión de DE a sus sitios en el oolema no induciría oscilaciones de calcio como así tampoco el reinicio de la meiosis en el ovocito, por lo que no respaldarían la participación de DE en la activación a través de la hipótesis del receptor.

Una observación interesante de los experimentos en los que se evaluaba el efecto de DE sobre el reinicio de la meiosis fue que mientras que el 100% de los ovocitos al comienzo del experimento se encontraban en metafase II, luego de un corto periodo de incubación, tanto en presencia como en ausencia de DE, aproximadamente el 45% de los ovocitos se encontraba en anafase II o en telofase II, es decir, casi la mitad de los mismos había reiniciado la meiosis. A pesar de este alto porcentaje de activación espontánea, el $96 \pm 4\%$ de dichos ovocitos fueron fertilizados luego de ser inseminados con espermatozoides capacitados. Estos datos no resultan llamativos si tenemos en cuenta las evidencias en la bibliografía sobre los requisitos para el bloqueo de fertilización por espermatozoides adicionales luego de la activación del ovocito. En este

sentido, se ha demostrado que el establecimiento de la prevención de la polispermia a nivel del oolema es estrictamente dependiente de la interacción entre las membranas de ambas gametas, ya que tanto la activación artificial de los ovocitos como la fertilización por inyección intracitoplasmática de espermatozoides no resulta en un bloqueo de la fertilización (Horvath et al, 1993; McAvey et al, 2002).

Como se mencionara en la introducción, DE presenta una homología significativa con helotermina, una proteína del veneno de lagartija capaz de bloquear el influjo de Ca^{2+} a través de receptores rianodínicos (RR) (Mochca-Morales et al, 1990; Morrissette et al, 1995). Resulta interesante el hecho que dichos receptores se encuentran expresados y son funcionales en el retículo endoplasmático de los ovocitos, depósito intracelular de Ca^{2+} , en invertebrados y mamíferos (Swann, 1992). Si bien el significado biológico de los RR para el ovocito es aún tema de controversias, y su relevancia se considera secundaria respecto de los receptores para IP₃, existen evidencias de que en algunas especies los RR podrían cumplir una función en la liberación de Ca^{2+} que ocurre tanto durante la fertilización como la activación (Swann, 1992). Dado que DE podría ser incorporada dentro del ooplasma durante la fusión de gametas, existía la posibilidad de que la proteína participara en la regulación de la liberación de Ca^{2+} , a través de los RR del retículo endoplasmático. Con el fin de investigar esa posibilidad, ovocitos sin ZP fueron inyectados individualmente con 200 pg/ml de proteína DE, evaluándose el Ca^{2+} intracelular mediante la emisión de Fura-2 AM tal como se describiera anteriormente. Los registros no detectaron modificaciones en los niveles de Ca^{2+} luego de la microinyección de DE, indicando que la proteína no sería inductora de la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (**Figura 3A**).

Una segunda posibilidad consistía en que DE no indujera la liberación de Ca^{2+} , sino que modulara la frecuencia o la amplitud de las oscilaciones de dicho ion, inducidas por otras proteínas del espermatozoide durante la activación. Para

analizar dicha posibilidad, en primer lugar los ovocitos fueron microinyectados individualmente con 100 pg de un extracto de proteínas de espermatozoide porcino (pSE), cuya capacidad de inducir la liberación de calcio en ovocitos de ratón ha sido ampliamente demostrada (Wu et al, 1998), y luego con 200 pg de DE purificada. Como se observa en la **figura 3B**, no se observaron modificaciones en las oscilaciones de Ca^{2+} inducidas por pSE luego de la microinyección de DE, indicando que la proteína no sería una moduladora de las oscilaciones de Ca^{2+} .

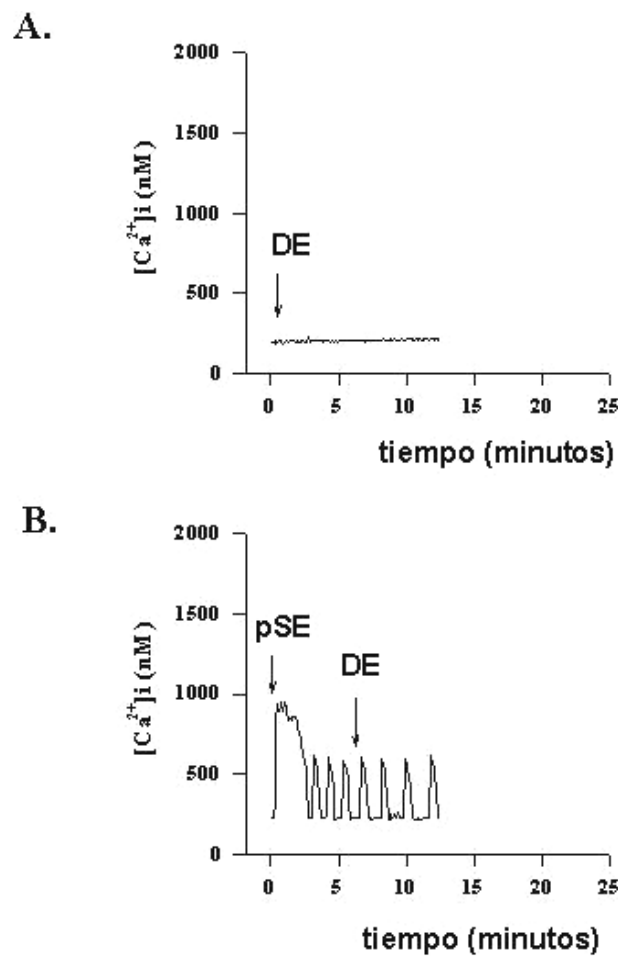


Figura 3. Efecto de la microinyección de DE sobre la liberación de calcio intracelular de los ovocitos. Ovocitos sin ZP de ratón fueron microinyectados con proteína DE o medio sólo, determinándose posteriormente la emisión fluorescente del colorante Fura 2D. **A.** Emisión registrada en un ovocito microinyectado con 20 pl de una solución de DE 10 ug/ml (n=15). **B.** Emisión en un ovocito microinyectado con 20 pl de extracto de espermatozoide porcino (pSE) y luego del inicio de las oscilaciones, con 20 pl de una solución de DE 10 ug/ml (n=3).

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios anteriores, DE introducida en el ooplasma sería incapaz tanto de inducir oscilaciones de Ca^{2+} como de regular oscilaciones previamente inducidas, indicando que DE no correspondería al factor espermático soluble responsable de iniciar la activación.

Como otra manera de estudiar una posible homología funcional entre helotermina y DE, se evaluó la capacidad de helotermina de cumplir la función de DE en la etapa de fusión de gametas. Se realizaron ensayos de penetración de ovocitos sin ZP en presencia de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de una u otra proteína purificadas, y se comparó la habilidad de cada una de inhibir el proceso de fusión. Los resultados indicaron que mientras que DE inhibió significativamente el porcentaje de ovocitos penetrados, helotermina no produjo un efecto significativo (**Figura 4**).

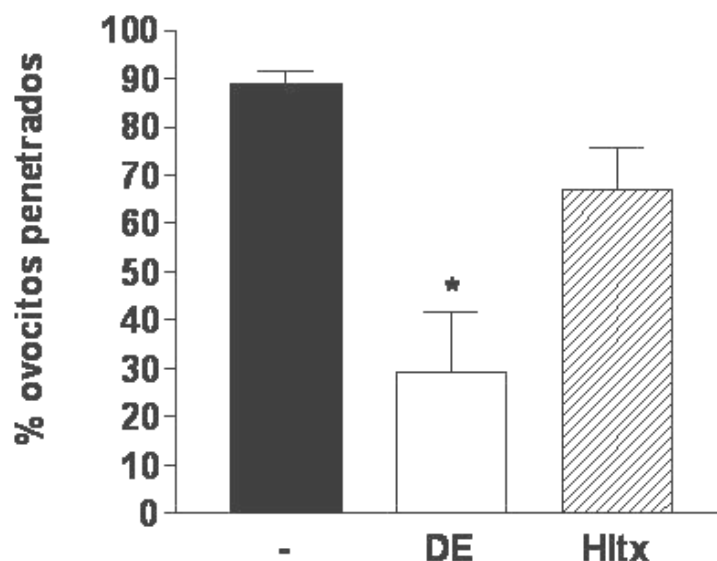


Figura 4. Efecto de helotermina en la fusión de gametas. Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados en medio sólo (-) o conteniendo 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína DE (DE) o helotermina (Hltx), y luego inseminados con espermatozoides capacitados, determinándose el porcentaje de ovocitos penetrados. * $p < 0.005$ vs control. (n=4)

En conjunto, los resultados demostraron que DE no sería capaz de inducir oscilaciones de calcio, ya sea mediante la unión a sus sitios complementarios en el oolema o por su incorporación dentro del ooplasma, como así tampoco de regular las oscilaciones producidas por un extracto espermático durante la activación del ovocito. Por lo tanto, si bien hasta el momento existía la posibilidad de que DE cumpliera un papel en la activación del ovocito, los estudios descriptos permitieron determinar que la proteína no tendría una función en la etapa posterior a la de fusión de gametas.

CAPÍTULO 3

Estudio del papel de DE durante las etapas de la fertilización previas a la fusión.

Los primeros estudios sobre el papel de la proteína DE en el espermatozoide establecieron que la misma cumplía un rol durante la fertilización en la rata (Cuasnicu et al, 1984). Teniendo en cuenta estos resultados, se diseñaron estudios cuyo fin último era desarrollar un anticonceptivo masculino basado en la supresión de la actividad de DE por métodos inmunológicos. Los resultados demostraron que la inmunización de ratas con la proteína DE producía una inhibición significativa en la fertilidad de los animales, confirmando la relevancia de DE para la fertilidad, y respaldando el potencial uso de esta proteína para el desarrollo de métodos anticonceptivos. Si bien se determinó que DE cumplía una función en la etapa de fusión de gametas (Rochwerger et al, 1992), los resultados obtenidos durante las inmunizaciones sugirieron que DE también podía participar en etapas adicionales durante la fertilización. Estas evidencias provinieron básicamente de experimentos en los cuales se analizaba el efecto de sueros de ratas inmunizadas con DE sobre la capacidad de espermatozoides en condiciones *in vivo*. Los resultados indicaron que mientras que los espermatozoides eran incapaces de fertilizar a los ovocitos en el oviducto, los ovocitos no fertilizados no presentaban una acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, contrariamente a lo esperado para el bloqueo de una proteína que participaba en la etapa de fusión. Estas observaciones sugirieron que los anticuerpos generados contra DE habían inhibido etapas de la fertilización previas a la de fusión. Los resultados de una serie de estudios preliminares de fertilización *in vitro* (FIV) utilizando ovocitos intactos de rata respaldaron la posibilidad de que DE participara en la interacción con la ZP. En esos ensayos, ovocitos con ZP cuyos COs habían sido removidos completamente por tratamiento con hialuronidasa mostraban un índice de fertilización disminuido en presencia de DE, sin una acumulación

de espermatozoides perivitelinos y con una disminución en el número de espermatozoides unidos a la ZP al final de la co-incubación (Cohen et al, 2003). Teniendo en cuenta las observaciones descritas, se estudió el rol de DE durante las etapas de la fertilización previas a la fusión (penetración del cúmulus e interacción con la ZP)

Las experiencias de FIV utilizando gametas de rata han demostrado ser poco eficientes y reproducibles, hecho demostrado por los pocos estudios presentados en la bibliografía utilizando a este modelo. Si bien en nuestro laboratorio habíamos logrado realizar algunos experimentos utilizando ovocitos intactos de rata, la dificultad en el procedimiento y la variabilidad entre ensayos nos llevó a cambiar de modelo para continuar el análisis de la posible participación de DE durante la interacción espermatozoide-ZP. Teniendo en cuenta que la mayoría de los laboratorios estudiando los mecanismos moleculares de la interacción de gametas utiliza el ratón como modelo animal, decidimos utilizar gametas de esta especie en los experimentos que se describirán a continuación. El primer paso consistió entonces en seleccionar una cepa de ratón en la que pudieran obtenerse un alto número de ovocitos, espermatozoides de buena calidad, y porcentajes elevados de fertilización *in vitro*. En nuestra institución contábamos con dos cepas de ratón utilizadas en estudios de interacción de gametas reportados en la bibliografía. Una de ellas, la C57Bl/6, es criada en el bioterio de IBYME, lo cual permitía contar con animales de las edades necesarias en el momento del experimento, evitando iniciar una nueva colonia de ratones. La segunda cepa era la CF1, ratones criados y utilizados por el laboratorio del Dr. Marcelo Rubinstein (INGEBI) para la producción de animales transgénicos. Como primer paso evaluamos la eficiencia en la cantidad de gametas obtenidas, lo cual resultó similar para ambas especies. Tanto los ratones C57Bl/6 como los CF1 permitían obtener numerosos espermatozoides epididimarios, de buena motilidad, y un número adecuado de ovocitos por oviducto. Una diferencia observada entre las dos cepas, era que los ovocitos de los CF1 presentaban un aspecto que sugería

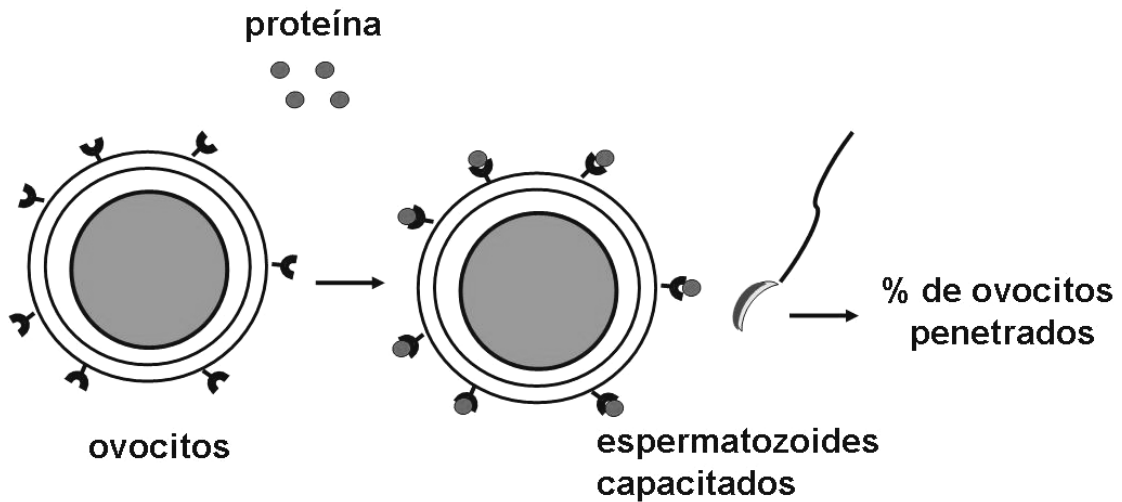
una mayor calidad, indicada por la presencia de un citoplasma más homogéneo y una forma más esférica, en contraposición a un citoplasma más granulado, y formas ovaladas.

En los primeros ensayos de FIV realizados en el laboratorio, se utilizaron gametas provenientes de ambas cepas, utilizando un protocolo obtenido de la bibliografía (Miyado et al, 2000). En correspondencia con la diferencia en la calidad ovocitaria, la cepa CF1 produjo porcentajes de ovocitos fertilizados significativamente mayores a los obtenidos con la cepa C57bl/6 (**CF1: 70±4% vs C57bl/6: 13±1%**). Por este motivo, se decidió utilizar ratones CF1 para los sucesivos experimentos. Como se mencionara anteriormente, los ratones de la cepa CF1 eran criados por el laboratorio de Dr. Rubinstein, por lo que se recibió la donación de tres parejas de animales CF1 provenientes de ese grupo para el inicio de una colonia, la cual es mantenida por nuestro laboratorio hasta el presente.

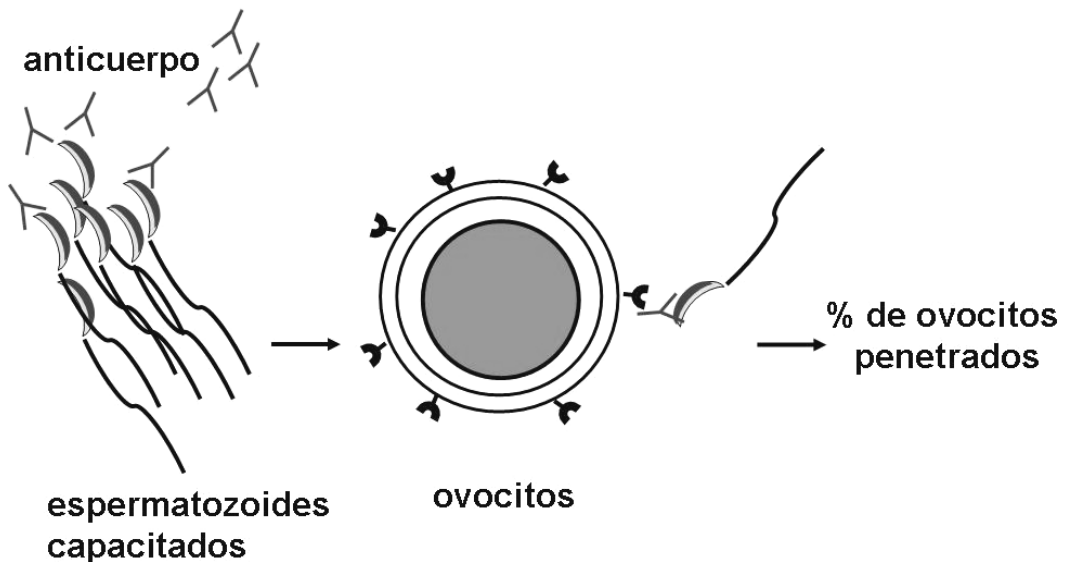
a) Participación de DE en la etapa de interacción espermatozoide-ZP

Con el fin de analizar la participación de DE en la interacción espermatozoide-ZP, se decidió utilizar dos esquemas experimentales previamente realizados en nuestro laboratorio para analizar la participación de proteínas del espermatozoide en la fusión de gametas. En los estudios realizados en esta parte, sin embargo, utilizamos ovocitos intactos (con ZP) en lugar de ovocitos sin ZP. En el primer esquema experimental, los ovocitos son preincubados durante 30 minutos con la proteína a ser estudiada, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. La idea de estos experimentos radica en que, en caso de existir sitios de unión para la proteína del espermatozoide en los ovocitos, su pre-incubación con la proteína soluble resultaría en una inhibición de los porcentajes de fertilización (**Esquema 1**). El segundo esquema, de algún modo complementario al primero, tiene como objetivo bloquear a la proteína espermática a través del empleo de anticuerpos específicos y evaluar

el efecto de dicho bloqueo sobre los eventos de la fertilización. En este caso, los espermatozoides son preincubados con los anticuerpos durante los 30 minutos para permitir la interacción anticuerpo-proteína en el espermatozoide, y los ovocitos agregados a las gotas de espermatozoides (**Esquema 2**).



Esquema 1. Ensayo de interacción de gametas *in vitro* en presencia de proteína.



Esquema 2. Ensayo de interacción de gametas *in vitro* en presencia de anticuerpo.

En los ensayos de FIV presentados en esta tesis, se utilizó generalmente una concentración de proteína de 6 μM y una dilución de anticuerpo de 1/50, correspondientes a las condiciones en las que previamente se habían observado porcentajes máximos de inhibición de la penetración de ovocitos sin ZP, en ensayos de fusión *in vitro*.

Para estudiar la posible participación de DE en la interacción espermatozoide-ZP se efectuaron ensayos de FIV en presencia de DE, analizándose si el efecto de la proteína era similar al de inhibición observado en los experimentos preliminares realizados en rata. Ovocitos de ratón desnudos del cúmulus fueron preincubados en medio solo, o medio conteniendo 6 μM DE, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 7 hs, los ovocitos fueron lavados, montados y observados al microscopio óptico. Mientras que DE no afectó la motilidad ni indujo la aglutinación de los espermatozoides, lo cual ya había sido reportado anteriormente (Cohen et al, 2000a; Ellerman et al, 2002), la proteína produjo una inhibición significativa, de aproximadamente el 90%, en el porcentaje de ovocitos fertilizados respecto del control (**Figura 1**). Contrariamente a lo esperado para una inhibición en la fusión de gametas, DE no produjo una acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, obteniéndose porcentajes de ovocitos con espermatozoides perivitelinos similares a los de control (**4 \pm 3% vs 7 \pm 2% control, NS**). En ambos casos, el número promedio de espermatozoides perivitelinos por ovocito fue inferior a uno. Estos resultados indicaron que la presencia de la proteína afectaba de algún modo la interacción de los espermatozoides con la ZP, respaldando la participación de la proteína en esta etapa de la fertilización.

Con el fin de visualizar una posible asociación de DE a la ZP, ovocitos intactos de ratón fueron incubados en medio solo o medio conteniendo 6 μM de proteína DE, luego fijados y sometidos a IFI utilizando anti-DE como primer anticuerpo. Como puede observarse en la **Figura 2**, los ovocitos incubados con DE presentaron una marca fluorescente intensa en la ZP, además de la

marca característica en el oolema reportada por nuestro laboratorio anteriormente. La marca en la ZP fue específica, ya que los ovocitos incubados en ausencia de proteína y con anti-DE no presentaron marca alguna.

Los resultados obtenidos al utilizar DE recombinante (recDE) en los ensayos de FIV e IFI fueron diferentes a los obtenidos en forma paralela con DE nativa (nDE). En primer lugar, el efecto de recDE sobre la FIV fue menor, alcanzando valores de inhibición de aproximadamente un 50% sobre el control (**Figura 1**). Dicho efecto fue específico, ya que los ovocitos incubados con 6 μ M MBP (proteína de fusión de recDE) no presentaron diferencias en los porcentajes de fertilización respecto del control, indicando que la porción correspondiente a MBP en recDE no sería la responsable de la inhibición observada. A diferencia de lo observado con nDE, los ovocitos incubados en presencia de recDE presentaron un porcentaje de espermatozoides perivitelinos significativamente mayor al del control (**22 \pm 8% vs 7 \pm 2%** control, $p < 0,05$), indicando que existía un bloqueo a nivel del oolema sin efectos sobre la etapa de interacción con la ZP. En segundo lugar, los resultados de la IFI indicaron que los ovocitos incubados con recDE no presentaron marca en la ZP, observándose exclusivamente marca fluorescente en el oolema (**Figura 2**). La especificidad de la marca de recDE fue corroborada por el hecho de que ovocitos incubados con MBP y anti-MBP no presentaron marca fluorescente. En conjunto, los resultados de los ensayos utilizando recDE indicaron que mientras que la proteína recombinante tenía un comportamiento similar al de la nativa en su interacción con el oolema, recDE no mimetizaba a nDE en la interacción con la ZP.

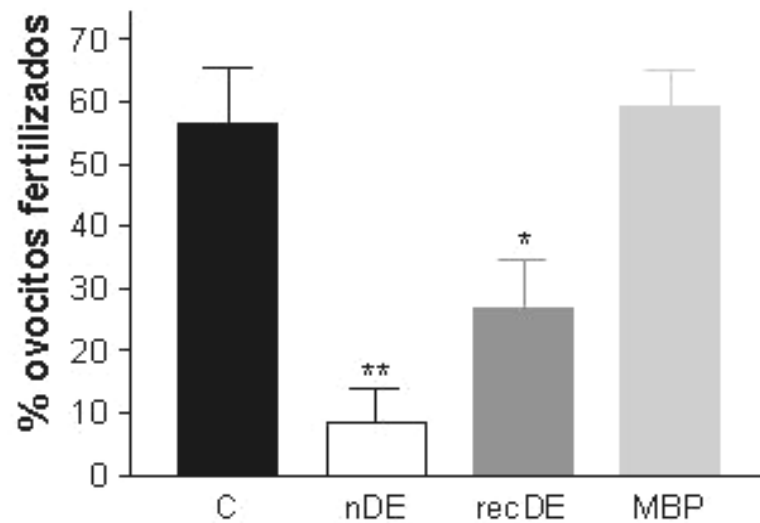


Figura 1. Efecto de la proteína DE sobre la FIV de ratón. Ovocitos de ratón con ZP fueron preincubados durante 30 minutos en ausencia de proteína (C) o en presencia de 6 μ M DE nativa (nDE), DE recombinante (recDE) o MBP, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 7 hs, los ovocitos fueron lavados y montados, determinándose el porcentaje de ovocitos fertilizados. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (n=10).

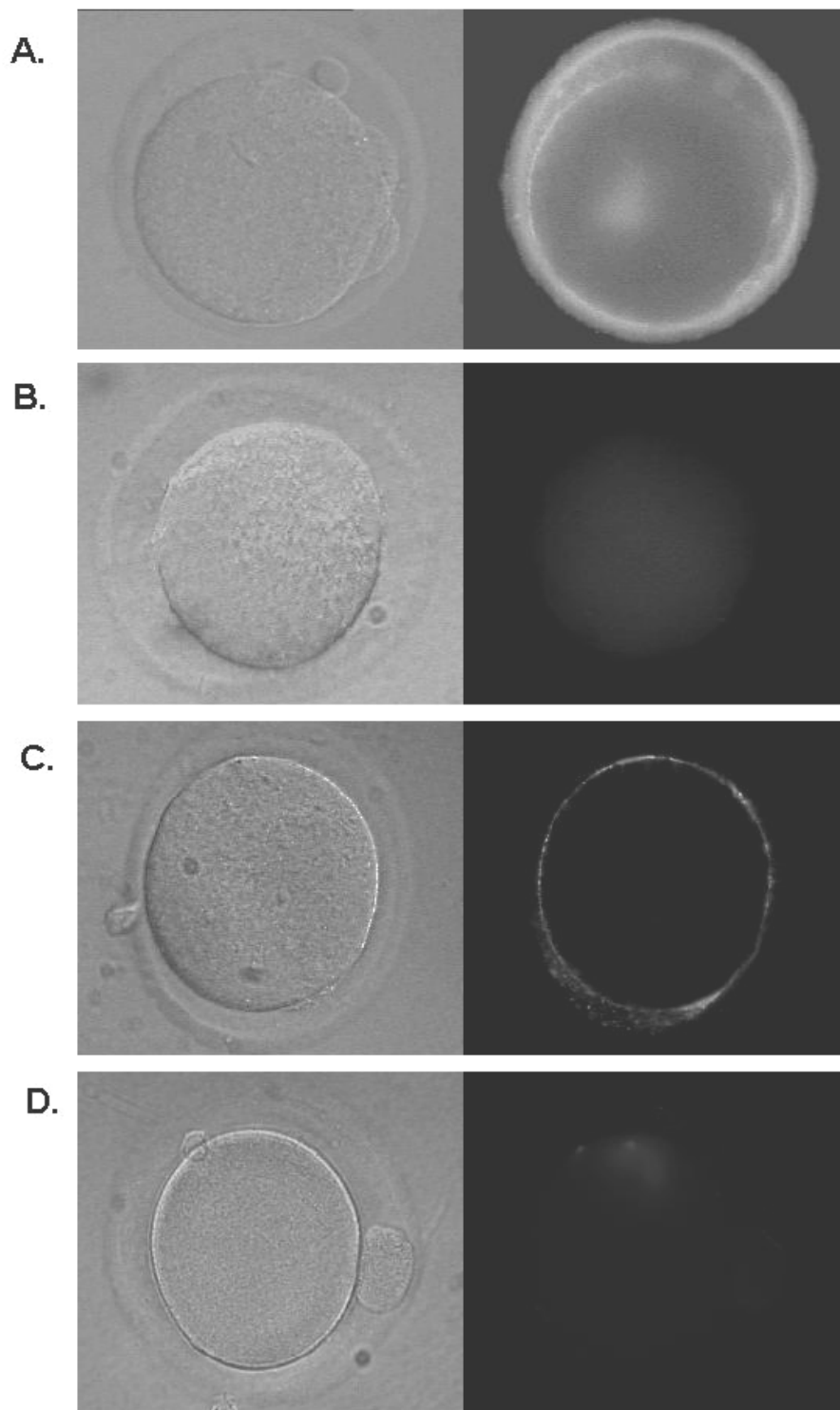


Figura 2. Inmunofluorescencia indirecta de ovocitos de ratón. Ovocitos de ratón con ZP fueron incubados con las proteínas que se indican a continuación, y luego fijados y sometidos a inmunofluorescencia indirecta usando los primeros anticuerpos correspondientes. **A.** 6 μ M DE y anti-DE, **B.** Sin proteína y anti-DE **C.** 6 μ M recDE y anti-MBP, **D.** 6 μ M MBP y anti-MBP.

Existen evidencias indicando que luego de la fertilización, la ZP sufre modificaciones generadas por la liberación de los gránulos corticales durante la activación. Dichas modificaciones corresponderían básicamente a alteraciones de las proteínas componentes y/o la estructura tridimensional de la ZP, y tendrían como consecuencia una disminución de la capacidad de unir espermatozoides en la ZP de los ovocitos fertilizados como un mecanismo para impedir la polispermia. Dado que, de acuerdo a los resultados anteriores, DE podría ser una de las moléculas del espermatozoide capaces de asociarse a la ZP, el paso siguiente de nuestros estudios consistió en analizar si existía una alteración en la capacidad de la ZP de unir a la proteína DE luego de la fertilización. Con este fin, ovocitos de ratón con ZP fueron co-incubados con espermatozoides capacitados y al cabo de 6-7 h, los ovocitos fueron fijados, incubados con DE y sometidos a IFI con anti-DE y un segundo anticuerpo fluoresceinado. Dado que el porcentaje promedio de ovocitos fertilizados por FIV era de alrededor del 50-60%, dentro de cada gota de ovocitos inseminados y luego sometidos a IFI se encontraban tanto ovocitos no fertilizados como fertilizados. Los resultados indicaron que, mientras que los ovocitos no fertilizados mostraron la marca fluorescente intensa sobre la ZP antes observada, los ovocitos fertilizados, sometidos al mismo procedimiento en paralelo y en la misma gota de incubación, sólo mostraron una marca suave **(Figura 3)**.



Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta comparando la asociación de DE a un ovocito de ratón fertilizado vs un ovocito no fertilizado. Ovocitos de ratón con ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados y, al cabo de 7 hs, incubados con 6 μ M DE, fijados y sometidos a IFI usando anti-DE como primer anticuerpo. En (A) se señalan con flechas los pronúcleos en el ovocito fertilizado en la fotografía de fase. En (B) puede observarse la diferencia en las intensidades de la marca fluorescente para DE entre el ovocito fertilizado y el no fertilizado.

En paralelo a los experimentos de FIV en presencia de DE, también se utilizó el segundo esquema experimental para estudiar el efecto del anticuerpo sobre la interacción de los espermatozoides con ovocitos intactos, como se explicara anteriormente. Espermatozoides capacitados de ratón fueron pre-incubados con anti-DE y luego utilizados para inseminar ovocitos con ZP. Si DE era relevante para la interacción del espermatozoide con la ZP, el bloqueo de la proteína en el espermatozoide mediante anti-DE traería como consecuencia una inhibición en dicha etapa y, por consiguiente, de la fertilización. Los resultados de estos experimentos indicaron que efectivamente la presencia de anti-DE 1/50 durante la co-incubación de gametas producía una inhibición significativa de la fertilización (**Figura 4**) sin un aumento en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides perivitelinos, tanto respecto del control sin anticuerpo (control: $22\pm 9\%$ vs anti-DE: $20\pm 6\%$) como en presencia de inmunoglobulina G de conejo (IgG) 1/50 ($22\pm 8\%$).

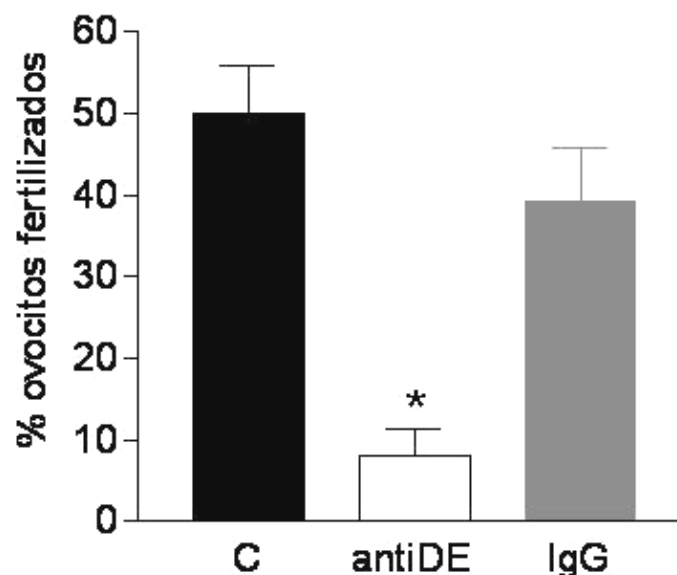


Figura 4. Efecto de anti-DE sobre la FIV de ratón. Espermatozoides capacitados de ratón fueron preincubados durante 30 minutos en ausencia de anticuerpo (C) o en presencia de anti-DE, o inmunoglobulinas G de conejo (IgG) a una dilución de 1/50, agregándose posteriormente los ovocitos a las gotas. Al cabo de 7 hs de co-incubación, los ovocitos fueron lavados y montados, determinándose el porcentaje de fertilización. $p < 0,05$. (n=7)

Ni la motilidad de los espermatozoides (control: $45\pm 6\%$; anti-DE: $47\pm 3\%$; IgG: $43\pm 2\%$) ni la capacidad de sufrir la RA espontánea (control: $48\pm 8\%$; anti-DE: $50\pm 4\%$; IgG: $45\pm 6\%$) se vieron modificadas por la presencia de anti-DE, descartando posibles efectos del anticuerpo sobre otros parámetros del espermatozoide que pudieran afectar su capacidad fertilizante.

La ausencia de espermatozoides acumulados en el espacio perivitelino en los ensayos de IVF, tanto en presencia de DE purificada como de anti-DE, sugirieron en forma indirecta que la proteína DE en el espermatozoide cumpliría una función en la interacción con la ZP. Con el fin de analizar esta posibilidad, se realizaron ensayos diseñados específicamente para evaluar la etapa de unión de los espermatozoides a la ZP, mediante la observación de las gametas a tiempos más cortos. Para ello, se siguieron los esquemas experimentales descritos anteriormente tanto en presencia de DE como de anti-DE. En el caso de los estudios con anticuerpo, los espermatozoides capacitados fueron incubados con anti-DE previo al agregado de los ovocitos, mientras que en los ensayos en presencia de DE, fueron los ovocitos los que se incubaron con la proteína previo a la inseminación. Las gametas fueron co-incubadas por treinta minutos, luego lavadas para remover los espermatozoides asociados débilmente a la ZP, y finalmente los ovocitos fueron observados al microscopio óptico. La cuantificación de los espermatozoides unidos por ovocito indicó que tanto la presencia de DE como de anti-DE en los ensayos de unión resultaron en una inhibición significativa del número de espermatozoides unidos por ovocito (**Figura 5 A,B**).

En conjunto, los resultados anteriores sugirieron que la proteína nDE purificada sería capaz de interactuar con la ZP, bloqueando posibles sitios de unión para DE en los espermatozoides. De este modo, la presencia de DE durante la co-incubación de las gametas disminuiría la capacidad de los espermatozoides de unirse con la ZP, inhibiendo por consiguiente la fertilización. En ovocitos fertilizados, la proteína DE sufriría una disminución en su capacidad de

asociación a la ZP, probablemente debida a la alteración de sus sitios de unión como consecuencia de la activación del ovocito. Por otra parte, respaldando los resultados de FIV e IFI obtenidos en presencia de proteína DE, el anticuerpo específico contra DE sería capaz de bloquear a la proteína en el espermatozoide, inhibiendo la etapa de unión de los espermatozoides a la ZP provocando una inhibición de la fertilización.

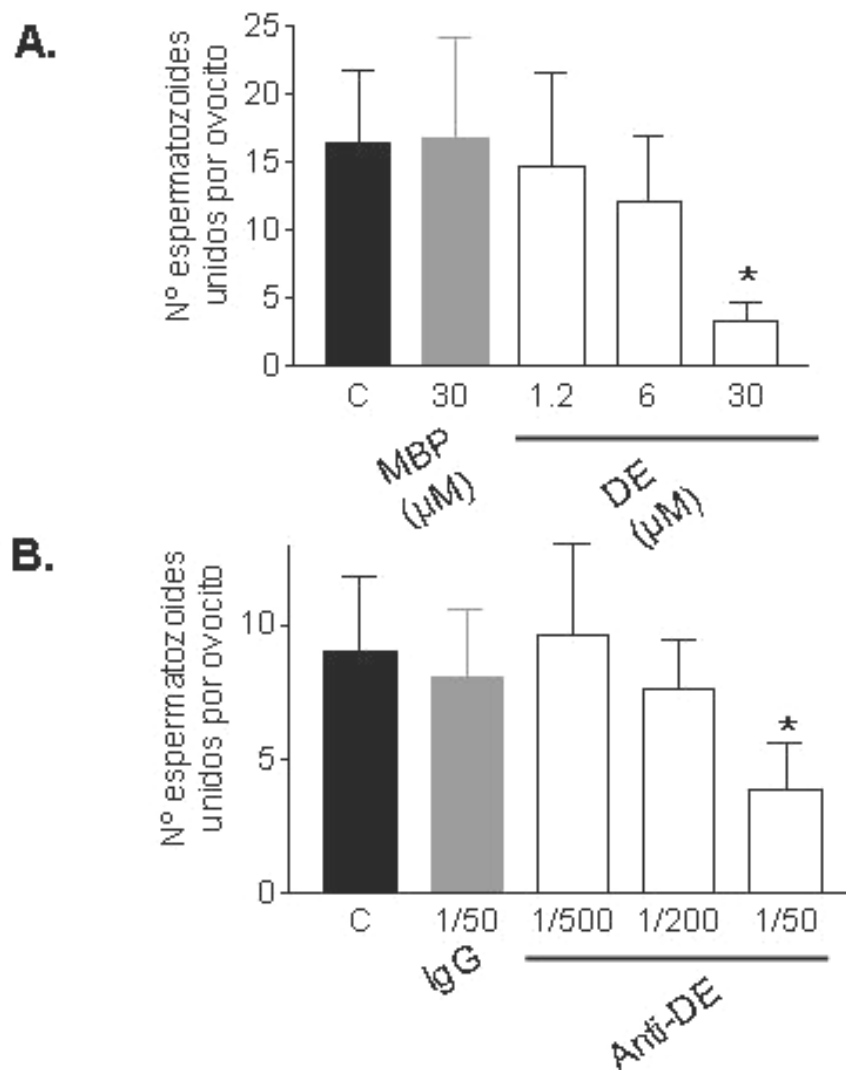


Figura 5. Efecto de DE y anti-DE sobre la unión de espermatozoides a la ZP.

A. Ovocitos intactos de ratón fueron preincubados durante durante 30 minutos en ausencia de proteína, o en presencia de DE a diferentes concentraciones o MBP 30 µM y luego inseminados (n=3). **B.** Espermatozoides capacitados fueron preincubados con diferentes concentraciones de anti-DE, o IgG 1/50, y luego los ovocitos fueron agregados a las gotas (n=8). En ambos casos, al cabo de 30 minutos de coincubación, los ovocitos fueron lavados, fijados y montados, determinándose el número de espermatozoides unidos. $p < 0,05$.

Como se describiera en la introducción de esta tesis, existe una proteína humana de origen epididimario denominada ARP, altamente homóloga a la proteína DE, que también se asocia al espermatozoide durante la maduración. La participación de dicha proteína en el proceso de fusión de gametas en el humano ha sido demostrada por nuestro laboratorio (Cohen et al, 2001) y por consiguiente, se ha considerado a ARP el homólogo funcional de DE. Teniendo en cuenta los resultados en el ratón, nuestro siguiente objetivo consistió en estudiar si ARP cumpliría una función en la interacción del espermatozoide con la ZP en el humano.

Para analizar esta posibilidad utilizamos un ensayo comúnmente conocido como “test de hemizona (HZ)”, en el que se analiza la capacidad de espermatozoides humanos, tratados bajo dos condiciones experimentales, de interaccionar con las dos mitades o hemizonas de la ZP de un ovocito humano. La utilización de hemizonas para evaluar el efecto de un tratamiento sobre la interacción de los espermatozoides con la ZP se debe a la gran variabilidad que existe entre diferentes ovocitos humanos. Cabe aclarar que los ovocitos utilizados en este ensayo son fijados previamente a su utilización, por lo que resultan inviábiles y, por ende, no fertilizables. Nuestros resultados indicaron que las hemizonas incubadas en presencia de 6 μ M de ARP recombinante presentaron un número de espermatozoides unidos significativamente menor al de las HZ contralaterales, incubadas en ausencia de proteína o presencia de 6 μ M MBP (**Figura 6A**). Asimismo, anti-ARP produjo una inhibición significativa de la unión a HZ respecto de los controles, es decir HZ incubadas en ausencia de anticuerpos o en presencia de IgG 1/50 y 1/10 (**Figura 6B**).

En conjunto, los resultados de los ensayos aquí presentados indican que la proteína DE, y su homólogo humano ARP, podrían participar en la interacción con la ZP además de cumplir una función en la etapa de fusión espermatozoide-ovocito determinada anteriormente.

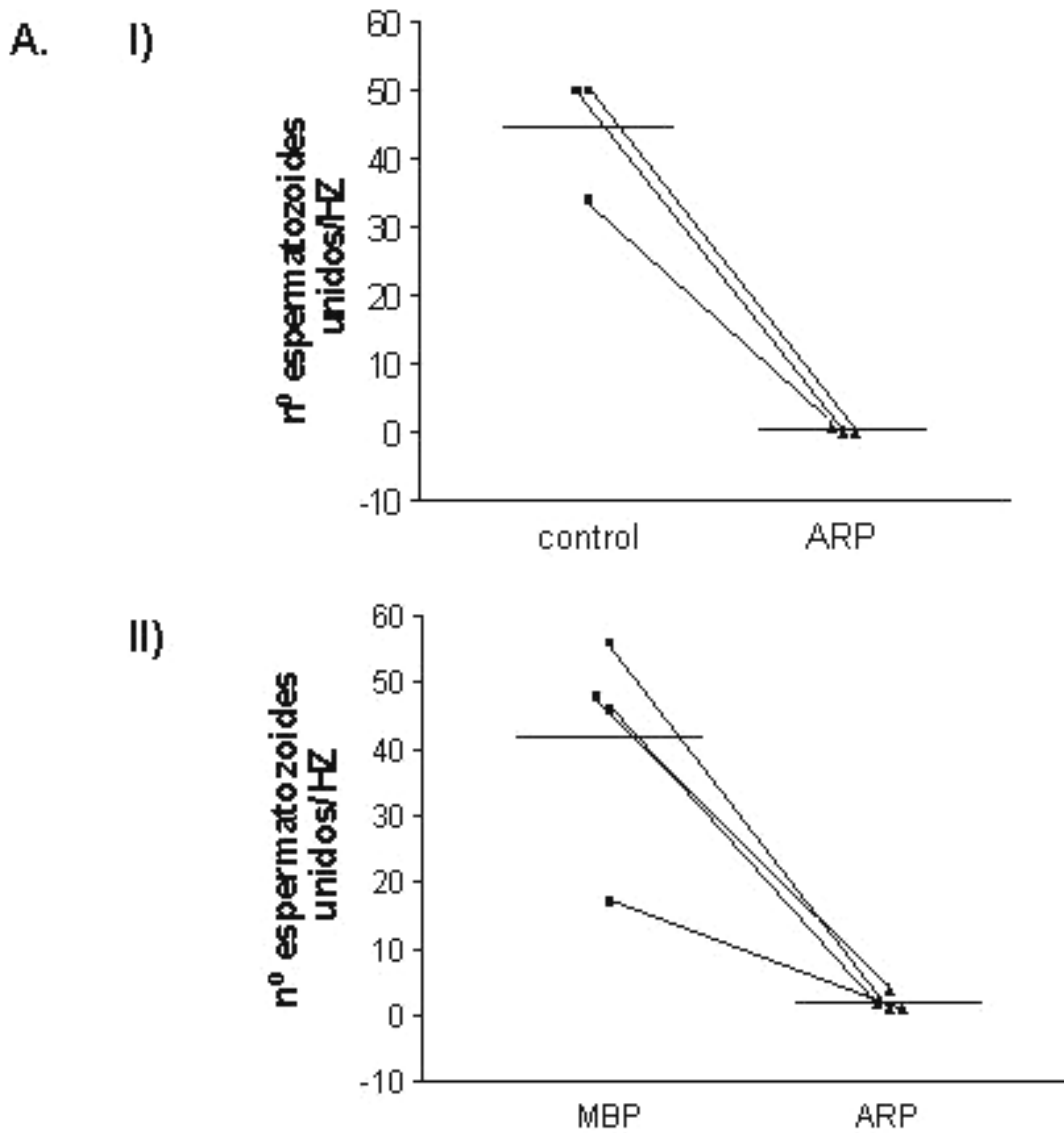


Figura 6A. Estudio de la participación de la proteína humana ARP en la interacción espermatozoide-ZP mediante el ensayo de hemizona en presencia de proteína ARP. Hemizonas (HZ) humanas fueron preincubadas durante 30 minutos en presencia de 6 μ M de proteína ARP, y luego inseminadas con espermatozoides humanos capacitados. Las mitades contralaterales de cada HZ fueron incubadas en paralelo en ausencia de proteína (I) o en presencia de 6 μ M de MBP (II) como controles negativos.

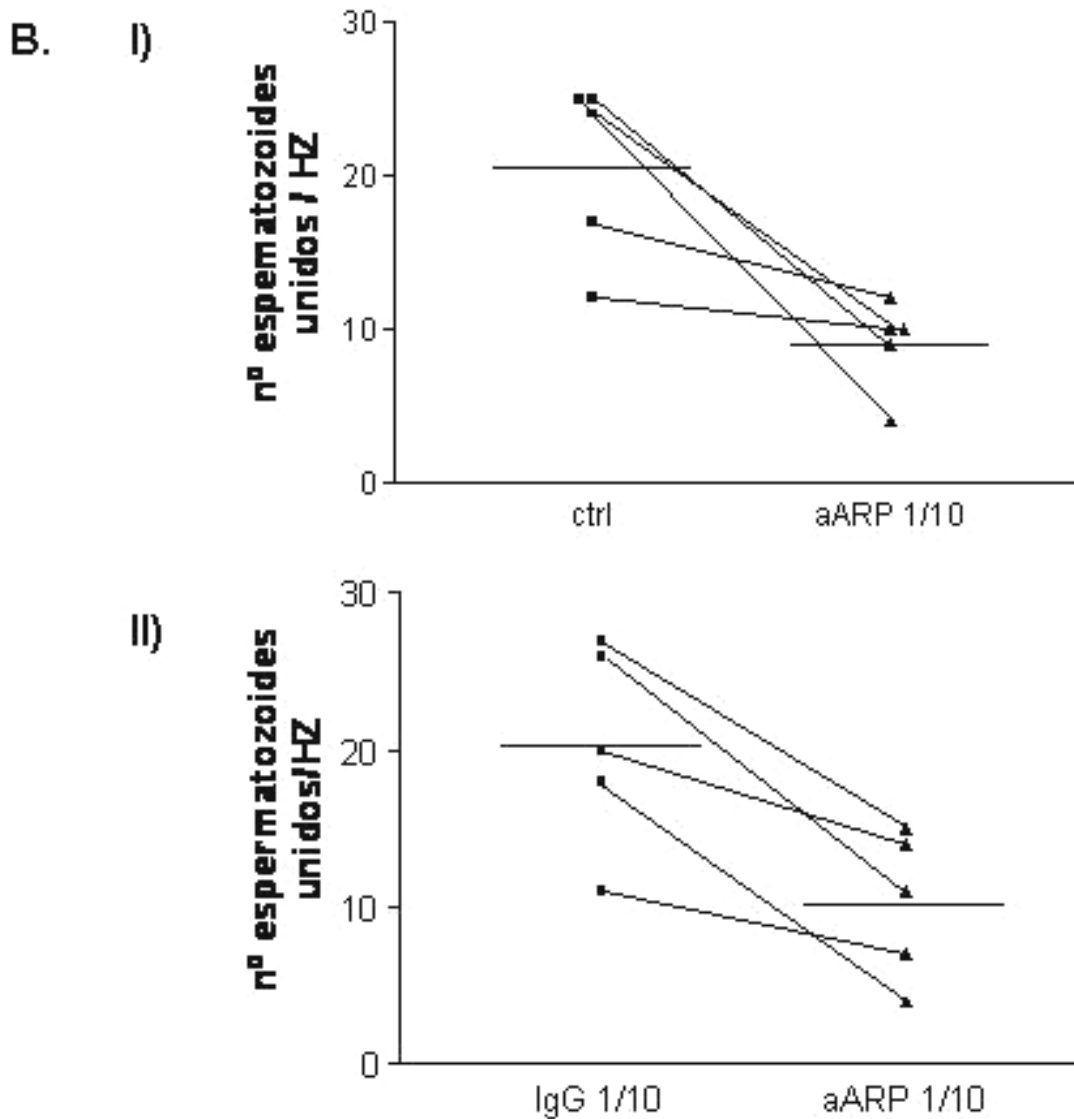


Figura 6B. Estudio de la participación de la proteína humana ARP en la interacción espermatozoide-ZP mediante el ensayo de hemizona en presencia de anti-ARP. Espermatozoides humanos capacitados fueron pre-incubados durante 30 minutos en presencia de anti-ARP 1/10, y luego utilizados para inseminar hemizonas humanas. Espermatozoides incubados en ausencia de anticuerpo (I) o en presencia de IgGs de conejo normales 1/10 (II) fueron utilizados para inseminar las hemizonas contralaterales. Tanto en (A) como en (B) las gametas fueron co-incubadas durante 4 hs, al cabo de lo cual el número de espermatozoides unidos a cada hemizona fue cuantificado por observación al microscopio óptico.

b) Participación de DE en la etapa de penetración del cúmulus

Mientras que los resultados de las inseminaciones con DE sugirieron la posible participación de DE en etapas de la fertilización previas a la de fusión, un segundo hallazgo también nos sugirió que DE podría tener un rol en la etapa de penetración del cúmulus oophorus. Durante la realización de ensayos en los que se analizaba la activación de ovocitos, por casualidad se colocaron complejos ovocitos-cúmulus (COCs) de ratón en gotas conteniendo a la proteína DE. Sorpresivamente, la incubación con DE provocó la dispersión de las células del cúmulus de los COCs. En la **Figura 7** puede compararse el aspecto compacto de COCs incubados en medio sólo con el de COCs incubados con DE, en los que se observa un claro efecto de la proteína sobre la integridad del cúmulus.

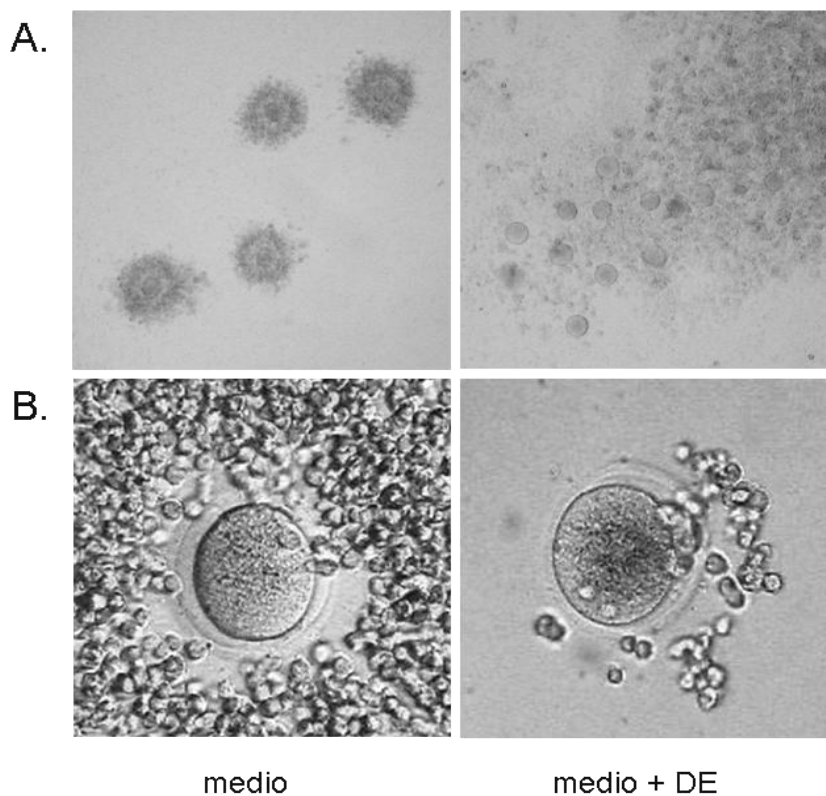


Figura 7. Efecto de la proteína DE sobre la integridad de COCs de ratón. COCs de ratón fueron incubados durante 30 min en medio solo o medio conteniendo 6 μ M DE. **A.** COCs observados en las gotas de incubación mediante un microscopio invertido. **B** COCs lavados, montados, y observados al microscopio óptico.

La desintegración del cúmulus en presencia de DE nos abría la posibilidad de estudiar el efecto *per se* de DE sobre la integridad del cúmulus. El paso previo a la realización de estos estudios consistió en desarrollar un método de evaluación que permitiera cuantificar el efecto de DE sobre el cúmulus. Se definió entonces un sistema que permitía asignar a cada COC un valor subjetivo, correspondiente al nivel de integridad del cúmulus. De este modo, se otorgó un valor de 4 a los COCs intactos, un valor de 0 a los COCs cuyo cúmulus había sido completamente removido y números entre 4 y 0 a los estadios intermedios, en los que las células del cúmulus habían sido parcialmente disgregadas. (**Figura 8**).

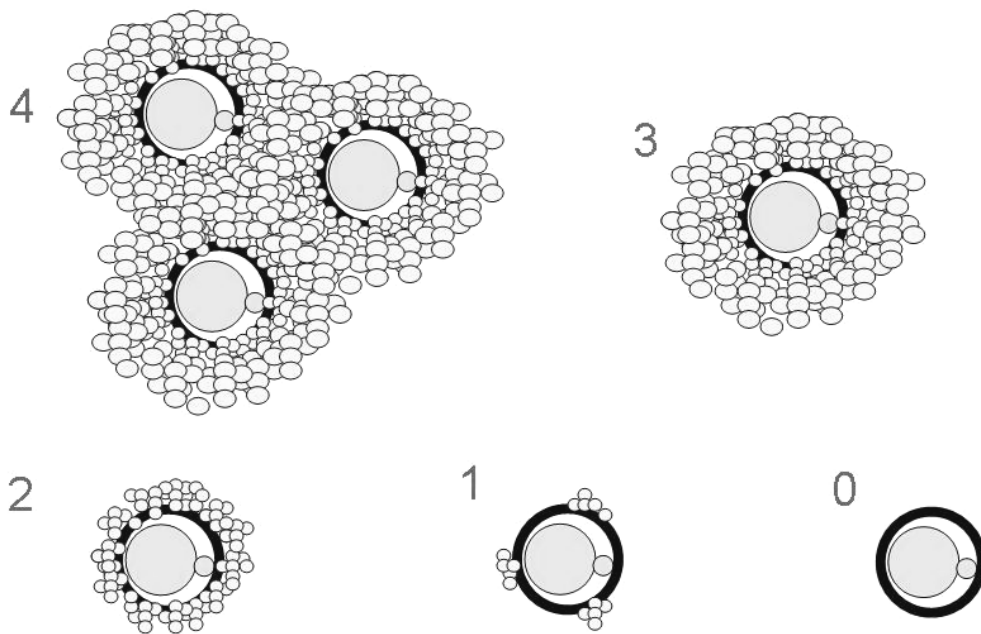


Figura 8. Clasificación de la integridad del cúmulus. Esquema en el que se representa el sistema de evaluación subjetiva utilizado para evaluar el efecto de proteínas sobre los COCs. Se asignó a cada COC individualmente un valor de entre 4 y 0, de acuerdo al esquema, según el grado de disgregación del cúmulus.

Una vez definido el sistema de evaluación, COCs de ratón fueron incubados en presencia de dos concentraciones de DE (6 y 12 μM), durante tres períodos de incubación (15, 30 y 60 min). Los COCs incubados en hialuronidasa, a la concentración normalmente utilizada para remover completamente a las células del cúmulus *in vitro*, fueron utilizados como control positivo del experimento, mientras que ovocitos incubados en ausencia de proteína fueron incluidos como control negativo. Los resultados demostraron que el efecto de DE sobre la desintegración del cúmulus fue dependiente de la concentración de la proteína y del tiempo de incubación (test de Anova, $p < 0,005$), observándose una disgregación total de los cúmulus de ratón por exposición a 12 μM DE durante 60 minutos (**Figura 9**).

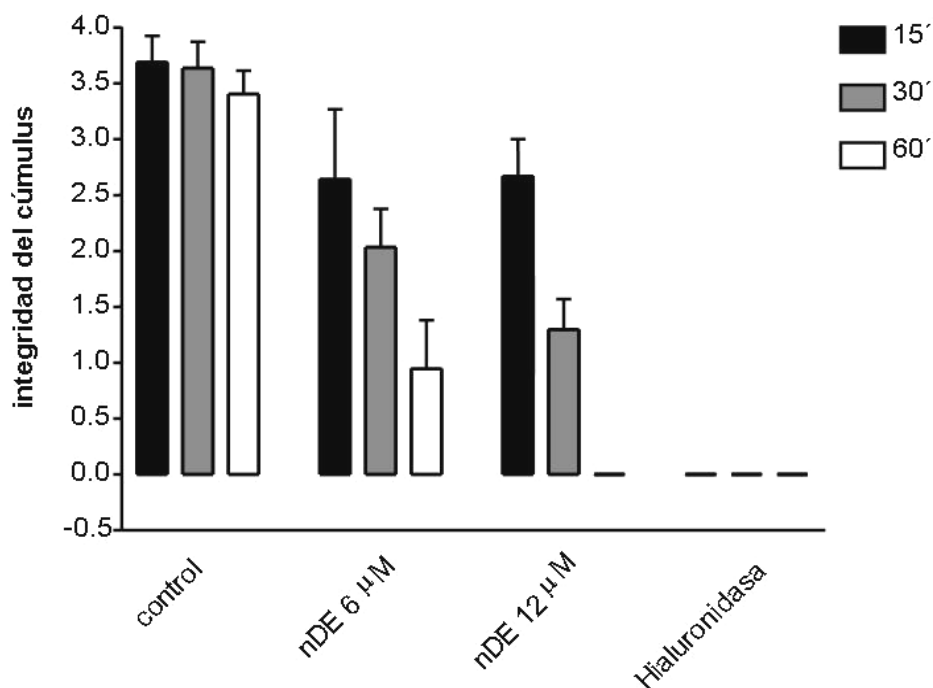


Figura 9. Actividad de DE sobre la integridad del cúmulus de ratón. COCs de ratón fueron incubados en ausencia de proteína (control), en presencia de nDE a las concentraciones indicadas, o bien en presencia hialuronidasa de testículo bovino (0,3 mg/ml), durante 15, 30 o 60 min, determinándose posteriormente la integridad de los cúmulus de acuerdo al sistema de evaluación descrito anteriormente (n=4).

El paso siguiente para intentar caracterizar la actividad de DE sobre el cúmulus consistió en evaluar la relevancia de la glicosilación y la conformación de la proteína para dicha función. Utilizamos a la proteína recDE producida en nuestro laboratorio. Como todas las proteínas producidas en sistemas procariotas, recDE carece de la glicosilación presente en la proteína nativa. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que recDE es capaz de asociarse al oolema de rata y es activa en ensayos de inhibición de fusión, aunque en menor grado que la proteína nativa, probablemente debido a una incorrecta conformación (Ellerman et al, 1998b). Con el fin de evaluar la actividad de recDE sobre la integridad del cúmulus, COCs fueron incubados en presencia de 6 μ M nDE o recDE durante 60 minutos, observándose el efecto de cada una de las proteínas al cabo de ese período. En paralelo, se incubaron COCs en presencia de helotermina, proteína nativa purificada del veneno de la lagartija *H. horrendum* perteneciente a la familia CRISP y altamente homóloga a DE. A diferencia de nDE y al igual que recDE, helotermina no contiene residuos glicosídicos. Mientras que la incubación de COCs en presencia de nDE provocó la disgregación del cúmulus previamente descrita, recDE y helotermina resultaron inactivas (**Figura 10**), sugiriendo que tanto la presencia de residuos glicosídicos como la conformación en la molécula podría ser relevante para su actividad.

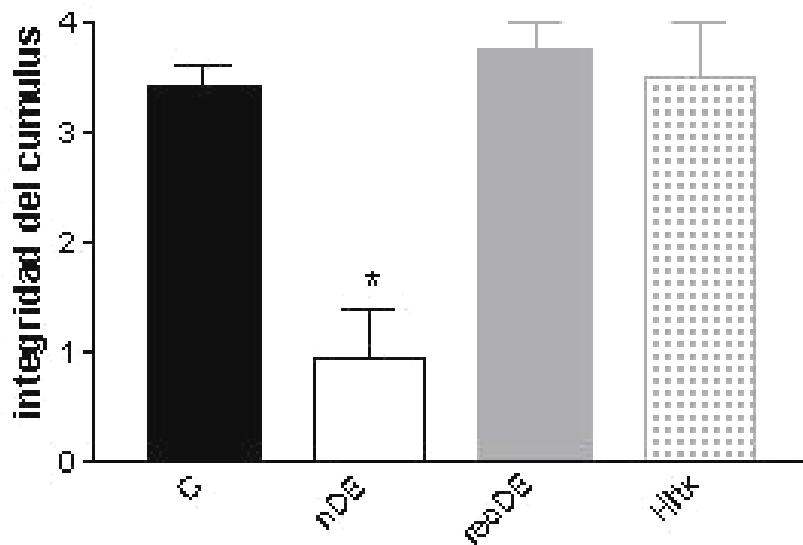


Figura 10. Actividad de DE recombinante (recDE) y helotermína (Hltx) sobre la integridad del cúmulus. COCs de ratón fueron incubados 60 min en presencia de 6 μ M nDE, recDE o Hltx, analizándose posteriormente el efecto de cada proteína sobre el cúmulus. * $p < 0,05$. (n=3).

Con el fin de analizar la relevancia de los carbohidratos para la actividad de DE, la proteína nativa fue tratada con la enzima PNGasa F, capaz de remover la totalidad de sus residuos glicosídicos, previo a su utilización en experimentos de integridad del cúmulus. La deglicosilación de DE fue llevada a cabo en diferentes condiciones, analizándose en cada caso la eficiencia del procedimiento. Las variables en cada experimento fueron: la concentración de proteína (2-10 μ g), el volumen final de reacción (1,5-30 μ l), la cantidad de enzima (100-250 UI/ μ l) y el tiempo de incubación (2-18 h), obteniéndose resultados variables en cada caso. Las condiciones más eficientes de deglicosilación (DE: 2 μ g/ml; volumen: 30 μ l; enzima: 250 UI/ μ l, tiempo: 6 h) permitieron la obtención de una solución de DE conteniendo un 80% de DE deglicosilada. Dicha proteína fue identificada por su mayor movilidad electroforética en geles de acrilamida, debida a su menor tamaño por la ausencia de azúcares, y cuantificada mediante densitometría de la banda correspondiente (**Figura 11**, primera calle).

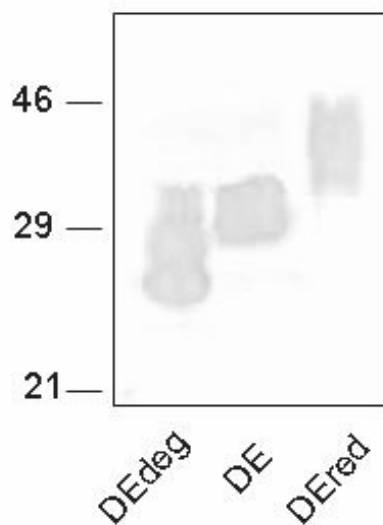


Figura 11. Análisis electroforético de DE deglicosilada (DEdeg) y DE reducida (DERed). Cantidades iguales de DE deglicosilada enzimáticamente, DE sin tratar y DE reducida y alquilada fueron analizadas mediante electroforesis y western blot. Obsérvese la mayor movilidad de DEdeg y la menor movilidad de DERed comparadas con la de DE no tratada (32 kDa).

Por otra parte, además de analizar la relevancia del componente glicosídico para la actividad de DE, en el mismo experimento se estudió la importancia de los puentes disulfuro y la conformación de la molécula para su función. El alto número y gran grado de conservación de los residuos cisteína en DE, al igual que en el resto de las CRISPs, indican la existencia de puentes disulfuro intramoleculares que podrían ser relevantes para su conformación y función (Haendler et al, 1993; O'Bryan et al, 1998). Por otro lado, estudios previos de nuestro laboratorio determinaron que recDE poseía sulfhidrilos libres y una menor actividad en fusión respecto a DE nativa utilizada a la misma concentración (Ellerman et al, 1998b). Por lo tanto, y tal como se mencionara anteriormente, existía la posibilidad de que la ausencia de efecto de recDE sobre los COCs se debiera a una conformación incorrecta en la proteína recombinante. Para evaluar la relevancia de los puentes disulfuro en DE, la proteína nativa fue tratada con DTT, agente reductor de dichos enlaces, y luego alquilada para impedir la re-asociación de los mismos, previamente a ser utilizada. La correcta reducción/alquilación de DE fue corroborada mediante western blot, en el que se observó el cambio en la migración electroforética característico de la proteína reducida (**Figura 11**, tercera calle). Finalmente, como otra aproximación al análisis de la relevancia de la conformación para la

actividad, se evaluó la actividad de la proteína DE previamente incubada a 95 °C. Los efectos de DE no tratada vs. DE sometida a los tratamientos anteriormente descritos se ilustran en la **Figura 12**. Como puede observarse, mientras que a una concentración de 6 μ M, DEdeg no presentó una actividad disminuida respecto a DE no tratada, tanto DEred como DE calentada fueron completamente inactivas. En conjunto, los resultados de estos estudios sugirieron que mientras que los residuos glicosídicos en DE no serían fundamentales para la actividad de la proteína sobre la integridad del cúmulus, los puentes disulfuro y la conformación serían relevantes.

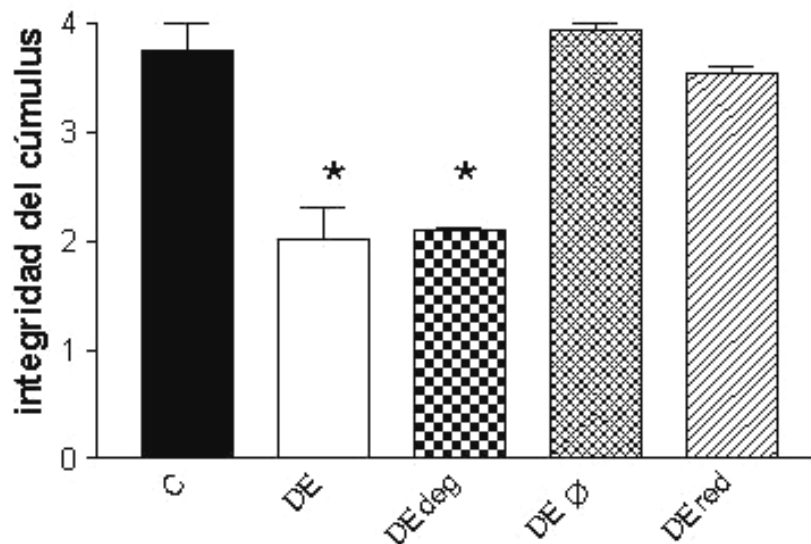


Figura 12. Relevancia de los residuos glicosídicos y la conformación de DE para su actividad sobre la integridad del cúmulus. COCs de ratón fueron incubados durante 60 min en presencia de 6 μ M DE sin tratar o sometida a los siguientes tratamientos: deglicosilación enzimática (DEdeg), reducción y alquilación (DEred) o calentamiento a 95°C (DEØ), analizándose posteriormente el efecto de cada preparación de proteína sobre la integridad del cúmulus. * $p < 0,05$. (n=2).

La disociación de las células del cúmulus en presencia de DE sugería que la proteína actuaba sobre la matriz extracelular secretada en el folículo ovárico como respuesta al pico de gonadotropinas, previamente a la ovulación. Con el

fin de evaluar dicha hipótesis, se analizó la actividad de DE sobre COCs inmaduros, que aún no habían sufrido expansión y, por lo tanto, carecían de matriz. Dichos COCs fueron obtenidos del ovario de ratones hembras estimuladas con PMSG, por punción de los folículos luego de 48 hs de la administración de la hormona. Mientras DE 6 μ M tuvo un efecto sobre la integridad de los cúmulos maduros, al igual que se observara anteriormente, la proteína no provocó cambios en la estructura de ninguno de los cúmulos inmaduros evaluados (**Figura 13**). Los resultados anteriores confirmaron la hipótesis de que el blanco de acción de DE sobre los COCs correspondería a la matriz extracelular del cúmulus.

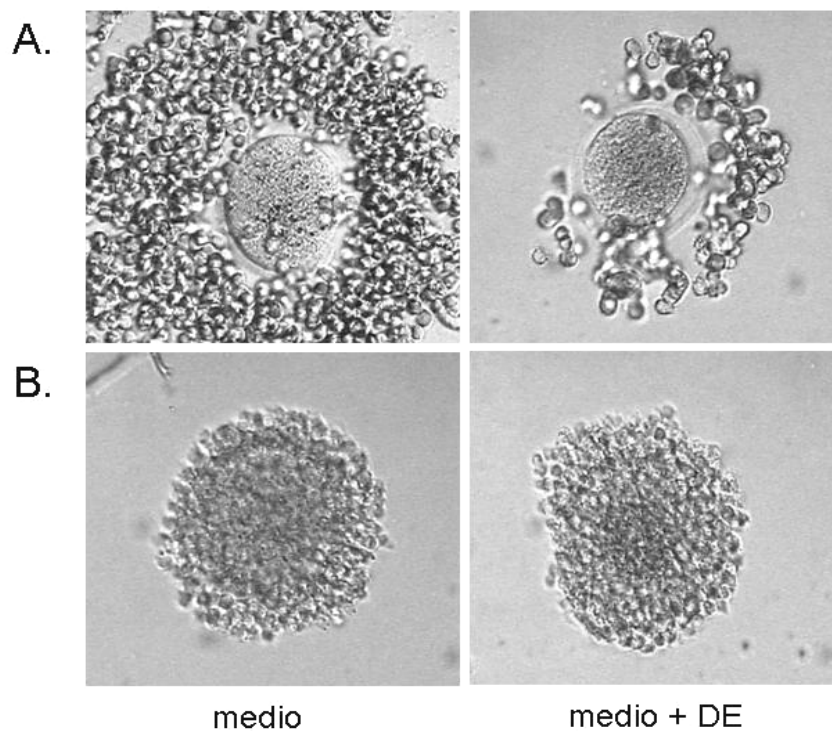


Figura 13. Actividad de DE sobre la integridad de cúmulus inmaduros. **A.** COCs obtenidos de la ampulla del oviducto de hembras superovuladas (maduros), **B.** COCs obtenidos por punción de folículos ováricos de hembras estimuladas con PMSG (inmaduros), fueron incubados 60 min en presencia de 6 μ M DE, analizándose posteriormente el efecto de la proteína sobre el la integridad del cúmulus.

Teniendo en cuenta que DE tenía la capacidad de desintegrar el cúmulus disociando a las células de la granulosa entre sí, el paso siguiente consistió entonces en evaluar la capacidad de DE para asociarse al cúmulus y sus componentes. Con este objetivo, COCs de ratón fueron incubados en ausencia de proteína o en presencia de 6 μ M DE y luego fijados y sometidos a IFI utilizando anti-DE como primer anticuerpo. Finalmente, los ovocitos fueron montados y fotografiados en un microscopio de epifluorescencia acoplado a una cámara fotográfica digital. En la **Figura 14** puede observarse la marca fluorescente entre las células del cúmulus parcialmente desintegrado, indicando que existiría una asociación de DE a la matriz remanente del COC.

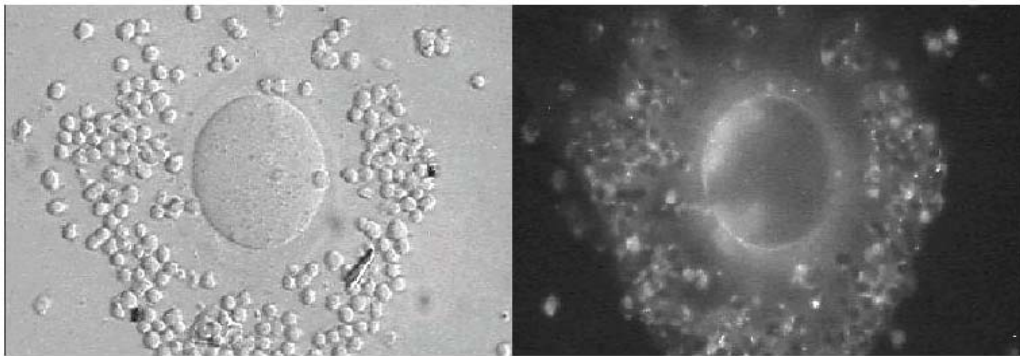


Figura 14. Interacción de DE con la matriz del cúmulus. COCs de ratón fueron incubados con 6 μ M DE, fijados y luego sometidos a inmunofluorescencia indirecta utilizando anti-DE.

Para analizar en forma independiente la asociación de la proteína a la matriz y su actividad sobre la misma, COCs de ratón fueron fijados con PFA 2% previamente a la incubación con DE. Según lo esperado, la incubación de COCs fijados con DE no produjo un efecto significativo sobre la integridad del cúmulus. Luego de la incubación con la proteína, los COCs fueron fijados nuevamente y sometidos a IFI utilizando anti-DE y un segundo anticuerpo acoplado a FITC. Según puede observarse en la **Figura 15A** la proteína DE se asoció a la matriz intacta de los COCs luego de la fijación.

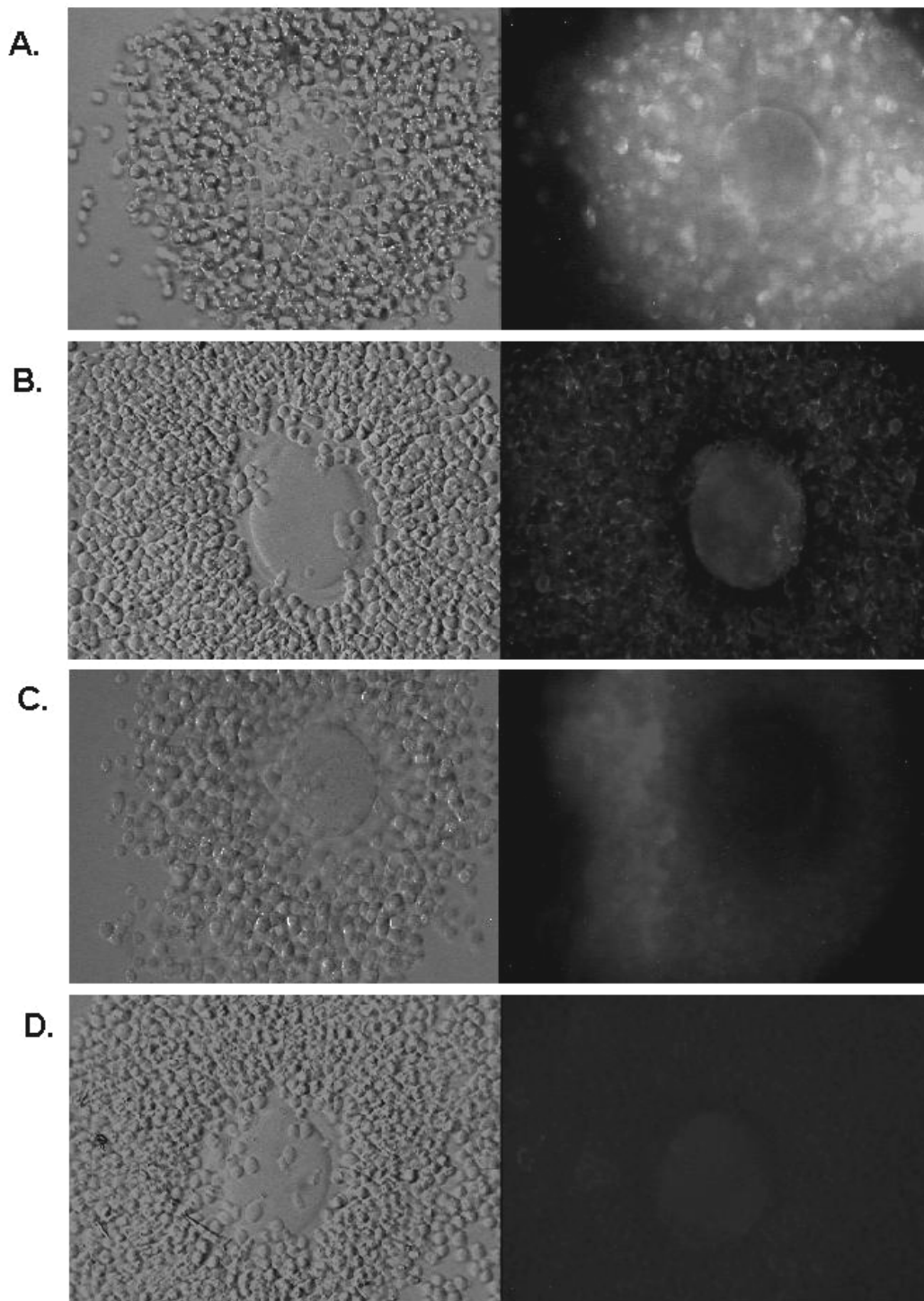


Figura 15. Asociación de DE a la matriz del cúmulus luego de la fijación. COCs de ratón fueron fijados y luego incubados con las proteínas que se indican a continuación, y sometidos a IFI con los anticuerpos correspondientes **A.** 6 μ M DE y anti-DE, **B.** medio sólo y anti-DE, **C.** 6 μ M recDE y anti-MBP, **D.** 6 μ M MBP y anti-MBP.

Los controles negativos de esta IFI, es decir, COCs incubados con anti-DE en ausencia de DE, no presentaron marca en la matriz aunque presentaron una marca suave en la superficie de las células de la granulosa (**Figura 15B**). Esta marca fue dependiente de ese primer anticuerpo, ya que COCs revelados con anti-MBP, y el mismo segundo anticuerpo fluoresceinado, no presentaron marca (**Figura 15D**). Por otro lado, COCs incubados con recDE presentaron fluorescencia en la matriz, aunque de mucho menor intensidad a la obtenida con DE (**Figura 15C**). Por lo tanto, de acuerdo a esperado, la actividad de DE sobre la matriz del cúmulus parecería relacionarse a la unión de la proteína a dicha estructura. De este modo, la baja intensidad de la marca obtenida con recDE podría estar reflejando la actividad insuficiente de esta proteína para afectar la integridad del cúmulus.

Según se describiera en la introducción de esta tesis, la matriz del cúmulus se encuentra compuesta por glicosaminoglicanos (GAGs) y proteínas, secretados en respuesta al pico preovulatorio de gonadotropinas durante la “expansión del cúmulus”. Si bien el GAG más abundante de esa matriz es el ácido hialurónico (AH), también se ha encontrado otros GAGs, principalmente dermatán sulfato, heparán sulfato y condroitín sulfato. Con el objetivo de determinar si DE presentaba la capacidad de unirse a alguno de estos GAGs, se evaluó la asociación de la proteína a GAGs componentes de la matriz. Diferentes GAGs comerciales puros (2 mg) fueron acoplados a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron incubadas en medio solo o conteniendo DE 6 μ M y posteriormente reveladas por western blot. Los resultados indicaron que la proteína DE se unió al ácido AH y no a otros GAGs acoplados a la membrana de nitrocelulosa (**Figura 16**).

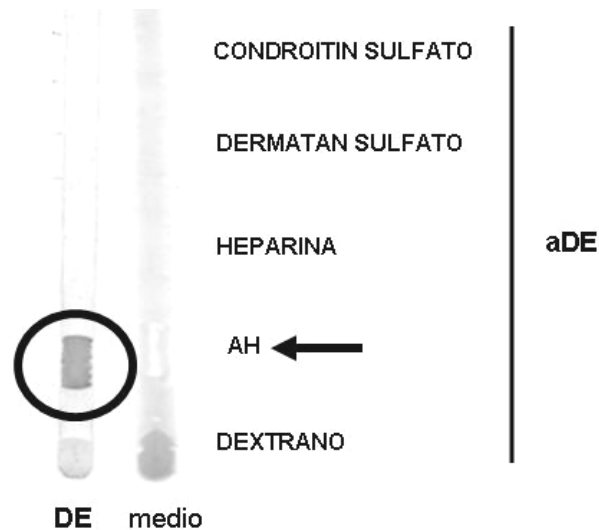


Figura 16. Asociación de DE a GAGs puros componentes de la matriz del cúmulus. Diferentes GAGs puros (1 mg) fueron acoplados a una membrana de nitrocelulosa y la misma fue luego incubada en medio conteniendo 6 μ M DE o medio solo como control negativo. Finalmente, las membranas fueron reveladas por western blot con anti-DE.

Por otro lado, la intensidad de la marca detectada aumentó a medida que se incrementó la cantidad de HA acoplado a la membrana (**Figura 17**). En forma paralela, y como control negativo de ese experimento, se utilizó condroitin sulfato (CS) incubado con DE y anti-DE

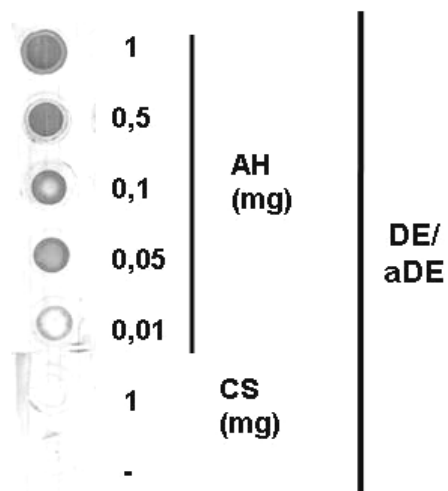


Figura 18. Asociación de DE a AH. Cantidades crecientes de AH (0,01 a 1 mg) fueron acopladas a una membrana de nitrocelulosa y luego la misma fue incubada con DE y revelada por western blot con anti-DE.

En conjunto, los resultados anteriores indicaron que DE era capaz de asociarse a AH puro en un sistema *in vitro*, y que dicha unión sería específica y dependiente de la cantidad de AH presente.

Evidencias recientes indicaron que la proteína testicular PH-20, cuya actividad hialuronidasa había sido postulada como relevante para la penetración del cúmulus, no sería esencial para la capacidad fertilizante del espermatozoide (Baba et al, 2002). Esos resultados han llevado a re-evaluar la posibilidad de que existan otras proteínas con actividad hialuronidasa que participaran en la penetración del cúmulus. Dado que DE tendría la capacidad de disgregar el cúmulus, y de unirse a AH, uno de los componentes mayoritarios de la matriz de los COCs, el paso siguiente de nuestros estudios consistió en investigar si la proteína tenía la capacidad de degradar al AH. En primer lugar, las secuencias aminoacídicas de DE y de dos proteínas con actividad hialuronidasa: la hialuronidasa del veneno de la abeja *Apis mellifera* (Gmachl & Kreil, 1993) y la proteína PH-20 de rata (Hou et al, 1996) fueron comparadas entre sí mediante el programa BLASTP 2.2.10. Los resultados indicaron que mientras que PH-20 presentó un 45% de homología con hialuronidasa, la homología de DE con ambas no fue significativa. La capacidad de DE para degradar AH también fue analizada mediante un ensayo bioquímico, basado en una curva patrón de hialuronidasa comercial. Brevemente, una solución de ácido hialurónico (AH) (0,07 mg/ml) fue incubada en ausencia de proteína, o en presencia de concentraciones crecientes de hialuronidasa de testículo bovino o de proteína DE, luego de lo cual el AH no hidrolizado fue precipitado, y su turbidez medida en la solución a una absorbancia de 620 nm. Para ello, se utilizaron tres preparaciones independientes de DE (correspondientes a tres purificaciones), a concentraciones de 1,5 μ M, 6 μ M y 12 μ M. Mientras que la actividad de la hialuronidasa comercial aumentó con la concentración empleada, DE no hidrolizó al AH a ninguna de las concentraciones utilizadas (**Figura 19**).

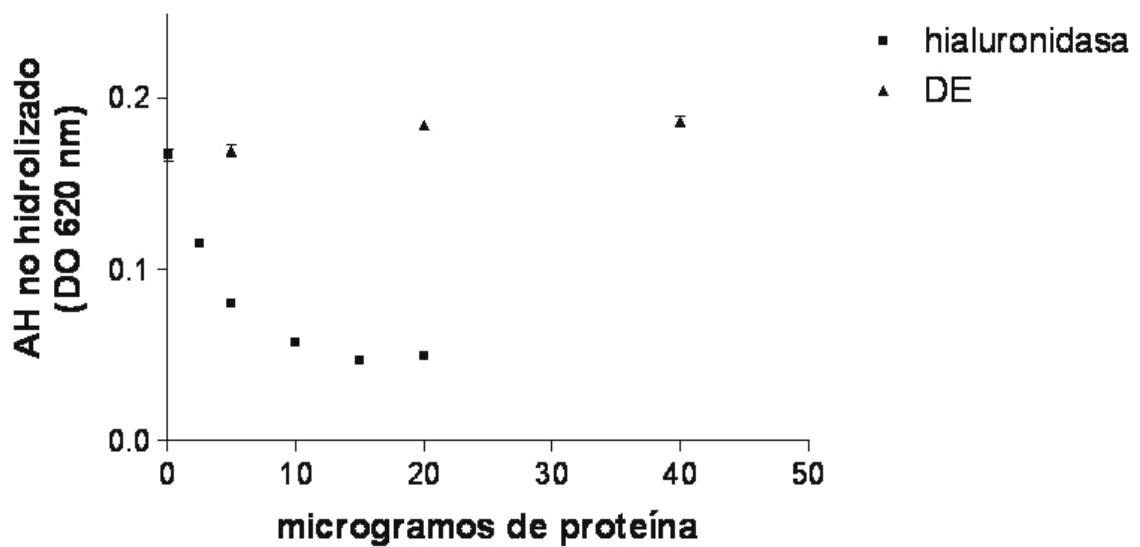


Figura 19. Determinación de la actividad hialuronidasa de nDE. Concentraciones crecientes de hialuronidasa de testículo bovino o de proteína DE fueron incubadas con AH, y luego el GAG remanente fue precipitado y cuantificado mediante absorbancia a 620 nm.

Según los resultados de este ensayo, la proteína DE no tendría una actividad hialuronidasa detectable, al menos mediante éste método. Se prevé la utilización de otras técnicas de evaluación de actividad hialuronidasa, o la utilización de otros sustratos, para caracterizar la actividad de DE.

El efecto de DE sobre la integridad de cúmulus maduros, junto con la asociación de la proteína a la matriz extracelular de dicha estructura y, más específicamente, a uno de sus componentes mayoritarios, el AH, sugieren que DE podría participar en la etapa de penetración del cúmulus por el espermatozoide.

En conjunto, los resultados de este capítulo indican que DE no sólo tendría un rol en la fusión de gametas, sino que además podría participar en las etapas previas de la fertilización.

CAPITULO 4

Análisis de la posible participación de la proteína testicular Tpx-1, homóloga a DE, en la interacción de gametas.

Además de la proteína epididimaria DE, entre los numerosos miembros de la familia CRISP identificados, solamente Tpx-1 se encuentra expresada exclusivamente en el tracto reproductor masculino. La alta homología entre Tpx-1 y DE (**Figura 1**), proteína involucrada en fusión, sugería la existencia de posibles mecanismos de acción comunes que podían ser relevantes para la función del espermatozoide. Por ese motivo, el último objetivo de esta tesis fue analizar si la proteína testicular Tpx-1 participaba en la interacción de gametas.

Proteína epididimaria DE

Proteína testicular Tpx-1

31 LSTTKMSVPEEIVSKHNQLRRMVSPSGDLLKMEWNYDAQVNAQQWADKCTFSHSPI ELR 90
30 LLTNQLQVQREIVNKHNELRRSVNPTGSD ILKMEWSI QAT TNAQK WANKCI LEHSSKDDR 89

91 TTNLRCGENSMSSYLASWSSAIQGWYNEYKDLTYDVGPKQPDSVVGHYTQVWWNSTFQV 150
90 KI NI RCGENL YMSTDPTLWSTVIQSIWYNENEDFVYGVGAK- PNSAVGHYTQL VWYSSF KI 148

151 ACGVAECP- KNPLRYYYVCHYCPVGNYQGRLYTPYT AGEPCASCPDHCEDGLCTNSCGHE 209
149 GCGIAYCPNQDNLKYFYVCHYCPMGNNVMKKSTPYQQGTPCASCNNCENGLCTNSCDFE 208

210 DKYTNCYLYKMLSCHELLKKGCKATCLCEGKI 244
209 DLLSNCESLKTSAGCKHELLKTKQATCLCEDKI 243

Aminoácidos idénticos = 123/215

Aminoácidos conservados = 158/215

Gaps = 2/215 (0%)

57% IDENTIDAD

73% HOMOLOGÍA

Figura 1. Comparación entre las secuencias aminoacídicas de las proteínas maduras DE y Tpx-1 de ratón usando el programa BLASTP 2.2.6.

Para la realización de estos estudios contamos con material cedido gentilmente por el laboratorio de los Dres. Hayashi y Kasahara, de la Universidad de Hokkaido, Japón, quienes nos proveyeron los clones para expresar a la proteínas recombinantes humana (TPX1) y de ratón (Tpx-1), así como también un anticuerpo purificado contra la proteína recombinante TPX1 (anti-TPX1) y un suero contra la proteína recombinante Tpx-1 (anti-Tpx-1).

El primer paso, previo a los experimentos propiamente dichos, consistió en evaluar la eficiencia de los anticuerpos para detectar las proteínas nativas correspondientes en humano y ratón. Además, se determinó la especificidad de los anticuerpos ya que, dada la homología de Tpx-1 con DE en espermatozoides de ratón (70%), y de TPX1 con ARP en espermatozoides humanos (58%), existía la posibilidad de que se produjeran reacciones cruzadas entre las proteínas epididimarias y testiculares.

En primer lugar se utilizó al anticuerpo contra la proteína humana anti-TPX1 para detectar a la proteína nativa por western blot. Dicho anticuerpo, a una dilución de 1/1000, permitió visualizar una banda del peso molecular esperado para TPX1 (25 kDa.) en extractos de proteínas de testículo y de espermatozoides humanos. La ausencia de reacción cruzada de anti-TPX1 con la proteína ARP, de un peso molecular de 29 kDa, fue fundamental para la posterior utilización del anticuerpo en estudios de inmunolocalización y en ensayos funcionales diseñados para analizar la participación de TPX1 en la interacción de gametas (**Figura 2**). En este sentido, una reacción cruzada entre DE y Tpx-1 hubiera podido dar lugar a conclusiones equívocas durante el análisis de los resultados.

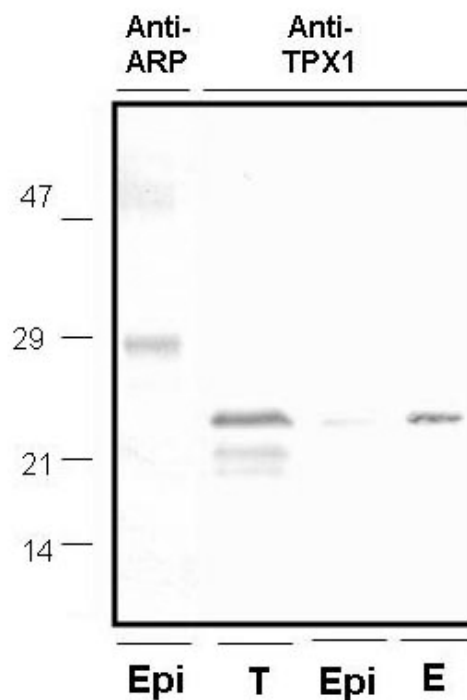


Figura 2. Análisis de la eficiencia y especificidad de anti-TPX1 para detectar a TPX1 humana. Extractos proteicos de epidídimo (Epi), testículo (T) y espermatozoides (E) humanos fueron separados electroforéticamente en un gel de archilamida 12% y luego revelados con anti-ARP o anti-TPX1 como primeros anticuerpos

El suero contra la proteína de ratón, anti-Tpx-1 sólo permitió detectar una banda muy suave en un extracto de proteínas de testículo de ratón, a una dilución de 1/50 (**Figura 3A**). Por ese motivo y, teniendo en cuenta la alta conservación de la proteína Tpx-1/CRISP-2 entre las distintas especies, se evaluó la capacidad de anti-TPX1 para detectar a la proteína Tpx-1 de ratón. Efectivamente, dicho anticuerpo resultó más eficiente que el suero anti-Tpx-1 para detectar a la proteína nativa de ratón. Los ensayos de western blot indicaron que la reacción del anticuerpo fue específica, ya que se detectó una única banda del tamaño molecular esperado para Tpx-1 en un extracto de proteínas de espermatozoides de ratón (**Figura 3B**). El anticuerpo no presentó reacción cruzada contra la proteína epididimaria DE purificada, ya que mientras que en la calle revelada con anti-DE se observaron las dos bandas características correspondientes a D y E, la calle revelada con anti-TPX1 no presentó marca.

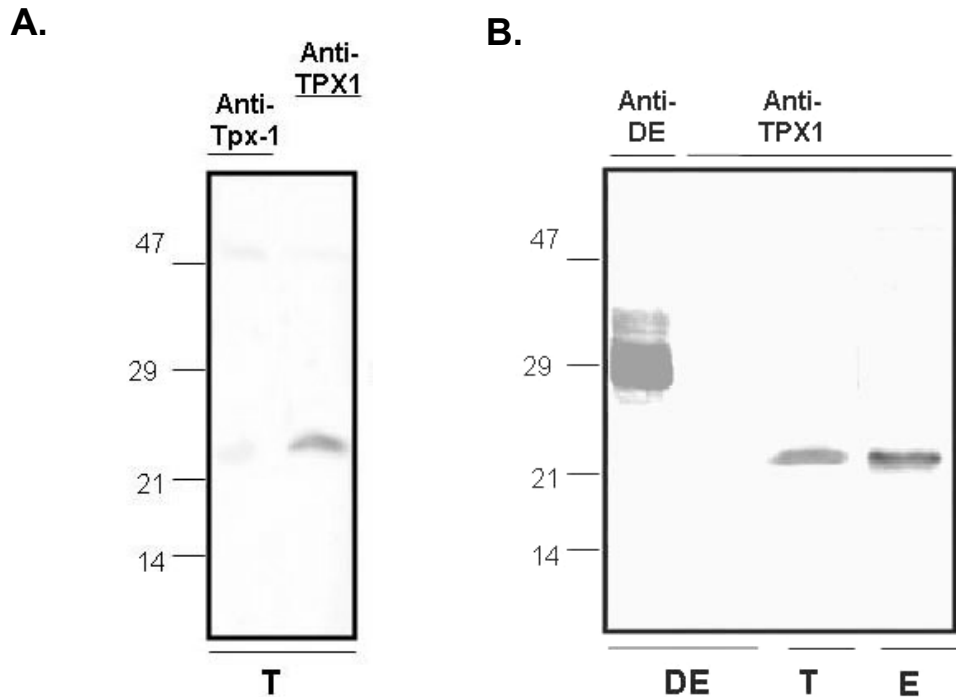


Figura 3. Análisis de la eficiencia y especificidad de anti-Tpx-1 y anti-TPX1 para detectar a Tpx-1 de ratón. **A.** Extractos proteicos (40 μ g) de testículo (T) de ratón fueron separados electroforéticamente en dos calles independientes y luego cada una de ellas fue revelada con anti-Tpx-1 1/50 o anti-TPX1 1/1000. **B.** Proteína DE purificada (0,5 μ g) o extractos de proteínas de testículo (T) o espermatozoides (E) de ratón fueron separados electroforéticamente y revelados con anti-TPX1.

Una vez determinada la especificidad de anti-TPX1, se utilizó dicho anticuerpo para estudiar la localización de TPX1 en espermatozoides humanos. La posible presencia de la proteína en la superficie de las células fue analizada mediante IFI de espermatozoides vivos y de espermatozoides fijados, no permeabilizados. Los resultados indicaron que la marca en esos espermatozoides se encontraba ausente o era muy débil. Para descartar que otras moléculas de la superficie del espermatozoide, tales como factores decapacitantes o proteínas de recubrimiento o “coating”, se encontraran interfiriendo con la accesibilidad de los anticuerpos a TPX1, los espermatozoides fueron tratados con NaCl 0,6M previo a la IFI. Los resultados en este caso fueron idénticos a los obtenidos para espermatozoides no tratados con fuerza iónica. Por el contrario, la IFI sobre

espermatozoides fijados y posteriormente permeabilizados resultó en una marca fluorescente intensa en la región acrosomal de la cabeza, acompañada de una marca débil en la pieza conectora y la cola (**Figura 4**). En conjunto, los resultados de IFI sugerían que TPX1 era una proteína intracelular, localizada principalmente en la región acrosomal de los espermatozoides humanos frescos.

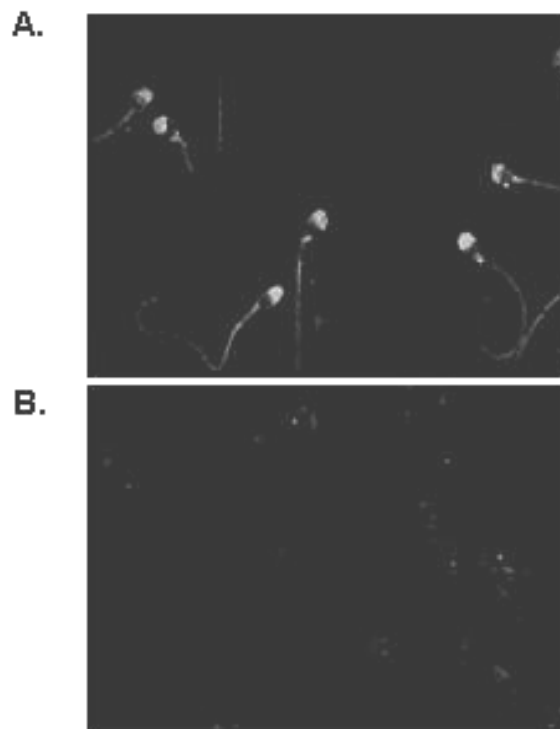


Figura 4. Localización de TPX1 en espermatozoides humanos. Espermatozoides humanos frescos fueron fijados, permeabilizados y sometidos a inmunofluorescencia indirecta utilizando **(A)** anti-TPX1 o **(B)** IgG de conejo normal como primeros anticuerpos.

En paralelo, se realizaron experimentos en los cuales los espermatozoides humanos fueron sometidos a diferentes procedimientos de extracción de proteínas, analizándose posteriormente la presencia de TPX1 en el sobrenadante o en el precipitado mediante western blot. Los resultados indicaron que, mientras que las incubaciones con PBS o NaCl 0,6M eran

incapaces de remover a TPX1 de los espermatozoides, la proteína era completamente liberada por la exposición de los espermatozoides a Triton X-100 (**Figura 5**).

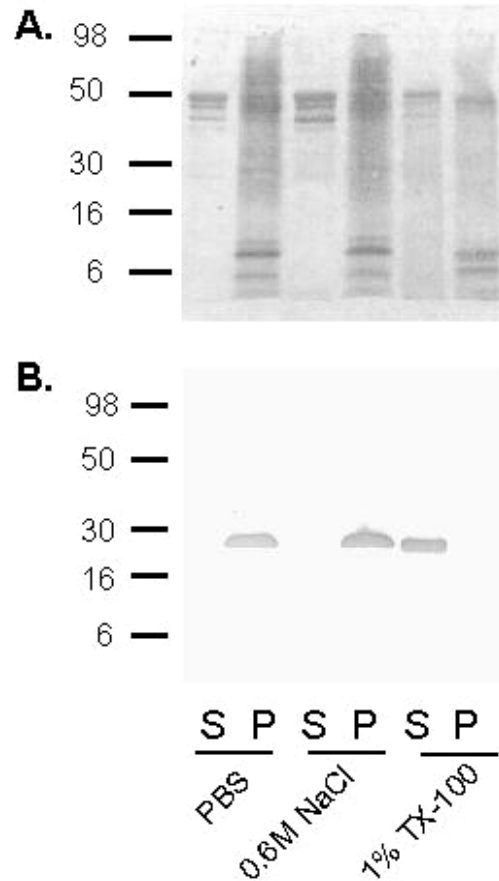


Figura 5. Extracción diferencial de la proteína TPX1 de espermatozoides humanos. Espermatozoides humanos fueron extraídos con PBS, 0,6 M NaCl o 1% Tritón X-100 (TX-100) y centrifugados para obtener los sobrenadantes (S) y los precipitados (P), los cuales fueron separados electroforéticamente y transferidos a membranas de nitrocelulosa. **A.** Contenido proteico detectado mediante la tinción con reactivo de Ponceau. **B.** Western blot utilizando anti-TPX1 como primer anticuerpo.

Los resultados de las extracciones descartaron la presencia de una población de TPX1 asociada al espermatozoide por fuerza iónica. Si bien existía la posibilidad de que TPX1 estuviera asociada fuertemente a la superficie del

espermatozoide, el análisis de la secuencia de TPX1 indicó que la misma carece de dominios hidrofóbicos que permitieran su inserción en la membrana plasmática. Por otro lado, si bien la abundancia de residuos cisteína en la molécula podía dar lugar a enlaces covalentes de TPX1 con otras proteínas de la superficie del espermatozoide, el hecho que la proteína fuera removida en forma aislada y no formando parte de un complejo no apoyaba dicha posibilidad. En conjunto, los resultados de los ensayos de extracción de proteínas sugirieron que TPX1 no sería una proteína de superficie del espermatozoide, respaldando los resultados de IFI apoyando una naturaleza intracelular de la proteína. Teniendo en cuenta que TPX1 fue detectada en la región acrosomal de los espermatozoides frescos, la proteína podría corresponder a un componente de la vesícula acrosomal.

El paso siguiente de los estudios consistió en investigar el comportamiento de TPX1 durante la capacitación y la RA. Con este objetivo, espermatozoides humanos frescos fueron incubados en condiciones capacitantes, e inducidos a sufrir la RA mediante su exposición a ionóforo de calcio. Alícuotas de espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados fueron fijadas, permeabilizadas, y sometidas a IFI tal como fuera descrito anteriormente. El análisis de los resultados mostró tres patrones fluorescentes en las diferentes poblaciones de espermatozoides. La cuantificación del número de células en cada uno de ellos indicó que, mientras que la mayoría de los espermatozoides frescos presentaba marca fluorescente en el capuchón acrosomal (patrón A), el porcentaje de células con ese patrón disminuía en espermatozoides capacitados y reaccionados, concomitantemente con un aumento en la proporción de espermatozoides con marca fluorescente en el segmento ecuatorial (patrón SE) (**Figura 6A**). Un número similar de espermatozoides sin marca o con una marca muy suave (patrón +/-) se encontraba presente en todas las poblaciones. Como se observa en la **figura 6B**, el porcentaje de espermatozoides identificados como reaccionados mediante la tinción con la lectina *P. sativum* en las tres poblaciones se correlacionó con el porcentaje de

células mostrando el patrón SE, sugiriendo que TPX1 se encontraría localizada en el segmento ecuatorial de los espermatozoides luego de la ocurrencia de la RA.

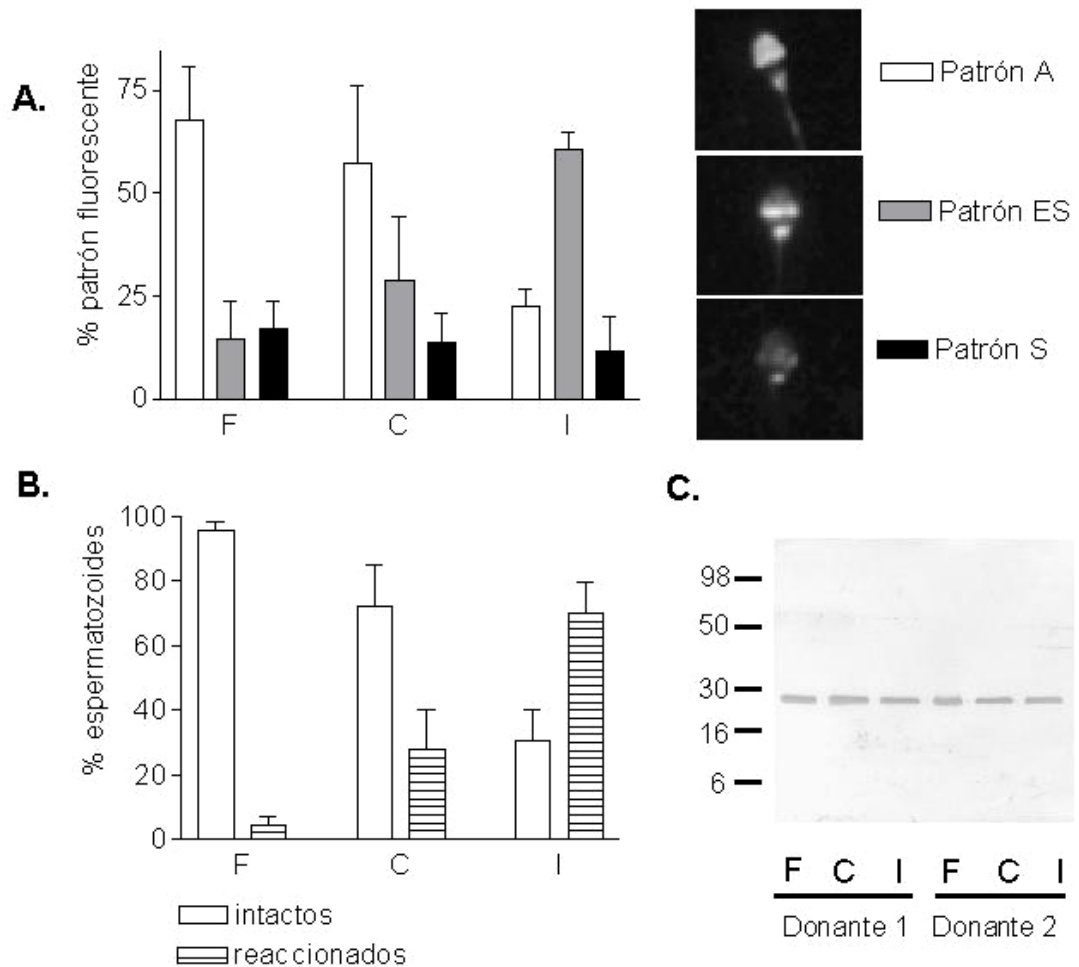


Figura 6. Comportamiento de la proteína TPX1 durante la capacitación y la RA. **A.** Patrones fluorescentes: región acrosomal (A), segmento ecuatorial (SE) y marca suave (S) obtenidos por inmunodetección de TPX1 en espermatozoides frescos (F), capacitados (C) y tratados con ionóforo de calcio (I). **B.** Porcentaje de espermatozoides intactos y reaccionados en cada población determinado por tinción con *Pisum* agglutinin. **C.** Extractos de proteínas totales de espermatozoides de las tres poblaciones F, C e I, de dos donantes diferentes, separados por electroforesis y revelados por western blot usando anti-TPX1.

Para estudiar si TPX1, como otras proteínas del espermatozoide, sufría modificaciones post-transduccionales luego de la capacitación y la RA, extractos proteicos totales de un mismo número de espermatozoides frescos, capacitados y tratados con inóforo fueron separados electroforéticamente y examinados por western blot usando anti-TPX1. Los resultados revelaron la ausencia de diferencias en la movilidad electroforética de la proteína entre las tres poblaciones de espermatozoides, descartando la existencia de un procesamiento de TPX1 durante la capacitación o la RA (**Figura 6C**).

La presencia de TPX1 en el acrosoma, organela considerada fundamental para la fertilización, como así también su presencia en el SE de los espermatozoides reaccionados, dominio responsable de la fusión con el oolema, abría la posibilidad de que la proteína participara en la interacción de gametas. Con el fin de evaluar esta hipótesis, se utilizó el ensayo heterólogo comúnmente conocido como HOPT (Hamster Oocyte Penetración Test) o ensayo de penetración de ovocitos de hamster sin ZP. Este ensayo permite evaluar la capacidad fertilizante de espermatozoides humanos capacitados mediante el análisis de la habilidad de los mismos de penetrar ovocitos de hamster sin ZP (Yanagimachi et al, 1976). En nuestros experimentos, espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes fueron pre-incubados con diferentes diluciones de anti-TPX1 y luego utilizados para inseminar ovocitos de hamster sin ZP, evaluándose posteriormente el efecto de los anticuerpos sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Gametas incubadas en ausencia de anticuerpo o en presencia de IgG de conejo normal fueron incluidas en todos los experimentos como controles negativos. Los resultados indicaron que la exposición de espermatozoides al anticuerpo anti-TPX1 a diluciones iguales o menores a 1/50 producía una inhibición significativa tanto en el porcentaje de ovocitos penetrados como en el número promedio de espermatozoides incorporados por ovocito, respecto a los controles (**Figura 7A**).

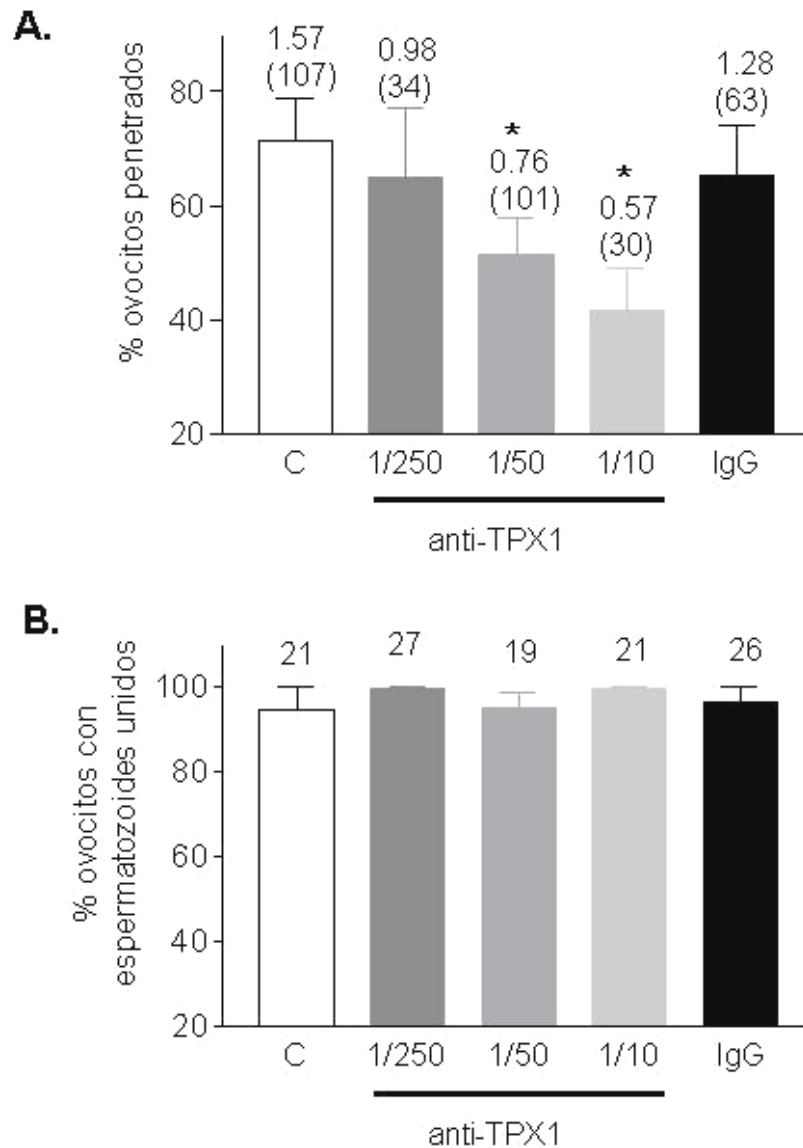


Figura 7. Efecto de anti-TPX1 sobre la habilidad de espermatozoides humanos para penetrar ovocitos de hamster sin ZP. Espermatozoides humanos capacitados fueron preincubados en gotas de medio solo (control, C) o medio conteniendo anti-TPX1 (1/250 a 1/10) o IgG 1/50, y luego co-incubados con ovocitos de hamster sin ZP, evaluándose posteriormente el porcentaje de ovocitos penetrados (A) y el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos (B). Arriba de cada barra se indica el número promedio de espermatozoides incorporados o unidos por ovocito. El número entre paréntesis corresponde al número total de ovocitos observados en cada caso. * $p < 0.05$. $n = 8$.

Teniendo en cuenta que la penetración de los ovocitos comprende un primer paso de unión de los espermatozoides al oolema, se analizó si el efecto de anti-TPX1 estaba dado por una inhibición sobre la habilidad de los espermatozoides de unirse a los ovocitos de hamster. Los resultados revelaron que el anticuerpo no afectaba esa etapa de la interacción de gametas, ya que ni el porcentaje de ovocitos con espermatozoides unidos, ni el número de espermatozoides unidos por ovocito, difirieron significativamente de los controles (**Figura 7B**). La inhibición en la penetración de los ovocitos no se debió a efectos de anti-TPX1 sobre la vitalidad de los espermatozoides, ya que el anticuerpo no produjo aglutinación ni afectó la motilidad de dichas células a ninguna de las concentraciones utilizadas (**Tabla 1**). Dado que la ocurrencia de la RA es un requisito fundamental para la fusión de los espermatozoides con el oolema, la inhibición en la penetración de los ovocitos producida por anti-TPX1 podría haber sido consecuencia de un efecto del anticuerpo sobre ese evento funcional. Los resultados indicaron, sin embargo, que los espermatozoides expuestos a anti-TPX1 exhibieron porcentajes de RA similares a aquellos observados en espermatozoides incubados bajo condiciones control (**Tabla 1**).

Tabla 1.

	% motilidad	% RA
Control	65±8	17±1
anti-TPX1 1/250	56±11	14±2.5
1/50	62±12	18±0.5
1/10	56±10	12±4
IgG 1/50	59±9	16±7

En paralelo a los estudios llevados a cabo para determinar la localización y posible función de TPX1 en espermatozoides humanos, se realizaron experimentos para investigar a la proteína Tpx-1 en espermatozoides de roedores. Dado que las proteínas de rata, ratón y humano tienen una alta homología (83-91%), era posible que Tpx-1 tuviera funciones similares a la de humano en los espermatozoides de roedores.

Al igual que en humano, los estudios de IFI utilizando anti-TPX1 sobre espermatozoides de ratón y rata determinaron que, mientras que tanto los espermatozoides vivos como fijados en ausencia de permeabilización no presentaron marca significativa, los espermatozoides fijados y permeabilizados presentaron marca en la región acrosomal (**Figura 8**).

A diferencia de los espermatozoides humanos, donde se observaba marca en la pieza conectora y la cola, en los espermatozoides de ratón y rata la marca en la cola se veía limitada a una fluorescencia suave en las piezas principal y terminal.

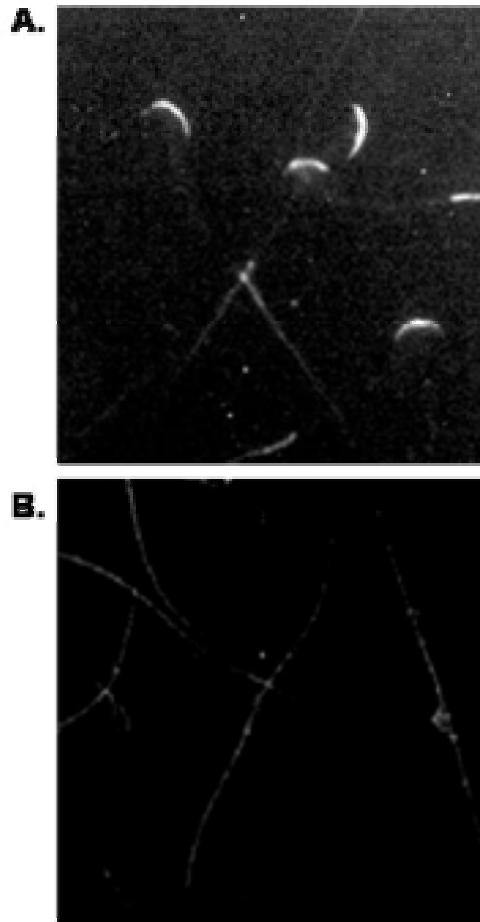


Figura 8. Localización de Tpx-1 en espermatozoides de ratón. Espermatozoides de ratón frescos fueron fijados, permeabilizados y sometidos a inmunofluorescencia indirecta utilizando **A.** anti-TPX1 o **B.** IgG de conejo normal como primeros anticuerpos. La localización en espermatozoides de rata fue idéntica a la observada en ratón.

Como otra alternativa para estudiar la localización subcelular de Tpx-1, espermatozoides epididimarios de ratón fueron sometidos a diferentes procedimientos de extracción de proteínas, analizándose posteriormente la presencia de Tpx-1 en los sobrenadantes o precipitados correspondientes mediante western blot. Por otro lado, teniendo en cuenta los resultados sugiriendo que TPX1 sería una molécula intra-acrosomal en espermatozoides humanos, se relacionó la liberación de Tpx-1 de espermatozoides de ratón con la pérdida del acrosoma durante los tratamientos. La presencia del contenido

acrosomal en los espermatozoides luego de cada tratamiento fue determinada mediante la técnica de Coomassie Blue, utilizada corrientemente para evaluar la RA en el ratón. Los porcentajes de proteína liberada al medio y remanente en el precipitado conteniendo a los espermatozoides fueron calculados mediante densitometría de las bandas obtenidas por western blot. El análisis de los resultados, en su conjunto, indicó que existía una correlación ($r=0,96$, $p<0,05$) entre el porcentaje de espermatozoides con tinción positiva por Coomassie Blue (espermatozoides con acrosomas intactos) y el porcentaje de proteína que permanecía asociada a los espermatozoides en cada tratamiento (**Figura 9**), sugiriendo la localización intra-acrosomal de la proteína Tpx-1 en espermatozoides de ratón.

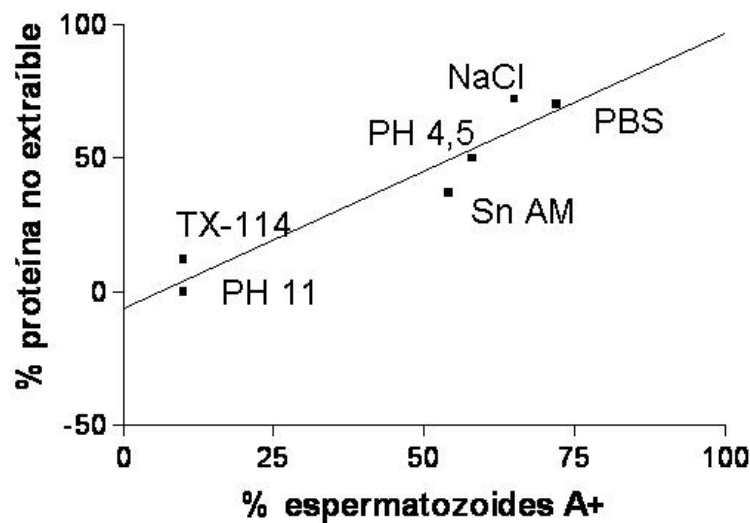


Figura 9. Correlación entre Tpx-1 no extraíble y la presencia del acrosoma en espermatozoides de ratón sometidos a diferentes tratamientos de extracción. Espermatozoides de ratón fueron incubados en diferentes soluciones: Tritón X-114 (TX-114), pH 11 (PH 11), pH 4,5 (PH 4,5), solución de extracción de matrices acrosomales (Sn AM), fuerza iónica (NaCl) y PBS, y luego la proteína no extraíble (asociada al precipitado) fue cuantificada por western blot y densitometría ($n=3$). Una alícuota de los espermatozoides fue fijada luego de la extracción, y la proporción de espermatozoides con acrosoma (A+) fue cuantificada. En la figura se grafica la correlación ($r=0,96$, $p<0,05$) entre el porcentaje de proteína no extraíble y el porcentaje de espermatozoides A+.

En cuanto a los resultados particulares de cada tratamiento, la primera observación fue que, contrariamente a lo obtenido para los espermatozoides humanos, la extracción de los espermatozoides de ratón con NaCl 0,6 M liberó aproximadamente un 30% de proteína al medio. Si bien estos resultados sugirieron que podía existir una población de Tpx-1 asociada a la superficie de los espermatozoides en esa especie, dos observaciones permitieron descartar esa posibilidad. En primer lugar, un porcentaje similar de proteína fue liberado por la incubación de los espermatozoides en PBS sólo. En segundo lugar, los porcentajes de espermatozoides sin contenido acrosomal, con tinción negativa para Coomassie Blue, fueron similares luego de los tratamientos con NaCl y PBS. Ambos resultados indicaron que la liberación de Tpx-1 al sobrenadante por NaCl podría estar provocada por efectos sobre la integridad de las membranas, probablemente causados por el procedimiento en sí, y no por la fuerza iónica. Por otra parte, se observó una diferencia entre la cantidad de Tpx-1 liberada al medio de espermatozoides de ratón tratados con diferentes pHs. Mientras que el tratamiento con una solución de pH básico (11) removió a la proteína casi completamente de las células, una solución de pH ácido (4,5) mantuvo una proporción de aproximadamente el 50% de la proteína asociada a los mismos. Esta diferencia sugirió que Tpx-1 podría estar asociada a una estructura del acrosoma cuya integridad depende del pH, tal como es la matriz acrosomal. En este sentido, otros estudios han utilizado soluciones de pH ácido, como por ejemplo la denominada Sn AM, para aislar matrices acrosomales de cobayo (Huang, Jr. et al, 1985). Los resultados de la separación en fases de las proteínas extraídas con el detergente T-X114 descartaron la posibilidad de que la proteína se encontrara fuertemente unida a la membrana plasmática o la membrana acrosomal del espermatozoide y que, como consecuencia, fuera extraída según el efecto de los tratamientos sobre la integridad de dichas membranas. Los resultados de esos experimentos, mostrando que la totalidad de Tpx-1 se encontró en la fase acuosa del extracto, indicaron la naturaleza hidrofílica de Tpx-1, respaldada por la ausencia de dominios hidrofóbicos en su secuencia (**Figura 10**).

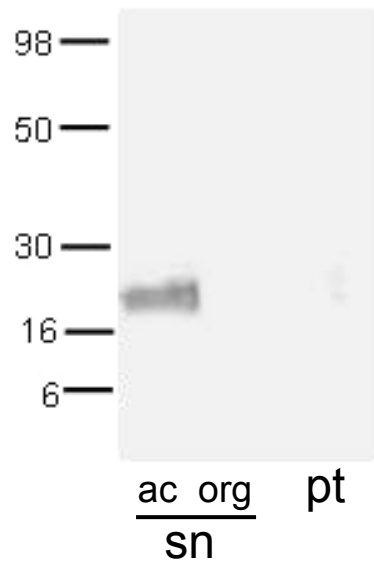


Figura 10. Partición en fases de Tpx-1 extraída con el detergente Tx-114. Espermatozoides de ratón fueron incubados en Tx-114, y centrifugados para obtener un sobrenadante (sn) y un precipitado (pt). El sn fue posteriormente sometido a partición en fases, obteniéndose una fase acuosa (ac) y una orgánica (org). Las muestras fueron separadas electroforéticamente, transferidas a nitrocelulosa y reveladas con anti-Tpx-1.

En conjunto, los resultados de los experimentos de IFI y de las extracciones respaldaron la hipótesis de que Tpx-1 en el ratón podría ser, al igual que en la rata (O'Bryan et al, 2001), el cobayo (Foster & Gerton, 1996), y el humano (nuestros resultados), un componente de la vesícula acrosomal, aportando además la idea de que la proteína podría encontrarse unida a la matriz de dicha organela.

El paso siguiente de nuestros estudios consistió en investigar el comportamiento de Tpx-1 durante la capacitación y la RA en el ratón. Con este objetivo, espermatozoides de ratón frescos fueron incubados en condiciones capacitantes, y luego inducidos a sufrir la RA mediante la exposición a ionóforo de calcio. Alícuotas de espermatozoides en los diferentes estadios, es decir, frescos, capacitados y reaccionados, fueron fijados, permeabilizados, y

sometidos a IFI. Al igual que en humano, tres patrones fluorescentes fueron obtenidos en las diferentes poblaciones de espermatozoides. La cuantificación de las células en cada uno de los patrones en cada estadio indicó que, en los espermatozoides capacitados y reaccionados, el porcentaje de células con marca en el acrosoma disminuyó concomitantemente con un aumento en la proporción de espermatozoides cuya marca fluorescente se localizaba en la región anterior del segmento ecuatorial (patrón SEa) (**Figura 11A**). Un número similar de espermatozoides sin marca se encontró en todas las poblaciones.

Como se observa en la **figura 11B**, el porcentaje de espermatozoides identificados como reaccionados mediante la tinción con la técnica de Coomassie Blue en las tres poblaciones correlacionó con el porcentaje de células mostrando el patrón SEa, sugiriendo que TPX1 se encontraría localizada en la región anterior del segmento ecuatorial luego de la ocurrencia de la RA. Al igual que en el humano, la similitud en la migración electroforética de Tpx-1 en las diferentes poblaciones de espermatozoides de ratón indicó que la proteína no sería procesada durante la capacitación o la reacción acrosomal (**Figura 11C**).

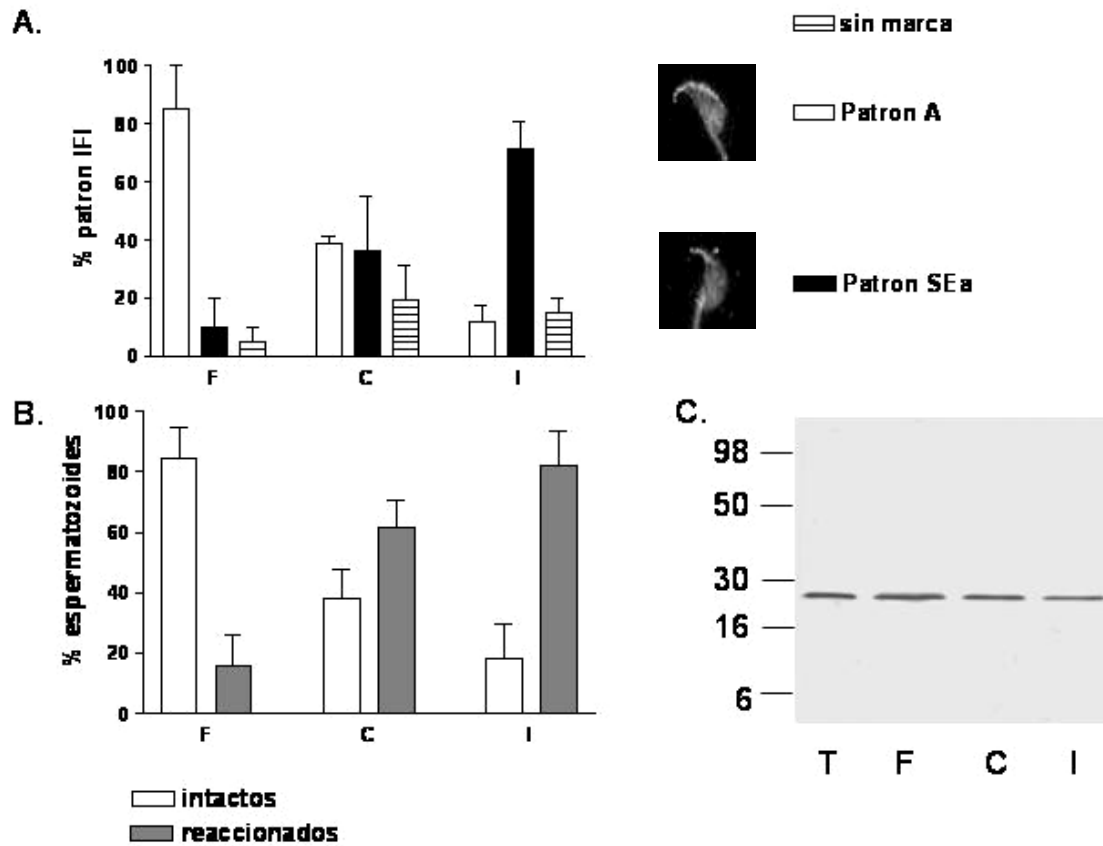


Figura 11. Comportamiento de la proteína Tpx-1 durante la capacitación y la RA en ratón. A. Patrones fluorescentes: región acrosomal (A) y región anterior del segmento ecuatorial (SEa), y espermatozoides sin marca obtenidos por inmunodetección de TPX1 en espermatozoides frescos (F), capacitados (C) y tratados con ionóforo de calcio (I). **B.** Porcentaje de espermatozoides reaccionados en cada población determinado por tinción con Coomassie Blue. **C.** Proteínas de testículo de ratón (40 μ g) o extractos de espermatozoides de las tres poblaciones F, C e I separados por electroforesis y revelados por western blot usando anti-TPX1.

El paso siguiente de nuestros estudios consistió entonces en analizar si Tpx-1 era relevante para el proceso de fertilización en el ratón, mediante experimentos de fertilización *in vitro* en presencia de anti-TPX1. A diferencia del HOPT, en el que sólo pueden usarse ovocitos sin ZP, en estos ensayos la utilización de ovocitos intactos permitió un análisis más completo de la función de la proteína durante las diferentes etapas de la fertilización, es decir, la interacción con la ZP y la fusión. Estos ensayos fueron realizados siguiendo el procedimiento descrito en el **esquema 2**, del capítulo 3 de esta tesis. Espermatozoides de ratón fueron capacitados y luego preincubados durante 30 minutos en gotas de medio solo, o conteniendo anti-TPX-1 o IgG de conejo normal. La concentración de anticuerpo utilizada en este caso correspondió a aquella en la que comenzó a verse la inhibición de la penetración de los ovocitos en los ensayos de HOPT, es decir, 1/50. Al cabo de la pre-incubación con el anticuerpo, los ovocitos con ZP fueron agregados a cada gota y las gametas co-incubadas durante 7 h. Los resultados de estos experimentos indicaron que la presencia de anti-TPX1 durante la co-incubación de gametas producía una disminución significativa del porcentaje de ovocitos fertilizados, a juzgar por la presencia de dos pronúcleos y la cola del espermatozoide dentro del ooplasma (**Figura 12A**). Esta inhibición se veía acompañada por un aumento significativo en el número promedio de espermatozoides perivitelinos por ovocito, indicando que existía un bloqueo de la función de la proteína a nivel del oolema (**Figura 12B**). Respaldando esta hipótesis, el índice de penetración de la ZP, calculado como la suma de los porcentajes de ovocitos fertilizados y ovocitos con espermatozoides perivitelinos, no se vio modificado por la presencia del anticuerpo (**Figura 12C**).

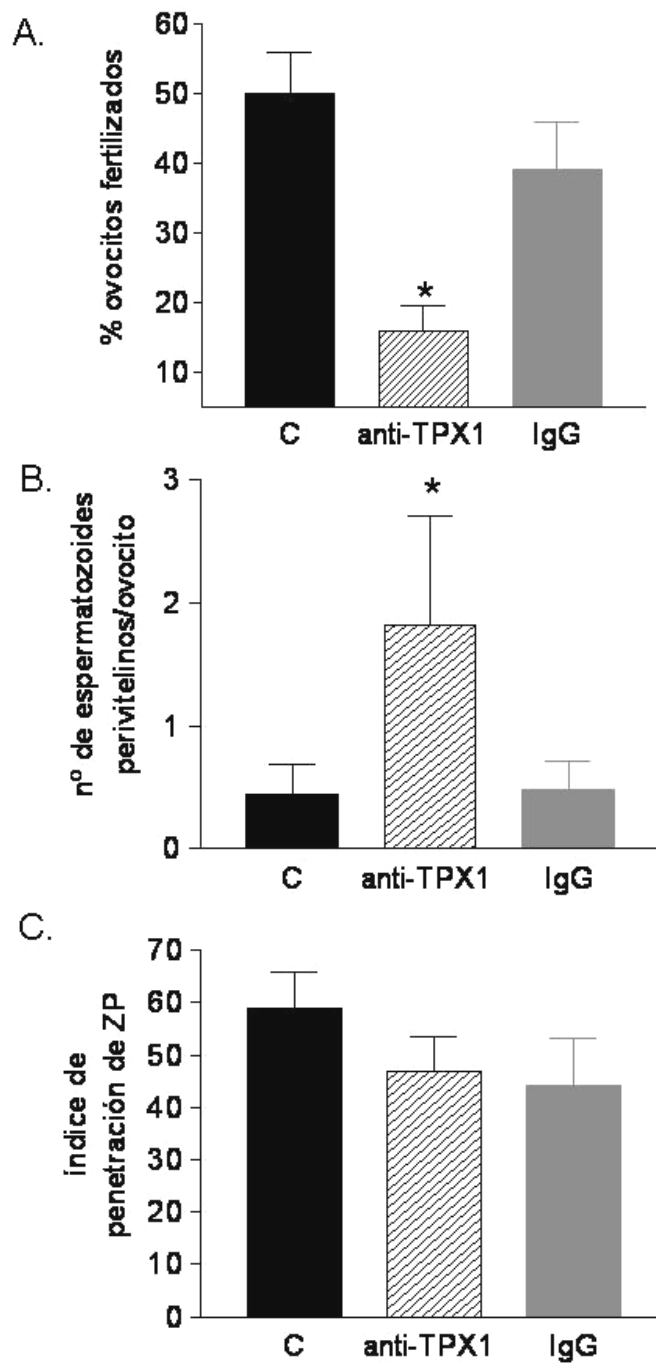


Figura 12. Efecto de anti-TPX1 sobre la FIV de ratón. Espermatozoides de ratón capacitados fueron preincubados durante 30 minutos en ausencia de anticuerpo (control: C) o en presencia de anti-TPX1 o IgG, a una dilución de 1/50, agregándose luego los ovocitos a cada gota. Al cabo de 7 hs de coincubación, los ovocitos fueron lavados y montados, determinándose: **A.** el porcentaje de ovocitos fertilizados, **B.** el número promedio de espermatozoides perivitelinos por ovocito y **C.** el índice de penetración de ZP, calculado como % ovocitos fertilizados + % ovocitos con espermatozoides perivitelinos. * $p < 0,05$. $n=7$.

La presencia de anti-TPX1 afectó específicamente la fertilización ya que no se observaron efectos sobre otros parámetros del espermatozoide que pudieran afectar indirectamente su capacidad fertilizante, tales como su motilidad (control: $45\pm 6\%$; anti-TPX1: $48\pm 3\%$; IgG: $43\pm 2\%$) o su capacidad de sufrir la RA espontánea (control: $48\pm 8\%$; anti-TPX1: $48\pm 5\%$; IgG: $50\pm 4\%$).

Los resultados de estos ensayos, junto con los del HOPT, indicaron que tanto el bloqueo de la proteína humana (TPX1) como de la de ratón (Tpx-1), por anti-TPX1, podía resultar en una inhibición de la interacción del espermatozoide con el oolema, sugiriendo que, en ambas especies, la proteína cumpliría un papel en la etapa de fusión de gametas. Con el fin de estudiar el mecanismo molecular a través del cual Tpx-1 podría participar en dicho evento de la fertilización, se analizó en primer lugar si la proteína tenía sitios de unión sobre la superficie del ovocito. Para estos estudios, ovocitos de ratón fueron incubados con Tpx-1 recombinante, analizándose posteriormente la unión de la proteína a los ovocitos mediante IFI. Para la expresión de la proteína, se transformaron bacterias de la cepa BI21 con un plásmido (pMal) inducible por IPTG, conteniendo la secuencia de expresión de la proteína MBP, seguida de la secuencia de Tpx-1 de ratón. Como se muestra en la **Figura 13A**, el agregado de IPTG a los cultivos bacterianos indujo la expresión de una proteína del tamaño molecular esperado para Tpx-1 (proteína de fusión de MBP y Tpx-1) de 62 kDa. Tpx-1 fue purificada mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina acoplada a amilosa, un polímero de maltosa con capacidad de unir a la proteína a través de su porción MBP. El proceso de purificación permitió la obtención de una proteína con un alto grado de pureza, evaluado tanto por western blot (utilizando anti-MBP o anti-TPX1) como por la técnica de tinción con plata (**Figura 13B**). Una banda minoritaria, adicional a la de Tpx-1, también fue observada luego de la purificación. El tamaño molecular de dicha banda, y la desaparición de la misma cuando las electroforesis fueron realizadas en condiciones reductoras, sugirió que la banda adicional podía corresponder a un dímero de Tpx-1.

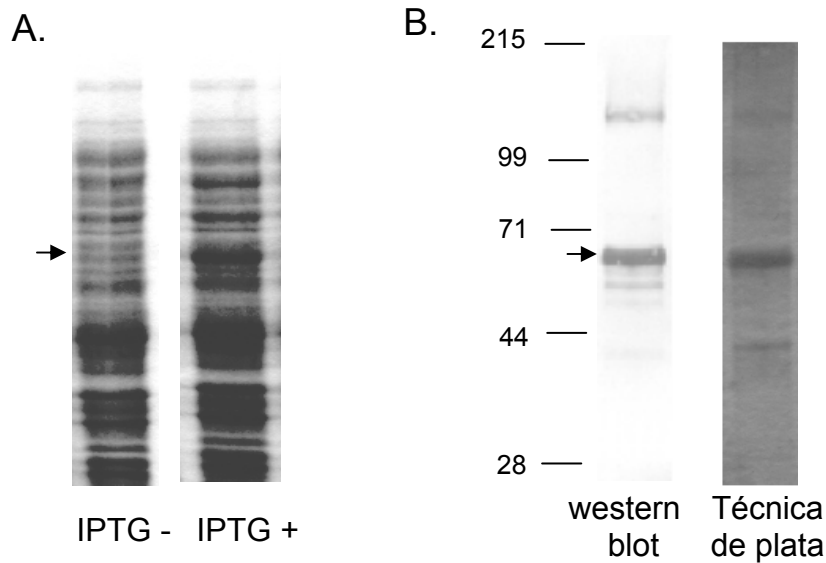


Figura 13. Expresión y purificación de Tpx-1. A. Bacterias BI21 conteniendo al vector pMAL-recTpx-1 fueron cultivadas en ausencia (IPTG -) o presencia (IPTG +) de IPTG y los extractos proteicos de los cultivos fueron separados por electroforesis y teñidos con Coomassie Blue. La presencia de la banda de 62 kDa correspondiente a Tpx-1 se encuentra indicada por una flecha, en el extracto de bacterias IPTG +. B. Tpx-1 purificada, analizada mediante electroforesis y western blot (usando anti-MBP) o mediante la técnica de plata.

Con el fin de analizar la presencia de sitios de unión para Tpx-1 en el ovocito, ovocitos intactos de ratón fueron incubados con 6 μ M Tpx-1, fijados, y luego sometidos a IFI usando anti-MBP y un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína. Ovocitos incubados en ausencia de proteína o en presencia de MBP fueron utilizados como controles del experimento. Los resultados indicaron que mientras que los ovocitos control no presentaron marca fluorescente, aquellos ovocitos incubados con Tpx-1 presentaron marca restringida a la superficie del ovocito, sin existir marca alguna sobre la ZP (**Figura 14**). La localización de dichos sitios, observada por ensayos de IFI utilizando ovocitos sin ZP, indicó que la marca se encontraba en toda la superficie, con excepción de un área negativa que ocupaba alrededor de un tercio de la circunferencia (**Figura 15**).

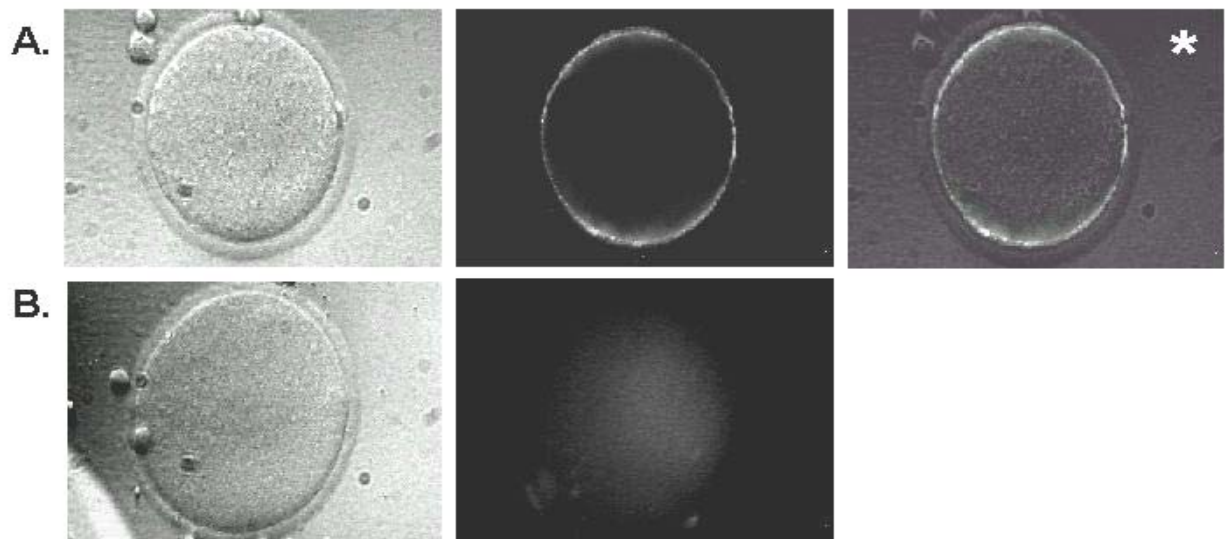


Figura 14. Presencia de sitios para Tpx-1 en ovocitos intactos. Ovocitos de ratón con ZP fueron incubados con 6 μ M (A) Tpx-1 o (B) MBP, y luego fijados y sometidos a IFI usando anti-MBP. Nótese la ausencia de marca para Tpx-1 en la ZP observada en la superposición de las figuras de fase y fluorescencia, en el panel señalado con un asterisco (*).

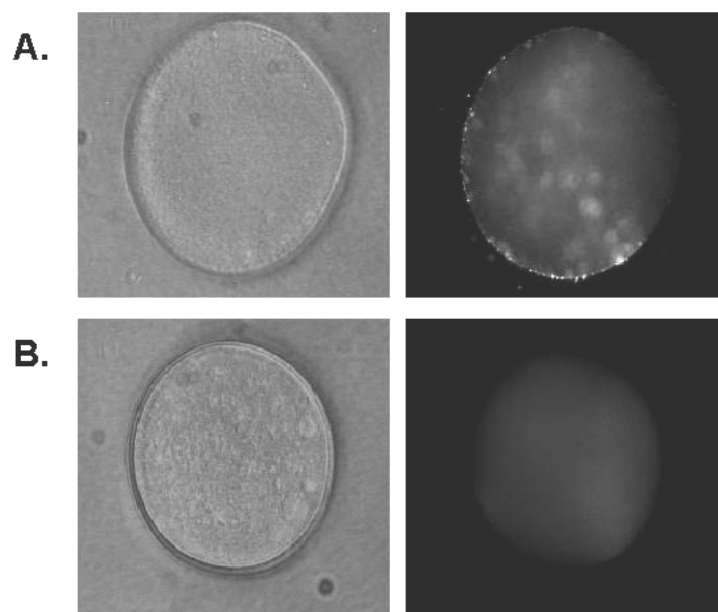


Figura 15. Localización de los sitios para Tpx-1 en ovocitos sin ZP. Ovocitos de ratón fueron incubados con 6 μ M (A) Tpx-1 o (B) MBP, y luego fijados y sometidos a inmunofluorescencia indirecta usando anti-MBP.

Dado que la localización de los sitios para Tpx-1 era muy similar a la de los sitios para DE en el ovocito de ratón y rata y, teniendo en cuenta la alta homología de secuencia entre las dos proteínas, existía la posibilidad de que ambas proteínas se unieran a un receptor común en el oolema. Para determinar si las dos proteínas compartían el sitio o si se unían a sitios independientes, se realizaron ensayos de competencia entre las dos proteínas por los sitios en el oolema. Ovocitos sin ZP de ratón fueron incubados con una cantidad fija de Tpx-1 (6 μ M) y concentraciones crecientes de DE y, luego de la fijación, la cantidad de Tpx-1 asociada a los mismos fue determinada mediante IFI con anti-MBP. Los resultados indicaron que la exposición a concentraciones crecientes de DE se vio acompañada por una disminución en la marca fluorescente correspondiente a Tpx-1 en la superficie de los ovocitos (**Figura 17**).

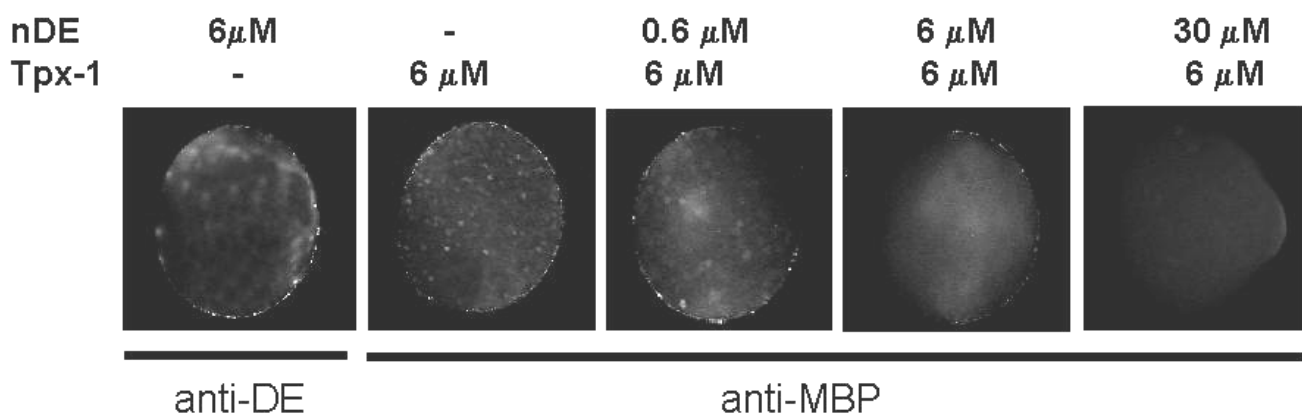


Figura 17. Ensayo de competencia entre DE y Tpx-1 por los sitios en el ovocito. Ovocitos de ratón sin ZP fueron incubados con 6 μ M Tpx-1, y concentraciones crecientes de DE nativa (nDE), analizándose posteriormente la asociación de Tpx-1 al ovocito mediante inmunofluorescencia indirecta usando anti-MBP.

Asimismo, ovocitos incubados con 6 μ M DE y concentraciones crecientes de Tpx-1, revelados con anti-DE, presentaron una reducción en la marca para DE (resultados no mostrados). En conjunto, los resultados de los experimentos de competencia indicaron que DE y Tpx-1 compartirían el sitio receptor en el oolema.

Teniendo en cuenta la alta homología entre Tpx-1 de rata y ratón (91%) era probable que existiera una reacción cruzada de Tpx-1 recombinante de ratón con sitios en el ovocito de rata. Los ensayos de IFI indicaron que, efectivamente, ovocitos de rata sin ZP también fueron capaces de unir a Tpx-1, y la localización de los sitios en ese caso fue muy similar a la observada en los ovocitos de ratón (**Figura 16**).

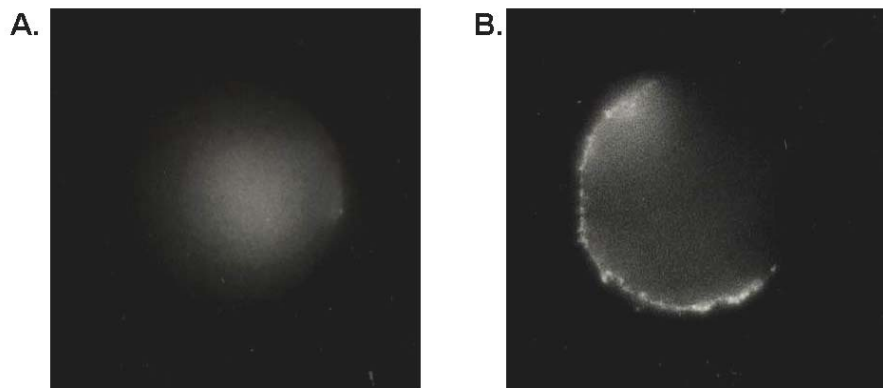


Figura 16. Localización de sitios para Tpx-1 en ovocitos de rata. Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con 6 μ M MBP (**A.**) o Tpx-1 (**B.**), y sometidos a inmunofluorescencia indirecta usando anti-MBP como primer anticuerpo.

Con el fin de estudiar si la unión de Tpx-1 recombinante al oolema era funcional, se analizó la capacidad de la proteína de inhibir la penetración de ovocitos sin ZP por espermatozoides capacitados. Ovocitos de rata sin ZP fueron preincubados con Tpx-1 a distintas concentraciones, y luego inseminados con espermatozoides capacitados de la misma especie. Los resultados indicaron que la presencia de Tpx-1 durante la co-incubación de las gametas produjo una inhibición dosis dependiente del porcentaje de ovocitos penetrados (**Figura 18**). El efecto de la proteína fue específico, ya que la presencia de la proteína MBP no provocó efectos sobre la penetración de los ovocitos. Los resultados de estos ensayos permitieron confirmar que la asociación de Tpx-1 a sus sitios en el oolema sería funcional, ya que es capaz de impedir la fusión de los espermatozoides a los ovocitos.

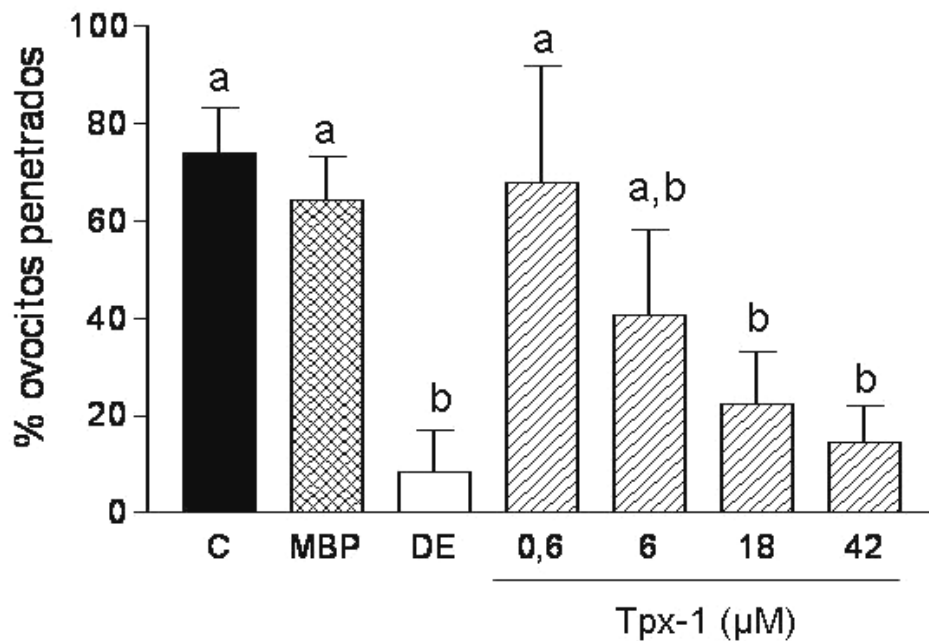


Figura 18. Efecto de Tpx-1 sobre la penetración de ovocitos sin ZP de rata. Ovocitos de rata sin ZP fueron preincubados 30 minutos en ausencia de proteína (C) o en presencia de 6 μM DE, MBP o concentraciones crecientes de Tpx-1, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 3 hs de coincubación, los ovocitos fueron lavados y montados, determinándose el porcentaje de ovocitos penetrados.

En resumen, los estudios presentados en este capítulo de la tesis sugieren que la proteína Tpx-1 sería una molécula intraacrosomal en roedores y en humano, y que permanecería asociada a los espermatozoides luego de la reacción acrosomal. En cuanto a la participación de la proteína en el proceso de fertilización, los resultados de nuestros ensayos funcionales en distintas especies indican que Tpx-1 sería relevante para la etapa de fusión de gametas.

Discusión

Al igual que en otras ramas de la ciencia, los conocimientos sobre la biología de la fertilización han ido incrementándose en forma exponencial a lo largo de los años. Dos mil años atrás se deliberaba sobre la reproducción de los seres en un nivel teórico o filosófico. Hace cuatro siglos se identificaban por primera vez las gametas femenina y masculina, describiéndose su interacción a nivel celular. Sin embargo, sólo a partir de la mitad del siglo pasado se realizaron los primeros estudios sobre los mecanismos moleculares de la fertilización. La interacción entre un espermatozoide y un ovocito es un evento complejo, en el que el espermatozoide, luego de la capacitación en tracto femenino, debe atravesar las cubiertas externas del ovocito, el cúmulus y la ZP, para finalmente alcanzar a la gameta femenina. La fusión del espermatozoide con el ovocito desencadena la activación de éste último, que da inicio al desarrollo embrionario.

Numerosas moléculas han sido involucradas en los diferentes eventos de la fertilización, entre las que se encuentra la proteína epididimaria de rata DE, identificada en el IBYME por los Dres. Cameo y Blaquier (Cameo & Blaquier, 1976). La asociación de esta proteína al espermatozoide durante la maduración epididimaria (Kohane et al, 1980a; Kohane et al, 1980b), su participación en la fertilización (Cuasnicu et al, 1984) y su localización en el segmento ecuatorial luego de la capacitación (Rochwerger & Cuasnicu, 1992) sugirieron que DE podría participar en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito. Un gran número de estudios realizados en nuestro laboratorio confirmaron dicha hipótesis, y determinaron la existencia de sitios de unión para DE en la región fusogénica del oolema de rata (Cuasnicú et al, 1990; Rochwerger et al, 1992), cuya aparición se encontraría relacionada con la adquisición de la fusogenicidad del ovocito durante la ovogénesis (Cohen et al, 1996). Estudios más recientes indicaron que existirían homólogos funcionales de DE tanto en ratón como en humano (Cohen et al, 2000a; Cohen et al, 2001).

El análisis de la secuencia de DE indicaba que no existían en la proteína dominios conocidos de unión a otras moléculas (Cohen et al, 2000b), sugiriendo que la molécula receptora de DE en el oolema se trataría de una entidad novel. Mientras que la localización y la aparición de los sitios para DE significó un avance sumamente importante en el área de la fusión de gametas, la identidad de dichos sitios ha sido una incógnita durante años. La realización de esos estudios era fundamental para comprender el mecanismo molecular por el cual DE participaba en fusión, lo cual resultaba de gran interés no sólo para nuestro laboratorio, sino también para otros investigadores trabajando en el área (Kaji & Kudo, 2004; Bedford, 2004). Los experimentos presentados en esta tesis corresponden a los primeros desarrollados en el laboratorio para identificar al receptor de DE en el ovocito. La mayor parte de ellos han resultado muy laboriosos básicamente debido a la escasez de material proveniente de ovocitos de mamíferos. Debe tenerse en cuenta que, a diferencia de otras células, los ovocitos se obtienen por pipeteo en forma individual, y posteriormente deben ser liberados del cúmulus y la ZP por pasajes en diferentes soluciones. Como ejemplo del escaso material con el que se contó, para cada ensayo bioquímico presentado en la tesis se sacrificaron al menos 20 hembras, de las cuales se aislaron un promedio de 800 ovocitos totales. El total de ovocitos utilizados sólo en los experimentos de crosslinking fue de aproximadamente 6000.

Las evidencias en la bibliografía indican que el reconocimiento y la fusión entre las membranas celulares, en sistemas como la invasión viral o la fusión de mioblastos, involucran a diferentes moléculas, tales como proteínas, residuos glicosídicos y componentes lipídicos (Poste & Allison, 1973; Knudsen & Horwitz, 1977; Olden et al, 1981). De igual modo, se ha sugerido que la fusión de gametas en los mamíferos también requeriría de la participación de moléculas de diferente naturaleza (Boldt et al, 1989b; Ponce et al, 1993; Coonrod et al, 1999a; Coonrod et al, 1999b). Considerando esta información, el sitio receptor de DE en el ovocito podía corresponder tanto a una molécula

de tipo proteico, como a un componente glicosídico o lipídico. Con el objeto de determinar la naturaleza química del sitio para DE, ovocitos de rata y ratón fueron tratados con diferentes enzimas, evaluándose posteriormente el efecto de las mismas sobre la unión de DE a los ovocitos por IFI. Estos estudios no permitieron caracterizar a los sitios para DE en el ovocito, ya que no se observó un efecto sobre la presencia o localización de los mismos como consecuencia de ninguno de los tratamientos. En esos experimentos, el hecho de que PLC y PLC-PI provocaran un aumento en la marca fluorescente para DE en los ovocitos sugiere que la remoción de componentes del oolema por esas enzimas podría ser favorable para la interacción de DE con su sitio. La acción de las enzimas fue confirmada en ovocitos de ratón tanto por una disminución de la capacidad fusogénica como de la marca fluorescente para la tetraspanina CD9, involucrada en fusión (Miyado et al, 2000; Kaji et al, 2000). Al igual que en estudios previos, nuestros resultados indicaron que las enzimas proteinasa K y PLC-PI afectaban la fusión de gametas en ratón (Boldt et al, 1988; Coonrod et al, 1999b). En cuanto al efecto de la PNGasaF, nuestros experimentos corresponden a los primeros en los que se observó un efecto en el proceso de fusión por la acción de una glicosidasa sobre los ovocitos. Estudios previos de otros investigadores habían indicado que el tratamiento de ovocitos de ratón y hámster con enzimas específicas para determinados residuos glicosídicos (glucuronidasa, fucosidasa, glucosidasa, galactosidasa, etc) no afectaban la fusión (Boldt et al, 1988; Ponce et al, 1993). A diferencia de esos estudios, la enzima utilizada en nuestros ensayos tiene la capacidad de remover todos los hidratos de carbono asociados a asparagina en las proteínas, sugiriendo que más de un residuo glicosídico podría estar involucrado en la fusión de gametas. Por su parte, el tratamiento de los ovocitos con proteinasa K no sólo inhibió la fusogenicidad de los mismos, sino que además provocó una reducción en la marca inmunofluorescente detectada en el oolema para CD9. Si bien la ausencia de efecto sobre el sitio para DE podría deberse a una falta de especificidad entre las enzimas utilizadas y la molécula receptora, la utilización de una gama relativamente amplia de

enzimas y condiciones experimentales en los ensayos con ovocitos de rata, así como el empleo de enzimas con actividades más generales sobre ovocitos de ratón, no apoyarían dicha posibilidad. Una explicación más probable sería que los sitios no fueran accesibles a la acción enzimática por encontrarse inmersos en la membrana del ovocito o por estar estéricamente impedidos por la presencia de otras proteínas del oolema.

Como una alternativa para la identificación del sitio de DE, y teniendo en cuenta nuestra experiencia en los procedimientos para el análisis de proteínas, realizamos ensayos bioquímicos para aislar a un posible complejo entre DE y un receptor de tipo proteico, los cuales serán descritos a continuación. Los resultados de nuestros estudios de biotilación de proteínas indicaron que las proteínas superficiales del ovocito de rata tenían perfiles proteicos similares a los presentados previamente en la literatura para la membrana plasmática de ovocitos de ratón. Mientras que en nuestros estudios entre 8 y 10 proteínas mayoritarias fueron identificadas en el oolema de rata, otros autores detectaron números similares de proteínas mediante iodación (Boldt et al, 1989a) o biotilación (Flaherty & Swann, 1993) en la superficie de ovocitos de ratón. En nuestros experimentos las proteínas biotiladas de superficie presentaron un tamaño superior a 50 kDa. En ovocitos de ratón, además de existir proteínas mayoritarias de tamaños superiores a 50 kDa, también se identificaron otras proteínas de pesos moleculares inferiores (Flaherty & Swann, 1993). La presencia de esas bandas adicionales, así como pequeñas diferencias en el tamaño y la cantidad relativa de cada banda, podrían estar reflejando diferencias entre la composición del oolema en rata y en ratón.

Contando con ovocitos cuyas proteínas de superficie se encontraban marcadas con biotina, como paso siguiente realizamos ensayos en los que dichos ovocitos incubados con DE fueron sometidos a inmunoprecipitación con anti-DE. Estos procedimientos nos hubiesen permitido aislar al complejo DE-receptor, y detectar posteriormente al receptor gracias a la marca de biotina.

La realización de esos ensayos, sin embargo, no permitió identificar al sitio para DE. Los resultados no se debieron a problemas de la técnica en sí, ya que la proteína DE fue correctamente precipitada en forma aislada, sin ninguna proteína asociada. El hecho de que el lavado de los ovocitos incubados con DE previo a la fijación y la IFI removiera a la proteína del oolema sugirió que DE purificada, en solución, tendría una baja afinidad por su receptor. Teniendo en cuenta esa observación, la incapacidad de aislar al complejo DE-receptor por inmunoprecipitación podría deberse a la disociación del complejo durante el procedimiento. A pesar de que la unión lábil de DE purificada a su receptor no sería favorable para la identificación del complejo DE-receptor, resulta importante aclarar que la afinidad de DE podría no ser importante para su función. En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que mientras que la presencia de DE en el medio de co-incubación de gametas producía una inhibición de la fusión, la misma no afectaba la unión de los espermatozoides a los ovocitos (Rochwerger et al, 1992). En esos estudios, los espermatozoides unidos, que no habían penetrado los ovocitos en presencia de DE, eran capaces de fusionarse luego de su transferencia a gotas de medio libres de la proteína. Esas evidencias indicaban que DE cumpliría un rol en una etapa posterior a la unión de las gametas, conducente a la fusión. Por lo tanto, la secuencia de eventos moleculares postulados durante la fusión de gametas sugiere que mientras que otras moléculas, como las integrinas, serían las responsables de la unión inicial de los espermatozoides al oolema, DE podría participar en un evento posterior para el cual una interacción fuerte podría no ser relevante (Cuasnicu et al, 2001; Talbot et al, 2003).

Como una alternativa para la identificación del receptor de DE, se realizaron experimentos de "ligand blot" en los cuales se evaluaba la capacidad de dicha proteína de unirse a proteínas de ovocito separadas electroforéticamente y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Daniel et al, 1983). Este procedimiento había sido utilizado previamente por otros investigadores para la

identificación de receptores en diversos sistemas. Dicha técnica ha sido aplicada, por ejemplo, en la identificación del receptor de la vitelogenina (RV), una proteína transportadora de lípidos, en la membrana plasmática del ovocito de gallina (Stifani et al, 1988). A diferencia de esos estudios, nuestros ensayos de "ligand blot" no permitieron la identificación del receptor de DE. Ninguna de las modificaciones ensayadas para favorecer la técnica, tales como un aumento en la cantidad del material de partida (1600 ovocitos) o la fijación de DE a la membrana para evitar la posible disociación del complejo, permitieron obtener resultados positivos. Al igual que en el caso de los ensayos de inmunoprecipitación, una explicación posible de estos resultados podría ser la baja afinidad entre la proteína DE y su sitio en el ovocito, o una insuficiente sensibilidad del método utilizado.

Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí descritos, se diseñaron experimentos con el fin de evitar la disociación del complejo DE-receptor. La marcación radiactiva de DE permitió contar con una proteína de alta actividad específica, la cual fue utilizada en algunos de nuestros ensayos para aumentar la capacidad de detección de DE. Para evitar la disociación de DE y su receptor, se utilizaron crosslinkers, agentes capaces de asociar covalentemente a moléculas asociadas entre sí por fuerza iónica. El hecho de que la utilización del crosslinker DSS evitara la disociación de la proteína DE de la superficie de ovocitos luego del lavado sugirió la eficiencia de dicho agente para mantener asociado al complejo DE-receptor. La separación electroforética de proteínas de ovocitos incubados con DE en presencia de DSS permitió obtener una banda de alto peso molecular, que podría corresponder al complejo DE-receptor. El peso molecular del complejo no pudo ser determinado ya que la banda observada en presencia de DSS permanecía por fuera del gel separador, en la interfase con el gel concentrador. La utilización de crosslinkers más complejos no brindó información adicional a la del DSS, probablemente debido a una baja eficiencia de los mismos sumada a la escasez del material proveniente de ovocitos.

Además de la banda de alto peso molecular, en los ensayos de crosslinking con DSS se observó una banda de un peso molecular de aproximadamente 60 kDa. Los resultados de los ensayos en los que se incubó a DE con ese crosslinker, en ausencia de ovocitos, indicaron que esa banda podría corresponder a la unión covalente de dos moléculas de DE, formando un dímero. Resulta interesante mencionar una publicación reciente en la que se sugiere que la proteína GAPR-1, identificada en el aparato de Golgi de células humanas en cultivo, con una homología significativa (39%) con DE, podría utilizar la dimerización como mecanismo para ejercer una acción enzimática putativa (Serrano et al, 2004). En este sentido, la dimerización de DE podría estar relacionada a su actividad. Sin embargo, no puede descartarse que la dimerización postulada corresponda a una situación artificial provocada por la alta concentración de proteína en presencia del crosslinker.

Posteriormente a la realización de los ensayos bioquímicos descritos anteriormente, surgieron en la bibliografía evidencias indicando que CD9 era relevante para la fusión de gametas (Miyado et al, 2000; Le Naour et al, 2000). Teniendo en cuenta la participación de CD9 en esa etapa, y que el ligando para CD9 en el espermatozoide no había sido identificado aún, nos planteamos la hipótesis de que CD9 pudiera corresponder al receptor de DE en el ovocito. El análisis de la posible competencia entre anti-CD9 y DE por CD9 en el oolema no respaldaron nuestra hipótesis. Asimismo, los resultados de ensayos preliminares de IFI, en los que analizamos la unión de DE a ovocitos de animales KO para CD9 (enviados por el Dr. Okabe desde Japón), tampoco apoyaron una interacción directa entre DE y CD9. Estudios más recientes sugirieron que CD9 podría tener una interacción directa con una proteína del espermatozoide perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas F, denominada "sperad" (Ellerman et al, 2003b).

La obtención de una banda de alto peso molecular en nuestros experimentos de crosslinking presenta semejanzas con los resultados de los estudios en

ovocitos de invertebrados, en los cuales también se detectaron compuestos de pesos moleculares elevados durante la identificación de posibles receptores para proteínas del espermatozoide. Este es el caso de las glicoproteínas receptoras para las proteínas del espermatozoide “bindina”, en el erizo de mar, de aproximadamente 350 kDa (Glabe & Vacquier, 1978; Foltz & Lennarz, 1992b) y “lisina”, en el molusco abalone, de 2.000 kDa (Swanson & Vacquier, 1997). Si bien en la actualidad la identidad de receptor de bindina es conocida, su gran tamaño y pobre solubilidad dificultaron los ensayos y, como consecuencia, debieron transcurrir muchos años entre el hallazgo de esa proteína (Glabe & Vacquier, 1978) y su posterior caracterización mediante técnicas modernas de biología molecular (Kamei & Glabe, 2003). En cuanto al receptor para la lisina del espermatozoide, el mismo solo pudo ser purificado a partir de un extracto de proteínas proveniente de un número elevado de ovocitos (Swanson & Vacquier, 1997). Evidentemente, esta no es una posibilidad en el caso de los ovocitos de mamíferos debido a la escasez del material disponible. Un ejemplo ilustrativo de la diferencia del modelo de mamíferos y el de invertebrados para el estudio de las proteínas de ovocito es que, a diferencia de los ovocitos obtenidos de animales como la rata o el ratón, cuantificados uno a uno, las cantidades de ovocitos de invertebrados se expresan utilizando medidas de volumen.

El conjunto de los estudios descriptos en esta tesis nos ha llevado a re-evaluar la utilidad de los procedimientos bioquímicos para la identificación del receptor de DE en el ovocito. Como se describiera anteriormente, la dificultad en la obtención de suficiente material de ovocitos para este tipo de estudios imposibilita, en la mayoría de los casos, llevar a cabo diferentes condiciones experimentales e incluir todos los controles necesarios en cada uno de los experimentos. Es probable que esa sea una de las causas que expliquen la escasez de información existente en la literatura sobre los componentes moleculares en la membrana del ovocito involucrados en la fusión con la membrana del espermatozoide. Dado que la identificación del sitio para DE en

el oolema podría ser fundamental para comprender los mecanismos moleculares del proceso de fusión, hemos comenzado a evaluar nuevas estrategias para enfrentar este objetivo. Al igual que en el ejemplo anterior, la identificación del receptor de DE en el ovocito podría requerir de tecnologías nuevas, diferentes a las utilizadas en esta tesis. Un caso interesante de una técnica de biología molecular utilizada para la identificación de una molécula ovocitaria es la del “representation difference analysis” o RDA, empleada para aislar al receptor de bindina en ovocitos de erizo de mar comparando fragmentos de cDNA involucrados en otorgar especie-especificidad a la fertilización en esos animales (Kamei & Glabe, 2003).

Si bien el tratamiento enzimático de los ovocitos en combinación con IFI no permitió caracterizar al sitio para DE, la reciente identificación de proteínas de la familia CRISP con capacidad de unirse a otras proteínas podría ser un argumento a favor de la naturaleza proteica del receptor para DE. El análisis de la bibliografía existente sobre las más de 70 CRISPs identificadas indica que las pocas CRISPs que se asocian a otras moléculas lo hacen a proteínas. Este es el caso de helotermina, y otras proteínas de venenos, que interactúan con canales iónicos (Morrissette et al, 1995; Yamazaki et al, 2003), de la proteasa Tex31 con afinidad hacia neurotoxinas (Milne et al, 2003), y de CRISP-3 ligando de una proteína plasmática de la familia de las inmunoglobulinas (Racowsky et al, 1992). Esta observación resulta particularmente interesante teniendo en cuenta el reciente surgimiento de la proteómica como una herramienta para la identificación de nuevas proteínas del ovocito, dentro de las cuales podría encontrarse el receptor de DE. Recientemente, hemos contactado al Dr. Scott Coonrod, de la Universidad de Cornell (Nueva York), uno de los investigadores con mayor número de publicaciones en el área de biología molecular del ovocito, y el primero en publicar el denominado “proteoma del ovocito” (Coonrod et al, 2002). El Dr. Coonrod ha utilizado la información brindada por la proteómica para identificar diferentes proteínas del ovocito que pudieran ser relevantes para la función de

esa gameta. Actualmente, el Dr. Coonrod se encuentra involucrado en un proyecto que prevé la generación de animales deficientes en cada una de las más de 250 proteínas de ovocito identificadas por proteómica. La implementación de dicho proyecto involucra la producción de animales transgénicos expresando RNA de interferencia para los correspondientes genes específicamente en el ovocito. Se ha sugerido que dicha tecnología, denominada de “knock down”, brindaría una información similar a la obtenida mediante la técnica tradicional de “knock out”, salteando algunas de sus dificultades (Mattioli et al, 1998). Como resultado del proyecto se obtendrá una serie de animales con ovocitos deficientes en diferentes funciones. Como una estrategia alternativa para avanzar en la identificación del receptor de DE, nos hemos propuesto estudiar si aquellos ovocitos con la fusogenicidad alterada, obtenidos en el laboratorio del Dr. Coonrod, presentan defectos en la presencia o localización de los sitios para DE.

La participación de DE en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito a través de sitios específicos localizados en el oolema (Rochwerger et al, 1992) abría la posibilidad de que DE también tuviera una función en el proceso de activación del ovocito, posterior al de fusión. Con el fin de evaluar esta hipótesis, en primer lugar se estudió si DE podía activar al ovocito al unirse a sus sitios en el oolema, según fuera postulado por el modelo del receptor de activación (Foltz & Schilling, 1993). Las evidencias en la bibliografía indicaban que péptidos sintéticos conteniendo al dominio desintegrina, presente en las proteínas ADAM del espermatozoide, eran capaces de inducir la liberación de calcio al unirse a integrinas en el oolema, tanto en ovocitos de *Xenopus* (Shilling et al, 1998) como de bovino (Campbell et al, 2000). A diferencia de esos péptidos, la unión de DE a la superficie de los ovocitos no provocó oscilaciones de calcio ni el reinicio de la meiosis en nuestros experimentos, descartando que DE indujera la activación al interactuar con su receptor en el oolema. Una observación paralela de esos estudios consistió en que, a pesar del alto porcentaje de activación espontánea de los ovocitos durante los

estudios, la penetrabilidad de los mismos no se veía afectada, a juzgar por el hecho de que los ovocitos activados podían ser fertilizados normalmente. Al igual que en el caso de la activación espontánea, evidencias previas de otros laboratorios indicaron que tanto la activación artificial, como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI: intracytoplasmic sperm injection) no producían un bloqueo de la fertilización, sugiriendo que el establecimiento de los mecanismos de bloqueo de polispermia sería estrictamente dependiente de la interacción entre las membranas del ovocito y el espermatozoide (Horvath et al, 1993; McAvey et al, 2002).

Mientras que numerosas evidencias indicaban que un extracto de proteínas solubles de espermatozoide era capaz de inducir la activación, la identidad de la molécula activadora era una incógnita al comienzo de nuestros estudios. Dada la alta homología de la proteína DE con helotermina, proteína reguladora de la liberación de calcio a través de los receptores rianodínicos (RR), resultaba interesante evaluar si DE incorporada dentro del citoplasma del ovocito (ooplasma) podía participar en la regulación de la liberación de dicho ión. Nuestros resultados indicaron que la microinyección de DE en el ooplasma no provocaba la liberación de calcio, indicando que la proteína no correspondía al factor activador soluble del espermatozoide. Por otro lado, DE tampoco fue capaz de modular las oscilaciones provocadas por la microinyección de un extracto de proteínas de espermatozoide conteniendo al factor activador. Publicaciones recientes indican que dicho factor se encontraría presente en una porción particulada del citoplasma denominada matriz perinuclear, localizada en la región postacrosomal (Fujimoto et al, 2004). Por lo tanto, la inactividad de DE, proteína presente en la membrana plasmática del espermatozoide, resulta coherente con estos resultados.

Si bien han transcurrido algunos años desde el inicio de estos estudios hasta la actualidad, aún no existen evidencias inequívocas que demuestren la identidad o la localización de la molécula activadora en el espermatozoide

(Kurokawa et al, 2004). Hoy en día la hipótesis que postula la existencia de un factor espermático activador soluble es la que tiene mayor consenso. Inicialmente, esta teoría fue respaldada por el hecho de que los ovocitos fertilizados mediante ICSI se activaban normalmente y eran capaces de originar embriones que llegaban a término (Kimura & Yanagimachi, 1995). La mayor parte de las publicaciones sobre activación de los últimos años sugieren que la liberación de calcio en el ovocito durante la activación estaría mediada, principalmente, por la producción de inositol trifosfato (IP3), por lo que proponen que el factor espermático correspondería a una molécula catalizadora de la generación de dicho compuesto como la fosfolipasa C (PLC) (Ben Yosef & Shalgi, 1998; Kurokawa et al, 2004). La relevancia de dicha molécula para la activación fue confirmada por estudios en los que la inhibición específica de PLC resultaba en el bloqueo de la liberación de calcio de los ovocitos (Wu et al, 2001). Se han detectado diferentes isoformas de PLC en el espermatozoide y en el ovocito por lo que, tanto la liberación de una PLC espermática, como la activación de una PLC ovocitaria por un factor del espermatozoide, introducido durante la fusión, podrían ser mecanismos posibles para desencadenar la activación del ovocito.

La homología entre DE y helotermina sugerían una homología funcional entre ambas moléculas. Si bien nuestros estudios indicaban que la proteína DE era incapaz de regular la liberación de calcio en los ovocitos, existía la posibilidad de que helotermina fuera capaz de bloquear la fusión de gametas *in vitro*. Nuestros experimentos descartaron dicha posibilidad, indicando que la similitud entre DE y helotermina no se ve reflejada en la capacidad de cumplir funciones cruzadas. Asimismo, la homología entre ambas proteínas abría la posibilidad de que el receptor de DE en el oolema tuviera características similares a las de los canales rianodínicos, receptores de la helotermina. Sin embargo, ensayos preliminares de inmunolocalización, utilizando un anticuerpo anti-receptor de rianodina (gentilmente cedido por el Dr. Darszon), no detectaron moléculas capaces de ser reconocidas por ese anticuerpo en la

superficie de los ovocitos de rata. En estos ensayos, la localización de los receptores rianodínicos fue similar a la descrita previamente en ovocitos bovinos (Yue et al, 1998), encontrándose limitada a la corteza del ooplasma, región ubicada por debajo de la membrana plasmática (Sardet et al, 2002).

El alto grado de conservación entre DE y helotermina, dos proteínas expresadas en sistemas no relacionados anatómicamente ni fisiológicamente, resulta muy interesante en términos evolutivos. Si bien nuestros estudios indicaron que DE no estaría involucrada en la activación del ovocito, podría cumplir una función homóloga a la de helotermina en la regulación de calcio durante algún otro proceso de la función espermática, previo a la fertilización, que sea dependiente de ese ión, tal como la capacitación y la RA (Córdoba et al, 1997; Visconti et al, 1995a; Dorval et al, 2002; Tardif et al, 2003). Resultados previos de nuestro laboratorio indicaron que la incubación de espermatozoides frescos de rata en un medio conteniendo a la proteína DE purificada resultaba en una inhibición de su capacidad fertilizante, sugiriendo que existiría una población de DE con una función “decapitante” (Cohen, 1992). Asimismo, se ha propuesto recientemente que la proteína DE podría regular negativamente la fosforilación en residuos tirosina del espermatozoide, uno de los eventos que tiene lugar durante la capacitación (Roberts et al, 2003). En coincidencia con esos resultados, evidencias de nuestro laboratorio ya habían determinado previamente que, además de existir una población de DE fuertemente unida al espermatozoide que permanecería asociada al segmento ecuatorial luego de la RA y participaría en el proceso de fusión, existiría una segunda población de DE, asociada débilmente, que sería liberada durante la capacitación (Cohen et al, 2000b). De este modo, sería posible que la existencia de mecanismos diferentes de unión de DE al espermatozoide durante la maduración, reflejados en la afinidad de cada población a la membrana, estuviera relacionada con la participación de la proteína en etapas diferentes de la función espermática. Podría postularse un modelo en el que la población débilmente unida, que se libera durante la capacitación, actuara como factor decapitante inhibiendo la

fosforilación en residuos tirosina, mientras que la población fuertemente unida, que migra al segmento ecuatorial, fuera la responsable de participar en el proceso de fusión.

Mientras que numerosos estudios de nuestro laboratorio determinaron que la proteína DE cumplía una función en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito, observaciones más recientes sugirieron que la proteína epididimaria podría participar, además, en otras etapas de la fertilización. Según se mencionara anteriormente, una posible función de DE durante la interacción espermatozoide-ZP fue sugerida por primera vez hace algunos años por los resultados de experimentos de inmunización con DE (Ellerman et al, 1998a). Si bien el tratamiento de los espermatozoides con sueros provenientes de ratas inmunizadas con DE provocaba una inhibición de la fertilización, la ausencia de una acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino sugería que los anticuerpos habían inhibido etapas de la fertilización previas a la de fusión. Los resultados presentados en esta tesis respaldaron fuertemente la participación de DE en la interacción de los espermatozoides con la ZP. En nuestros estudios, se observó un efecto inhibitorio tanto del proceso de fertilización completo como de la asociación de los espermatozoides a la ZP por la presencia de DE durante la co-incubación de gametas de ratón. Estos resultados sugerían que la proteína DE presente en el medio podría competir con la DE del espermatozoide en su interacción con la ZP. Evidencias previas de nuestro laboratorio ya habían demostrado que DE no afectaba la motilidad ni inducía la aglutinación de los espermatozoides. Sin embargo, una posibilidad adicional a tener en cuenta era que la proteína, durante la co-incubación de gametas, actuara como factor decapacitante según fuera sugerido anteriormente para la población de DE débilmente unida al espermatozoide. Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio indicaron que en nuestro esquema experimental DE no cumpliría con esa función. En estos experimentos, cuando espermatozoides que ya habían sido previamente capacitados eran incubados en un medio conteniendo a la proteína DE, un

parámetro indicador de capacitación, tal como la fosforilación en residuos tirosina, no se veía afectado (resultados aún no publicados). Por lo tanto, en nuestros ensayos de interacción de gametas, la proteína DE no provocaba una reversión del estado capacitado luego de que el mismo hubiera sido establecido. La ausencia de un efecto de DE sobre parámetros que pudieran inhibir indirectamente la capacidad fertilizante de los espermatozoides apoyó la existencia de un efecto inhibitorio directo de DE sobre la interacción con la ZP. Dicha inhibición se vio acompañada por la unión de la proteína a la ZP de los ovocitos, determinada mediante ensayos de IFI de ovocitos incubados con DE. Respaldando esos resultados existen evidencias indicando que una molécula estructuralmente similar a la proteína D (uno de las dos entidades moleculares de DE) podía ser aislada de la membrana del espermatozoide de rata mediante una columna de afinidad conteniendo proteínas purificadas de la ZP (Hall & Tubbs, 1997). La capacidad de asociación de DE con la ZP se encontró significativamente reducida en ovocitos fertilizados, sugiriendo que dicha unión se veía afectada por la reacción de zona que ocurre en el ovocito como parte de los mecanismos del bloqueo de la polispermia. En este sentido, nuestros resultados indicando que la unión de DE soluble a la ZP fue capaz de reproducir la asociación de los espermatozoides a la ZP de los ovocitos antes y después de la fertilización, otorga una especial relevancia fisiológica a los resultados. Un esquema experimental complementario para analizar la participación de DE en la etapa de interacción con la ZP consistió en el bloqueo de la proteína en el espermatozoide mediante el anticuerpo específico anti-DE. Los resultados de estos estudios determinaron que anti-DE producía una inhibición tanto de la fertilización de ovocitos intactos como de la unión de los espermatozoides capacitados a la ZP sin afectar otros parámetros espermáticos y, por lo tanto, respaldaron los resultados obtenidos con la proteína DE purificada.

Experimentos previos de nuestro laboratorio determinaron que recDE presentaba la capacidad de asociarse a los ovocitos sin ZP de rata, y de inhibir

la fusión de gametas *in vitro* de esa especie (Ellerman et al, 2002). Los estudios presentados en esta tesis indicaron que, al igual que en la rata, recDE fue capaz de inhibir la fertilización en el ratón. La acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino por la presencia de recDE, observada en nuestros estudios, sugirió que la proteína se encontraba bloqueando la interacción de los espermatozoides con el oolema y respaldó una actividad de recDE en fusión. Contrariamente a lo esperado, a diferencia de la DE nativa, recDE no afectó la etapa previa de interacción con la ZP. En forma congruente con esos resultados, se observó una asociación de la proteína recombinante a la superficie de los ovocitos y no a la ZP. Estudios previos de nuestro laboratorio indicaron que la eficiencia de recDE para inhibir la fusión de gametas era inferior a la de DE nativa, brindando además información sobre las posibles causas de esa diferencia (Ellerman et al, 2002). La presencia de residuos cisteína en DE, conservados en todos los miembros de la familia CRISP, sugería que los puentes disulfuro podrían ser funcionalmente relevantes para esta proteína. Efectivamente, el análisis de la estructura de recDE indicó que, a diferencia de DE nativa, la proteína recombinante poseía grupos tioles libres que podrían causar una incorrecta conformación de la molécula (Ellerman et al, 2002). Por otro lado, mientras que la ausencia de residuos glicosídicos en recDE (por su expresión en un sistema bacteriano) también abrió la posibilidad de que los carbohidratos fueran importantes para la actividad de la proteína, la deglicosilación de DE nativa no resultó en una pérdida de su actividad en fusión (Ellerman et al, 2002).

Considerando que la proteína DE se encontraba involucrada en la interacción espermatozoide-ZP, existía la posibilidad de que su homólogo en el humano, la proteína ARP, también cumpliera una función en esa etapa. Con el fin de analizar esa hipótesis utilizamos ensayos de hemizona, en los que evaluamos la capacidad de espermatozoides humanos capacitados de interactuar con la ZP. Los resultados indicaron que tanto la presencia de anti-ARP como de ARP, presentes durante el ensayo, producían una inhibición específica en el número

de espermatozoides unidos respecto de la hemizona contralateral, incubada en medio solo o en presencia de un anticuerpo o proteína como controles. En conjunto, ambos esquemas experimentales sugirieron que ARP podría estar involucrada en la interacción de los espermatozoides con la ZP en el humano. Una observación llamativa de estos estudios fue que a diferencia de recDE, la proteína ARP, también recombinante, presentó actividad a nivel de la ZP. Dado que ambas proteínas carecen de glicosilación, y han sido expresadas en un mismo sistema de expresión, la diferencia en la actividad de ambas proteínas podría deberse a diferencias en su estructura terciaria. Una posibilidad es que la secuencia aminoacídica de ARP sea más favorable para el plegamiento de la proteína dentro del citoplasma bacteriano.

Al igual que en el caso de DE y ARP, evidencias recientes han llevado a evaluar si las ADAM, moléculas tradicionalmente involucradas en fusión, también podrían participar en otras etapas de la interacción de gametas. El caso más llamativo es el de la proteína fertilina, dímero de las proteínas fertilina β (ADAM2) y fertilina α (ADAM1), cuya función había sido establecida tan fuertemente que hace una década aproximadamente se encontraba descrita en los libros de texto de biología molecular, para ejemplificar el mecanismo de la fusión (Alberts et al, 1994). La presencia de una secuencia desintegrina en ADAM 2 y de un péptido fusogénico en ADAM 1 respaldaban la función de la proteína en la unión y la fusión al oolema, respectivamente (Blobel et al, 1992; Almeida et al, 1995). Sin embargo, resultados más recientes, provenientes principalmente del análisis de animales KO, pusieron en evidencia que ni ADAM1/2, ni una tercera proteína de la familia ADAM identificada en el espermatozoide, denominada ciritestina (ADAM 3), eran relevantes para la etapa de interacción del espermatozoide con el oolema (Cho et al, 1998; Cho et al, 2000). Las causas de la infertilidad en esos animales KO correspondían principalmente a defectos en el transporte de los espermatozoides por el tracto femenino, en la penetración del cúmulus y en la unión a la ZP, y sólo parcialmente, a defectos en la etapa de fusión. La re-

evaluación de los ensayos en los que se analizaba la interacción de fertilina con ovocitos sin ZP indicó que la proteína podía unirse a restos de ZP que permanecían en la superficie de los ovocito luego de la remoción de la matriz, y que dicha unión podía ser la causa de una incorrecta interpretación de los resultados (Yamagata et al, 2002). Analizando las evidencias más recientes en su conjunto, parecería que las ADAM serían más importantes para la etapa de interacción espermatozoide-ZP que para la de fusión de gametas, propuesta tradicionalmente. A diferencia de fertilina, nuestras evidencias indican que la interacción de DE con el oolema no sería a través de restos remanentes de ZP. En primer lugar, la capacidad de recDE de asociarse al oolema pero no a la ZP, es un argumento a favor de que la participación de DE en la etapa de interacción con la ZP sería independiente, y adicional, a la función de la proteína en fusión. Por otro lado, ensayos recientes de nuestro laboratorio han permitido descartar la presencia de ZP3 en la superficie de los ovocitos luego del tratamiento para remover la ZP.

Según se describiera en la introducción de esta tesis, existen varias moléculas del espermatozoide a las que se les ha otorgado una función en la interacción con la ZP, por lo que se ha postulado que podría existir una cierta redundancia en la existencia de ligandos en el espermatozoide que podrían actuar en forma conjunta para mantener al espermatozoide hiperactivado asociado a la ZP (Castle, 2002). Se ha sugerido que las proteínas localizadas en la superficie del espermatozoide, como galacosyltransferasa (Shur & Hall, 1982) y SED1 (Ensslin & Shur, 2003) participarían en la unión primaria a la ZP mientras que las proteínas intra-acrosomales, expuestas luego de la RA, como SP56 (Cohen & Wassarman, 2001; Kim et al, 2001a) y zonadhesina (Lea et al, 2001), estarían involucradas en la unión secundaria del espermatozoide a la ZP. De acuerdo a este modelo, la localización superficial de las ADAM y la proteína DE sugiere que ambas podrían formar parte del conjunto de moléculas involucradas en la unión primaria a la ZP. A pesar de que se ha sugerido que las ADAM interactuarían con residuos de hidratos de carbono en la ZP, el

mecanismo de dicha interacción aún se desconoce (Yamagata et al, 2002). Los resultados de esta tesis indican que DE y su homólogo humano ARP participarían en la interacción espermatozoide-ZP en las respectivas especies. Mientras que se ha observado que DE presenta la capacidad de asociarse a la ZP de ovocitos de ratón no fertilizados, la identificación del ligando para DE en la ZP y el mecanismo molecular de dicha interacción serán objeto de futuros estudios de nuestro laboratorio.

La observación de que la proteína DE tenía un efecto *per se* sobre la integridad del cúmulus oophorus de rata y ratón sugirió que la proteína podía cumplir una función durante la etapa de penetración de dicha estructura por el espermatozoide. La capacidad de la proteína DE purificada de dispersar, en forma concentración y tiempo dependiente, a las células de cúmulus maduros, sugirió que el blanco de la acción de DE sería la matriz depositada alrededor de las células del cúmulus durante su expansión, en el período periovulatorio. La ausencia de un efecto de DE sobre la integridad de cúmulus inmaduros fue un hallazgo importante ya que confirmó que el efecto de DE dependía de la presencia de la matriz y, además, permitió descartar posibles efectos tóxicos de la proteína que pudieran provocar la disociación de las células del cúmulus. La inmunolocalización de DE sobre la matriz extracelular del cúmulus, y la unión de la proteína a uno de los componentes principales de dicha estructura, el ácido hialurónico (AH), fueron evidencias adicionales a favor de la interacción de DE con la matriz del cúmulus. En conjunto, los estudios realizados sugirieron que DE presente en la superficie del espermatozoide podría ejercer un efecto localizado sobre la matriz del cúmulus, y de este modo facilitar la penetración del mismo.

El AH es el glicosaminoglicano mayoritario de la matriz del cúmulus. La ausencia de homologías entre DE y otras proteínas del espermatozoide con actividad hialuronidasa, y la incapacidad de DE para hidrolizar al AH *in vitro*, sugieren que el efecto sobre el cúmulus no se debería a una actividad

hialuronidasa en la molécula. No puede descartarse aún que la actividad hialuronidasa no haya sido detectada en nuestros ensayos debido a la insuficiente sensibilidad del método utilizado, por lo que en un futuro se prevé la utilización de métodos adicionales que permitan detectar la actividad en forma más efectiva. Como alternativa, el mecanismo de DE sobre la matriz podría involucrar su unión a AH, pero ser independiente de la digestión de dicho GAG. En este sentido, se ha demostrado que la interacción iónica entre componentes proteicos y GAGs de la matriz del cúmulus sería fundamental tanto para la organización de dicha estructura como para su estabilidad (Chen et al, 1994; Russell et al, 2003; Salustri et al, 2004). Se ha determinado que algunas proteínas de la matriz estarían asociadas al AH en forma dependiente de calcio, lo cual ha llevado a un grupo de investigadores a proponer la utilización de quelantes de calcio en combinación con proteasas de origen vegetal para remover el cúmulus de ovocitos humanos previo a ser sometidos a ICSI. Este método tendría la ventaja de evitar la utilización de hialuronidasa bovina, dado el riesgo potencial de contaminación con patógenos de origen animal (Parinaud et al, 1998). Por lo tanto, el hecho de que exista una asociación iónica entre los componentes de la matriz del cúmulus, sugiere que DE podría afectar la integridad del cúmulus interfiriendo con alguna de esas interacciones moleculares. Por último, también existe la posibilidad de que DE, luego de unirse a AH, ejerza una actividad enzimática con especificidad hacia un sustrato diferente. Según fuera descrito en la introducción, además del AH, GAG mayoritario, existe un gran número de otros GAGs y proteínas involucradas en el ensamblaje de la matriz del cúmulus (Zhuo & Kimata, 2001). Teniendo en cuenta esta información, DE podría actuar enzimáticamente sobre alguna otra de esas moléculas. En relación con esa posibilidad, resulta interesante mencionar la reciente identificación de una proteína con una homología significativa con DE (50%), la cual presenta actividad proteasa (Milne et al, 2003). Dicha proteína, denominada Tex31, fue aislada del veneno de un molusco marino del género *Conus* por su capacidad de clivar específicamente el propéptido de proteínas neuroactivas conocidas como

“conotoxinas”. La existencia de un posible bolsillo catalítico conformacional en Tex31 fue sugerida por la homología de la proteína con otras dos proteínas de la superfamilia CAP cuyas estructuras terciarias habían sido estudiadas anteriormente (Fernandez et al, 1997; Henriksen et al, 2001). Teniendo en cuenta que existen aminoácidos conservados entre las distintas CAP formando parte de ese putativo dominio catalítico estructural, se ha propuesto que algunas de las proteínas de esta superfamilia podrían ser proteasas cuyos sustratos aún no han sido identificados (Milne et al, 2003; Serrano et al, 2004). En síntesis, considerando la capacidad de DE para afectar la integridad del cúmulus sin poseer actividad hialuronidasa, el mecanismo de DE podría involucrar una primera etapa de unión a AH seguida de una segunda etapa que involucre ya sea una acción no enzimática o una actividad enzimática hacia un sustrato diferente de AH. Estudios futuros apuntarán a identificar posibles sustratos para la proteína DE.

La presencia de matrices extracelulares ricas en AH ha sido correlacionada con un aumento de la migración de células durante la embriogénesis, la cicatrización y la invasión tumoral (Knudson & Knudson, 1993). Las evidencias indican que en esos procesos celulares existiría una expresión aumentada de proteínas que, al unirse a AH, inducirían respuestas intracelulares de locomoción (por ejemplo, RHAMM o “receptor for hyaluronan mediated motility”) (Hall & Turley, 1995; Savani et al, 1995), o actuarían directamente por adhesión a AH y posterior translocación (por ejemplo, CD44) (Isacke & Yarwood, 2002), para permitir a las células avanzar a través de las matrices. Si bien el espermatozoide se diferencia radicalmente de esas células por tratarse de una entidad mótil, la gran abundancia de AH, u otros GAGs con propiedades similares, tanto en la ZP como en la matriz del cúmulus (Dandekar et al, 1992); (Yudin et al, 1988); (Flechon et al, 2003), podría favorecer el avance de los espermatozoides durante su tránsito hacia el ovocito.

Existen dos hipótesis principales que podrían explicar el mecanismo a través del cual un espermatozoide es capaz de penetrar el cúmulus durante la fertilización (Bedford, 2004). Mientras que uno de los modelos plantea que la penetración del cúmulus sería un evento mecánico, mediado por la fuerza generada por la hiperactividad del espermatozoide, la hipótesis alternativa propone que el espermatozoide se abriría paso entre las células del cúmulus gracias a la existencia de la hialuronidasa, capaz de degradar a la matriz. El efecto de DE sobre la integridad del cúmulus sugiere que el espermatozoide podría contar con un mecanismo independiente de la hialuronidasa para disgregar la matriz del cúmulus, aunque no descarta que la motilidad pueda ser un componente adicional para la penetración del cúmulus.

Al igual que en la etapa de interacción con la ZP, recDE no presentó un efecto sobre la integridad del cúmulus ni fue capaz de unirse a la matriz extracelular. Los ensayos de desintegración del cúmulus en presencia de DE sometida a diferentes tratamientos indicaron que los hidratos de carbono no serían relevantes para la actividad de la proteína sobre el cúmulus, mientras que la conformación sería fundamental para dicha función.

Los estudios presentados en esta tesis indican que, así como la proteína DE no cumpliría un papel en la etapa de activación del ovocito, posterior a la de fusión, podría participar en etapas adicionales, previas a dicho evento, durante el proceso de interacción de gametas. Resultaría bastante improbable que DE participara en tres eventos de la fertilización mediante tres mecanismos moleculares independientes. Las evidencias provenientes de nuestros estudios indican que la proteína DE sería capaz de asociarse a AH y de afectar la integridad de la matriz del cúmulus. En cuanto al ligando para DE en la ZP y en el oolema, los mismos no han sido identificados aún. El análisis conjunto de las actividades detectadas para DE en fusión, interacción con la ZP, y disgregación del cúmulus, indica que existirían diferencias entre algunas características de la primera y las dos últimas actividades. La primera

observación que surge de los resultados es que, mientras que recDE tendría la capacidad de unirse a la superficie de los ovocitos de rata y ratón, y de inhibir el proceso de fusión en ambas especies, la proteína no tendría actividad en la etapa de interacción con la ZP o en la disgregación del cúmulus. Estudios recientes de nuestro laboratorio indicaron que el dominio activo en la molécula de DE para su actividad en la etapa de fusión estaría circunscripto a una región de 12 aminoácidos conteniendo a uno de las dos motivos consenso que caracterizan a la familia de proteínas CRISP, denominado "Signature 2" (resultados aún no publicados). Dicha región fue delimitada mediante la producción de fragmentos recombinantes y péptidos sintéticos de la proteína DE, y la evaluación de su capacidad para unirse a la superficie del ovocito y de inhibir el ensayo de fusión *in vitro* de rata. Los resultados de estos experimentos indicaron que una porción discreta, lineal, de la proteína DE sería suficiente para su actividad en la etapa de fusión de gametas, sugiriendo que la conformación de la proteína sólo contribuiría a la actividad de la proteína en esa etapa. Por ese motivo, recDE sería activa para inhibir la fusión, a pesar de tener una conformación defectuosa. Por el contrario, según se mencionara anteriormente, la conformación de DE parecería ser esencial tanto para la actividad de la proteína en la interacción con la ZP como sobre la integridad del cúmulus, explicando la ausencia de actividad de recDE en estas etapas. Cabe mencionar que la reciente utilización de fragmentos recombinantes de DE en ensayos preliminares de desintegración de cúmulus indicó que los mismos, al igual que recDE, carecían de actividad.

Mientras que la actividad de DE en fusión parece diferenciarse de las funciones anteriores de la proteína durante la fertilización, por el contrario, la existencia de un mecanismo común entre la actividad de DE sobre el cúmulus y sobre la ZP es una posibilidad a tener en cuenta. Al respecto, diferentes estudios en la bibliografía han determinado la presencia de AH y otros componentes de la matriz del cúmulus asociados a la ZP de varias especies, entre ellas el humano (Dandekar et al, 1992), el hámster (Yudin et al, 1988) y

el pocino (Flechon et al, 2003). Dichos componentes se encontrarían particularmente localizados en la superficie, tanto interna como externa, de la ZP y en los canalículos ocupados originalmente por proyecciones celulares de comunicación entre las células del cúmulus y el ovocito (Salustri et al, 1999; Flechon et al, 2003). Por otro lado, se ha determinado que la N-acetylglucosamina, carbohidrato responsable de la unión de los espermatozoides a la ZP, también correspondería a uno de los dos tipos de residuos glicosídicos que componen al AH (Hook et al, 1984). Por lo tanto, la similitud entre los componentes de la matriz extracelular de ovocito o ZP y la matriz de las células del cúmulus, podría dar lugar a una actividad común de DE durante la interacción de los espermatozoides con la ZP y el cúmulus.

La participación de DE en más de una etapa de la fertilización es uno más de los tantos casos de proteínas a las que se le han otorgado múltiples funciones. El ejemplo más llamativo al respecto es el de acrosina, proteína involucrada en cuatro funciones diferentes durante la fertilización, tales como la liberación de las proteínas de la matriz acrosomal, la unión secundaria y penetración de la ZP, y la adquisición de la fusogenicidad del SE (Yanagimachi, 1994). Como ejemplos adicionales de proteínas multifuncionales podría mencionarse a: i) PH-20, cuya actividad hialuronidasa estaría involucrada en la penetración del cúmulus, pero que además tendría la capacidad de unirse a ZP2 (Hunnicuttt et al, 1996), ii) galactosiltransferasa, la cual hidrolizaría residuos glicosídicos de la ZP, induciría la RZ mediada por ZP3 y, además, participaría en procesos de adhesión celular (Shur, 1993; Talbot et al, 2003) y iii) sp17, que, además de interactuar con las glicoproteínas de la ZP, se uniría a heparina en matrices extracelulares (Yamasaki et al, 1995; Wen et al, 2001).

Respecto de DE, la diferencia entre su mecanismo de acción en fusión y en las etapas previas de la fertilización podría estar relacionada a la localización diferente de la proteína en el espermatozoide durante esos eventos. Originalmente localizada en la región acrosomal de la membrana plasmática

del espermatozoide, DE se re-localiza al segmento ecuatorial, dominio involucrado en la fusión de gametas, previo a la reacción acrosomal. Podría postularse un modelo hipotético en el que DE, en su localización original, ejerciera una actividad conformación-dependiente en etapas previas a la inducción de la RA y que, concomitantemente con la RA, la proteína migrara al SE, exponiendo el dominio activo de interacción con el oolema, y participando de ese modo en la fusión de gametas. Resulta interesante mencionar que la Lic. Vanina Da Ros, miembro de nuestro laboratorio, ha desarrollado recientemente una línea de ratones KO para la proteína DE. En un futuro próximo se prevé comenzar con el análisis del fenotipo de estos animales, lo cual brindará información concluyente no sólo respecto de la relevancia de DE para la fertilidad de los animales, sino de la participación de la proteína en las distintas etapas de la fertilización.

La alta homología entre DE y la proteína testicular Tpx-1 sugirió posibles mecanismos o funciones comunes entre ambas proteínas. Por otra parte, la información existente sobre Tpx-1 en la bibliografía era escasa y controvertida en roedores, e inexistente en el humano, al comienzo de nuestros estudios. Dados los motivos anteriores, nos planteamos determinar la localización de Tpx-1 en el espermatozoide de humano y ratón, y su posible participación en la interacción de gametas.

Los estudios de inmunolocalización de Tpx-1, indicando que la permeabilización era requerida para la detección de la proteína en la región acrosomal de los espermatozoides humanos y de ratón, sugirieron que la proteína podría ser un componente intra-acrosomal en ambas especies. La presencia de una marca adicional, más débil, en la cola de los espermatozoides podría reflejar la detección de Tpx-1 en las fibras densas según fuera reportado anteriormente para la rata (O'Bryan et al, 1998; O'Bryan et al, 2001). Estudios complementarios en los que se analizó el comportamiento de Tpx-1 en los ensayos de extracción de proteínas,

respaldaron la localización de la proteína dentro de la vesícula acrosomal. El tratamiento de los espermatozoides con fuerza iónica fue incapaz de liberar a Tpx-1 de los espermatozoides, indicando la ausencia de una población de Tpx-1 asociada a la membrana del espermatozoide por interacciones iónicas. Por otro lado, dicho tratamiento descartó que la ausencia de marca para Tpx-1 en espermatozoides no permeabilizados, en los experimentos de inmunolocalización, se debiera a la presencia de moléculas que enmascararan a Tpx-1.

Si bien la extracción de Tpx-1 con soluciones conteniendo detergentes podía indicar que Tpx-1 se encontraba fuertemente unida a la membrana del espermatozoide, existían dos evidencias en contra de esa posibilidad. En conjunto, la ausencia de dominios hidrofóbicos en Tpx-1 (Kasahara et al, 1989) y los resultados obtenidos en la extracción con Tx-114 de espermatozoides de ratón indicaron la naturaleza hidrofílica de Tpx-1, descartando la posible inserción de la proteína en la membrana. Por otro lado, la abundancia de cisteínas en Tpx-1 abría la posibilidad de que la proteína estuviera asociada covalentemente a un componente de la membrana del espermatozoide mediante puentes disulfuro. Sin embargo, la remoción de la proteína en forma individual, y no formando parte de un complejo con otra proteína, no favorecería ese mecanismo de asociación. La localización intra-acrosomal de Tpx-1 en espermatozoides humanos y de ratón fue similar a la descrita anteriormente para la proteína en cobayo y rata por microscopía electrónica (Hardy et al, 1991; O'Bryan et al, 2001). Como todas las proteínas CRISP, Tpx-1 posee en su secuencia un péptido señal que sugiere su carácter secretorio (Kasahara et al, 1989). Se ha sugerido que dicho péptido podría ser el responsable de dirigir a la proteína al interior de la vesícula acrosomal durante la espermatogénesis (Mizuki et al, 1992). Mientras que no se ha detectado una población superficial de Tpx-1 en espermatozoides maduros, se ha postulado que Tpx-1 podría secretarse y re-asociarse a las células germinales, participando en su interacción con las células de Sertoli (Maeda et

al, 1998; Maeda et al, 1999). Si bien la localización de Tpx-1 en la superficie de las células espermatogénicas (Maeda et al, 1998) y el interior del acrosoma de los espermatozoides (nuestros resultados; (Hardy et al, 1991; O'Bryan et al, 2001)) resulta controvertida, esa diferencia también podría estar sugiriendo la participación de la proteína en funciones diferentes durante distintas etapas de la espermatogénesis.

Los ensayos de extracción de proteína utilizando espermatozoides de ratón indicaron que existía una correlación entre el contenido acrosomal y la proporción de proteína que permanecía asociada a los espermatozoides. Por otra parte, la liberación de Tpx-1 fue diferente en soluciones de pHs ácidos o básicos. Las primeras evidencias indicando una relación entre el pH y dicha matriz provinieron de estudios en los que se purificaba una fracción particulada del acrosoma de cobayo mediante una solución de pH ácido que era capaz de conservar su integridad (Huang, Jr. et al, 1985). Posteriormente, estudios de extracción de espermatozoides de esa misma especie con soluciones de diferentes pHs indicaron que, mientras los pHs ácidos mantenían a las proteínas del acrosoma asociadas a la matriz, los pHs neutros y básicos las disociaban de dicha estructura (Hardy et al, 1991). La permanencia de Tpx-1 asociada a los espermatozoides de ratón en condiciones de conservación de la integridad de la matriz sugiere que podría existir una población de Tpx-1 fuertemente asociada a esa fracción.

Solamente aquellas proteínas que no son liberadas durante la capacitación se encuentran presentes en los espermatozoides cuando los mismos alcanzan el oviducto e interactúan con el ovocito. Por ese motivo, previo a evaluar la participación de Tpx-1 en el proceso de fertilización, estudiamos el destino de Tpx-1 en los espermatozoides luego de la capacitación *in vitro* y la RA. Con ese fin, evaluamos en forma conjunta la localización de la proteína en espermatozoides frescos, capacitados, y tratados con ionóforo, y la ocurrencia de la RA en las tres poblaciones. Tanto en humano como en ratón se encontró

una correlación entre el porcentaje de espermatozoides con Tpx-1 localizada en el segmento ecuatorial y el porcentaje de espermatozoides reaccionados. En espermatozoides de ratón, Tpx-1 fue detectada sólo en la región anterior del segmento ecuatorial, y no en el dominio entero como en el humano. Este resultado fue llamativo, ya que generalmente las proteínas se encuentran ocupando dominios enteros del espermatozoide (Eddy & O'Brien, 1994). La detección de Tpx-1 en la región anterior del segmento ecuatorial podría estar reflejando una mayor concentración de la proteína en esa localización, lo cual podría tener relevancia fisiológica si se tiene en cuenta que la región anterior de la cabeza es la región a través de la cual los espermatozoides comienzan el contacto con el oolema durante la fusión (Phillips & Shalgi, 1982).

Se ha determinado que varias proteínas del espermatozoide sufrirían modificaciones post-transduccionales luego de la capacitación y la RA (Moos et al, 1993; Wen et al, 1999). La ausencia de diferencias en la movilidad electroforética de Tpx-1 en las poblaciones de espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados, tanto en ratón como humano, permitió descartar la existencia de un procesamiento de Tpx-1 durante los procesos de capacitación o RA.

La potencial relevancia de Tpx-1 durante la fertilización fue analizada mediante la realización de ensayos funcionales en los que se evaluó la capacidad de anti-TPX1 de afectar la interacción de espermatozoides humanos y de ratón con el ovocito. Dadas las implicancias éticas de realizar ensayos de fertilización in vitro utilizando ambas gametas humanas, la participación de TPX1 humana durante la fertilización fue analizada por el ensayo de fusión heterólogo denominado HOPT, que evalúa la capacidad de los espermatozoides humanos de fusionarse e incorporarse a ovocitos de hámster. En estos ensayos la ZP es removida de los ovocitos de hámster dado que, según se describiera en la introducción, dicha matriz es una de las barreras más eficientes para impedir la fertilización inter-específica. El

resultado del HOPT indicó que anti-TPX1 producía una inhibición significativa y específica sobre la capacidad de los espermatozoides humanos capacitados de penetrar a los ovocitos de hámster sin ZP. Dicha inhibición, en ausencia de efectos sobre otros parámetros espermáticos tales como la motilidad o la ocurrencia de la RA, sugirió que TPX1 se encontraría involucrada en el proceso de interacción espermatozoide-ovocito.

Adicionalmente, se analizó el efecto de anti-TPX1 en experimentos de fertilización *in vitro* de ratón. A diferencia del HOPT, en estos ensayos la interacción de espermatozoides con ovocitos de la misma especie tuvo como ventaja la utilización de ovocitos intactos (con ZP) y, como consecuencia, permitió un análisis de la participación de Tpx-1 en la fertilización en un sistema más completo. La presencia de anti-TPX1 produjo una inhibición de la fertilización en forma concomitante con una acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, indicando que Tpx-1 no estaría involucrada en la etapa de interacción con la ZP. Los resultados de estos ensayos, junto con los del HOPT, determinaron que tanto el bloqueo de la proteína humana como de la proteína de ratón, por anti-TPX1, resultaba en una inhibición de la interacción del espermatozoide con el oolema. Si bien el efecto inhibitorio del anticuerpo podría haber sido atribuido a la alta homología de Tpx-1 con las proteínas epididimarias ARP en espermatozoides humanos (58%) y DE en espermatozoides de ratón (67%), involucradas en el proceso de fusión de gametas (Cohen et al, 2000a; Cohen et al, 2001), el reconocimiento específico de Tpx-1, ARP y DE por sus respectivos anticuerpos excluyó dicha posibilidad.

El análisis de la participación de Tpx-1 en la interacción de gametas nos llevó a postular que Tpx-1 podría mediar la fusión de gametas uniéndose a sitios localizados en la superficie del ovocito, al igual que había sido determinado previamente para DE y ARP en roedores (Cohen et al, 2000a) y humano (Cohen et al, 2001), respectivamente. Nuestros estudios indicaron que, efectivamente, la proteína Tpx-1 recombinante era capaz de asociarse a la

superficie de los ovocitos, y no a la ZP, reflejando los resultados de los experimentos funcionales en los que anti-TPX1 inhibía la penetración de los ovocitos sin afectar la etapa previa de interacción con la ZP. Los sitios de unión para Tpx-1 se encontraron localizados en toda la superficie del ovocito con excepción de un área negativa que, en algunos ovocitos, coincidía con una región distendida del oolema, identificada como una región libre de microvellosidades y por la cual raramente ocurre la fusión (Longo, 1985). La asociación de Tpx-1 a la región fusogénica del oolema de ratón respaldó la participación de esta proteína en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito.

Una localización similar para los sitios de unión de DE y Tpx-1 en la superficie de los ovocitos de rata y ratón nos llevó a estudiar si cada proteína tenía un sitio de unión particular o si ambas proteínas del espermatozoide compartían un único sitio en el oolema. Los resultados de nuestros ensayos indicaron que DE y Tpx-1 competían por los sitios en el ovocito, en condiciones *in vitro*. Si bien estos resultados podrían deberse a la utilización de las proteínas en solución, lo cual tal vez no refleje la situación real de cada proteína sobre el espermatozoide en cuanto a cantidad, localización y afinidad por el sitio, también abren la posibilidad de que la unión de DE y Tpx-1 al mismo receptor tenga una relevancia fisiológica para la fusión. En este sentido la comparación de las secuencias de Tpx-1 y DE reveló que estas proteínas comparten 10 de los 12 aminoácidos del dominio en el que, según nuestros resultados, se encontraría el sitio activo de DE.

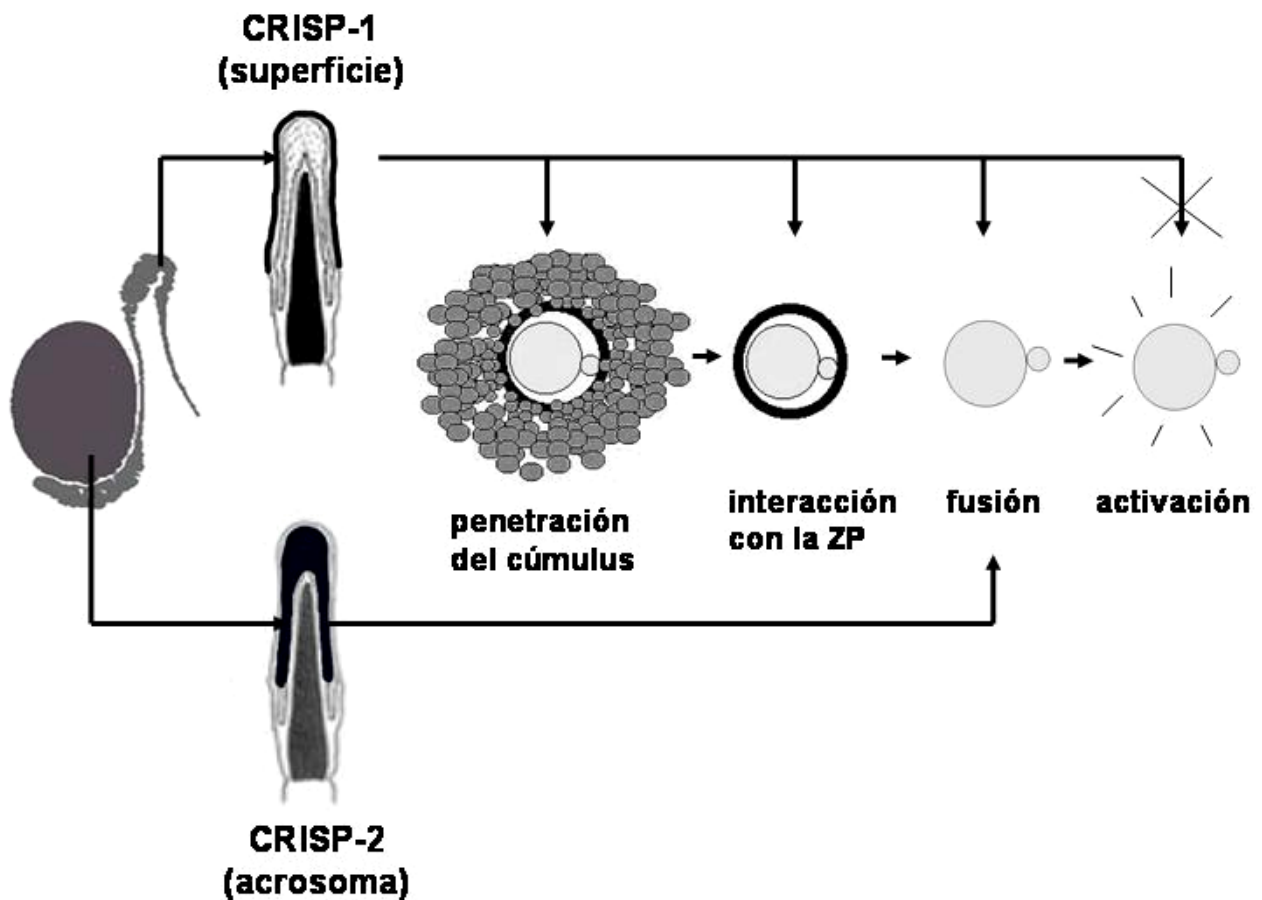
Teniendo en cuenta que Tpx-1 podría ser relevante para la fusión de gametas, podrían postularse varias hipótesis para explicar la localización de Tpx-1 en el SE de los espermatozoides reaccionados, tanto en humano como en ratón. Una primera posibilidad sería que Tpx-1 fuera liberada parcialmente de la vesícula acrosomal durante la RA, y que una población permaneciera en el “bolsillo” del acrosoma por dentro del SE luego de ese evento. Sin embargo, esa localización no sería consistente con el papel de la proteína en fusión,

sugerido por los ensayos funcionales. Como alternativa, Tpx-1 podría ser liberada del acrosoma, uniéndose posteriormente a la superficie del SE, la región de la membrana plasmática involucrada en fusión. Este mecanismo de liberación y posterior asociación con la superficie celular podría ser similar al que se sugirió para Tpx-1 en células espermatogénicas de rata (Maeda et al, 1999) y para acrosina, componente acrosomal detectado en la superficie del SE luego de la RA (Takano et al, 1993). Una tercera posibilidad sería que Tpx-1 alcanzara la superficie del SE por migración desde las membranas del acrosoma luego del establecimiento de la continuidad de membranas que tiene lugar durante la RA. Este mecanismo es poco probable, considerando la naturaleza hidrofílica de Tpx-1 y su posible asociación con la matriz acrosomal. La realización de estudios de microscopía electrónica permitirá obtener la información necesaria para discriminar entre los posibles mecanismos descritos.

Diferentes evidencias indican que los espermatozoides con acrosomas intactos pueden unirse pero no fusionarse con la membrana plasmática del ovocito, sugiriendo que componentes claves para la fusogenicidad del espermatozoide estarían ausentes o inactivos previo a la RA (Arts et al, 1997; Yanagimachi, 1988b; Arts et al, 1993). Como ejemplo, tanto la liberación de acrosina como de metaloproteasas acrosomales han demostrado ser esenciales para el desarrollo de la fusogenicidad del SE en espermatozoides de hámster (Diaz-Perez et al, 1988; Diaz-Perez & Meizel, 1992; Takano et al, 1993). Al igual que en el caso de esas proteínas, Tpx-1 podría corresponder a un componente del acrosoma liberado durante la RA e involucrado en la adquisición de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Resulta interesante plantear un modelo hipotético en el que DE y Tpx-1 se encontraran involucradas en otorgar la fusogenicidad al SE. En este modelo, DE podría ser translocada al SE previo a la RA, mientras que Tpx-1 sólo se asociaría a dicho dominio posteriormente a la ocurrencia de la RA, siendo la presencia de ambas proteínas en el SE un requisito para la fusión.

Al igual que DE y Tpx-1, existen otros ejemplos de moléculas homólogas y/o de la misma familia cumpliendo funciones en una misma etapa de la fertilización. Uno de los casos más similares es el de las dos proteínas testiculares de la familia ADAM, fertilina y ciritestina, presentes en la superficie de los espermatozoides, ambas involucradas en la interacción con la ZP (Nishimura et al, 2001). Un segundo ejemplo sería el de CD9 y CD81, proteínas pertenecientes a la familia de las tetraspaninas, presentes en el oolema, con una función en el proceso de fusión de gametas (Kaji et al, 2002). Ejemplos interesantes de funciones similares en moléculas homólogas también provienen del análisis de animales KO, en los cuales la ausencia de una determinada proteína no resulta en un fenotipo deficiente debido a la existencia de moléculas compensatorias de la función de la proteína ausente. Esta situación fue observada en los ratones KO para PH-20 en los cuales la fertilidad no se vio afectada, debido a la expresión de otras proteínas con actividad hialuronidasa que, de acuerdo a lo sugerido por los autores del trabajo, podrían compensar la ausencia de PH-20 (Baba et al, 2002). Un caso interesante de redundancia funcional de proteínas homólogas es el de las proteínas de transición (Transcription Proteins) TP-1 y TP-2, que participan en la compactación del núcleo de la espermátide durante el proceso de transición entre la asociación de histonas y protaminas al DNA (Shirley et al, 2004). Tanto los animales KO para TP-1 como para TP-2 son fértiles debido a que, en ausencia de una de las TP, la otra es capaz de compensar su función. Resulta interesante mencionar la reciente identificación de dos nuevos miembros de la familia CRISP en el tracto reproductor masculino que también podrían colaborar con CRISP-1 y CRISP-2 en la función del espermatozoide. Estas son las proteínas epididimarias MAK248 de mono, detectada en la superficie de los espermatozoides mediante la utilización de sueros de monos inmunizados con proteínas espermáticas liberadas por PLC (Yudin et al, 2002), y CRISP-4 de ratón, cuya asociación al espermatozoide aún no ha sido estudiada (Jalkanen et al, 2005).

El conjunto de las evidencias experimentales presentadas en esta tesis sugiere que una proteína de la familia CRISP (CRISP-1) podría participar en más de una etapa de la fertilización (penetración del cúmulus, ZP, fusión) y que, al mismo tiempo, más de una CRISP (CRISP-1 y CRISP-2) podrían estar involucradas en un mismo evento (fusión) (**ver esquema**).



La información brindada por estos estudios es coherente con evidencias recientes indicando que la fertilización involucraría numerosas moléculas cumpliendo funciones en las diferentes etapas. Si bien este modelo puede resultar un tanto complejo, se ha postulado que los espermatozoides podrían utilizar esos mecanismos de redundancia funcional de moléculas para

asegurar el éxito de la fertilización. Esta hipótesis tiene especial sentido si se tiene en cuenta que la ausencia de citoplasma en las células germinales del testículo, a partir del estadio de espermátide elongada, tiene como consecuencia que los espermatozoides carezcan de maquinaria de síntesis de proteínas. Al verse impedidos de regular sus funciones modificando la expresión de proteínas, es posible que los espermatozoides hayan adoptado evolutivamente un sistema que les permita aprovechar mejor sus recursos, utilizando cada una de sus moléculas para más de un evento, y al mismo tiempo asegurar los diferentes eventos de la fertilización, contando con más de una molécula para cada función.

Según se describiera en la introducción de esta tesis, uno de los objetivos de nuestro laboratorio es la utilización de los conocimientos brindados por la biología molecular de las gametas para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad. Como se describirá a continuación, la implementación de dichos métodos podría ser de utilidad para el control de la natalidad tanto en la especie humana como en poblaciones de animales que pudieran ser perjudiciales para los ecosistemas o la salud del hombre.

Uno de los mayores desafíos del siglo XX ha sido intentar controlar el crecimiento poblacional desenfrenado de la especie humana, dado los potenciales efectos negativos del mismo sobre el desarrollo económico y cultural de los pueblos. Los datos estadísticos indican que en el año 2002 el tamaño de la población mundial triplicaba la de los comienzos del siglo XX y duplicaba la que existía en 1960. Se ha determinado que la prevalencia y la continuidad en el uso de anticonceptivos están directamente relacionados con el número de métodos disponibles (Griffin, 1996). La eficiencia, la reversibilidad, los efectos no deseados y la disponibilidad de cada uno de esos sistemas de anticoncepción son variables, por lo que muchas veces llevan a la insatisfacción y a la discontinuidad en el uso. En la actualidad, la anticoncepción masculina se encuentra limitada básicamente a la utilización

del condón, ya que si bien la vasectomía es una opción, no siempre resulta en un método reversible. Por todos esos motivos, resulta importante desarrollar nuevas estrategias de anticoncepción, que puedan sumarse a las opciones existentes.

El desarrollo de un anticonceptivo basado en la inhibición de la capacidad fertilizante de las gametas es una opción sumamente interesante, la cual ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. Un método basado en el bloqueo de proteínas del ovocito sería muy difícil de desarrollar, teniendo en cuenta la escasa información existente sobre la composición molecular del ovocito, y además sería aplicable sólo a la anticoncepción femenina. Contrariamente, el desarrollo de un método de bloqueo de la función espermática podría ser más factible y, además, útil tanto para la anticoncepción en el hombre como en la mujer. La inhibición de la capacidad fertilizante del espermatozoide podría lograrse mediante la inhibición de la síntesis o de la función de proteínas relevantes para la fertilización. Esta última posibilidad se encuentra respaldada por los resultados de estudios indicando que la inmunización de animales con proteínas específicas del espermatozoide genera anticuerpos que son inocuos para el individuo, pero que pueden afectar su fertilidad (Naz & Menge, 1990; O'Rand et al, 1993; Bérubé & Sullivan, 1994; Zhang et al, 1997; Naz, 1999).

Evidencias de nuestro laboratorio indicaron que la inmunización de animales con proteínas del espermatozoide permitiría regular la fertilidad. Nuestros experimentos indicaron que la inmunización de ratas con DE era capaz de producir anticuerpos específicos contra la proteína y de inhibir significativamente la fertilidad tanto en machos como en hembras (Cuasnicú et al, 1990; Perez Martinez et al, 1995). Hace ya varios años, la existencia de la proteína epididimaria humana ARP asociada al espermatozoide humano, y su participación en la etapa fusión de gametas, sugirieron que ARP podría ser el homólogo funcional de la proteína DE (Cohen et al, 2001). La relevancia de

ARP para el proceso de fertilización, y los resultados de nuestros estudios previos de inmunización con DE, nos llevaron a considerar si ARP podía ser un buen candidato para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva humana. La presencia de ARP en la superficie del espermatozoide permitiría que la proteína fuera accesible a anticuerpos producidos en el hombre, sugiriendo que la misma cumpliría con uno de los requisitos fundamentales de un inmunógeno para el desarrollo de una vacuna anticonceptiva masculina. Como se mencionara anteriormente, este proyecto tenía una especial importancia dada la escasez de métodos anticonceptivos para el hombre. Recientemente, nuestro laboratorio comenzó un proyecto de inmunización de primates no humanos con la proteína ARP, en colaboración con los Dres Myles y Primakoff de la Universidad de California, Davis, y el Centro de Primates Regional de California. Hasta el momento, los resultados de estos estudios han sido favorables, ya que la proteína ARP fue capaz de inducir una respuesta inmune significativa y reversible en monos sin afectar ninguno de los parámetros seminales estudiados. La continuación de ese proyecto tendrá como objetivo estudiar si la generación de anticuerpos contra ARP por inmunización de primates se ve reflejada en una inhibición de la fertilidad de los animales. Los resultados de esta tesis indicando que DE participaría en más de una etapa de la interacción de gametas apoyan la utilización del homólogo humano de esta proteína, ARP, como posible inmunógeno para el desarrollo de un método anticonceptivo. En este sentido, la inhibición de eventos sucesivos durante la fertilización, por el bloqueo de una única proteína, podría resultar en una anticoncepción más eficiente que la inhibición de un único evento.

La relevancia de Tpx-1 para la fertilización en humano, sugerida por los resultados presentados en esta tesis, se encuentra respaldada por estudios demostrando una relación entre defectos en el gen de *tpx-1* y algunos casos de infertilidad masculina (Olesen et al, 2001). Se ha sugerido que la utilización de “cocktails” de moléculas espermáticas relevantes para la fertilización podría brindar resultados superiores a los de la inmunización con un solo antígeno

(Frayne & Hall, 1999). En este sentido, la utilización de Tpx-1 como inmunógeno sería de utilidad únicamente en el caso de un anticonceptivo femenino, dado que la localización intra-acrosomal de la proteína permitiría que los anticuerpos accedan sólo luego de la RA, durante la fertilización en el oviducto. La posible redundancia funcional entre CRISP-1/DE y CRISP-2/Tpx-1, y la alta homología entre el sitio activo de DE (Signature 2) y la región homóloga en la molécula de Tpx-1, podrían ser de gran utilidad a la hora de aumentar la eficiencia de un método de regulación de la fertilidad, ya que podrían utilizarse anticuerpos o inhibidores comunes a ambas moléculas para inhibir una única función espermática. Resulta interesante mencionar que existe un modelo natural de ratones infértiles producido por la ocurrencia de eventos de translocación en una región del cromosoma 17 (“complejo t”) (Olds-Clarke, 1997) en la que, entre otros, se encontrarían los genes codificando para ambas CRISPs (Redkar et al, 2001). Para evaluar la posible utilización de Tpx-1 como blanco para el desarrollo de un anticonceptivo, nuestro laboratorio se encuentra actualmente diseñando ensayos piloto de inmunización en roedores en los cuales se utilizará como inmunógeno a Tpx-1. En esos experimentos la proteína será inyectada tanto en forma aislada, como en un “cocktail de inmunización” conteniendo a Tpx-1 y DE.

Además de la posible aplicación en el humano, el desarrollo de nuevos métodos anticonceptivos también podría ser de utilidad para controlar la natalidad de animales domésticos, y para regular el crecimiento de la población de animales salvajes que pudiera tener consecuencias perjudiciales para la economía o la salud. Recientemente, el laboratorio ha establecido una colaboración con el Dr. Lencina, Director del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, cuyo objeto será comenzar los estudios para el desarrollo de un método para el control de la fertilidad en perros. Dicho anticonceptivo, basado en la identificación de los homólogos para CRISP-1 y CRISP-2 en perros, permitiría combatir el crecimiento de las poblaciones de perros que circulan libremente en las áreas urbanas, posibles reservorios de la rabia.

En resumen, numerosos experimentos previos de nuestro laboratorio indicaban que la proteína epididimaria DE/CRISP-1 participaba en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios en el ovocito. Sin embargo, la identidad de la molécula receptora para DE era una gran incógnita. Los numerosos experimentos bioquímicos realizados en esta tesis revelaron la necesidad de implementar tecnologías alternativas para identificar al receptor de DE, al igual que ocurriera con la identificación del receptor del espermatozoide en el ovocito de invertebrados (Foltz & Lennarz, 1992a; Swanson & Vacquier, 1997). Si bien la participación de DE en fusión sugirió que la proteína podía estar involucrada en el proceso de activación del ovocito, nuestros estudios indicaron que DE no cumpliría una función en etapas posteriores a la fusión. Contrariamente, los resultados de esta tesis indicaron que DE podría estar involucrada en etapas previas de la fertilización, tales como la penetración del cúmulus y la interacción con la ZP. Asimismo, hemos observado que, además de DE, una proteína testicular, perteneciente a la misma familia, denominada Tpx-1/CRISP-2 (Kasahara et al, 1989) también participaría en la fusión de gametas. Por lo tanto, mientras que una proteína del espermatozoide podría participar en varias etapas de la fertilización, también podría existir una redundancia funcional de moléculas espermáticas en una misma etapa. En conjunto, los resultados de esta tesis han contribuido a los conocimientos sobre la biología molecular de la interacción de gametas, aportando además información relevante para el desarrollo de potenciales métodos anticonceptivos de aplicación tanto en el ser humano como en animales.

Bibliografía

-
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. Germ cells and fertilization. *Molecular biology of the cell*. 3rd. 1032-1033 (1994)
- Alfieri, JA, Martin, AD, Takeda, J, Kondoh, G, Myles, DG, and Primakoff, P. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *J.Cell Sci.* 116: 2149-2155 (2003).
- Almeida, EAC, Huovila, A-PJ, Sutherland, AE, Stephens, LE, Calarco, PG, Shaw, LM, Mercurio, AM, Sonnenberg, A, Primakoff, P, Myles, DG, and White, JM. Mouse egg integrin $\alpha 6\beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell* 81: 1095-1104 (1995).
- Arts, EGJM, Kuiken, J, Jager, S, and Hoekstra, D. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa- -Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur.J.Biochem.* 217: 1001-1009 (1993).
- Arts, EGJM, Wijchman, JG, Jager, S, and Hoekstra, D. Protein involvement in the fusion between the equatorial segment of acrosome-reacted human spermatozoa and liposomes. *Biochem.J.* 325: 191-198 (1997).
- Austin, CR. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res [B]* 4: 581-596 (1951).
- Austin, CR. The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 170: 326-1952).
- Austin, C.R. Sperm maturation in the male and female genital tracts. *Biology of Fertilization*, Vol.2. 121-155 (1985)
- Austin, CR and Short F.R.S. *Germ Cells and Fertilization*. 1982: 1972).
- Baba, D, Kashiwabara, S, Honda, A, Yamagata, K, Wu, Q, Ikawa, M, Okabe, M, and Baba, T. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. *J.Biol.Chem.* 277: 30310-30314 (2002).
- Bedford, J.M. Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. *The Spermatozoon*. 7-21 (1979)
- Bedford, JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol.Reprod.* 28: 108-120 (1983).
- Bedford, JM. Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.* 79: 429-460 (2004).
- Bedford, JM and Kim, HH. Cumulus oophorus as a sperm sequestering device, in vivo. *J.Exp.Zool.* 265: 321-328 (1993).
- Bedford, JM, Moore, HDM, and Franklin, LE. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp.Cell Res.* 119: 119-126 (1979).
- Ben Yosef, D and Shalgi, R. Early ionic events in activation of the mammalian egg. *Rev.Reprod.* 3: 96-103 (1998).

-
- Berger, T, Turner, KO, Meizel, S, and Hedrick, JL. Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol.Reprod.* 40: 525-530 (1988).
- Bérubé, B and Sullivan, R. Inhibition of in vivo fertilization by active immunization of male hamsters against a 26-kDa sperm glycoprotein. *Biol.Reprod.* 51: 1255-1263 (1994).
- Biggers, JD, Whitten, WK, and Whittingham, DG. *Methods in mammalian embryology*, Ed. JC Daniel, Freeman, San Francisco. . 86-116 (1971).
- Bigler, D, Chen, M, Waters, S, and White, JM. A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. *Trends Cell Biol.* 7: 220-225 (1997).
- Bigler, D, Takahashi, Y, Chen, MS, Almeida, EA, Osbourne, L, and White, JM. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. *J.Biol.Chem.*2000.Apr.21;275(16):11576-84. 275: 11576-11584 (2000).
- Blackmore, PF. Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca^{2+} influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell.Signal.* 5: 531-538 (1993).
- Blaquier, JA, Cameo, MS, and Burgos, MH. The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea pig. *Endocrinology* 90: 839-842 (1973).
- Bleil, JD and Wassarman, PM. 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 (1983).
- Bleil, JD and Wassarman, PM. Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87: 5563-5567 (1990).
- Blobel, CP, Wolfsberg, TG, Turck, CW, Myles, DG, Primakoff, P, and White, JM. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature.* 356: 248-252 (1992).
- Boatman, DE and Robbins, RS. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol.Reprod.* 44: 806-813 (1991).
- Boldt, J, Gunter, LE, and Howe, AM. Characterization of cell surface polypeptides of unfertilized, fertilized, and protease-treated zona-free mouse eggs. *Gam.Res.* 23: 91-101 (1989a).
- Boldt, J, Howe, AM, Parkerson, JB, Gunter, LE, and Kuehn, E. Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. *Biol.Reprod.* 40: 887-896 (1989b).
- Boldt, J, Howe, AM, and Preble, J. Enzymatic alteration of the ability of mouse egg plasma membrane to interact with sperm. *Biol.Reprod.* 39: 19-27 (1988).

-
- Brooks, DE, Means, AR, Wright, EJ, Singh, SP, and Tiver, KK. Molecular cloning of the cDNA for androgen-dependent sperm-coating glycoproteins secreted by the rat epididymis. *Eur.J.Biochem.* 161: 13-18 (1986).
- Burkman, LJ, Coddington, CC, Franken, DR, Krugen, TF, Rosenwaks, Z, and Hogen, GD. The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil.Steril.* 49: 688-697 (1988).
- Cameo, MS and Blaquier, JA. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J.Endocr.* 69: 317-324 (1976).
- Campbell, KD, Reed, WA, and White, KL. Ability of integrins to mediate fertilization, intracellular calcium release, and parthenogenetic development in bovine oocytes. *Biol.Reprod.* 62: 1702-1709 (2000).
- Castle, PE. Could multiple low-affinity bonds mediate primary sperm-zona pellucida binding? *Reproduction.* 124: 29-32 (2002).
- Chang, MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698 (1951).
- Charest, NJ, Joseph, DR, Wilson, EM, and French, FS. Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acid for an androgen-regulated epididymal protein: sequence homology with metalloproteins. *Mol.Endo.* 2: 999-1004 (1988).
- Chen, L, Mao, SJT, McLean, LR, Powers, RW, and Larsen, WJ. Proteins of the inter-Alpha-trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. *J.Biol.Chem.* 269: 28282-28287 (1994).
- Chen, MS, Tung, KS, Coonrod, SA, Takahashi, Y, Bigler, D, Chang, A, Yamashita, Y, Kincade, PW, Herr, JC, and White, JM. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 11830-11835 (1999a).
- Chen, MS, Tung, KS, Coonrod, SA, Takahashi, Y, Bigler, D, Chang, A, Yamashita, Y, Kincade, PW, Herr, JC, and White, JM. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96: 11830-11835 (1999b).
- Cherr, GN, Lambert, H, Meizel, S, and Katz, DF. In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous solubilized zona. *Dev.Biol.* 114: 119-131 (1986).
- Cherr, GN, Meyers, SA, Yudin, AI, Vandevort, CA, Myles, DG, Primakoff, P, and Overstreet, JW. The PH-20 protein in cynomolgus macaque spermatozoa: Identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. *Dev.Biol.* 175: 142-153 (1996).

- Chevrier, C and Dacheux, J-L. Evolution of the flagellar waveform of ram spermatozoa in relation to the degree of epididymal maturation. *Cell Motil.Cytoskeleton* 23: 8-18 (1992).
- Cho, C, Bunch, DO, Faure, JE, Goulding, EH, Eddy, EM, Primakoff, P, and Myles, DG. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. *Science* 281: 1857-1859 (1998).
- Cho, C, Ge, H, Branciforte, D, Primakoff, P, and Myles, DG. 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 (2000).
- Cohen, DJ. Redistribución de una proteína del espermatozoide y su participación en el proceso de fusión con el ovocito. 1-69 (1992).
- Cohen, DJ, Busso, D, Dematteis, A, Da Ros, VG, and Cuasnicú, PS. Participación de la proteína epididimaria DE en la etapa de interacción espermatozoide-zona pellucida. XVIII Reunión Bial de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH).Varadero, Cuba.Mayo, 2003. 2003).
- Cohen, DJ, Ellerman, DA, Busso, D, Morgenfeld, M, Piazza, A, Hayashi, M, Young, ET, Kasahara, M, and Cuasnicu, PS. Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. *Biol.Reprod.* 65: 1000-1005 (2001).
- Cohen, DJ, Ellerman, DA, and Cuasnicú, PS. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol.Reprod.* 63: 462-468 (2000a).
- Cohen, DJ, Muncue, MJ, and Cuasnicú, PS. 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 (1996).
- Cohen, DJ, Rochwerger, L, Ellerman, DA, Morgenfeld, M, Busso, D, and Cuasnicu, PS. 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 (2000b).
- Cohen, N and Wassarman, PM. Association of egg zona pellucida glycoprotein mZP3 with sperm protein sp56 during fertilization in mice. *Int.J.Dev.Biol.* 45: 569-576 (2001).
- Connelly, TJ and Coronado, R. Activation of the Ca²⁺ binding and regulatory site in the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) for rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 81: 459-469 (1994).
- Coonrod, S, Naaby-Hansen, S, Shetty, J, and Herr, J. 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. (1999a).

- Coonrod, SA, Naaby-Hansen, S, Shetty, J, Shibahara, H, Chen, M, White, JM, and Herr, JC. Treatment of mouse oocytes with PI-PLC releases 70-kDa (pI 5) and 35- to 45-kDa (pI 5.5) protein clusters from the egg surface and inhibits sperm-oolemma binding and fusion. *Dev.Biol.* 207: 334-349 (1999b).
- Coonrod, SA, Wright, PW, and Herr, JC. Oolemmal proteomics. *J.Reprod.Immunol.* 53: 55-65 (2002).
- Cooper, TG. The epididymis, sperm maturation and fertilization. 1986).
- Córdoba, M, Santa-Coloma, TA, Beorlegui, NB, and Beconi, MT. Intracellular calcium variation in heparin-capacitated bovine sperm. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 41: 725-733 (1997).
- Crosby, JA, Jones, R, Barros, C, and Carvallo, P. Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. *Mol.Reprod.Dev.* 49: 426-434 (1998).
- Cross, NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol.Reprod.* 59: 7-11 (1998).
- Cross, NL, Morales, P, Overstreet, JW, and Hanson, FW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gam.Res.* 15: 213-226 (1986).
- Cross, NL, Morales, P, Overstreet, JW, and Hanson, FW. Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol.Reprod.* 38: 235-244 (1988).
- Cuasnicú, P.S., Cohen, D.J., Ellerman, D.A., Busso, D., Da Ros, V.G., and Morgenfeld, M. Changes in sperm proteins during epididymal maturation. *The Epididymis. From Molecules to Clinical Practice.* 389-404 (2002)
- Cuasnicú, P.S., Conesa, D., and Rochwerger, L. Potential contraceptive use of an epididymal protein that participates in fertilization. *Gamete interaction. Prospects for immunocontraception.* 143-153 (1990)
- Cuasnicu, PS, Ellerman, DA, Cohen, DJ, Busso, D, Morgenfeld, MM, and Da Ros, VG. Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Arch.Med.Res.* 32: 614-618 (2001).
- Cuasnicu, PS, Gonzalez Echeverria, F, Piazza, A, and Blaquier, JA. Antibody against epididymal glycoprotein blocks fertilizing ability in rats. *J.Reprod.Fertil.* 72: 467-471 (1984).
- Da Ros, VG, Munuce, MJ, Cohen, DJ, Marin-Briggiler, CI, Busso, D, Visconti, PE, and Cuasnicu, PS. Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. *Biol.Reprod.* 70: 1325-1332 (2004).
- Dandekar, P, Aggeler, J, and Talbot, P. Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Hum.Reprod.* 7: 391-398 (1992).

- Dandekar, P and Talbot, P. Perivitelline space of mammalian oocytes: Extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Mol.Reprod.Dev.* 31: 135-143 (1992).
- Daniel, TO, Schneider, WJ, Goldstein, JL, and Brown, MS. Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting. *J.Biol.Chem.* 258: 4606-4611 (1983).
- DasGupta, S, Mills, CL, and Fraser, LR. Ca^{2+} -related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlortetracycline fluorescence assay. *J.Reprod.Fertil.* 99: 135-143 (1993).
- Diaz-Perez, E and Meizel, S. Importance of mammalian sperm metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: Inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. *Mol.Reprod.Dev.* 31: 122-130 (1992).
- Diaz-Perez, E, Thomas, P, and Meizel, S. Evidence suggesting a role for sperm metalloendoprotease activity in penetration of zona-free hamster eggs by human sperm. *J.Exp.Zool.* 248: 213-221 (1988).
- Dorak, MT. Evolution of Sexual Reproduction. World Wide Web 2004).
- Dorfman, A. Mucopolysaccharidases. *Methods Enzymol.* 1: 166-173 (1955).
- Dorval, V, Dufour, M, and Leclerc, P. Regulation of the phosphotyrosine content of human sperm proteins by intracellular Ca^{2+} : role of Ca^{2+} -adenosine triphosphatases. *Biol.Reprod.* 67: 1538-1545 (2002).
- Ducibella, T. Mammalian egg cortical granules and cortical reaction. Elements of mammalian fertilization. Volume 1. Basic concepts. 205-231 (1991)
- Ducibella, T, Duffy, P, and Buetow, J. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. *Biol.Reprod.* 50: 467-473 (1994).
- Ducibella, T, Kurasawa, S, Duffy, P, Kopf, GS, and Schultz, RM. Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: Maturation- dependent differences in cortical granule exocytosis and *Zona pellucida* modifications induced by inositol 1,4,5- trisphosphate and an activator of protein kinase C. *Biol.Reprod.* 48: 1251-1257 (1993).
- Dyson, AL and Orgebin-Crist, MC. Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology* 93: 391-395 (1973).
- Eddy, E.M. and O'Brien, D.A. The spermatozoon. *The Physiology of Reproduction.* 2. 29-78 (1994)
- Ellerman, DA, Brantua, VS, Martinez, SP, Cohen, DJ, Conesa, D, and Cuasnicu, PS. Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. *Biol.Reprod.* 59: 1029-1036 (1998a).

-
- Ellerman, DA, Cohen, DJ, Werbahj, S, Dematteis, A, and Cuasnicu, PS. Cloning and expression of epididymal protein DE, and biological activity of the recombinant protein. Proc.of the 8th International Symposium on Spermatology 87-1998b).
- Ellerman, DA, Da Ros, VG, Busso, D, Morgenfeld, M, Tollner, T, Overstreet, JW, and Cuasnicu, PS. Relevancia de la proteína epididimaria "ARP" para la fertilidad humana: estudios de inmunización en primates no humanos. Revista Cubana de Salud Pública.XI Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana. 29: 28-2003a).
- Ellerman, DA, Da Ros, VG, Cohen, DJ, Busso, D, Morgenfeld, MM, and Cuasnicu, PS. Expression and structure-function analysis of DE, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. Biol.Reprod. 67: 1225-1231 (2002).
- Ellerman, DA, Ha, C, Primakoff, P, Myles, DG, and Dveksler, GS. Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. Mol.Biol.Cell 14: 5098-5103 (2003b).
- Ensslin, M, Vogel, T, Calvete, JJ, Thole, HH, Schmidtke, J, Matsuda, T, and Topfer-Petersen, E. Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar sperm-associated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. Biol.Reprod. 58: 1057-1064 (1998).
- Ensslin, MA and Shur, BD. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. Cell 114: 405-417 (2003).
- Eppig, JJ. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. Nature 281: 483-484 (1979).
- Evans, JP. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. Front.Biosci. 4: D114-31 (1999).
- Fayrer-Hosken, RA and Brackett, BG. Use of salt-stored zonae pellucidae for assessing rabbit sperm capacitation for in vitro fertilization. Gamete Res. 17: 191-201 (1987).
- Fernandez, C, Szyperski, T, Bruyere, T, Ramage, P, Mosinger, E, and Wuthrich, K. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. J.Mol.Biol. 266: 576-93. (1997).
- Flaherty, SP and Swann, NJ. Biotinylation of proteins on the surface of zona-free mouse oocytes. Mol.Reprod.Dev. 35: 285-292 (1993).
- Flechon, JE, Degrouard, J, Kopecný, V, Pivko, J, Pavlok, A, and Motlik, J. The extracellular matrix of porcine mature oocytes: origin, composition and presumptive roles. Reprod.Biol.Endocrinol. 1: 124-2003).

-
- Florman, HM and First, NL. The regulation of acrosomal exocytosis.I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida *in vitro*. Dev.Biol. 128: 453-463 (1988).
- Florman, HM and Storey, BT. Mouse gamete interactions. The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. Dev.Biol. 91: 121-130 (1982).
- Foltz, KR and Lennarz, WJ. Identification of the sea urchin egg receptor for sperm using an antiserum raised against a fragment of its extracellular domain. J.Cell.Biol. 116: 647-658 (1992a).
- Foltz, KR and Lennarz, WJ. Identification of the sea urchin egg receptor for sperm using an antiserum raised against a fragment of its extracellular domain. J.Cell Biol. 116: 647-658 (1992b).
- Foltz, KR and Schilling, FM. Receptor-mediated signal transduction and egg activation. Zygote 1: 276-279 (1993).
- Foster, JA, Friday, BB, Maulit, MT, Blobel, C, Winfrey, VP, Olson, GE, Kim, KS, and Gerton, GL. AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. J.Biol.Chem. 272: 12714-12722 (1997).
- Foster, JA and Gerton, GL. 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 (1996).
- Fournier-Delpech, S, Hamamah, S, Tananis-Anthony, C, Courot, M, and Orgebin-Crist, MC. Hormonal regulation of zona-binding ability and fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. Gam.Res. 9: 21-30 (1984).
- Fraser, LR and Drury, LM. The relationship between sperm concentration and fertilization *in vitro* of mouse eggs. Biol.Reprod. 13: 513-518 (1975).
- Fraser, LR, Harrison, RAP, and Herod, JE. Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. J.Reprod.Fertil. 89: 135-148 (1990).
- Frayne, J and Hall, L. The potential use of sperm antigens as targets for immunocontraception; past, present and future. J.Reprod.Immunol. 43: 1-33 (1999).
- Freeman, B. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. Reproduction 125: 635-643 (2003).
- Fujimoto, S, Yoshida, N, Fukui, T, Amanai, M, Isobe, T, Itagaki, C, Izumi, T, and Perry, AC. Mammalian phospholipase Czeta induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. Dev.Biol. 274: 370-383 (2004).

-
- Furlong, LI, Hellman, U, Krimer, A, Tezon, JG, Charreau, EH, and Vazquez-Levin, MH. Expression of human proacrosin in *Escherichia coli* and binding to zona pellucida. *Biol.Reprod.* 62: 606-615 (2000).
- Furnus, CC, Valcarcel, A, Dulout, FN, and Errecalde, AL. The hyaluronic acid receptor (CD44) is expressed in bovine oocytes and early stage embryos. *Theriogenology* 60: 1633-1644 (2003).
- Fusi, FM, Vignali, M, Busacca, M, and Bronson, RA. Evidence for the presence of an integrin cell adhesion receptor on the oolemma of unfertilized human oocytes. *Mol.Reprod.Dev.* 31: 215-222 (1992).
- Gaddum-Rosse, P. Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs? *Am.J.Anat.* 174: 347-356 (1985).
- Garberi, JC, Fontana, JD, and Blaquier, JA. Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. *Int.J.Androl.* 5: 619-626 (1982).
- Garberi, JC, Kohane, AC, Cameo, MS, and Blaquier, JA. Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. *Mol.Cell.Endocrinol.* 13: 73-82 (1979).
- Girija Devi, L and Shivaji, S. Computerized analysis of the motility parameters of hamster spermatozoa during maturation. *Mol.Reprod.Dev.* 38: 94-106 (1994).
- Glabe, CG and Vacquier, VD. Egg surface glycoprotein receptor for sea urchin sperm bindin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 75: 881-885 (1978).
- Gmachl, M and Kreil, G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90: 3569-3573 (1993).
- Gmachl, M, Sagan, S, Ketter, S, and Kreil, G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett.* 336: 545-548 (1993).
- Go, KJ and Wolf, DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol.Reprod.* 32: 145-153 (1985).
- Gong, XH, Dubois, DH, Miller, DJ, and Shur, BD. Activation of a G protein complex by aggregation of β -1, 4-galactosyltransferase on the surface of sperm. *Science* 269: 1718-1721 (1995).
- Gougoulidis, T, Trounson, A, and Dowsing, A. Inhibition of bovine sperm-oocyte fusion by the carbohydrate GalNAc. *Mol.Reprod.Dev.* 54: 179-185. (1999).
- Green, DPL. The induction of the acrosome reaction in guinea pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. *J.Cell Sci.* 32: 137-151 (1978).
- Griffin, D. The immunoregulation of fertility: changes in perspectives. *Am.J.Reprod.Immunol.* 35: 140-147 (1996).
- Gwatkin, RBL. *Fertilization Mechanisms in Man and Mammals.* 1977).

-
- Gwatkin, RBL and Williams, DT. Receptor activity of the hamster and mouse solubilized zona pellucida before and after the zona reaction. *J.Reprod.Fertil.* 49: 55-59 (1977).
- Haddad, A and Nagai, E. Radioautographic study of glycoprotein biosynthesis and renewal in the ovarian follicles of mice and the origin of the zona pellucida. *Cell Tissue Res.* 177: 347-369 (1977).
- Haendler, B, Kratzschmar, J, Theuring, F, and Schleuning, WD. 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 (1993).
- Haendler, B, Toda, I, Sullivan, DA, and Schleuning, WD. Expression of transcripts for cysteine-rich secretory proteins (CRISPs) in the murine lacrimal gland. *J.Cell Physiol.* 178: 371-378 (1999).
- Hall, CL and Turley, EA. Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis. *J.Neurooncol.* 26: 221-229 (1995).
- Hall, JC and Tubbs, CE. Purification and characterization of protein D/E, a putative sperm-binding protein involved in fertilization. *Prep.Biochem.Biotechnol.* 27: 239-251 (1997).
- Hanada, A and Chang, MC. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. *Biol.Reprod.* 6: 300-309 (1972).
- Hardy, DM and Garbers, DL. A sperm membrane protein that binds in a species-specific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. *J.Biol.Chem.* 270: 26025-26028 (1995).
- Hardy, DM, Huang, TTF, Driscoll, WJ, Tung, KSK, and Wild, GC. Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol.Reprod.* 38: 423-437 (1988).
- Hardy, DM, Oda, MN, Friend, DS, and Huang, TT, Jr. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. *Biochem.J.* 275 (Pt 3): 759-766 (1991).
- Hatanaka, Y, Nagai, T, Tobita, T, and Nakano, M. Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization *in vitro*. *J.Reprod.Fertil.* 95: 431-440 (1992).
- Hayashi, M, Fujimoto, S, Takano, H, Ushiki, T, Abe, K, Ishikura, H, Yoshida, M, Kirchhoff, C, Ishibashi, T, and Kasahara, M. 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 (1996).

- He, ZY, Brakebusch, C, Fassler, R, Kreidberg, JA, Primakoff, P, and Myles, DG. None of the integrins known to be present on the mouse egg or to be ADAM receptors are essential for sperm-egg binding and fusion. *Dev.Biol.* 254: 226-237 (2003).
- Heinlein, UAO, Wallat, S, Senftleben, A, and Lemaire, L. Male germ cell-expressed mouse gene *TAZ83* encodes a putative, cysteine-rich transmembrane protein (*cyritestin*) sharing homologies with snake toxins and sperm-egg fusion proteins. *Dev.Growth Diff.* 36: 49-58 (1994).
- Henriksen, A, King, TP, Mirza, O, Monsalve, RI, Meno, K, Ipsen, H, Larsen, JN, Gajhede, M, and Spangfort, MD. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. *Proteins* 45: 438-448 (2001).
- Hinrichsen, M and Blaquier, JA. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J.Reprod.Fertil.* 60: 291-294 (1980).
- Hirao, Y and Yanagimachi, R. Temperature-dependence of sperm-egg fusion and post-fusion events in hamster fertilization. *J.Exp.Zool.* 205: 433-438 (1978).
- Hoodbhoy, T and Dean, J. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* 127: 417-422 (2004).
- Hoodbhoy, T, Joshi, S, Boja, ES, Williams, SA, Stanley, P, and Dean, J. Human sperm do not bind to rat zonae pellucidae despite the presence of four homologous glycoproteins. *J.Biol.Chem.* 280: 12721-12731 (2005).
- Hoodbhoy, T and Talbot, P. Mammalian cortical granules: Contents, fate, and function. *Mol.Reprod.Dev.* 39: 439-448 (1994).
- Hook, M, Kjellen, L, and Johansson, S. Cell-surface glycosaminoglycans. *Annu.Rev.Biochem.* 53: 847-869 (1984).
- Horvath, PM, Kellom, T, Caulfield, J, and Boldt, J. Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Mol.Reprod.Dev.* 34: 65-72 (1993).
- Hou, ST, Mal, A, Jones, R, and Hall, L. Molecular cloning and characterization of rat sperm surface antigen 2B1, a glycoprotein implicated in sperm-zona binding. *Mol.Reprod.Dev.* 45: 193-203 (1996).
- Howes, E, Pascall, JC, Engel, W, and Jones, R. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J.Cell Sci.* 114: 4127-4136 (2001).
- Huang, TT, Jr., Hardy, D, Yanagimachi, H, Teuscher, C, Tung, K, Wild, G, and Yanagimachi, R. pH and protease control of acrosomal content stasis and release during the guinea pig sperm acrosome reaction. *Biol.Reprod.* 32: 451-462 (1985).

-
- Hunnicutt, CR, Primakoff, P, and Myles, DG. 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 (1996).
- Inoue, N, Ikawa, M, Isotani, A, and Okabe, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 434: 234-238 (2005).
- Isacke, CM and Yarwood, H. The hyaluronan receptor, CD44. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 34: 718-721 (2002).
- Jalkanen, J, Huhtaniemi, I, and Poutanen, M. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. *Biol.Reprod.* 72: 1268-1274 (2005).
- Johnson, MH, Eager, D, Muggleton-Harris, A, and Grave, HM. Mosaicism in organisation of concanavalin A receptors on surface membranes of mouse eggs. *Nature* 257: 321-322 (1975).
- Jones, KT. Ca²⁺ oscillations in the activation of the egg and development of the embryo in mammals. *Int.J.Dev.Biol.* 42: 1-10 (1998).
- Jones, R, Shalgi, R, Holland, J, and Phillips, DM. Topographical rearrangement of a plasma membrane antigen during capacitation of rat spermatozoa in vitro. *Dev.Biol.* 139: 349-362 (1990).
- Jury, JA, Frayne, J, and Hall, L. The human fertilin α gene is non-functional: Implications for its proposed role in fertilization. *Biochem.J.* 321: 577-581 (1997).
- Jury, JA, Frayne, J, and Hall, L. 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 (1998).
- Kaji, K and Kudo, A. The mechanism of sperm-oocyte fusion in mammals. *Reproduction* 127: 423-429 (2004).
- Kaji, K, Oda, S, Miyazaki, S, and Kudo, A. Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev.Biol.* 247: 327-334 (2002).
- Kaji, K, Oda, S, Shikano, T, Ohnuki, T, Uematsu, Y, Sakagami, J, Tada, N, Miyazaki, S, and Kudo, A. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat.Genet.* 24: 279-282 (2000).
- Kamei, N and Glabe, CG. The species-specific egg receptor for sea urchin sperm adhesion is EBR1, a novel ADAMTS protein. *Genes Dev.* 17: 2502-2507 (2003).
- Kaplan, R and Kraicer, PF. Effect of elevated calcium concentration on fertilization of rat oocytes in vitro. *Gam.Res.* 1: 281-285 (1978).

-
- Kasahara, M, Figueroa, F, and Klein, J. Molecular cloning of a testis-specific gene from mouse chromosome 17. *Transplant.Proc.* 19: 815-816 (1987).
- Kasahara, M, Gutknecht, J, Brew, K, Spurr, N, and Goodfellow, PN. Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* 5: 527-534 (1989).
- Kellom, T, Vick, A, and Boldt, J. 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 (1992).
- Kim, KS, Cha, MC, and Gerton, GL. Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol.Reprod.* 64: 36-43 (2001a).
- Kim, KS, Foster, JA, and Gerton, GL. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol.Reprod.* 64: 148-156 (2001b).
- Kim, KS and Gerton, GL. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev.Biol.* 264: 141-152 (2003).
- Kimura, N, Konno, Y, Miyoshi, K, Matsumoto, H, and Sato, E. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol.Reprod.* 66: 707-717 (2002).
- Kimura, Y and Yanagimachi, R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol.Reprod.* 53: 855-862 (1995).
- Kjeldsen, L, Cowland, JB, Johnsen, AH, and Borregaard, N. 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 (1996).
- Klemme, LM, Roberts, KP, Hoffman, LB, Ensrud, KM, Siiteri, JE, and Hamilton, DW. Cloning and characterization of the rat *crisp-1* gene [In Process Citation]. *Gene* 240: 279-288 (1999).
- Knudsen, KA and Horwitz, AF. Tandem events in myoblast fusion. *Dev.Biol.* 58: 328-338 (1977).
- Knudson, CB and Knudson, W. Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis, and disease. *FASEB J.* 7: 1233-1241 (1993).
- Kohane, AC, Cameo, MS, Piñeiro, L, Garberi, JC, and Blaquier, JA. Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol.Reprod.* 23: 181-187 (1980a).
- Kohane, AC, Gonzalez Echeverria, F, Piñeiro, L, and Blaquier, JA. Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol.Reprod.* 23: 737-742 (1980b).
- Kohane, AC, Piñeiro, L, and Blaquier, JA. Androgen-controlled synthesis of specific protein in the rat epididymis. *Endocrinology* 112: 1590-1596 (1983).

-
- Kopf, G.S., Ning, X.P., Visconti, P., Purdon, M.A., Galantino-Homer, H.L., and Fornes, M. Signaling Mechanisms Controlling Mammalian Sperm Fertilization Competence and Activation. *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications*. First Edition. 105-118 (2002)
- Kratzschmar, J, Haendler, B, Eberspaecher, U, Roosterman, D, Donner, P, and Schleuning, WD. 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 (1996).
- Krätzschmar, J, Haendler, B, Eberspaecher, U, Roosterman, D, Donner, P, and Schleuning, WD. 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 (1996).
- Kurokawa, M, Sato, K, and Fissore, RA. Mammalian fertilization: from sperm factor to phospholipase C ζ . *Biol.Cell* 96: 37-45 (2004).
- Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).
- Le Naour, F, Rubinstein, E, Jasmin, C, Prenant, M, and Boucheix, C. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* 287: 319-321 (2000).
- Lea, IA, Sivashanmugam, P, and O'Rand, MG. Zonadhesin: characterization, localization, and zona pellucida binding. *Biol.Reprod.* 65: 1691-1700 (2001).
- Lee, GM. Measurement of volume injected into individual cells by quantitative fluorescence microscopy. *J.Cell Sci.* 94 (Pt 3): 443-447 (1989).
- Leyton, L and Saling, P. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J.Cell Biol.* 108: 2163-2168 (1989).
- Li, ST, Huang, XY, and Sun, FZ. Flowering plant sperm contains a cytosolic soluble protein factor which can trigger calcium oscillations in mouse eggs. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 287: 56-59 (2001).
- Lin, Y, Mahan, K, Lathrop, WF, Myles, DG, and Primakoff, P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J.Cell Biol.* 125: 1157-1163 (1994).
- Linder, B and Heinlein, UAO. Decreased *in vitro* fertilization efficiencies in the presence of specific cyritestin peptides. *Dev.Growth Diff.* 39: 243-247 (1997).
- Longo, FJ. Fine structure of the mammalian egg cortex. *Am.J.Anat.* 174: 303-315 (1985).
- Lopez, LC and Shur, BD. Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J.Cell Biol.* 105: 1663-1670 (1987).

-
- Lu, G, Villalba, M, Coscia, MR, Hoffman, DR, and King, TP. Sequence analysis and antigenic cross-reactivity of a venom allergen, antigen 5, from hornets, wasps, and yellow jackets. *J.Immunol.* 150: 2823-2830 (1993).
- Lu, QX and Shur, BD. 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 (1997).
- Maeda, T, Nishida, J, and Nakanishi, Y. 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 (1999).
- Maeda, T, Sakashita, M, Ohba, Y, and Nakanishi, Y. Molecular cloning of the rat Tpx-1 responsible for the interaction between spermatogenic and Sertoli cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 248: 140-146 (1998).
- Magdaleno, L, Gasset, M, Varea, J, Schambony, AM, Urbanke, C, Raida, M, Topfer-Petersen, E, and Calvete, JJ. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *FEBS Lett.* 420: 179-185 (1997).
- Maleszewski, M, Kimura, Y, and Yanagimachi, R. Sperm membrane incorporation into oolemma contributes to the oolemma block to sperm penetration: Evidence based on intracytoplasmic sperm injection experiments in the mouse. *Mol.Reprod.Dev.* 44: 256-259 (1996).
- Manning, JT. Gamete dimorphism and the cost of sexual reproduction: are they separate phenomena? *J.Theor.Biol.* 55: 393-395 (1975).
- Martin, I, Epand, RM, and Ruyschaert, JM. Structural properties of the putative fusion peptide of fertilin, a protein active in sperm-egg fusion, upon interaction with the lipid bilayer. *Biochemistry* 37: 17030-17039 (1998).
- Martin, I and Ruyschaert, JM. Comparison of lipid vesicle fusion induced by the putative fusion peptide of fertilin (a protein active in sperm-egg fusion) and the NH2-terminal domain of the HIV2 gp41. *FEBS Lett.* 405: 351-355 (1997).
- Mashiach, R, Tadir, Y, Fisch, B, Ovadia, J, Eltes, F, and Bartoov, B. The relationship between sperm ultrastructural features and fertilizing capacity in vitro. *Fertil.Steril.* 57: 1052-1057 (1992).
- Matsudaira, P. Limited N-terminal sequence analysis. *Methods Enzymol.* 182: 602-613 (1990).
- Mattioli, M, Galeati, G, and Seren, E. Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Res.* 20: 177-183 (1988).
- Mattioli, M, Lucidi, P, and Barboni, B. Expanded cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol.Reprod.Dev.* 51: 445-453 (1998).

- McAvey, BA, Wortzman, GB, Williams, CJ, and Evans, JP. Involvement of calcium signaling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biol.Reprod.* 67: 1342-1352 (2002).
- Miller, BJ, Georges-Labouesse, E, Primakoff, P, and Myles, DG. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J.Cell Biol.* 149: 1289-1296 (2000).
- Miller, DJ, Gong, X, and Shur, BD. Sperm require β -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Development* 118: 1279-1289 (1993).
- Miller, DJ, Macek, MB, and Shur, BD. Complementarity between sperm surface B-1,4-galactosyltransferase and egg-coat ZP3 mediates sperm-egg binding. *Nature.* 357: 589-593 (1992).
- Milne, TJ, Abbenante, G, Tyndall, JD, Halliday, J, and Lewis, RJ. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. *J.Biol.Chem.* 278: 31105-31110 (2003).
- Miyado, K, Yamada, G, Yamada, S, Hasuwa, H, Nakamura, Y, Ryu, F, Suzuki, K, Kosai, K, Inoue, K, Ogura, A, Okabe, M, and Mekada, E. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* 287: 321-324 (2000).
- Mizuki, N and Kasahara, M. Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol.Cell.Endocrinol.* 89: 25-32 (1992).
- Mizuki, N, Sarapata, D, García-Sanz, JA, and Kasahara, M. 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 (1992).
- Mochca-Morales, J, Martin, BM, and Possani, LD. Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (mexican beaded lizard) venom. *Toxicon.* 28: 299-309 (1990).
- Molinolo, AA, Lanari, C, Charreau, EH, Sanjuan, N, and Pasqualini, CD. Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *J.Natl.Cancer Inst.* 79: 1341-1350 (1987).
- Moller, CC and Wassarman, PM. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. *Dev.Biol.* 132: 103-112 (1989).
- Moos, J, Peknicova, J, and Tesarik, J. Relationship between molecular conversions of acrosin and the progression of exocytosis in the calcium ionophore-induced acrosome reaction. *Biochim.Biophys.Acta Mol.Cell Res.* 1176: 199-207 (1993).
- Morice, P, Josset, P, Chapron, C, and Dubuisson, JB. History of infertility. *Hum.Reprod.Update.* 1: 497-504 (1995).

-
- Morrisette, J, Kratzschmar, J, Haendler, B, El-Hayek, R, Mochca-Morales, J, Martin, BM, Jitandrakumar, RP, Moss, RL, Schleuning, WD, Coronado, R, and Possani, LD. Primary structure and properties of helothermine, a peptide that blocks ryanodine receptors. *Biophys.J.* 68: 2280-2288 (1995).
- Muga, A, Neugebauer, W, Hirama, T, and Surewicz, WK. Membrane interaction and conformational properties of the putative fusion peptide of PH-30, a protein active in sperm-egg fusion. *Biochemistry* 33: 4444-4448 (1994).
- Murphy, EV, Zhang, Y, Zhu, W, and Biggs, J. 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 (1995).
- Myles, DG. Molecular mechanisms of sperm-egg membrane binding and fusion in mammals. *Dev.Biol.* 158: 35-45 (1993).
- Myles, DG, Kimmel, LH, Blobel, CP, White, JM, and Primakoff, P. Identification of a binding site in the disintegrin domain of fertilin required for sperm-egg fusion. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91: 4195-4198 (1994).
- Myles, DG and Primakoff, P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. *Biol.Reprod.* 56: 320-327 (1997).
- Naz, R and Menge, A. Development of antisperm contraceptive vaccine for humans: why and how? *Hum.Reprod.* 5: 511-518 (1990).
- Naz, RK. Vaccine for contraception targeting sperm. *Immunol.Rev.* 171: 193-202 (1999).
- Nishimura, H, Cho, C, Branciforte, DR, Myles, DG, and Primakoff, P. Analysis of Loss of Adhesive Function in Sperm Lacking Cyritestin or Fertilin beta. *Dev.Biol.* 233: 204-213 (2001).
- Nishimura, H, Kim, E, Nakanishi, T, and Baba, T. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. *J.Biol.Chem.* 279: 34957-34962 (2004).
- Nobile, M, Magnelli, V, Lagostena, L, Mochca-Morales, J, Possani, LD, and Prestipino, G. The toxin helothermine affects potassium currents in newborn rat cerebellar granule cells. *J.Membrane Biol.* 139: 49-55 (1994).
- O'Bryan, MK, Loveland, KL, Herszfeld, D, McFarlane, JR, Hearn, MT, and De Kretser, DM. Identification of a rat testis-specific gene encoding a potential rat outer dense fibre protein. *Mol.Reprod.Dev.* 50: 313-322 (1998).
- O'Bryan, MK, Sebire, K, Meinhardt, A, Edgar, K, Keah, H, Hearn, MT, and De Kretser, DM. Tpx-1 is a component of the outer dense fibers and acosome of rat spermatozoa. *Mol.Reprod.Dev.* 58: 116-125 (2001).

- O'Rand, MG, Beavers, J, Widgren, EE, and Tung, KSK. Inhibition of fertility in female mice by immunization with a B-cell epitope, the synthetic sperm peptide, P10G. *J.Reprod.Immunol.* 25: 89-102 (1993).
- O'Rand, MG and Fisher, SJ. Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zona. *Dev.Biol.* 119: 551-559 (1987).
- O'Rand, M.G., Welch, J.E., and Fisher, S.J. Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. *Molecular and cellular aspects of reproduction.* 131-144 (1986)
- Okabe, M, Yagasaki, M, Oda, H, Matzno, S, Kohama, Y, and Mimura, T. 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 (1988).
- Olden, K, Law, J, Hunter, VA, Romain, R, and Parent, JB. Inhibition of fusion of embryonic muscle cells in culture by tunicamycin is prevented by leupeptin. *J.Cell Biol.* 88: 199-204 (1981).
- Olds-Clarke, P. Models for male infertility: the t haplotypes. *Rev.Reprod.* 2: 157-164 (1997).
- Olesen, C, Hansen, C, Bendtsen E., Byskov A.G., Schwinger, E, Lopez-Pajares, I, Jensen, PKA, Kristoffersson, U, Schubert, R, Van Assche, E, Wahlstroem, J, Lespinasse, J, and Tommerup, N. Identification of human candidate genes for male infertility by digital differential display. *Mol.Hum.Reprod.* 7: 11-20 (2001).
- Oliphant, G. Removal of sperm-bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of acrosome reaction. *Fertil.Steril.* 9: 404-414 (1976).
- Oliphant, G and Brackett, BG. Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strength and reversible capacitation with epididymal extracts. *Fertil.Steril.* 24: 948-955 (1973).
- Oliphant, G, Reynolds, AB, and Thomas, TS. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am.J.Anat.* 174: 269-283 (1985).
- Olson, JH, Xiang, X, Ziegert, T, Kittelson, A, Rawls, A, Bieber, AL, and Chandler, DE. Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 11205-11210 (2001).
- Osheroff, JE, Visconti, PE, Valenzuela, JP, Travis, AJ, Alvarez, J, and Kopf, GS. Regulation of human sperm capacitation by a cholesterol efflux-stimulated signal transduction pathway leading to protein kinase A-mediated up-regulation of protein tyrosine phosphorylation. *Mol.Hum.Reprod.* 5: 1017-1026 (1999).
- Parinaud, J, Labal, B, and Vieitez, G. High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. *Fertil.Steril.* 58: 599-602 (1992).

-
- Parinaud, J, Vieitez, G, Milhet, P, and Richoilley, G. Use of a plant enzyme preparation (Coronase) instead of hyaluronidase for cumulus cell removal before intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod.* 13: 1933-1935 (1998).
- Perez Martinez, S, Conesa, D, and Cuasnicú, PS. 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 (1995).
- Phillips, DM and Shalgi, R. Sperm penetration into rat ova fertilized in vivo. *J.Exp.Zool.* 221: 373-378 (1982).
- Pomeroy, KO, Dodds, JF, and Seidel, GE, Jr. Caffeine promotes in vitro fertilization of mouse ova within 15 minutes. *J.Exp.Zool.* 248: 207-212 (1988).
- Ponce, RH, Urch, UA, and Yanagimachi, R. Inhibition of sperm-egg fusion in the hamster and mouse by carbohydrates. *Zygote.* 2: 253-262 (1994).
- Ponce, RH, Yanagimachi, R, Urch, UA, Yamagata, T, and Ito, M. 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 (1993).
- Poste, G and Allison, AC. Membrane fusion. *Biochim.Biophys.Acta* 300: 421-465 (1973).
- Primakoff, P, Hyatt, H, and Myles, DG. 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 (1985).
- Racowsky, C, Homa, ST, Kaufman, ML, Gunnala, S, and Dermer, RA. Chromosomal analysis of meiotic stages of human oocytes matured in vitro: Benefits of protease treatment before fixation. *Fertil.Steril.* 57: 1026-1033 (1992).
- Rankin, T, Familiari, M, Lee, E, Ginsberg, A, Dwyer, N, Blanchette-Mackie, J, Drago, J, Westphal, H, and Dean, J. Mice homozygous for an insertional mutation in the *Zp3* gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 122: 2903-2910 (1996).
- Rankin, T, Talbot, P, Lee, E, and Dean, J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* 126: 3847-3855 (1999).
- Rankin, TL, Coleman, JS, Epifano, O, Hoodbhoy, T, Turner, SG, Castle, PE, Lee, E, Gore-Langton, R, and Dean, J. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev.Cell* 5: 33-43 (2003).
- Rankin, TL, O'Brien, M, Lee, E, Wigglesworth, K, Eppig, J, and Dean, J. Defective zonae pellucidae in *Zp2*-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 128: 1119-1126 (2001).

- Rankin, TL, Tong, ZB, Castle, PE, Lee, E, Gore-Langton, R, Nelson, LM, and Dean, J. Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* 125: 2415-2424 (1998).
- Redkar, AA, Hui, L, Olds-Clarke, P, and Pilder, SH. Fine mapping and characterization of the Stop1d (Sperm-t-complex-oocyte-penetration-1-distal) locus in the t-haplotype region of *Mus musculus*. *J.Androl (Suppl)* 22: 94-2001).
- Rich, T, Chen, P, Furman, F, Huynh, N, and Israel, MA. 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 (1996).
- Richardson, RT and O'Rand, MG. Site-directed mutagenesis of rabbit proacrosin - Identification of residues involved in zona pellucida binding. *J.Biol.Chem.* 271: 24069-24074 (1996).
- Ridley, M. The Cooperative Gene. 2001).
- Roberts, KP, Wamstad, JA, Ensrud, KM, and Hamilton, DW. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein crisp-1. *Biol.Reprod.* 69: 572-581 (2003).
- Roblero, LS, Guadarrama, A, Ortiz, ME, Fernandez, E, and Zegers-Hochschild, F. High potassium concentration and the cumulus corona oocyte complex stimulate the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil.Steril.* 54: 328-332 (1990).
- Rochwerger, L, Cohen, DJ, and Cuasnicú, PS. Mammalian sperm-egg fusion: The rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. *Dev.Biol.* 153: 83-90 (1992).
- Rochwerger, L and Cuasnicu, PS. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vivo and in vitro capacitation. *Mol.Reprod.Dev.* 31: 34-41 (1992).
- Roldan, ERS, Murase, T, and Shi, QX. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science.* 266: 1578-1581 (1994).
- Russell, DL, Doyle, KM, Ochsner, SA, Sandy, JD, and Richards, JS. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J.Biol.Chem.* 278: 42330-42339 (2003).
- Saling, PM and Storey, BT. Mouse gamete interactions during fertilization *in vitro*. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J.Cell Biol.* 83: 544-555 (1979).
- Salustri, A, Camaioni, A, Di Giacomo, M, Fulop, C, and Hascall, VC. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum.Reprod.Update.* 5: 293-301 (1999).
- Salustri, A, Garlanda, C, Hirsch, E, De Acetis, M, Maccagno, A, Bottazzi, B, Doni, A, Bastone, A, Mantovani, G, Beck, PP, Salvatori, G, Mahoney, DJ, Day, AJ, Siracusa, G, Romani, L, and Mantovani, A. PTX3 plays a key role in the

- organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in vivo fertilization. *Development* 131: 1577-1586 (2004).
- Sardet, C, Prodon, F, Dumollard, R, Chang, P, and Chenevert, J. Structure and function of the egg cortex from oogenesis through fertilization. *Dev.Biol.* 241: 1-23 (2002).
- Savani, RC, Wang, C, Yang, B, Zhang, S, Kinsella, MG, Wight, TN, Stern, R, Nance, DM, and Turley, EA. Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM. *J.Clin.Invest* 95: 1158-1168 (1995).
- Schreiber, MC, Karlo, JC, and Kovalick, GE. A novel cDNA from *Drosophila* encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen 5, and plant group 1 pathogenesis-related proteins. *Gene* 191: 135-141 (1997).
- Schroer, SC, Yudin, AI, Myles, DG, and Overstreet, JW. Acrosomal status and motility of guinea pig spermatozoa during in vitro penetration of the cumulus oophorus. *Zygote*. 8: 107-117 (2000).
- Serrano, RL, Kuhn, A, Hendricks, A, Helms, JB, Sinning, I, and Groves, MR. Structural analysis of the human Golgi-associated plant pathogenesis related protein GAPR-1 implicates dimerization as a regulatory mechanism. *J.Mol.Biol.* 339: 173-183 (2004).
- Shabanowitz, RB and O'Rand, MG. Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J.Reprod.Fertil.* 82: 151-161 (1988).
- Shalgi, R, Kaplan, R, Nebel, L, and Kraicer, PF. The male factor in fertilization of rat eggs in vitro. *J.Exp.Zool.* 217: 319-402 (1981).
- Shalgi, R and Phillips, DM. Mechanics of *in vitro* fertilization in the hamster. *Biol.Reprod.* 71: 154-161 (1980a).
- Shalgi, R and Phillips, DM. Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. *J.Ultrastruct.Res.* 71: 154-161 (1980b).
- Shamsadin, R, Adham, IM, Nayernia, K, Heinlein, UA, Oberwinkler, H, and Engel, W. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. *Biol.Reprod.* 61: 1445-1451 (1999).
- Shilling, FM, Magie, CR, and Nuccitelli, R. Voltage-dependent activation of frog eggs by a sperm surface disintegrin peptide. *Dev.Biol.* 202: 113-124 (1998).
- Shirley, CR, Hayashi, S, Mounsey, S, Yanagimachi, R, and Meistrich, ML. Abnormalities and reduced reproductive potential of sperm from *Tnp1*- and *Tnp2*-null double mutant mice. *Biol.Reprod.* 71: 1220-1229 (2004).
- Shur, BD. Glycosyltransferases as cell adhesion molecules. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5: 854-863 (1993).

-
- Shur, BD and Hall, NG. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J.Cell Biol.* 95: 574-579 (1982).
- Stewart-Savage, J and Bavister, BD. A cell surface block to polyspermy occurs in the golden hamster eggs. *Dev.Biol.* 128: 150-157 (1988).
- Stifani, S, George, R, and Schneider, WJ. Solubilization and characterization of the chicken oocyte vitellogenin receptor. *Biochem.J.* 250: 467-475 (1988).
- Suarez, SS. Hyperactivated motility in sperm. *J.Androl.* 17: 331-335 (1996).
- Suarez, SS and Dai, X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol.Reprod.* 46: 686-691 (1992).
- Suarez, SS and Ho, HC. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod.Domest.Anim* 38: 119-124 (2003).
- Suarez, SS, Katz, DF, Owen, DH, Andrew, JB, and Powell, R. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol.Reprod.* 44: 375-381 (1991).
- Swann, K. Different triggers for calcium oscillations in mouse eggs involve a ryanodine-sensitive calcium store. *Biochem.J.* 287: 79-84 (1992).
- Swann, K and Ozil, J-P. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int.Rev.Cytol.* 152: 183-222 (1994).
- Swanson, WJ and Vacquier, VD. The abalone egg vitelline envelope receptor for sperm lysin is a giant multivalent molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 6724-6729 (1997).
- Takano, H, Yanagimachi, R, and Urch, UA. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. *Zygote* 1: 79-91 (1993).
- Talbot, P. Sperm penetration through oocyte investments. *Am.J.Anat.* 174: 331-346 (1985).
- Talbot, P and Dandekar, P. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? *Microsc.Res.Tech.* 61: 349-357 (2003).
- Talbot, P, Dicarlantonio, G, Zao, P, Penkala, J, and Haimo, LT. Motile cells lacking hyaluronidase can penetrate the hamster oocyte cumulus complex. *Dev.Biol.* 108: 387-398 (1985).
- Talbot, P, Shur, BD, and Myles, DG. Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol.Reprod.* 68: 1-9 (2003).
- Tanghe, S, Van Soom, A, Nauwynck, H, Coryn, M, and de Kruif, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol.Reprod.Dev.* 61: 414-424 (2002).

- Tardif, S, Dube, C, and Bailey, JL. Porcine sperm capacitation and tyrosine kinase activity are dependent on bicarbonate and calcium but protein tyrosine phosphorylation is only associated with calcium. *Biol.Reprod.* 68: 207-213 (2003).
- Thompson, B. and Harrub, B. *The Origin of Gender and Sexual Reproduction (I)*. 2002)
- Towbin, H, Staehelin, T, and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 76: 4350-4360 (1979).
- Udby, L, Bjartell, A, Malm, J, Egesten, A, Lundwall, A, Cowland, JB, Borregaard, N, and Kjeldsen, L. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J.Androl* 26: 333-342 (2005).
- Udby, L, Calafat, J, Sorensen, OE, Borregaard, N, and Kjeldsen, L. Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. *J.Leukoc.Biol.* 72: 462-469 (2002a).
- Udby, L, Cowland, JB, Johnsen, AH, Sorensen, OE, Borregaard, N, and Kjeldsen, L. An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. *J.Immunol.Methods* 263: 43-55 (2002b).
- Urch, UA, Wardrip, NJ, and Hedrick, JL. Limited and specific proteolysis of the zona pellucida by acrosin. *J.Exp.Zool.* 233: 479-483 (1985).
- Uto, N, Yoshimatsu, N, Lopata, A, and Yanagimachi, R. Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *J.Exp.Zool.* 248: 113-120 (1988).
- Visconti, PE, Bailey, JL, Moore, GD, Pan, D, Olds-Clarke, P, and Kopf, GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 121: 1129-1137 (1995a).
- Visconti, PE, Moore, GD, Bailey, JL, Leclerc, P, Connors, SA, Pan, D, Olds-Clarke, P, and Kopf, GS. Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 121: 1139-1150 (1995b).
- Visconti, PE, Ning, X, Fornes, MW, Alvarez, JG, Stein, P, Connors, SA, and Kopf, GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev.Biol.* 214: 429-443 (1999).
- Wang, C, Lee, GS, Leung, A, Surrey, ES, and Chan, SYW. Human sperm hyperactivation and acrosome reaction and their relationships to human in vitro fertilization. *Fertil.Steril.* 59: 1221-1227 (1993).
- Wassarman, P. The mammalian ovum. *The Physiology of Reproduction*. 69-101 (1988a)

-
- Wassarman, PM. The biology and chemistry of fertilization. *Science* 235: 553-554 (1987).
- Wassarman, PM. Zona pellucida glycoproteins. *Annu.Rev.Biochem.* 57: 415-442 (1988b).
- Wassarman, PM, Bleil, JD, Florman, HM, Greve, JM, Roller, RJ, Salzman, GS, and Samuels, FG. The mouse egg's receptor for sperm: what is it and how does it work? *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 50: 11-19 (1985).
- Wassarman, PM, Jovine, L, and Litscher, ES. A profile of fertilization in mammals. *Nat.Cell Biol.*2001.Feb;3(2):E59-64. 3: E59-64. (2001).
- Wassarman, PM and Litscher, ES. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues.Organs* 168: 36-45 (2001).
- Wen, Y, Richardson, RT, and O'Rand, MG. Processing of the sperm protein Sp17 during the acrosome reaction and characterization as a calmodulin binding protein. *Dev.Biol.* 206: 113-122 (1999).
- Wen, Y, Richardson, RT, Widgren, EE, and O'Rand, MG. Characterization of Sp17: a ubiquitous three domain protein that binds heparin. *Biochem.J.* 357: 25-31 (2001).
- WHO. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4th: 1999).
- Wolfe, CA, Cladera, J, Ladha, S, Senior, S, Jones, R, and O'Shea, P. Membrane interactions of the putative fusion peptide (MF alpha P) from fertilin-alpha, the mouse sperm protein complex involved in fertilization. *Mol.Membr.Biol.* 16: 257-263 (1999).
- Wolfsberg, TG, Primakoff, P, Myles, DG, and White, JM. 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 (1995).
- Wu, H, He, CL, and Fissore, RA. Injection of a porcine sperm factor induces activation of mouse eggs. *Mol.Reprod.Dev.* 49: 37-47 (1998).
- Wu, H, Smyth, J, Luzzi, V, Fukami, K, Takenawa, T, Black, SL, Allbritton, NL, and Fissore, RA. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biol.Reprod.* 64: 1338-1349 (2001).
- Xu, Z, Kopf, GS, and Schultz, RM. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ release in early and late events of mouse egg activation. *Development* 120: 1851-1859 (1994).

- Yamagata, K, Nakanishi, T, Ikawa, M, Yamaguchi, R, Moss, SB, and Okabe, M. Sperm from the calmegin-deficient mouse have normal abilities for binding and fusion to the egg plasma membrane. *Dev.Biol.* 250: 348-357 (2002).
- Yamakawa, T, Miyata, S, Ogawa, N, Koshikawa, N, Yasumitsu, H, Kanamori, T, and Miyazaki, K. 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 (1998).
- Yamasaki, N, Richardson, RT, and O'Rand, MG. Expression of the rabbit sperm protein Sp17 in COS cells and interaction of recombinant Sp17 with the rabbit zona pellucida. *Mol.Reprod.Dev.* 40: 48-55 (1995).
- Yamazaki, Y, Hyodo, F, and Morita, T. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Arch.Biochem.Biophys.* 412: 133-141 (2003).
- Yanagimachi, R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J.Reprod.Fertil.* 18: 275-286 (1969).
- Yanagimachi, R. Calcium requirement for sperm-egg fusion in mammals. *Biol.Reprod.* 19: 949-958 (1978).
- Yanagimachi, R. Mammalian Fertilization. *The Physiology of Reproduction.* 1. 135-185 (1988a)
- Yanagimachi, R. Sperm-egg fusion. *Current topics in membranes and transport.* 3-43 (1988b)
- Yanagimachi, R. Mammalian Fertilization. *The Physiology of Reproduction.* 2. 189-317 (1994)
- Yanagimachi, R, Yanagimachi, H, and Rogers, BJ. The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol.Reprod.* 15: 471-476 (1976).
- Younis, AI, Zuelke, KA, Harper, KM, Oliveira, MA, and Brackett, BG. In vitro fertilization of goat oocytes. *Biol.Reprod.* 44: 1177-1182 (1991).
- Yuan, RY, Primakoff, P, and Myles, DG. 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 (1997).
- Yudin, AI, Cherr, GN, and Katz, DF. Structure of the cumulus matrix and zona pellucida in the golden hamster: a new view of sperm interaction with oocyte-associated extracellular matrices. *Cell Tissue Res.* 251: 555-564 (1988).
- Yudin, AI, Li, MW, Robertson, KR, Tollner, T, Cherr, GN, and Overstreet, JW. Identification of a novel GPI-anchored CRISP glycoprotein, MAK248, located on the posterior head and equatorial segment of cynomolgus macaque sperm. *Mol.Reprod.Dev.* 63: 488-499 (2002).

-
- Yudin, AI, Vandervoort, CA, Li, MW, and Overstreet, JW. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol.Reprod.Dev.* 53: 350-362 (1999).
- Yue, C, White, KL, Reed, WA, and King, E. Localization and regulation of ryanodine receptor in bovine oocytes. *Biol.Reprod.* 58: 608-614 (1998).
- Zhang, L, Jiang, S, Wozniak, PJ, Yang, X, and Godke, RA. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol.Reprod.Dev.* 40: 338-344 (1995).
- Zhang, X, Lou, YH, Koopman, M, Doggett, T, Tung, KS, and Curtiss, R3. Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3. *Biol.Reprod.* 56: 33-41 (1997).
- Zhuo, L and Kimata, K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct.Funct.* 26: 189-196 (2001).