

Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización funcional de la proteína epididimaria DE (CRISP-1) a través de modelos *in vitro* y generación de animales "knock out"



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

Autor: Lic. Vanina G. Da Ros Director: Dra. Patricia S. Cuasnicú

Instituto de Biología y Medicina Experimental Buenos Aires, 2007

Caracterización funcional de la proteína epididimaria DE (CRISP-1) a través de modelos *in vitro* y generación de animales "knock out"

La proteína epididimaria de rata DE es el primer miembro descripto de la familia de proteínas ricas en cisteínas (CRISP) y, por ende, también conocida como CRISP-1. DE se asocia a la región dorsal de la cabeza del espermatozoide durante la maduración epididimaria, migra al segmento ecuatorial bajo condiciones capacitantes, y participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios presentes en la superficie del ovocito. El primer objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del bicarbonato, ión indispensable para la capacitación, sobre la migración de la proteína DE. En paralelo, se evaluó el efecto sobre otros dos parámetros espermáticos asociados a la capacitación, tales como la fosforilación de proteínas en tirosina y la expresión de la capacidad fusogénica. Los resultados indicaron que si bien los tres parámetros evaluados fueron bicarbonatodependientes, la migración de DE al segmento ecuatorial ocurriría a través de vías alternativas a la clásica cAMP/PKA, involucrada en la fosforilación en tirosina y la capacidad fusogénica del espermatozoide. El segundo objetivo de este trabajo consistió en estudiar los mecanismos moleculares por los cuales DE interactúa con sus sitios en el ovocito. El empleo de fragmentos recombinantes y péptidos sintéticos indicó que el sitio activo de DE residiría en una región de sólo 12 aminoácidos altamente conservada en todos los miembros de la familia CRISP. Finalmente, la relevancia de DE/CRISP-1 para la fertilidad fue estudiada a través de la generación de ratones "knock out" para dicha proteína. El análisis del fenotipo de los mismos indicó que si bien la fertilidad de los animales no se vio afectada, los espermatozoides presentaban una capacidad fusogéncia significativamente disminuida, sugiriendo que otras proteínas con características y/o función similares estarían compensando el efecto observado. En conjunto, estos resultados proveen importante información sobre los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de gametas y apoyan la existencia de mecanismos compensatorios con el fin de asegurar el éxito de la fertilización.

Palabras claves: epidídimo, familia CRISP, fertilización, capacitación, espermatozoide, fertilidad.

Functional characterization of epididymal protein DE(CRISP-1) through *in vitro* studies and generation of "knock out" animals

Rat epididymal protein DE is the first described member of the cysteine rich secretory protein family (CRISP) and, thus also known as CRISP-1. DE associates with the dorsal region of the sperm head during epididymal maturation, migrates to the equatorial segment under capacitanting conditions and participates in gamete fusion through complementary sites on the egg surface. The first aim of this work was to study the influence of bicarbonate, essential anion for sperm capacitation, on DE migration. In parallel, we investigated the influence of bicarbonate on two other sperm functional parameters associated with capacitation, such as tyrosine protein phosphorylation and expression of the fusogenic ability. Results indicated that although the three parameters were bicarbonate-dependent, DE migration would occur through a signaling pathway alternative to the classic cAMP/PKA involved in tyrosine phosphorylation and expression of the fusogenic ability. The second objective of the present work was to study the molecular mechanisms involved in the interaction between DE and its complementary sites on the egg surface. The use of recombinant and synthetic peptides indicated that the active site of DE resides in a region of only 12 aminoacids highly conserved among members of the CRISP family. Finally, the relevance of DE/CRISP-1 for animal fertility was evaluated through the generation of knock out animals for this protein. The analysis of the phenotype of these animals showed that, although their fertility was not affected, the sperm fusogenic ability was significantly reduced, suggesting that other proteins with similar characteristics and/or function, would be compensating the described effect. Altogether, these results provide important information on the molecular mechanisms involve in gamete interaction, and support the existence of compensatory mechanisms to ensure the success of fertilization.

Keywords: epididymis, CRISP family, fertilization, capacitation, sperm, fertility.

AGRADECIMIENTOS

- a mi directora Patricia Cuasnicú
- a mis compañeros de laboratorio: Débora, Juli, Gus, Loli, Diego, Petu y Mauro
- a Marcelo Rubinstein y su grupo: Diego, Tom, Elena, Flavio, Andy, Dani y Maru
- a Mitch Eddy y sus técnicos: Bill y Gina
- a Clarisa, Monica Vazquez y su grupo
- a Omar Pignataro y su grupo
- a Pablo Visconti
- a Violeta
- a la Dra. Livia Lustig
- a mis compañeros de pasillo
- a mis compañeros de Instituto y de edificio
- al personal del IByME, especialmente a Paola
- a los directores del IByME: Dr. Charreau y Dr. De Nicola
- al CONICET, PLACIRH y FCEN-UBA
- a mis amigos
- a los Di Miele, Jaroslawski y Gelman
- a mi hermano
- a mis papás
- y a mi nueva familia: Diego y Matías

Les quiero agradecer enormemente a todos Uds, porque en diferente medida, contribuyeron para que esta tesis sea una realidad.

a mis papás

INDICE

Introducción	6
Objetivos	40
Capítulo 1: "DE y el proceso de capacitación"	44
Materiales y Métodos	45
Resultados	51
Discusión	65
Capítulo 2: "DE y el proceso de fertilización"	78
Materiales y Métodos	79
Resultados	87
Discusión	102
Capítulo 3: "DE y su relevancia para la fertilidad"	110
Materiales y Métodos	111
Resultados	128
Discusión	156
Conclusión	166
Abreviaturas	169
Referencias	172

INTRODUCCION

La reproducción sexual involucra la combinación de dos individuos heterosexuales para producir descendencia cuya carga genética es diferente que ambos antecesores. El objetivo de este tipo de reproducción es crear nuevas combinaciones de genes o variables ventajosas que permitan la sobrevivencia de la especie en un medio ambiente cambiante e impredecible. Tanto la fertilización como la meiosis constituyen la base de la reproducción sexual. La fertilización es el proceso en el cual dos células haploides (gametas femenina y masculina), se fusionan combinando su material genético para formar una sola célula diploide, la cigota. Tempranamente en el desarrollo del nuevo embrión, se producen células germinales diploides, las cuales al dividirse por meiosis generan las gametas.

El proceso de gametogénesis comienza con la formación de esas células germinales primordiales en la pared posterior del intestino primitivo (saco vitelino definitivo). Posteriormente, estas células migran hacia la cresta genital (lugar donde se desarrollará la gónada) diferenciándose en oogonias (en la hembra) o espermatogonias (en el macho). A continuación se describen los procesos de generación de un ovocito (Baker, 1982) y espermatozoide (Setchell, 1982) a partir de esas células y las características principales de las gametas maduras. Posteriormente, se detallan las diferentes etapas involucradas en la fertilización.

1. La gameta femenina

La ovogénesis (Figura 1) es el proceso por el cual se genera un ovocito maduro a partir de una célula germinal primordial. Es discontinuo con fases secuenciales de proliferación, de crecimiento y reduccional, y ocurre en los ovarios (Figura 1), órganos pares que se encuentran adosados a la pared posterior de la cavidad pélvica.

La meiosis femenina se inicia en la etapa fetal, se prolonga hasta la edad madura de la hembra y, sólo se completa durante el proceso de fertilización. Durante un corto período del desarrollo fetal, la mayoría de las oogonias se divide mitóticamente alcanzando así un número total de células germinales que potencialmente podrán

originar un ovocito maduro. Posteriormente, algunas oogonias cesan de dividirse y replican su ADN, transformándose en ovocitos primarios contenidos en estructuras celulares llamadas folículos. Los ovocitos entran en meiosis hasta detenerse en diplotene de la profase I, y es en este estadio que se encuentran todos los ovocitos al momento del nacimiento. Sin embargo, recientes estudios en ratones juveniles y adultos indican la existencia de una población de oogonias en el ovario postnatal, mitóticamente activas y capaces de originar folículos conteniendo ovocitos maduros (Johnson et al., 2004). Mas aún, resultados posteriores del mismo grupo de trabajo, demostraron que en la médula ósea de ratones hembras adultas se encontraría un reservorio de oogonias, las cuales viajarían por el torrente sanguíneo hasta llegar al ovario donde sufrirían la ovogénesis (Johnson et al., 2005). A pesar de exhibir igual morfología y expresión de marcadores génicos específicos, queda aún demostrar que los ovocitos así generados sean capaces de ser fertilizados y desarrollar descendencia viable.



Figura 1: La ovogénesis y el tracto reproductor femenino

A la izquierda, se muestra una representación simple del tracto reproductor femenino. En el centro, se esquematiza un corte transversal de un ovario resaltando diferentes estadios foliculares presentes durante la ovogénesis. A la derecha, se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis femenina.

Retomando la doctrina clásica para la cual la hembra nace con un número finito de potenciales ovocitos, al llegar la pubertad se produce el crecimiento de los ovocitos en forma coordinada con células de origen somático presentes en los folículos. Durante el período periovulatorio, un ovocito reanuda la meiosis estimulada por la acción de hormonas, experimentando la primer división reductiva. Se producen entonces dos células haploides desiguales: un ovocito secundario y un cuerpo polar carente casi por completo de citoplasma. El ovocito secundario reinicia la meiosis II quedándose detenida en metafase hasta la ovulación.

En el momento de la ovulación, el ovocito secundario, que se encuentra formando folículos preovulatorios o De Graaf (Figura 2), junto con el primer cuerpo polar y algunas células de soporte son expulsados del ovario al oviducto donde son retenidos (ver Figura 1). La meiosis continúa sólo luego de la entrada del espermatozoide al ovocito, resultando en la extrusión del segundo cuerpo polar. En cambio, la segunda división meiótica no se completa si no ha ocurrido la fertilización y el ovocito secundario es degenerado. Los restos de folículo que han quedado en el ovario luego de la ovulación se transforman en cuerpo lúteo, cuyo destino es diferente dependiendo de si ha ocurrido o no la fertilización.

El ovocito ovulado de los mamíferos euterianos es una célula esférica de tamaño variable según la especie (70-120 μ M) rodeada de una envoltura glicoproteica, denominada la zona pelúcida (ZP) (Figura 2). Entre la ZP y la membrana plasmática (oolema) se encuentra el espacio perivitelino conformado por una matriz extracelular sintetizada principalmente por el ovocito pero con el agregado de fluido y moléculas provenientes de las células que lo rodean (Talbot & Dandekar, 2003). Por afuera de la ZP y en la mayoría de los mamíferos, se encuentra el *cumulus oophorus*, formado por un grupo de células de la granulosa, llamadas células del cúmulus y una matríz extracelular conteniendo ácido hialurónico, glicosaminoglicanos y proteínas sintetizadas por las células de la granulosa (Zhuo & Kimata, 2001). Al conjunto del ovocito, la ZP, las células del cúmulus y la matríz extracelular se la denomina complejo cúmulos-ovocito (CCO) (Figura 2).



Figura 2: La gameta femenina

a) Microfotografía de un folículo de Graaf donde puede verse el ovocito rodeado de varias capas de células de la granulosa desplazado del centro del folículo por el antro.
b) Microfotografía de un COC ya ovulado. O: ovocito. ZP: zona pelúcida. CR: corona radiata. CL: células del cúmulus.
c) Fotografía de microscopio electrónico de barrido de un COC de hámster.
d) Microfotografía de un ovocito sin células del cúmulus en donde se distinguen la zona pelúcida, el espacio perivitelino y el primer cuerpo polar.

La ZP es una matriz transparente, relativamente gruesa, y compuesta principalmente por entre dos y cuatro glicoproteínas, según la especie, sintetizadas por el ovocito a partir del estadio de folículo primario (Wassarman, 1988). La ZP de ratón, sistema en el cual se han realizado la mayoría de los estudios, está compuesta por tres proteínas: ZP1, ZP2 y ZP3 (Wassarman, 1988; Wassarman & Litscher, 2001; Hoodbhoy & Dean, 2004). Estas proteínas estarían formando filamentos constituidos por heterodímeros de ZP2 y ZP3, intercomunicados por homodímeros de ZP1 (Wassarman, 1988). Un elemento estructural presente en todas estas proteínas, denominado dominio ZP, (Bork & Sander, 1992) sería el responsable del ensamblaje de estos filamentos (Jovine et al., 2002; Jovine et al., 2005). Mediante el estudio de ratones genéticamente modificados ("knock out") carentes de ZP1, ZP2 ó ZP3 se demostró que mientras ZP1 tendría solo un rol estructural siendo dispensable para la formación del ovocito y la

fertilización, ZP3 sería la molécula fundamental para formar la ZP, y sólo una proteína adicional (ZP1 ó ZP2) sería necesaria (Rankin et al., 1996). Funcionalmente, la ZP sería la encargada de brindar la especie-especificidad durante la fertilización, impedir la polispermia y proteger al ovocito y embrión de daños físicos.

2. La gameta masculina

La espermatogénesis se define como el proceso secuencial de fases proliferativas, reduccional y de diferenciación, que produce espermatozoides a partir de las células germinales primordiales. Este proceso ocurre en los túbulos seminíferos contenidos en la gónada masculina, órganos pares denominados testículos (Figura 3).

La meiosis de las células germinales masculinas (Figura 3) comienza luego de la pubertad y ocurre durante toda la vida adulta del individuo. Una población de células germinales continúa multiplicándose por mitosis a lo largo de la vida proveyendo así de una fuente constante de espermatozoides. Una característica particular de estas divisiones mitóticas es que las mismas presentan telofases incompletas, lo que origina clones celulares unidos por puentes intercitoplasmáticos. En el transcurso de esta fase proliferativa, algunas espermatogonias se diferencian en espermatocitos primarios, los cuales entran en meiosis generando espermatocitos secundarios. Éstos entran a una interfase intermeiótica de poca duración, para pasar luego a la segunda división meiótica que da origen a las células llamadas espermátides.

Las espermátides están ubicadas hacia la luz del túbulo seminífero y en ese medio ambiente bioquímico completan la última fase de la espermatogénesis, denominada espermiogénesis, que es un proceso de remodelación morfológica regulado básicamente por la testosterona. Durante esta etapa, el citoplasma de la espermátide se pierde casi por completo por lo que el espermatozoide carece de la maquinaria necesaria para la expresión de proteínas, síntesis y degradación de lípidos, y transporte vesicular.



Figura 3: La espermatogénesis y el tracto reproductor masculino

A la izquierda y arriba, se muestra una representación simple del tracto reproductor masculino. A la derecha y arriba, se muestra una microfotografía de un corte transversal de un túbulo seminífero, nótese los espermatozoides en el centro del túbulo. A la derecha y abajo, se esquematiza una célula de Sertoli en un corte transversal de un túbulo seminífero resaltando diferentes estadios celulares presentes durante la espermatogénesis. A la izquierda y abajo, se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis masculina.

Además de la línea germinal, dentro del túbulo seminífero se encuentran las células de Sertoli (Figura 3). La función de estas células es crear y mantener un microambiente apropiado para el correcto desarrollo de los espermatozoides. Su forma

es única ya que se apoyan en la membrana basal y llegan hasta el lumen del epitelio seminífero extendiéndose como "ramas de un árbol" entre las células germinales.

Luego de la espermiación, los espermatozoides salen del epitelio seminífero por la *rete testis*, que se conecta mediante los ductos eferentes con el epidídimo (Figura 3).

A pesar de que la forma y el tamaño de los espermatozoides de las distintas especies de los mamíferos son variables (ver Figura 5), los mismos comparten una estructura general similar. Básicamente, el espermatozoide posee dos componentes morfológicos distintivos: la cabeza y la cola o flagelo (Eddy & O'Brien, 1994) (Figura 4).

La cabeza contiene al núcleo en donde se encuentra la cromatina asociada a proteínas básicas y de bajo peso molecular, llamadas protaminas. Estas proteínas permiten un mayor empaquetamiento de la cromatina comparado con las histonas presentes en las células somáticas. Rodeando la parte anterior del núcleo se encuentra el acrosoma, estructura membranosa originada a partir del aparato de Golgi. Esta vesícula secretoria contiene varias enzimas hidrolíticas las cuales han sido relacionadas con la capacidad del espermatozoide de penetrar las cubiertas que rodean al ovocito durante la fertilización. El acrosoma está constituido por dos segmentos denominados capuchón acrosomal y segmento ecuatorial (SE), distinguibles por la concentración y distribución de partículas intramembranosas. 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. Como toda célula, el espermatozoide, incluido el acrosoma, está limitado por la membrana plasmática. La región de la membrana plasmática que cubre el acrosoma se conoce como región acrosomal, en tanto que la región por debajo del acrosoma recibe el nombre de post-acrosomal.



Figura 4: La gameta masculina

Se muestra un esquema de un espermatozoide humano de frente y de perfil. En el mismo se puede observar los dos componentes morfológicos distintivos: cabeza y flagelo, y sus estructuras internas.

El componente principal de la cola es el axonema, que consiste en un par de microtúbulos centrales rodeados por un cilindro de 9 pares de microtúbulos. Esta estructura es la que permite el movimiento de la cola. Convencionalmente, el flagelo se divide en tres piezas: media, principal y terminal. El axonema de la pieza media está recubierto por mitocondrias ubicadas según un patrón helicoidal las cuales cumplirían un papel en la provisión de energía.

2.1. Maduración epidimaria

En los mamíferos, los espermatozoides que salen del testículo aún no poseen la capacidad de moverse progresivamente y fertilizar al ovocito (Yanagimachi, 1994). Estas capacidades las adquieren mediante su pasaje por el epidídimo, proceso conocido como maduración epididimaria (Bedford, 1979; Hinrichsen & Blaquier, 1980; Austin, 1985; Cooper, 1986). El epidídimo (Figura 3) consiste en un conducto único, largo y muy replegado, que cubre el borde posterior del testículo. Convencionalmente, el epidídimo se divide en tres regiones según su proximidad con el testículo: *caput* (cabeza), *corpus* (cuerpo) y *cauda* (cola). Aunque no todos los espermatozoides adquieren la capacidad fertilizante simultáneamente, y existe variación entre las distintas especies, como regla general se establece que una gran población de espermatozoides obtiene el potencial fertilizante al llegar al *cauda* epididimario (Yanagimachi, 1994).

El proceso de maduración es dependiente de andrógenos (Blaquier et al., 1973; Dyson & Orgebin-Crist, 1973) 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. Pero sin lugar a dudas, la mayor parte de los cambios ocurren al nivel de la membrana plasmática, como el procesamiento, la migración y la liberación de proteínas y lípidos existentes en la superficie del espermatozoide, y la adquisición de nuevas proteínas secretadas por el epidídimo (revisión de trabajos en: Yanagimachi, 1994; Gatti et al., 2004).

Los espermatozoides son almacenados en la región del cauda epididimario hasta la eyaculación la cual recoge las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales) y conduce a los espermatozoides hasta la uretra (Eddy & O'Brien, 1994).

2.2. Capacitación

A pesar de que los espermatozoides eyaculados son mótiles y tienen la capacidad potencial de fertilizar al ovocito, necesitan permanecer durante un cierto período de tiempo en el tracto genital femenino para poder expresar dicha capacidad. Este fenómeno ha recibido el nombre de "capacitación" (Chang, 1951; Austin, 1952).

El sitio fisiológico en donde ocurre la capacitación *in vivo* es el oviducto o el útero dependiendo de la especie (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, espermatozoides del cauda epididimario pueden ser capacitados *in vitro* en un medio definido con una concentración de electrolitos similar a la del fluido oviductal. Si bien los medios no son universales y difieren para cada especie, éstos generalmente contiene sustratos energéticos como el piruvato, lactato y glucosa, un aceptor de colesterol como la albúmina sérica, e iones como Ca⁺², K⁺, Na⁺ y HCO₃⁻.

Uno de los mayores cambios que ocurren durante el proceso de capacitación implica la desestabilización de la membrana plasmática. En diversas especies se ha demostrado que la membrana muestra una distribución asimétrica de lípidos (Muller et al., 1994; Nolan et al., 1995; Gadella et al., 1999), la cual sería distorsionada por acción del ion bicarbonato durante la capacitación (Harrison et al., 1996; Rathi et al., 2001; Gadella & Harrison, 2002; De Vries et al., 2003; Baumber & Meyers, 2006). Se cree que el mayor efecto de la reorganización de los lípidos sería el de facilitar la remoción del colesterol de ciertas dominios de la membrana plasmática (Flesch et al., 2001). La albúmina (presente en el tracto femenino) fue propuesta como uno de los agentes removedor del colesterol (Go & Wolf, 1985; Cross, 1998; Osheroff et al., 1999; Visconti et al., 1999a). Sin embargo, posteriormente se demostró que la albúmina es activa sólo luego de la reorganización de los lípidos, evento inducido por el bicarbonato (Flesch et al., 2001). A su vez el bajo contenido de colesterol tiene efectos importantes sobre los microdominios de la membrana denominados "rafts": complejos dinámicos compuestos por colesterol y esfingolípidos. Se postula que los "rafts" estarían involucrados en la transducción de señales intracelulares ya que en los mismos se agrupan ciertos tipos de proteínas intrínsecas de membrana (revisión de trabajos en: Maxfield, 2002). Recientes evidencias en el cerdo muestran que dos marcadores de "rafts" se redistribuyen a la

región apical de la membrana del espermatozoide como consecuencia de la acción del bicarbonato y albúmina presentes en la capacitación (van Gestel et al., 2005).

Como resultado de la redistribución de lípidos a la región apical de la membrana y de la pérdida de colesterol, aumenta la fluidez de la membrana y de esta forma probablemente se debilite la unión de los factores decapacitantes. Estos factores son proteínas de superficie que están débilmente asociadas a la superficie del espermatozoide epididimario inhibiendo la capacitación y luego 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), y la proteína

Estudios en diversas especies han descripto un aumento en la cantidad de proteínas fosforiladas en tirosina durante el proceso de capacitación produciendo una correlación entre el estado capacitante del espermatozoide y dicha fosforilación (Visconti et al., 1995; Carrera et al., 1996; Galantino-Homer et al., 1997; Visconti et al., 1999b; Baumber & Meyers, 2006). Con algunas excepciones (Jha et al., 2002; Asquith et al., 2004; Mitra et al., 2004; Dube et al., 2005; Nagdas et al., 2005), queda aún por estudiar la identidad y función de esta gran cantidad de proteínas que sufren esta modificación post-traduccional durante la capacitación.

En resumen, las modificaciones que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación traen como consecuencia cambios tanto en la cabeza como en la cola del espermatozoide generando una membrana plasmática menos estable, y por ende más fusogénica. Mientras que los cambios al nivel de la cabeza permiten que el espermatozoide pueda sufrir la denominada reacción acrosomal, a nivel de la cola permiten al espermatozoide desarrollar el fenómeno de hiperactivación.

- Reacción acrosomal

La reacción acrosomal (RA) es la exocitosis regulada del contenido acrosomal del espermatozoide (Figura 5). A diferencia de la capacitación, la RA es muy rápida e irreversible.



Figura 5: Reacción acrosomal

Microfotografía de un espermatozoide de cobayo **a**) sin reaccionar y **b**) reaccionado. ac: acrosoma. **c**) Microfotografía de espermatozoides de hámster. Los dos espermatozoides ubicados en la porción inferior de la foto ya han comenzado la reacción acrosomal.

Nótese la forma diferente de la cabeza de los espermatozoides de las dos especies.

En los últimos años, se han propuestos algunos modelos fisiológicos que intentan explicar el mecanismo de inducción de la RA. Los primeros estudios en el ratón indicaron que 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). Estudios posteriores demostraron que la proteína ZP3, mas aún la unión de los oligosacáridos de ZP3 a distintos sitios en el espermatozoide induciría la RA (Leyton & Saling, 1989b). Por lo tanto, sólo los espermatozoides intactos eran capaces de unirse a la ZP. Sin embargo, recientemente se propuso un nuevo modelo, denominado "exocitosis acrosomal", en el

que se plantea que la RA sería un proceso gradual, espontáneo, que sería acelerado por la ZP pero no iniciado por la misma. Según este modelo, entonces, los espermatozoides no deben estar intactos para unirse a la ZP (Kim & Gerton, 2003). Asimismo, 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 inducir la RA (Parinaud et al., 1992; Blackmore, 1993; Roldan et al., 1994). Mas aún, se ha postulado un efecto sinérgico entre elementos presentes en el cúmulus y la ZP sobre el espermatozoide para completar la reacción (Cherr et al., 1986). Por lo tanto, no parecería existir en el medio de fertilización un único componente crucial para el desencadenamiento de la RA, sino que resulta más probable que el espermatozoide capacitado se encontrara listo para sufrir la RA, y que su inducción se produjera a medida que el mismo avanza a través de concentraciones crecientes de factores estimulantes en su camino al ovocito.

Como consecuencia de la inducción de la RA, se inicia una cascada de transducción de señales en el espermatozoide que incluye un aumento en la concentración del calcio intracelular y la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos de la región acrosomal, con excepción del SE. Al igual que la fusión de membranas en otros sistemas como entre vesículas de transporte y la membrana plasmática, la fusión en la RA está mediada por la acción de unas proteínas pertenecientes a la familia SNARE, como Rab3A y NSF (De Blas et al., 2005). En los sitios de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, se forman vesículas mixtas generando poros entre los que se libera el contenido del acrosoma (**Figura 6**).

Como resultado de esta exocitosis acrosomal, la membrana acrosomal interna se encuentra expuesta al medio extracelular, y adquiere continuidad con la membrana plasmática del SE (Yanagimachi, 1994). De esta manera, se exponen moléculas intracrosomales que permitirían al espermatozoide penetrar la ZP, y por otro lado el SE adquiere capacidad fusogénica. Existen evidencias indicando que ciertas enzimas acrosomales como la acrosina y las metaloproteasas, liberadas durante la RA, afectarían a la membrana del SE otorgándole fusogenicidad (Diaz-Perez et al., 1988; Diaz-Perez & Meizel, 1992; Takano et al., 1993). La importancia fisiológica de la RA radica en que

sólo luego de haber reaccionado un espermatozoide es capaz de atravesar la ZP y fusionarse con el oolema (Yanagimachi, 1994).



Figura 6: Progresión de la reacción acrosomal

Se muestra un diagrama representando las etapas de la reacción acrosomal en la cabeza del espermatozoide de ratón. mp: membrana plasmática, ma int: membrana acrosomal interna, ma ext: membrana acrosomal externa.

- Hiperactivación

La hiperactivación (revisión de trabajos en: Yanagimachi, 1994; Suarez & Ho, 2003) es el tipo de movimiento que presentan los espermatozoides, de todas las especies estudiadas, al momento y en el lugar de la fertilización tanto *in vivo* como *in vitro* y observado. Este movimiento es diferente bajo distintas condiciones fisiológicas y en distintas especies, pero básicamente involucra un incremento en la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, y generalmente, asimetría en el batido del flagelo.

Si bien se observó que el fluido oviductal o componentes del cúmulus inducen la hiperactivación, aún no se han identificado con certeza moléculas responsables de la iniciación de este proceso. Asimismo, la cascada de señales que regulan la hiperactivación tampoco se haya completamente descripta, aunque se sabe que el cAMP, calcio, bicarbonato y sustratos metabólicos serían fundamentales.

Se cree que el rol fisiológico de la hiperactivación sería favorecer el desprendimiento de los espermatozoides de las células oviductales, la penetración de sustancias con características viscosas como el mucus del tracto femenino, y finalmente, la penetración del cúmulus y la ZP del ovocito.

3. Interacción de gametas

El proceso de interacción espermatozoide-ovocito involucra una serie de etapas que están esquematizadas en la **Figura 7** y serán descriptas con detalle a continuación.



Figura 7: Interacción espermatozoide-ovocito

Se muestra una microfotografía de un espermatozoide penetrando al ovocito y un diagrama esquemático del proceso de fertilización.

3.1. Penetración del cumulus oophorus

En la mayoría de las especies de mamíferos, los espermatozoides que llegan al oviducto encuentran al ovocito rodeado del *cumulus oophorus* y por ende, deben avanzar a través de la matriz existente entre las células del cúmulus para alcanzar al ovocito (Figura 7).

El rol fisiológico del *cumulus oophorus* es controversial ya que la fertilización *in vitro* puede ocurrir en ausencia del cúmulus y, por otra parte, ovocitos de algunas especies de animales euterianos presentan cúmulus vestigiales (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, se cree que la presencia del cúmulus sería favorable para la interacción espermatozoide-ovocito. Entre las funciones descriptas para esta matríz se encuentran: aumentar el tamaño del ovocito para que el mismo sea mas fácilmente ubicado por los espermatozoides en el oviducto (Bedford & Kim, 1993), prolongar la vida fértil de los espermatozoides y seleccionar aquellos con mayor capacidad fertilizante (Roblero et al., 1990; Tanghe et al., 2002), estimular tanto la motilidad de los espermatozoides como la ocurrencia de la RA (Schroer et al., 2000) y favorecer la penetración de la ZP (Yudin et al., 1988) y el desarrollo embrionario (Zhang et al., 1995).

Aún no existe consenso respecto de los mecanismos involucrados en la penetración del *cumulus oophorus* por el espermatozoide. Parece estar claro que los espermatozoides deben estar capacitados para poder penetrar dicha matriz (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, el estado del acrosoma durante esta etapa es aún controversial y podría ser diferente dependiendo de la especie (Bedford, 2004). 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 (Bedford, 2004). Otro modelo 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). Sin embargo, se ha observado que espermatozoides mótiles de erizo de mar y rana, los cuales carecen de actividad hialuronidasa, son capaces de penetrar el cúmulus de

hámster (Talbot et al., 1985). Por otra parte, estudios de animales "knock out" (ko) para PH-20 (Primakoff et al., 1985), proteína testicular con actividad hialuronidasa (Gmachl et al., 1993; Lin et al., 1994; Cherr et al., 1996), indicaron que esta enzima no sería esencial para la fertilidad del animal, a pesar de sufrir un retardo en la dispersión *in vitro* de las células del cúmulus respecto de los animales normales (Baba et al., 2002). Experimentos posteriores del mismo grupo de trabajo, identificaron a otra hialuronidasa, denominada Hyal5, presente en membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides epididimarios de ratón. Los autores postulan la existencia de una redundancia en cuanto a la función de PH-20 y Hyal5, por lo que entonces Hyal5 estaría compensando la función de PH-20 en los animales ko antes descriptos (Kim et al., 2005).

3.2. Interacción espermatozoide-ZP

Luego de haber penetrado el *cumulus oophorus*, el espermatozoide se encuentra con la ZP (Figura 7 y 8) a la cual se une por la interacción entre moléculas presentes tanto en la superficie del espermatozoide como en la ZP.



Figura 8: Unión espermatozoide-ovocito en el ratón.
a) Microfotografía de espermatozoides unidos a la ZP de un ovocito. b) Fotografía de microscopio electrónico de transmisión de la cabeza de un espermatozoide unido a la ZP de un ovocito. pm: membrana plasmática, ZP: zona pellúcida, n: núcleo, a: acrosoma.

Basándose en evidencias provenientes de estudios en el ratón, se ha propuesto un modelo de adhesión entre el espermatozoide y la ZP que constata de dos etapas (Wassarman, 1988): 1) "unión primaria": interacción del espermatozoide intacto con la

ZP, más específicamente con carbohidratos en ZP3, desencadenando así la RA y 2) "unión secundaria": interacción del espermatozoide reaccionado con la ZP a través de ZP2 mediante componentes presentes en la membrana acrosomal interna. Sin embargo, este modelo ha sido recientemente cuestionado por experimentos con ratones modificados genéticamente, los cuales poseen una ZP "humanizada", es decir en vez de ZP3 de ratón, estos animales sintetizan a la homóloga humana y lo mismo para ZP2 u ambas (Rankin et al., 1998; Rankin et al., 2003). En base a los resultados de estos trabajos, los autores proponen un nuevo modelo de interacción entre el espermatozoide y una estructura supramolecular de la ZP compuesta por ZP2 y ZP3, en vez de la interacción con una única glicoproteína en particular (Rankin et al., 2003; Hoodbhoy & Dean, 2004). Sin embargo, esta hipótesis ha sido refutada (Nixon et al., 2005; Wassarman, 2005), por lo que parecería ser el modelo original de "unión primaria y secundaria" hasta ahora el más aceptado.

Asimismo, también existe controversia en cuanto a la identidad del ligando para ZP3 presente en el espermatozoide. Uno de los candidatos más extensamente estudiados ha sido la β 1,4-galactosiltransferasa I (GalT I) (Shur & Hall, 1982; Lopez & Shur, 1987), aunque su relevancia para la fertilidad ha sido luego replanteada en vista de que los ratones ko para GaT I son fértiles, a pesar de presentar niveles muy bajos tanto de RA inducida por ZP3 como de fertilización de ovocitos in vitro (Lu & Shur, 1997). Otros candidatos alternativos propuestos son sp56 (Bleil & Wassarman, 1990) y zonadhesina (Hardy & Garbers, 1995) pero debido a su localización intracrosomal (Foster et al., 1997; Kim et al., 2001; Bi et al., 2003) existen controversias en cuento a su disponibilidad para interactuar con ZP3. Según el modelo clásico no podrían actuar en la "unión primaria" ya que el espermatozoide se encontraría intacto al momento de unirse a ZP3 aunque en el nuevo modelo de "exocitosis acrosomal" descripto anteriormente (ver sección Reacción acrosomal) (Kim & Gerton, 2003), las moléculas de la matriz acrosomal podrían asociarse a la ZP. Se ha descripto un cuarto candidato (Ensslin et al., 1998) y recientemente se ha identificado su homólogo en ratón, denominado SED1. Estudios con animales ko han demostrado la relevancia de esta proteína para la etapa de unión del espermatozoide a la ZP ya que los ratones machos son subfértiles in vivo e incapaces de unirse a la ZP de ovocitos in vitro (Ensslin & Shur, 2003).

En cuanto a las moléculas del espermatozoide responsables de la "unión secundaria", se han sugerido algunas proteínas tales como PH-20 (Myles & Primakoff, 1997; Yudin et al., 1999) y proacrosina/acrosina (Richardson & O'Rand, 1996; Crosby et al., 1998; Furlong et al., 2000; Howes et al., 2001). En cuanto a PH-20, tal como se mencionara anteriormente, los machos ko para esta proteína resultaron fértiles (Baba et al., 2002), probablemente por redundancia funcional con la hialuronidasa Hyal 5 (Kim et al., 2005). Asimismo, se postula que esta nueva proteína, que es liberada durante la RA, podría "depolimerizar" localmente a la matríz del cúmulus cerca o en la superficie de la ZP, permitiendo así que la cola del espermatozoide se mueva libremente y facilitando la penetración de la ZP. En el caso de acrosina, estudios con animales ko han replanteado el papel de esta enzima en el proceso de fertilización ya que los machos carentes de esta proteína son fértiles (Baba et al., 1994) a pesar de mostrar un retardo en la fertilización in vitro comparado con animales "wild type" (Adham et al., 1997). No obstante, una combinación de estudios posteriores a nivel genético, bioquímico y funcional apoya la hipótesis que la interacción proacrosina/acrosina con ZP2 es importante para la unión del espermatozoide reaccionado a la ZP, postulando la existencia de otras proteasas que pudieran reemplazar a proacrosina/acrosina en esos animales ko (Howes et al., 2001).

La interacción entre el espermatozoide y la ZP continúa con la etapa de penetración de la ZP para la cual dos hipótesis han sido propuestas (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. Según esta teoría, la mayoría de dichas enzimas serían liberadas sobre la superficie de la ZP durante la RA, provocando hidrólisis en la porción de la zona que rodea al espermatozoide e induciendo así el "ablandamiento" de la misma. Otras enzimas permanecerían unidas a la membrana acrosomal interna y serían la responsables de clivar a las moléculas de ZP2 a las que el espermatozoide se haya unido, permitiendo así el avance a través de la zona. La segunda hipótesis, denominada hipótesis mecánica, propone que la RA 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 las características estructurales y funcionales de la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos euterianos,

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, 2004). 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, que quedarían por ende 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.

La interacción espermatozoide-ZP es, en general, especie-específica. Esto significa que un espermatozoide es capaz de unirse y penetrar sólo la ZP de un ovocito de la misma especie. 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 interespecífica ya sea mediante mecanismos comportamentales y anatómicos, como así también barreras celulares adicionales como la ZP (Hanada & Chang, 1972).

3.3. Fusión espermatozoide-ovocito

Una vez que el espermatozoide ha atravesado la ZP y el espacio perivitelino, ocurre la fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito (ver Figura 7). Sólo luego de la ocurrencia de esta fusión un ovocito puede considerarse fertilizado.

La fusión del espermatozoide con el ovocito comprende dos fases de interacción entre las membranas de ambas gametas: una primera de unión, y una segunda de fusión propiamente dicha. Este proceso comienza con la unión de la cabeza del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito y luego de un breve período, que varía según la especie, se produce una abrupta declinación o cesación del movimiento de la cola (Gaddum-Rosse, 1985). Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente

incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi & Phillips, 1980). La parte posterior de la cabeza y la cola son incorporadas a través de un proceso de fusión de membranas, mientras que la región anterior de la cabeza es incorporada al citoplasma de un modo similar a la fagocitosis (Figura 9).





No toda la membrana plasmática de las gametas es fusogénica por lo que los dominios de membrana involucrados en la fusión son restringidos en ambos tipos celulares. El ovocito de roedores se encuentra recubierto de microvellosidades en toda su superficie, con excepción de un área que coincide con la región que recubre al huso meiótico (Ebensperger & Barros, 1984), y a través de la cual raramente ocurriría la fusión del espermatozoide (Johnson et al., 1975; Ebensperger & Barros, 1984). Esto podría deberse a que el segundo corpúsculo polar se forma y se libera por esta región luego de la fertilización, resultando "peligroso" que el espermatozoide se fusione y se incorpore por allí ya sea por interferir con la correcta liberación del corpúsculo, o bien por ser el mismo eliminado durante el proceso de extrusión. Si bien al asociarse al oolema, el espermatozoide entra en contacto con las microvellosidades, aún no se

conoce si las mismas son esenciales para la ocurrencia de la fusión (Bedford & Cooper, 1978).

En el caso del espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al SE 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 inmótiles o de muy baja motilidad son capaces de fusionarse con el ovocito. Por el contrario, la RA es un requisito fundamental para la ocurrencia de la fusión, ya que como se mencionó anteriormente, los espermatozoides no reaccionados (intactos) son incapaces de fusionarse con el oolema (Yanagimachi, 1994).

Si bien el proceso de fusión es un punto clave de la fertilización, es muy escasa la información disponible sobre los mecanismos moleculares involucrados en esta etapa. Al igual que ocurre para la unión a la ZP, la fusión está mediada por la interacción de moléculas complementarias localizadas en los dominios fusogénicos específicos de las membranas de ambas gametas.

En cuanto a los componentes de la membrana del ovocito, las integrinas fueron las primeras moléculas postuladas como mediadoras del proceso de fusión, por tratarse de ligandos específicos de proteínas presentes en el espermatozoide ya involucradas en este proceso. La integrina $\alpha 6\beta 1$, una de las principales en la superficie del ovocito, fue originalmente propuesta como la responsable de la unión espermatozoide-ovocito (Almeida et al., 1995; Bigler et al., 2000). Sin embargo, el hecho que animales ko para esta integrina sean fértiles, cuestionó la relevancia de esta proteína para la fertilización (Miller et al., 2000). Asimismo, la importancia de las integrinas para la fusión ha sido luego replanteada en vista de que un estudio utilizando diferentes combinaciones de animales ko para integrinas y 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 este proceso (He et al., 2003).

La asociación entre la integrina $\alpha 6\beta 1$ y la tetraspanina CD9 en la membrana del ovocito de ratón (Chen et al., 1999) y el hecho que esta tetraspanina haya sido implicada en la fusión de membranas en otros sistemas celulares (Tachibana & Hemler, 1999), sugirió que CD9 también podría cumplir alguna función en el proceso de fusión de gametas. Esta hipótesis fue confirmada por el estudio de animales ko para esta proteína (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000), demostrando que las hembras mutantes son estériles y que sus ovocitos, a pesar de unirse a espermatozoides, son incapaces de fusionarse con los mismos. De acuerdo a estos resultados, CD9 sería una de las moléculas del ovocito responsable del proceso de fusión entre el espermatozoide y el ovocito. Estos estudios fueron los primeros en identificar a una molécula del ovocito esencial para la fertilidad femenina y para la fusión de gametas. Experimentos posteriores demostraron que CD9 actúa en "cis" con otros elementos, aún no identificados, presentes en la membrana del ovocito, funcionando como un organizador de la superficie ovocitaria (Zhu et al., 2002). Estos resultados no descartan la posibilidad de que CD9 pueda también interactuar en "trans" como ligando de una proteína del espermatozoide.

Resultados más recientes indicaron además que los animales ko para proteínas del ovocito unidas al oolema vía glicosilfosfatidilinositol también presentaban ovocitos con la fusogenicidad altamente afectada (Alfieri et al., 2003). Sin embargo, la identidad de estas proteínas, que pudieran ser relevantes para la fusión, aún no se conoce.

Respecto a las moléculas del espermatozoide implicadas en fusión, los estudios se limitan principalmente a las proteínas de la familia ADAM, a una proteína recientemente descripta denominada "Izumo" y a la proteína epididimaria DE/CRISP-1.

La familia de proteínas denominada ADAM (**a** disintegrin and **a** metalloprotease domain) está compuesta por alrededor de 40 miembros (revisión de trabajos: Kim et al., 2006b), tres de los cuales han sido postulados como mediadores del proceso de fusión espermatozoide-ovocito: fertilina α /ADAM1 (existen 2 subunidades: a y b), fertilina β /ADAM2 y ciritestina/ADAM3 (revisión de trabajos: Evans, 1999). Estas proteínas se expresan en el testículo y se localizan en el SE del espermatozoide reaccionado, ubicación consistente con una posible participación en el proceso de fusión.

La proteína fertilina es un heterodímero entre los polipéptidos α y β (Blobel et al., 1992), conteniendo la fertilina α un potencial péptido de fusión similar a los observados en diferentes proteínas virales mientras que la ß presenta un dominio desintegrina (Blobel et al., 1992). Estas características junto con distintos experimentos in vitro (revisión de trabajos: Evans, 1999) sugirieron la posible participación del heterodímero en la fusión de gametas a través del siguiente modelo: el dominio desintegrina de fertilina β se uniría a una integrina del ovocito, lo que expondría el péptido fusogénico de fertilina a, conduciendo a la fusión de las membranas. Sin embargo, evidencias posteriores han puesto en duda la función propuesta para este heterodímero. A pesar de que el análisis de la fertilidad de ratones KO deficientes para fertilina a/ADAM1a (sólo presente en células germinales testiculares) ó fertilina β /ADAM2 indicó que los machos son infértiles (Cho et al., 1998; Nishimura et al., 2004) el fenotipo de los ratones fue inesperado y complejo. En ambos casos, la infertilidad in vivo se debe a que los espermatozoides presentan defectos en el transporte a través del oviducto y en la etapa de unión a la ZP. Los ratones deficientes en fertilina β , además, presentan una disminución en la capacidad espermática de unirse y fusionarse con el oolema in vitro (Cho et al., 1998; Nishimura et al., 2001). Por otro lado, ratones ko para la otra subunidad α , es decir, ADAM1b resultaron fértiles (Kim et al., 2006a).

En cuanto a ciristestina/ADAM3, su historia es similar a fertilina ya que los estudios previos *in vitro* (revisión de trabajos: Evans, 1999) postularon a esta proteína como mediadora del proceso de fusión y mas aún los ratones macho ko para esta proteína son infértiles. Sin embargo y a pesar de mostrar una disminución en la capacidad de unión al oolema, la capacidad de fusión de estos espermatozoides no está afectada, y la infertilidad de los animales se debería a una unión deficiente entre los espermatozoides y la ZP (Nishimura et al., 2001; Shamsadin et al., 1999).

Estudios de expresión de proteínas sobre estas cuatro líneas de animales ko indicaron la ausencia de otras proteínas ADAMs en la célula germinal testicular o en el espermatozoide además de la proteína ADAM que se deseaba anular (Kim et al., 2006a; Kim et al., 2006b; Nishimura et al., 2001; Stein et al., 2005). Mas aún, animales ko para calmegina, chaperona requerida para el proceso de fertilización (Ikawa et al., 1997; Ikawa et al., 2001; Nakanishi et al., 2004), presenta el mismo fenotipo que los animales deficientes en ADAM1a, y disminución o ausencia de alguna de esta proteínas ADAMs. Por lo tanto, en base a todos los resultados obtenidos, se concluye que, por lo menos en el ratón, el heterodímero ADAM1b/ADAM2 sería dispensable para el proceso de fertilización, ya sea migración de espermatozoides a través del oviducto, unión espermatozoide-ZP o fusión espermatozoide-ovocito. Por otro lado, ADAM1a/ADAM2 sería esencial para la correcta localización de ADAM3 en la superficie del espermatozoide, y ADAM3 sería la molécula requerida para la unión espermatozoide-ZP (Stein et al., 2005; Kim et al., 2006a). Aún no se descarta que otras proteínas ADAMs presentes sobre el espermatozoide estén involucradas en el proceso de fusión

La proteína Izumo corresponde a un miembro de expresión testicular de la familia de inmunoglobulinas IgSF localizado en el acrosoma del espermatozoide (Inoue et al., 2005). La relevancia de esta proteína para la fertilidad y su rol en el proceso de fusión fueron confirmados mediante el análisis de los animales ko para Izumo. Los machos mutantes son estériles y mas aún la capacidad fusogénica de los espermatozoides es el único parámetro espermático comprometido que presentaron estos animales (Inoue et al., 2005).

La proteína DE y su participación en el proceso de fusión en la rata, fueron descriptas por nuestro laboratorio. Su caracterización, así como las evidencias de su participación en la fusión de gametas, serán desarrolladas con mayor profundidad más adelante en la introducción.

En cuanto a la especificidad de especie en la fusión, la misma existe pero es menos restringida que en la penetración de la ZP. La fusión de gametas heterólogas es posible en algunos casos, pero sólo con gametas provenientes de determinadas especies y no siempre en ambas direcciones. Como ejemplo, los ovocitos de rata pueden ser

penetrados heterólogamente por espermatozoides de ratón, pero los ovocitos de ratón no pueden ser penetrados por espermatozoides de rata (Yanagimachi, 1994).

- Consecuencias de la fusión

Luego de la fusión con el espermatozoide, el ovocito inicia una serie de eventos morfológicos y bioquímicos que llevan a la división celular y diferenciación, o sea a la formación de un nuevo individuo. A este reinicio de la actividad del ovocito se lo denomina activación. Unos segundos luego de que la fusión ha ocurrido se produce un aumento transitorio de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático en el ovocito (Yanagimachi, 1994). El mecanismo por el cual se desencadena esta liberación de Ca^{2+} aún no ha sido completamente dilucidado (revisión de trabajos: Kurokawa et al., 2004).

Los indicadores más visibles de la activación son la exocitosis de los gránulos corticales y el reinicio de la meiosis.

i) Exocitosis de los gránulos corticales: 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 que contienen mucopolisacáridos y diversas enzimas (Ducibella, 1991). La aparición de dichos gránulos se encuentra asociada a la expansión del aparato de Golgi durante el crecimiento del ovocito. Pocos minutos luego de producida la fusión, más del 95% de los gránulos corticales han sido expulsados por exocitosis (Ducibella, 1991; Hoodbhoy & Talbot, 1994). Su función es modificar la ZP, en lo que se denomina la "reacción de zona", como así también el oolema, "reacción vitelina", de forma tal de prevenir la polispermia. En varias especies, se ha demostrado que 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). Por ejemplo, en el ratón, ZP2 (120 kDa) es hidrolizada, resultando en una proteína de menor peso molecular a la que se denomina ZP2f (Moller & Wassarman, 1989). ZP3 también es modificada por el contenido de los gránulos corticales, pero en este caso se modifica el patrón de glicosilación de dicha proteína (Wassarman, 1987). Por otro lado, al nivel del oolema, 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).

En algunas especies, como el hámster, humano y perro, la prevención de polispermia depende principalmente de la reacción de zona. En otras especies, como el conejo y el murciélago, el bloqueo depende principalmente de la modificación del oolema, por lo cual estos ovocitos presentan normalmente espermatozoides supernumerarios en el espacio perivitelino. Existe además un tercer grupo de especies, que incluye a la rata, ratón y cobayo, en el que el bloqueo de polispermia depende de ambos (Austin, 1961; Yanagimachi, 1994).

ii) Reinicio de la meiosis: Una vez que se ha completado la meiosis y liberado el segundo corpúsculo polar, el complemento haploide resultante se transforma en el pronúcleo femenino. En tanto, el núcleo del espermatozoide se decondensa y se transforma en el pronúcleo masculino. En ambos pronúcleos comienza la síntesis de ADN. Una vez que los pronúcleos han completado su desarrollo, migran al centro del ovocito (Figura 10), sus envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar lugar a la primera división mitótica.



Figura 10: Ovocito fertilizado.

Microfotografía de un ovocito humano ya fertilizado. Obsérvese los dos pronúcleos en el centro del ovocito conteniendo varios nucleolos cada uno.

4. La proteína epididimaria "DE"

Tal como se mencionara anteriormente, una de las proteínas del espermatozoide implicadas en el proceso de fusión de gametas es la proteína epididimaria DE. Esta proteína fue originalmente identificada en nuestro laboratorio (Cameo & Blaquier, 1976; Kohane et al., 1979; Kohane et al., 1980a), como una de las principales secreciones del epidídimo de rata. La caracterización de DE purificada (32 kDa) indicó que se trata de una glicoproteína ácida que contiene un 10% de residuos glicosílicos formados por D-manosa, D-galacotosa, N-acetil-D-glucosamina, ácido N-acetil-neuramínico y D-glucosa (Garberi et al., 1982).

DE está constituida por las proteínas D y E, las cuales se detectan como dos bandas claramente distinguibles en geles de poliacrilamida nativos (Cameo & Blaquier, 1976; Garberi et al., 1979). Estudios utilizando combinaciones de distintos anticuerpos indicaron la existencia de un epitope presente en E y no en D, sugiriendo que la diferencia entre ambas proteínas residiría en la secuencia aminoacídica (Xu & Hamilton, 1996; Roberts et al., 2002). Sin embargo, se ha encontrado sólo un gen que presenta transcriptos alternativos los cuales no difieren en las regiones codificantes, razón por la cual los mismos no podrían dar lugar a la diferencia entre D y E (Klemme et al., 1999; Roberts et al., 2001). Recientemente, se ha encontrado que la forma E presenta un residuo adicional de N-acetil galactosamina en su región N-terminal, el que podría originar el epitope presente únicamente en E (Roberts et al., 2006).

DE es sintetizada en forma andrógeno-dependiente en las regiones proximales del epidídimo y se asocia a la superficie del espermatozoide de rata durante el tránsito epididimario (Kohane et al., 1980a; Kohane et al., 1980b). Experimentos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) mostraron que originalmente localizada en la región dorsal del acrosoma, DE migra al SE bajo condiciones capacitantes tanto *in vivo* como *in vitro* (Rochwerger & Cuasnicu, 1992) (Figura 11). La observación de que esta migración disminuye en ausencia de calcio, ión esencial para la iniciación de la RA (ver sección *Reacción acrosomal*), y aumente por el agregado de ionóforo de Ca⁺² al medio

de capacitación, indica que la misma sucedería concomitantemente con la ocurrencia de la RA (Rochwerger & Cuasnicu, 1992).



Figura 11: Localización de la proteína DE sobre el espermatozoide.

a) Esquema de la cabeza de un espermatozoide de rata en donde se distinguen la región dorsal (RD) y el segmento ecuatorial (SE). Microfotografía de la cabeza de un espermatozoide de rata con marca fluorescente para DE en **b**) la región dorsal, **c**) el segmento ecuatorial.

Resultados posteriores indicaron la existencia de dos poblaciones asociadas a la superficie del espermatozoide con afinidades diferentes: una población mayoritaria que se asocia en forma débil por interacciones iónicas y que aumenta durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, y una fracción minoritaria que se asocia con alta afinidad y que se mantiene constante a lo largo de la maduración (Cohen et al., 2000b). En tanto la población "débilmente unida", se liberaría de las células durante la capacitación, la población "fuertemente unida" permanecería sobre el espermatozoide luego de dicho proceso y migraría al SE con la RA

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 presenta un 100% de homología con la glicoproteína secretora epididimaria de rata AEG (acidic epididymal protein) previamente clonada por Brooks et al. (1986) y Charest et al. (1988). El análisis de esta secuencia indicó que DE pertenece a la familia de proteínas CRISP (**c**ysteine-**ri**ch **s**ecretory **p**rotein) cuyos miembros poseen un total de 16 cisteínas, 10 de las cuales se localizan en el extremo C-terminal de la molécula. Dado que DE es el primer miembro descripto de este familia, también ha sido denominada CRISP-1 (Haendler et
al., 1993). Cabe mencionar que DE/CRISP-1 presenta una gran homología con otras dos proteínas epididimarias: la proteína de ratón AEG-1 ó CRISP-1 (82%) (Mizuki & Kasahara, 1992; Haendler et al., 1993), y la proteína humana ARP ó hCRISP-1 (55%) (Hayashi et al., 1996; Kratzschmar et al., 1996).

En los últimos años, la familia de proteínas CRISP ha crecido significativamente debido a la identificación de nuevos miembros no sólo en mamíferos, sino que además en especies alejadas evolutivamente. En cuanto a las proteínas de mamíferos, se han identificado: Tpx-1/CRISP-2, de origen testicular (Hardy et al., 1988; Kasahara et al., 1989; O'Bryan et al., 1998); CRISP-3 con una expresión más ubicua que incluye próstata, páncreas, saliva, neutrófilos, timo, colon y ovario (Haendler et al., 1993; Udby et al., 1995; Kjeldsen et al., 1996); y la recientemente identificada CRISP-4, también de origen epididimario (Jalkanen et al., 2005; Nolan et al., 2006). Asimismo, se ha descripto la existencia de proteínas CRISPs en venenos de lagarto y serpiente (Morrissette et al., 1995; Yamazaki & Morita, 2004), en ovocito y embrión de rana (Olson et al., 2001) y en embrión de gallina (Smith et al., 2001). La familia CRISP, junto con alergenos de insectos (V5), proteínas de plantas y de humanos relacionadas con proteína del grupo 1 involucradas en la patogénesis de plantas (Pathogenesis-Related-1) (Fernandez et al., 1997; Henriksen et al., 2001; Serrano et al., 2004), conforman la superfamilia de proteínas CAP (CRISP/Antigen-5/PR-1).

Si bien existen numerosos miembros de la familia CRISP, muy pocos han sido estudiados en relación a su función biológica (Rochwerger et al., 1992; Morrissette et al., 1995; Yamazaki & Morita, 2004; Wang et al., 2005; Guo et al., 2005). Entre los mismos se encuentra la proteína DE/CRISP-1. Resultados de nuestro laboratorio mostraron que la exposición de espermatozoides epididimarios a un anticuerpo policlonal contra DE (anti-DE) previo a su inseminación uterina, es capaz de inhibir significativamente el porcentaje de ovocitos fertilizados en el oviducto (Cuanicu et al, 1984), sugiriendo que DE estaría involucrada en el proceso de fertilización. Estudios posteriores indicaron que la inmunización de ratas machos y hembras con DE produjo una respuesta inmune en mas del 90% de los animales como así también una inhibición significativa de la fertilidad en ambos sexos (Cuasnicu et al, 1989, Perez Martinez et al,

Introducción

1995) a través de un mecanismo que involucraría la entrada de los anticuerpos al tracto reproductivo, su unión a los espermatozoides y la inhibición especifica de su capacidad fertilizante sin provocar efectos patológicos (Ellerman et al, 1998). Recientemente, se demostró que la proteína DE recombinante es también capaz de generar una respuesta inmune en ratas tanto machos como hembras, resultando en una disminución significativa en la fertilidad de los animales sin producir efectos patológicos evidentes (Ellerman et al., en prensa). En conjunto, estos resultados indicaron que, además de su participación en el proceso de fertilización, DE sería relevante para la fertilidad de un individuo y, por ende, un potencial candidato para la regulación de la fertilidad.

Resultados posteriores, utilizando ensayos de fertilización in vitro, mostraron que la exposición de los espermatozoides al anticuerpo anti-DE era capaz de inhibir significativamente la penetración de ovocitos sin ZP, sugiriendo que DE estaría involucrada en la etapa especifica de fusión de gametas (Cuasnicu et al, 1991). Como otra aproximación al estudio de la participación de DE en el proceso de fusión, ovocitos sin ZP y espermatozoides capacitados fueron coincubados en presencia de DE purificada con la idea de que si existieran sitios de unión para DE en la superficie del ovocito, la proteína debería unirse a dichos sitios e inhibir significativamente el proceso de fusión. Los resultados indicaron que, efectivamente, DE es capaz de producir una inhibición disminución significativa y concentración-dependiente del porcentaje de ovocitos sin ZP penetrados (Rochwerger et al., 1992), sin afectar la unión inicial de los espermatozoides a los ovocitos. En conjunto, estos resultados sugieren que DE participaría en un evento posterior a la unión de las gametas y conducente a la fusión de las membranas, a través de sitios complementarios. Ensayos de IFI permitieron detectar la presencia de dichos sitios en toda la superficie del ovocito, exceptuando la región de la membrana plasmática libre de microvellosidades que cubre el huso meiótico por la cual el espermatozoide raramente se fusiona con el ovocito (Rochwerger et al., 1992, Cohen et al, 1996) (Figura 12). Por lo tanto, mientras la proteína DE se localiza en la región fusogénica de la membrana plasmática del espermatozoide, los sitios complementarios para DE se encontrarían localizados en la región fusogénica de la membrana plasmática del ovocito.



Figura 12: Localización de la sitios complementarios a DE en el ovocito. Microfotografías de un ovocito de rata sin ZP con marca fluorescente para sitios de unión a DE. Se muestran dos planos focales del mismo ovocito. La flecha indica el área negativa.

En cuanto a las proteínas homólogas a DE en otras especies, resultados de nuestro laboratorio utilizando anticuerpos anti-DE han demostrado la presencia de la proteína de ratón AEG/CRISP-1 en extractos proteicos de epidídimos y de espermatozoides como así también sobre la región acrosomal de la cabeza del espermatozoide de ratón. El agregado de la proteína de rata durante la coincubación de espermatozoides y ovocitos sin ZP de ratón, produjo una disminución significativa en el porcentaje de fertilización, sin inhibir la unión de las gametas. Estudios de IFI utilizando DE y anti-DE, indicaron la presencia de sitios complementarios para DE en la región fusogénica de los ovocitos de ratón (Cohen et al., 2000a). Por su parte, la proteína homóloga humana ARP/hCRISP-1 se asocia con alta afinidad al espermatozoide humano y permanece luego del proceso de capacitación. Resultados de nuestro laboratorio indicaron que un anticuerpo específico contra ARP era capaz de inhibir significativamente la penetración de ovocitos de hámster por espermatozoides humanos, mientras que la proteína recombinante ARP poseía sitios de unión en la superficie del ovocito humano (Cohen et al., 2001).

Estudios posteriores tuvieron como objetivo tratar de comprender el mecanismo molecular por el cual DE y sus homólogos participarían en el proceso de fusión. En primer lugar, DE de rata fue expresada en un sistema procariótico evaluando su actividad biológica a través de las técnicas de IFI y el ensayo de fusión previamente mencionados. Estos experimentos indicaron que, al igual que la proteína nativa, la proteína recombinante era capaz de unirse a los sitios complementarios presentes en el ovocito como así también de inhibir el proceso de fusión (Ellerman et al, 2002). Ensayos de deglicosilación de la proteína nativa, y comparación entre dicha proteína y la recombinante no glicosilada mostraron que los carbohidratos no serían esenciales, indicando que la actividad biológica de la proteína residiría en la región peptídica de la misma. Asimismo, la reducción de puentes disulfuros en ambas proteínas demostraron que la exacta formación de dichos puentes en la proteína no sería fundamental para su función biológica (Ellerman et al., 2002).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento en cuanto al comportamiento y función de la proteína epididimaria DE, el presente trabajo ha tenido tres objetivos principales que se detallan en la próxima sección.

OBJETIVOS

El presente trabajo ha tenido tres objetivos principales llevados a cabo a través de diferentes estudios.

Objetivo I. DE y el proceso de capacitación

Tal como fuera mencionado anteriormente, DE se encuentra originalmente localizada en la región dorsal del acrosoma del espermatozoide de rata y migra al SE bajo condiciones capacitantes tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre las moléculas esenciales para la compleción del proceso de capacitación, el ión bicarbonato ha sido descripto como responsable de la ocurrencia de diferentes eventos moleculares asociados a este proceso tales como la redistribución de lípidos, la fosforilación de proteínas en tirosina y la hiperpolarización de la membrana plasmática (revisión de trabajos: Visconti et al., 2002; Gadella & van Gestel, 2004). Por lo tanto, el primer objetivo de esta Tesis consistió en investigar si la migración de DE al SE está regulada por el ión bicarbonato durante el proceso de capacitación.

En paralelo a estos estudios, investigamos la influencia del ión bicarbonato sobre otros dos importantes eventos que tienen lugar durante el proceso de capacitación y que no habían sido aún estudiados en el modelo de rata: la fosforilación de proteínas en tirosina y la expresión de la capacidad fusógenica del espermatozoide.

Por lo tanto, los estudios realizados para llevar a cabo este primer objetivo fueron:

- Evaluación del efecto producido por la ausencia de bicarbonato sobre la migración de la proteína DE al SE, la fosforilación de proteínas en tirosina y la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide.
- 2. Estudio de la participación de la vía de transducción de señales intracelulares cAMP/PKA en la regulación por bicarbonato de los tres parámetros mencionados.

Objetivo II. DE y el proceso de fertilización

Como fuera descripto en la *Introducción*, nuestros estudios indican que la proteína DE y sus homólogos participarían en el proceso de fusión de gametas a través de su unión a sitios complementarios localizados en la superficie del ovocito. Con el fin de esclarecer los mecanismos moleculares involucrados en dicha interacción, el segundo objetivo de esta Tesis consistió en identificar el sitio activo por el cual DE interactúa con el ovocito y participa en el proceso de fusión de gametas.

Para tal fin se realizaron los siguientes estudios:

- Determinación de la región de la proteína DE responsable de su unión al ovocito de rata.
- Evaluación de la especificidad de la interacción entre dicha región y los sitios complementarios en el ovocito.

Objetivo III. DE y su relevancia para la fertilidad

Tal como fuera descripto anteriormente, los resultados de la inmunización de ratas con DE indican que esta proteína epididimaria, además de participar en el proceso de fertilización, podría ser relevante para la fertilidad de un individuo. Por esta razón, y como una lógica continuación de nuestros estudios, el tercer objetivo de este trabajo consistió en la generación de ratones "knock out" para CRISP-1 y el estudio de su fertilidad. De acuerdo a nuestro conocimiento, estos son los primeros animales ko producidos para una proteína identificada en el país.

Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron los siguientes estudios:

1. Generación de una línea de ratones ko para CRISP-1.

2. Evaluación de la ausencia de CRISP-1 sobre la fertilidad de los animales y sobre diversos parámetros funcionales del espermatozoide.

CAPITULO I

"DE y el proceso de capacitación"

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

Ratas macho adultas (3-9 meses de edad), y hembras prepúberes (25-30 días de edad) de la cepa Sprague-Dawley fueron utilizadas para los ensayos descriptos en este capítulo. Los animales fueron mantenidos a 23°C en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, con alimento y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad. Los experimentos con animales fueron llevados a cabo siguiendo "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" publicada por NIH (Bethesda, MA, EEUU).

2. Preparación de los espermatozoides

2.1. Obtención y capacitación in vitro de espermatozoides de rata

El medio utilizado para la recuperación y capacitación de los espermatozoides de rata correspondió al medio de fertilización RFM (Kaplan & Kraicer, 1978). En algunos casos se utilizó dicho medio pero sin el agregado de bicarbonato de sodio manteniendo el pH en 7,2-7,4 por la presencia de HEPES (25 mM). Antes de utilizar el medio, el mismo fue equilibrado durante 30 min en el incubador a 37°C. Para la obtención de espermatozoides epididimarios, los animales fueron anestesiados, y los epidídimos extraídos y limpiados de tejido adiposo y de sangre. Los espermatozoides fueron recuperados por punción del túbulo correspondiente a la región del cauda y los espermatozoides mótiles fueron seleccionados por la técnica de "swim up" modificada (descripta originalmente por Shalgi et al., 1981). Para ello, los espermatozoides fueron colocados en el fondo de un tubo cónico Falcon (de 15 ml de capacidad) y cubiertos de 1,5 ml de medio RFM sin HCO₃⁻ y luego incubados durante 10 min a 37°C permitiendo que los espermatozoides mótiles asciendan hacia la superficie libre.

Paralelamente, 400 μ l de medio RFM con o sin HCO₃⁻ fue agregado a placas de cultivo de 24 hoyos cubriendo a los mismos con 300 μ l de vaselina por hoyo. A continuación, alícuotas de las capas superiores del "swim up" fueron agregadas a cada hoyo de la placa de

cultivo. La concentración final de espermatozoides en cada hoyo fue entre 0,5 y 1 x 10^6 células/ml determinada mediante la utilización de un hemocitómetro. La incubación continuó por un período de hasta 5 hs a 37°C y en el caso que el medio contuviera HCO₃⁻, la misma se realizó en un incubador de gaseo automático conteniendo una atmósfera de 5% de CO₂.

2.2. Tratamiento de los espermatozoides de rata

En algunos casos, la incubación de espermatozoides fue realizada en medio sin HCO₃⁻ pero en presencia de dibutiril AMP cíclico (dbcAMP) a 5 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU; preparado en medio RFM) y pentoxifilina (PTX) a 3 mM (Sigma; preparado en medio RFM al momento del uso). En otros casos, se realizó la incubación de espermatozoides en medio completo con el agregado de H89 a 10, 30 ó 100 μ M (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU; preparado a 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO)). Para el estudio de la acumulación de AMP cíclico (cAMP), los espermatozoides fueron capacitados en presencia de bicarbonato y 3 mM de PTX. En algunos casos, se agregó acetato de miristato (PMA) a 10 μ M (Sigma; preparado a 3 mM en DMSO) ó KH7 a 50 μ M (cedido por el Dr Buck, Cornell University; NY; EEUU; preparado a 100 mM en DMSO). En los experimentos que se utilizaron reactivos disueltos en DMSO, también se agregó un tratamiento con solo el vehículo.

Para determinar la reversibilidad del efecto causado por bicarbonato sobre la capacitación del espermatozoide, los mismos fueron incubados en medio sin HCO_3^- por 3 hs, y luego expuestos al agregado del anión por 15, 30 o 60 min adicionales.

2.3. Obtención y capacitación de espermatozoides de ratón

Los epidídimos fueron obtenidos, limpiados y los espermatozoides colectados por punción de los túbulos del cauda. El medio utilizado, en este caso, fue el descripto por Fraser y Drury (1975) suplementado con BSA 3%. La capacitación fue llevada cabo en gotas de 200 μ l de medio bajo vaselina. En cada gota se sembró una alícuota de la suspensión original de forma tal que la concentración final resultó de 0,1-1 x 10⁷ células/ml determinada por conteo en hemocitómetro. La incubación continuó por un período de 90 min a 37°C en estufa con gaseo automático conteniendo una atmósfera de 5% de CO₂.

3. Evaluación de la migración de la proteína DE

Inmunofluorescencia indirecta

Alícuotas de suspensiones de espermatozoides fueron incubadas con paraformaldehído (PFA) 1% en PBS por 10 min a TA y posteriormente lavadas tres veces con PBS-BSA 4 mg/ml. Los espermatozoides fijados fueron extendidos sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina (0,1 mg/ml) y secados al aire. El bloqueo fue realizado con suero de cabra normal (SCAN) 5% en PBS por 30 min a 37°C. Las muestras fueron luego incubadas con el el anticuerpo policlonal anti-DE (concentración original: 7,2 mg/ml y diluido 1/100 en SCAN 1% en PBS) (Kohane et al., 1983) durante 16 hs a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS y los extendidos fueron luego expuestos a anticuerpos anti-IgG de conejo acoplados a isocianato de fluoresceína (FITC; Sigma) diluido 1/100 en PBS durante 30 min a 37°C. Finalmente, luego de 3 lavados adicionales, las muestras fueron montadas con glicerol 90% en PBS y los cubreobjetos sellados con esmalte. Para cada tratamiento, se contaron 200 células en un microscopio Nikon Optiphot (Nikon, Tokyo, Japón) equipado con lentes epifluorescentes (500 x).

4. Determinación de fosforilación de proteínas en tirosina

4.1. Separación electroforética y Western Blot

Alícuotas de suspensiones de espermatozoides fueron lavadas dos veces con PBS y los espermatozoides resuspendidos en buffer de sembrado $(10 \ \mu l / 1 \ x \ 10^6$ células) conteniendo Tris-HCl 25 mM pH 6,8, SDS 0,5% y glicerol 5%. Luego de 5 min de incubación, los mismos fueron hervidos por 5 min y centrifugados a 4000 x g por 3 min. Los sobrenadantes fueron recuperados y hervidos en presencia de 2- β -mercaptoetanol 70 mM durante 5 min. Las proteínas solubles recuperadas luego de una nueva centrifugación fueron diluidas en azul de bromofenol y sometidas a una separación electroforética. Para ello, se utilizaron geles de 1,5 mm de espesor de poliacrilamida 7,5% con SDS 0,1% (Laemmli, 1970). La corrida se realizó bajo condiciones de corriente constante (25 mA por gel) a temperatura ambiente (TA).

Luego de la separación, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979) utilizando un buffer con Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%. La transferencia fue realizada a 4°C a voltaje constante durante toda la noche (35 V) o 1 h (100 V), confirmándose por tinción de las proteínas con rojo Ponceau 0,1% en ácido acético 5%. Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados por incubación de las membranas con leche descremada 2% en PBS. Al cabo de 1 h, las membranas fueron expuestas a anticuerpos IgGs monoclonales anti-fosfotirosina (clone 4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, EEUU) diluído 1/10.000 en solución de bloqueo por 1 h. Luego de 3 lavados de 10 min cada uno en PBS-Tween 20 0,1%, las membranas fueron incubadas durante 1 h con anticuerpos anti-IgG de ratón acoplados a peroxidasa (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU) diluido 1/5.000 en solución de bloque. Las membranas fueron lavadas nuevamente y las bandas reactivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial "ECL plus" (Amersham Life Science Inc., Oakville, ON, Canada). Las membranas con el reactivo de quimioluminiscencia fueron expuestas a placas Biomax MR (Eastman Kodax Company, Rochester, NY) durante pocos minutos y luego reveladas por pasajes sucesivos en soluciones de revelador, lavado y fijador. Todas las incubaciones fueron realizadas a TA y con agitación.

4.2. Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides

Los espermatozoides fueron tratados tal como se describió anteriormente excepto por los siguientes cambios. Luego del bloqueo, los extendidos fueron incubados con el anticuerpo anti-fosfotirosina (1/100) y la segunda incubación realizada en presencia de anticuerpos de ratón acoplados a FITC (Sigma; 1/100).

5. Evaluación de la capacidad fertilizante del espermatozoide de rata

5.1. Superovulación de las hembras y preparación de los ovocitos

Hembras prepúberes fueron superovuladas con una inyección de 20 UI de gonadotrofina coriónica equina (eCG; Syntex), seguida, a las 48-72 hs, por una inyección de 25 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG; Sigma). Doce a 15 hs luego de la administración de hCG, las hembras fueron sacrificada y sus oviductos recuperados. Los complejos ovocito-

cúmulus fueron obtenidos mediante punción de la ampulla, y las células del cúmulus fueron disociadas mediante incubación con hialuronidasa 1 mg/ml (type IV, Sigma) en PBS-BSA 4 mg/ml. Los ovocitos libres de células fueron lavados por 5-6 pasajes sucesivos por gotas de medio RFM. Luego, la zona pelúcida (ZP) fue removida mediante tratamiento con solución ácida de Tyrode (pH 2,5) (Nicolson et al., 1975) durante 10-20 seg, y posterior lavado en medio RFM. Todos estos procedimientos se realizarán bajo lupa estereoscópica con un aumento de 60x.

5.2. Ensayo de fusión de gametas

Los ovocitos sin ZP fueron colocados en gotas de 100 μ l de RFM con o sin bicarbonato cubiertas por aceite mineral, e inseminados con espermatozoides capacitados *in vitro* (tal como se describió en el punto 2 de este capítulo) en una concentración final de 0,5 a 1 x 10⁵ células/ml. La coincubación de las gametas se llevó a cabo durante 2 a 3 hs en estufa a 37°C y cuando el medio contuvo bicarbonato, la misma fue realizada en una atmósfera de 5% de CO₂. Finalmente, los ovocitos fueron lavados para remover los espermatozoides que hubieran quedado débilmente unidos, y montados entre un portaobjetos (en el centro de 4 gotas de una mezcla 9:1 de vaselina líquida y parafina) y un cubreobjetos, para su posterior evaluación bajo microscopio óptico (400 x). Se consideraron "penetrados" a aquellos ovocitos que presentaban dos pronúcleos y la presencia de la cola del espermatozoide dentro del citoplasma del ovocito.

6. Medición de los niveles de cAMP intracelulares

Radioinmunoensayo

Alícuotas de las suspensiones de espermatozoides fueron centrifugadas para remover el medio y luego los espermatozoides fueron resuspendidos en 500 μ l de etanol absoluto. A continuación, se realizó una nueva centrifugación a máxima velocidad y el sobrenadante, trasvasado a otro tubo, fue evaporado. Finalmente, se agregó a este último tubo 200 μ l (cada 1 x 10⁶ células) de buffer acetato de sodio 50 mM pH 6,2–ajustado con ácido acético glacial–.

Para realizar la medición de cAMP, se siguió la técnica descripta en Del Punta et al. (1996), utilizando estándares de concentración del nucleótido entre 0 y 5000 fmoles (Sigma) en 100 µl de buffer acetato. Se realizaron duplicados de tanto los estándares como de las muestras $(0.5 \times 10^6 \text{ células})$. Ambos fueron acetiladas durante 10 min a TA por el agregado de 10 µl de una mezcla de anhídrido acético y trietilamina (1:2 v/v). Posteriormente, se agregó a cada tubo 25.000 cpm de TME-AMPc (Sigma) marcado con I¹²⁵ (por Dr Omar Pignataro, IByME) en 100 µl de buffer acetato, y el anticuerpo anti-AMPc (cedido por Dr. Parlow del National Hormone and Peptide Program, Harbor-UCLA Medical Center, CA, EEUU) diluído 1/17.500 en 100 µl de buffer acetato, continuando la incubación a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se agregó a cada tubo 50 µl de BSA 2% y 2 ml de etanol frío, y las muestras centrifugadas a 3000 rpm en rotor H6000A (Sorvall, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, EEUU) durante 12 min. El sobrenadante fue descartado y la radioactividad del pellet determinada en contador Beckman para rayos gamma. Los controles utilizados fueron, por un lado, sin muestra o estándar (unión máxima del anticuerpo al trazador), y por el otro, sin muestra o estándar y sin anticuerpo (pegado inespecífico del trazador).

7. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como la media \pm SEM para cada grupo de experimentos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa "GraphPad Prism", (versión 3,02, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU). Los porcentajes de migración de la proteína DE y los porcentajes de ovocitos penetrados fueron analizados con el test X², mientras que la acumulación de cAMP fue analizada con el test de Student. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes a un valor de p < 0,05.

RESULTADOS

Como fuera descripto anteriormente, el primer objetivo de este trabajo consistió en evaluar la influencia del ión bicarbonato sobre la migración de la proteina DE al SE y sobre otros dos fenómenos asociados a la capacitación tales como la fosforilación de proteínas en tirosina y la expresión de la capacidad fusogéncia.

1. Efecto de la ausencia de bicarbonato sobre diferentes eventos asociados a la capacitación

1.1. Migración de la proteína DE

Con el objetivo de evaluar la influencia del bicarbonato sobre este fenómeno, espermatozoides mótiles obtenidos del cauda epididimario fueron incubados en el medio RFM con ó sin el agregado del anión durante 5 hs. Posteriormente, los espermatozoides fueron fijados y sujetos a IFI utilizando anti-DE y anti-IgG acoplado a FITC, como primer y segundo anticuerpo, respectivamente. Los resultados mostrados en la **Figura 1.1A**, indicaron que, en presencia de bicarbonato, el porcentaje de espermatozoides con DE en el SE aumentaba en función del tiempo de capacitación. Los espermatozoides incubados en ausencia del ión, por su parte, mostraron niveles significativamente menores de redistribución de DE.

Para determinar la reversibilidad del efecto causado por la ausencia de bicarbonato sobre la migración de DE, los espermatozoides fueron incubados en medio sin HCO₃⁻ por 3 hs, y luego expuestos al agregado del anión por 15, 30 ó 60 min. Al cabo de los diferentes tiempos, los espermatozoide fueron recuperados y sometidos a IFI, observándose que la redistribución de DE alcanzaba los niveles del control luego de 30 min de exposición al bicarbonato (**Figura 1.1B**).



Figura 1.1: Efecto de la ausencia de bicarbonato sobre la migración de la proteína DE al SE del espermatozoide.

Espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio con ó sin HCO_3^- durante 5 hs (A) ó sin $HCO_3^$ por 3 hs agregando luego el ión al medio y continuando la incubación por 15, 30, 60 o 120 min adicionales (B). Alícuotas de espermatozoides fueron recuperadas a diferentes tiempos y la redistribución de DE al SE analizada por IFI. Los datos representan el promedio \pm SEM de 6 experimentos independientes. (A) línea llena vs línea de guiones; p < 0,02. (B) línea punteada vs línea de guiones, p < 0,05.

1.2. Fosforilación de proteínas en tirosina

A pesar de haber sido descripta en otras especies, la fosforilación de proteínas en tirosina no había sido estudiada aún en el modelo de rata, razón por la cual, en paralelo a los estudios de migración de DE, se investigó la ocurrencia de este evento en espermatozoides de rata y su regulación por bicarbonato durante la capacitación. Para ello, en primer lugar, espermatozoides epididimarios fueron incubados en el medio RFM, evaluándose la ocurrencia de la fosforilación de proteínas en tirosina a diferentes tiempos de capacitación y mediante dos metodologías que proporcionan datos complementarios.

En el primer caso, las proteínas fueron extraídas con SDS y β -mercaptoetanol y separadas por electroforesis y Western Blot, utilizando anti-fosfotirosina como primer anticuerpo. Los resultados mostrados en la **Figura 1.2A** revelaron un aumento en la

fosforilación de residuos tirosina de proteínas de peso molecular entre 30 y 120 kDa a medida que transcurre el proceso de capacitación. Mientras que los espermatozoides no capacitados no presentaron proteínas con dicha modificación post-traduccional, espermatozoides incubados por al menos 4 hs mostraron un patrón máximo de proteínas fosforiladas. Como control negativo se incluyó un extracto de proteínas de espermatozoides capacitados por 5 hs y sujetos a la inmunodetección omitiendo el primer anticuerpo.



Figura 1.2: Fosforilación de proteínas en tirosina durante la capacitación del espermatozoide de rata.

(A) Alícuotas de espermatozoides recuperadas a distintos tiempos de la capacitación (1 a 5 hs) fueron sujetas a Western Blot. Se realizaron 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. NC: espermatozoides no capacitados. C: espermatozoides capacitados por 5 hs y revelados omitiendo el primer anticuerpo. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en kDa. (B) Microfotografías de contraste de fase (izquierda) e IFI (derecha) de espermatozoides no capacitados (1,2) y capacitados por 5 hs (3, 4, 5, 6). La IFI fue realizada utilizando anti-fosfotirosina (4), u omitiendo el primer anticuerpo como control (6). Escala = $20 \mu m$.

La segunda técnica utilizada fue la IFI, la cual proporciona información sobre la localización de las proteínas fosforiladas. Para ello, los espermatozoides fueron fijados, e incubados con anti-fosfotirosina y anti-IgG acoplados a FITC, como primer y segundo

Capítulo I -Resultados

anticuerpo, respectivamente. Como en el caso anterior, el control negativo consistió en la omisión del primer anticuerpo. Los resultados obtenidos fueron consistentes con los hallados con la metodología anterior, observándose una reacción negativa en espermatozoides no capacitados y una marca fluorescente localizada en las piezas media y principal del flagelo en el 80% de los espermatozoides capacitados por 5 hs (Figura 1.2B).

El siguiente paso consistió entonces en evaluar el efecto de la ausencia de bicarbonato sobre este mismo fenómeno. Para ello, espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio con ó sin el agregado del ión, determinándose la ocurrencia de este evento mediante Western Blot e IFI tal como se describiera anteriormente. Los resultados indicaron que, a diferencia de lo observado en espermatozoides control, los espermatozoides incubados en ausencia de bicarbonato no mostraron el patrón característico de proteínas fosforiladas (Figura 1.3A), ni la marca fluorescente en la cola (la imagen obtenida fue idéntica a la mostrada en el panel 2 de la Figura 1.2B). Sin embargo, una banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 45 kDa fue detectada por Western Blot aún en espermatozoides incubados en ausencia de HCO₃⁻. La especificidad de esta banda fue confirmada por el hecho de que la misma no estaba presente cuando el primer anticuerpo era omitido (control negativo mostrado en la Figura 1.2A).





Para determinar la reversibilidad del efecto causado por la ausencia de bicarbonato, espermatozoides incubados en medio libre del ion por 3 hs, fueron expuestos al mismo y la fosforilación de proteínas en tirosina evaluada a diferentes tiempos luego del agregado. Los resultados indicaron que el patrón máximo de proteínas fosforiladas fue alcanzado a sólo 15 min luego del agregado del bicarbonato al medio (Figura 1.3B).

1.3. Capacidad fusogénica del espermatozoide

Con el fin de estudiar la influencia del bicarbonato sobre la expresión de la capacidad fusogénica, espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio RFM en presencia ó ausencia de bicarbonato durante 4 hs y luego utilizados para inseminar ovocitos de rata sin ZP, evaluándose el porcentaje de ovocitos penetrados al cabo de 3 hs de coincubación. Tal como se muestra en la **Figura 1.4A**, a diferencia de los espermatozoides incubados con bicarbonato durante todo el proceso, las células incubadas en ausencia del ión fueron incapaces de penetrar los ovocitos sin ZP (1 ovocito penetrado de un total de 61).

Para investigar si el anión resultaba esencial para la capacitación o para la fusión de gametas en sí, espermatozoides incubados en ausencia del bicarbonato fueron coincubados con los ovocitos en medio completo y viceversa. Los resultados indicaron que los espermatozoides incubados sin bicarbonato durante la capacitación no fueron capaces de penetrar a los ovocitos, independientemente de la presencia del ión durante la coincubación de la gametas. Contrariamente, los espermatozoides capacitados en medio completo mostraron una capacidad fusogénica independiente del medio utilizado durante la coincubación de la gametas. Estos resultados demuestran que el bicarbonato sería necesario para la adquisición de la capacidad fusogénica, que ocurre durante la capacitación espermática, y no para el evento de fusión en sí mismo (Figura 1.4A).

El siguiente paso consistió en evaluar la reversibilidad de este efecto observado, y para ello, los espermatozoides fueron incubados en medio sin HCO₃⁻ por 3 hs, luego expuestos al agregado del anión por diferentes períodos, y finalmente utilizados para

inseminar ovocitos de rata sin ZP. Los resultados indicaron que mientras los espermatozoides incubados en ausencia de bicarbonato no fueron capaces de penetrar los ovocitos, aquellos expuestos durante 15, 30 ó 60 min al ión mostraron un aumento en el porcentaje de penetración (Figura 1.4B).



Figura 1.4: Efecto de la ausencia de bicarbonato sobre la capacidad fusogénica de los espermatozoides.

(A) Espermatozoides epididimarios fueron incubados en presencia (+) ó ausencia (-) de bicarbonato por 4 hs (1), y luego coincubados con ovocitos sin ZP con (+) ó sin (-) HCO_3^- (2), evaluándose el porcentaje de ovocitos penetrados al cabo de 2-3 hs. Los datos representan el promedio ± SEM de 6 experimentos independientes. a vs b, p < 0,001. (B) Espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio sin (-) HCO_3^- por 3 hs evaluándose el porcentaje de ovocitos sin ZP penetrados a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min) luego del agregado del ión al medio. Los datos representan el promedio ± SEM de 6 experimentos independientes. a vs b, p < 0,05.

En conjunto, los resultados encontrados hasta el momento, indican que tanto la migración de la proteína DE al SE, como la fosforilación de proteínas en tirosina, y la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide, serían eventos dependientes de la presencia de bicarbonato durante el proceso de capacitación.

2. Señalización intracelular del bicarbonato a través de la vía sAC/cAMP/PKA

Estudios en diferentes especies sugieren que el bicarbonato actuaría durante la capacitación activando la cascada de señalización intracelular dependiente de cAMP (Revisión de trabajos: Visconti et al., 2002). En el ratón, se demostró que este ión podría entrar al espermatozoide a través de un cotransportador Na⁺/HCO₃⁻. Una vez dentro de la célula, el bicarbonato interactuaría con una isoforma soluble y testicular de la enzima adenilato ciclasa (sAC), la cual aumentaría los niveles intracelulares de cAMP activando de esta forma a la proteína quinasa A (PKA).

Con el fin de investigar si el efecto del ión bicarbonato sobre los tres parámetros estudiados estaba mediado por esta cascada de señalización, primeramente se estudió la influencia de dicho ión sobre la acumulación de cAMP intracelular durante la capacitación. Para ello, espermatozoides de rata fueron incubados durante la capacitación en presencia ó ausencia de bicarbonato y en presencia de un inhibidor de fosfodiesterasa: PTX, recuperándose alícuotas de los mismos al cabo de diferentes períodos. Posteriormente, el cAMP intracelular fue extraído con etanol y sus niveles determinados por radioinmunoensayo utilizando cAMP I¹²⁵ radioactivo (marcado por el Dr. Pignataro) y anticuerpos anti-cAMP (cedidos por el Dr. Parlow). En el **Figura 1.5** se observa, que en condiciones capacitantes, se produce un aumento en la acumulación de cAMP respecto al control sin capacitar (t = 0), el cual alcanza un máximo a los 30 min de capacitación. Por su parte, espermatozoides incubados por diferentes tiempos en ausencia de bicarbonato presentaron niveles de acumulación de cAMP muy similares entre sí y no diferentes a los espermatozoides control.



Figura 1.5: Efecto de la ausencia de bicarbonato sobre la acumulación de cAMP durante la capacitación.

Espermatozoides epididimarios fueron incubados con (\blacksquare) o sin (\square) bicarbonato y PTX durante 4 hs. Alícuotas de espermatozoides fueron recuperadas a diferentes tiempos, determinándose el contenido de cAMP por RIA. Este experimento se realizó 4 veces obteniendo resultados similares, mostrándose un experimento representativo. Los datos representan el promedio de los duplicados ± el error estándar.

Evidencias previas en espermatozoides de hámster demuestran que los ésteres de forbol inducen la acumulación de cAMP bajo condiciones capacitantes (Visconti & Tezon, 1989) y en presencia de bicarbonato en el medio de capacitación (Visconti et al., 1990).

Con el objetivo de estudiar si el bicarbonato era capaz de inducir este camino de producción de cAMP en la rata, espermatozoides epididimarios fueron incubados bajo condiciones capacitantes, determinándose la acumulación de cAMP 30 min luego del agregado del éster de forbol: PMA. Debido a que el PMA se resuspende únicamente en DMSO, en estos experimentos se incluyó como control un tratamiento con DMSO a igual concentración final que la utilizada con PMA. Los resultados presentados en la **Figura 1.6** muestran que los espermatozoides incubados en presencia de bicarbonato y PMA presentaron un aumento significativo en los niveles de cAMP comparados con el tratamiento sin PMA ó con sólo DMSO. Asimismo, el control de espermatozoides no

capacitados presentó niveles muy bajos de cAMP comparables a experimentos anteriores. Cuando se realizaron estos mismos experimentos en ausencia de bicarbonato, no se registró el aumento en la acumulación de cAMP por incubación con PMA (**Figura 1.6**).



Figura 1.6: Estimulación de la producción de cAMP por ésteres de forbol. Espermatozoides epididimarios fueron incubados con (+) o sin (-) HCO_3^- y 10 µM de PMA y/o DMSO, determinándose la acumulación de cAMP al cabo de 30 min. NC: espermatozoides no capacitados. Las datos están normalizados respecto a HCO_3^- (+) y representan el promedio ± SEM de 4 experimentos independientes. a, c vs b, p < 0.05; a vs d, NS.

Tal como se mencionara anteriormente, evidencias previas indican que el bicarbonato actuaría directamente estimulando a la enzima sAC específica de testículo (Okamura et al., 1985; Garty & Salomon, 1987; Visconti et al., 1990; Chen et al., 2000). Resultados recientes de otro laboratorio muestran la existencia de un inhibidor específico de esta enzima en el ratón, denominado KH7 (Hess et al., 2005). Estos datos, junto a nuestros resultados previos, nos llevaron a analizar la ocurrencia de los tres eventos antes descriptos, en presencia del inhibidor KH7 gentilmente cedido por el laboratorio productor.

En primer lugar se estudiaron las condiciones experimentales requeridas para evaluar el efecto del inhibidor en el modelo de la rata ya que originalmente había sido utilizado en el ratón. Para ello, espermatozoides epididimarios de rata fueron incubados bajo condiciones capacitantes, determinándose la acumulación de cAMP luego del agregado de KH7. Como control, se incluyeron espermatozoides de ratón incubados con el inhibidor tal cual fuera descripto por el laboratorio productor. Los resultados muestran que, mientras la presencia de KH7 produjo una clara inhibición en la acumulación de cAMP en espermatozoides de ratón, no se observó efecto alguno sobre los espermatozoides de rata (**Figura 1.7**). Estos resultados indican que el compuesto KH7 sería específico para la sAC de ratón, no existiendo por el momento ningún inhibidor para la enzima de rata que permita evaluar la participación de sAC en el proceso de capacitación en esta especie.



Figura 1.7: Inhibición de la acumulación de cAMP por un inhibidor específico de sAC. Espermatozoides de ratón ó rata fueron incubados bajo condiciones capacitantes con (+) ó sin (-) 50 μ M de KH7 y el contenido de cAMP determinado por RIA. . Las datos representan el promedio \pm SEM de 3 y 4 experimentos independientes. ratón: p < 0,05; rata: NS.

Habiendo determinado que el bicarbonato induce un aumento en los niveles de cAMP, el próximo paso consistió en estudiar si este ión ejerce su efecto sobre los tres eventos antes estudiados a través de la vía cAMP/PKA. Para tal fin, se utilizaron dos estrategias: primeramente, espermatozoides epididimarios fueron capacitados en ausencia de bicarbonato y en presencia de PTX y un análogo permeable de cAMP: dbcAMP. En la segunda estrategia, espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio completo

con el agregado de H89 como inhibidor de la PKA. Dado que el H89 se resuspende en DMSO, el DMSO sólo fue utilizado como control de estos últimos experimentos.

En cuanto a la migración de la proteína DE al SE, los resultados indicaron que los espermatozoides incubados en ausencia de bicarbonato y presencia de dbcAMP y PTX mostraron niveles de redistribución significativamente inferiores al control con el ión y no significativamente diferentes al control sin bicarbonato, sugiriendo que la presencia de dichos reactivos no logró reemplazar al anión en cuanto a su capacidad de inducir la relocalización de DE (Figura 1.8A). Este resultado fue luego respaldado por la observación de que la incubación con H89 tampoco fue capaz de inhibir el fenómeno de redistribución (Figura 1.8B). El DMSO utilizado como control no mostró efecto alguno sobre el parámetro estudiado.



Figura 1.8: Influencia del bicarbonato sobre la migración de la proteína DE a través de la vía cAMP/PKA.

Espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio con (+) ó sin (-) HCO₃⁻, ó en medio sin HCO₃⁻ conteniendo 5 mM de dbcAMP y 3 mM de PTX (A) ó en medio completo y con (+) ó sin (-) 30 μ M de H89 y/o DMSO (B). Al cabo de 5 hs, el porcentaje de espermatozoides con DE en el SE fue determinado por IIF. Los resultados están representados como el promedio ± SEM de 7 (panel A) ó 4 (panel B) experimentos independientes. Panel A: p < 0.05. Panel B: NS.

Por su parte, la evaluación de la fosforilación de proteínas en tirosina indicó que los espermatozoides incubados sin bicarbonato y tratados con dbcAMP y PTX presentaron un patrón idéntico al de los espermatozoides incubados en medio control (Figura 1.9A). Asimismo, en ambos tratamientos, el número de espermatozoides con marca fluorescente en la cola no fue significativamente diferente (C: $69\% \pm 4\%$; dbcAMP +PTX: $83\% \pm 3\%$; n = 3; NS). Por su parte, los resultados obtenidos en presencia de H89 indicaron que mientras una concentración 10 μ M del inhibidor no afectó el patrón característico de proteínas fosforiladas en tirosina, 30 μ M de H89 redujo en forma importante el número de bandas reactivas. Dicha inhibición no se incremento por exposición a 100 μ M del inhibidor. (Figura 1.9B) y no fue observado en presencia de DMSO sólo.



Figura 1.9: Influencia del bicarbonato sobre la fosforilación de proteínas en tirosina a través de la vía cAMP/PKA.

Espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio con (+) ó sin (-) HCO₃⁻, ó en medio sin HCO₃⁻ conteniendo 5 mM de dbcAMP y 3 mM de PTX (A) ó en medio completo y con (+) ó sin (-) diferentes concentraciones de H89 y/o DMSO (B). Al cabo de 5 hs, la fosforilación de proteínas en tirosina fue evaluada por Western Blot. Se realizaron tres experimentos independientes y se muestra uno representativo. NC: espermatozoides no capacitados. A la izquierda de cada panel se muestran los marcadores de peso molecular en kDa.

En relación a la dependencia de cAMP para la expresión de la capacidad fusogénica, los resultados obtenidos en ausencia de bicarbonato y en presencia de dbcAMP y PTX, mostraron sólo una recuperación parcial en la capacidad fusogénica de los espermatozoides comparados con el control (Figura 1.10A). Por su parte, los experimentos

en los cuales PKA fue inhibida por H89 durante la capacitación mostraron también sólo una inhibición parcial de la capacidad fusogénica mientras que el DMSO no produjo ningún efecto sobre el porcentaje de ovocitos penetrados (Figura 1.10B).



Figura 1.10: Influencia del bicarbonato sobre la capacidad fusogénica a través de la vía cAMP/PKA. Espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio con (+) ó sin (-) HCO₃, ó en medio sin HCO₃ pero conteniendo 5 mM de dbcAMP y 3 mM de PTX (A) ó en medio completo y con (+) ó sin (-) 30 μ M de H89 y/o DMSO (B). Al cabo de 4 hs, los espermatozoides fueron coincubados con ovocitos de rata sin ZP en medio con HCO₃, evaluándose el porcentaje de ovocitos penetrados luego de 2-3 hs de coincubación. Los resultados están representados como el promedio ± SEM de 5 (panel A) ó 7 (panel B) experimentos independientes. p < 0,0001.

Por otro lado, dado que el volumen que se agrega al inseminar los ovocitos arrastra H89 a una concentración final de 6 μ M, se investigó si este compuesto era capaz de inhibir la fusión al estar presente durante la etapa de fertilización. Los resultados indicaron que el H89 afecta la capacidad fusogénica de los espermatozoides sólo cuando el mismo es agregado durante la capacitación (**Figura 1.11**).



Figura 1.11: Efecto de H89 sobre la fusión de gametas.

Espermatozoides epididimarios fueron incubados en medio completo y con (+) ó sin (-) 30 μ M de H89 ó DMSO (1). Al cabo de 4 hs, los espermatozoides fueron coincubados con ovocitos de rata sin ZP en medio con HCO⁻, y con (+) ó sin (-) 6 μ M de H89 ó DMSO (2), evaluándose el porcentaje de ovocitos penetrados luego de 2-3 hs de coincubación. Los resultados están representados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes, p < 0,0001.

En resumen, los resultados obtenidos indican que si bien el bicarbonato regula tanto la migración de la proteína DE, como la fosforilación de proteínas en tirosina y la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide de rata durante la capacitación, las vías de señalización involucradas en dicha regulación serían diferentes para cada uno de estos eventos.

DISCUSION

Tal como se mencionara anteriormente, la proteína epididimaria DE, originalmente localizada en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide, migra al SE durante la capacitación del espermatozoide. Este proceso, indispensable para que el espermatozoide adquiera capacidad fertilizante, ocurre en el tracto reproductor femenino en donde las concentraciones de bicarbonato aumentan comparadas con el tracto reproductor masculino (Vishwakarma, 1962), siendo en algunas especies como el mono, aún superiores en el momento posterior a la ovulación (Maas et al., 1977). Diversas evidencias sugieren la importancia del ión bicarbonato para la fertilidad de un individuo. En relación al macho, se han generado diferentes líneas de ratones deficientes en proteínas sensibles a la acción del bicarbonato, produciendo infertilidad (sAC: Esposito et al., 2004; intercambiador Na⁺/H⁺: Wang et al., 2003a); transportador de fosfolípidos: Wang et al., 2004). Por otro lado, se ha descripto una correlación entre hombres infértiles y una deficiencia en la activación de la AC dependiente de bicarbonato (Okamura et al., 1986; Ishikawa et al., 1989). En relación a la hembra, se demostró que una menor secreción de bicarbonato en células uterinas está asociada con una bajada en la fertilidad (Wang et al., 2003b).

Dada la importancia del bicarbonato para la ocurrencia de la capacitación, el primer objetivo de esta tesis consistió en investigar la influencia de dicho ión sobre la migración de la proteína DE al SE. En paralelo a estos estudios, se investigó el requerimiento de bicarbonato para la ocurrencia de otros dos eventos estrechamente asociados al proceso de capacitación tales como la fosforilación de proteínas en tirosina y la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide.

En primer lugar, nuestros estudios mostraron que la incubación de los espermatozoides en un medio libre de bicarbonato produjo una disminución significativa en el porcentaje de células con DE localizada en el SE. Estos resultados, conjuntamente con la completa recuperación de los niveles de redistribución de DE luego del agregado del ión al medio, indican que el bicarbonato modularía la ocurrencia del fenómeno de migración de DE durante la capacitación. Asimismo, el hecho de que el porcentaje de espermatozoides con DE en el SE haya alcanzado el valor control luego del agregado del ión indica que la

falta de bicarbonato durante la incubación no produjo ningún efecto irreversible sobre los espermatozoides.

Se ha descripto que el bicarbonato induce cambios en la organización de los lípidos de la membrana plasmática durante la capacitación, produciendo un incremento en la inestabilidad de dicha membrana que facilita la pérdida de colesterol y, probablemente, debilita la unión de proteínas de superficie (revisión de trabajos: Harrison & Gadella, 2005). Asimismo, se ha demostrado que el ión genera pérdida o ganancia de sitios de unión a diversas lectinas durante la capacitación de espermatozoides de carnero y cerdo (Ashworth et al., 1995). La pérdida de proteínas de superficie podría también facilitar el movimiento lateral de moléculas dentro de la membrana plasmática, pudiendo explicar así el efecto del bicarbonato sobre la redistribución de la proteína DE al SE.

En la literatura, existen otras proteínas que sufren relocalización entre diferentes dominios de la membrana del espermatozoide durante la capacitación, entre las que se encuentra la proteína PH-20 de cobayo (Primakoff et al., 1985), cuya migración es dependiente de la presencia de Ca⁺² en el medio de capacitación (Cowan et al., 1991). En este sentido, es interesante mencionar que experimentos previos de nuestro laboratorio indicaron que la migración de DE estaría también regulada por este ión, apoyando fuertemente una asociación entre este fenómeno de migración y la ocurrencia de la RA (Rochwerger & Cuasnicu, 1992). Esta idea está respaldada por estudios *in vivo* en los cuales se observó la localización de DE en el SE en el 20% de los espermatozoides reaccionados presentes en el fluido oviductal, y en el 100% de aquellos presentes en el espacio perivitelino y obligatoriamente ya reaccionados (Rochwerger & Cuasnicu, 1992).

En paralelo, y para investigar la influencia del bicarbonato sobre la fosforilación de proteínas en tirosina, se examinó la ocurrencia de este fenómeno a lo largo de la capacitación del espermatozoide de rata, ya que el mismo no había sido aún descripto en esta especie. Similarmente a lo que ocurre en otros modelos animales (Leyton & Saling, 1989a; Visconti et al., 1995a; Galantino-Homer et al., 1997; Leclerc et al., 1997; Kalab et al., 1998; Pukazhenthi et al., 1998; Si & Okuno, 1999), los espermatozoides de rata

incubados bajo condiciones capacitantes mostraron un incremento de proteínas con dicha modificación post-traduccional, dependiente del tiempo de incubación. La observación de que a las 4 hs de capacitación se obtuviera el patrón máximo de proteínas fosforiladas es consistente con el hecho de que la capacidad fusogénica del espermatozoide de rata se evidencia a partir de dicho período de incubación (Rochwerger et al., 1992).

En el transcurso de nuestros estudios, dos grupos independientes describieron la ocurrencia del fenómeno de fosforilación en la rata utilizando un medio de capacitación diferente (BWW: Biggers Whitten Whittingham). El primer grupo determinó el patrón de proteínas fosforiladas en espermatozoides incubados por 3 hs, observando, a diferencia de nuestros resultados, muy bajos niveles de fosforilación y ningún aumento a lo largo del tiempo (Lewis & Aitken, 2001). El segundo grupo evaluó la fosforilación luego de 5 hs de incubación obteniendo un mayor número de proteínas fosforiladas que el grupo anterior, pero no coincidentes con las halladas en nuestro trabajo (Roberts et al., 2003). Esta discrepancia en los resultados podría atribuirse a diferencias en las condiciones de capacitación utilizadas por los otros grupos, las cuales podrían no ser suficientes para completar el proceso. En este sentido, cabe mencionar que en nuestros estudios utilizamos las mismas condiciones de capacitación que las empleadas para los ensayos de fusión de gametas y con las cuales obtenemos un 100% de fertilización de los ovocitos sin ZP. Teniendo en cuenta que únicamente los espermatozoides totalmente capacitados y reaccionados son capaces de fusionarse y penetrar los ovocitos, podemos asegurar que los espermatozoides incubados bajo nuestras condiciones logran completar el proceso de capacitación.

Los estudios de IFI realizados en nuestro trabajo mostraron que, a diferencia de los espermatozoides sin capacitar, el 80% de las células incubadas durante 5 hs en condiciones capacitantes exhibieron proteínas fosforiladas en tirosina en el flagelo. Si bien en algunas especies tales como el ratón y el humano, el porcentaje de células teñidas al cabo de la capacitación fue menor, alcanzando sólo un 50% (Urner & Sakkas, 2003), la localización de las proteínas fosforiladas en tirosina en las piezas media y principal de la cola concuerda con la descripta en espermatozoides de otras especies como ratón (Urner et al., 2001), mono (Mahony & Gwathmey, 1999), hámster (Si & Okuno, 1999) y humano (Naz et al., 1991;

Carrera et al., 1996; Leclerc et al., 1997). Contrariamente a lo observado en nuestros estudios, Lewis & Aitken (2001) no hallaron marca en el flagelo de los espermatozoide de rata sino en el margen posterior del acrosoma de espermatozoides no capacitados, la cual se pierde a lo largo de la incubación. Una vez más, esta diferencia en los resultados podría deberse a las condiciones de incubación empleadas. En este sentido, las evidencias en el ratón indican que la aparición de marca en la cabeza denota un estado de inmadurez funcional del espermatozoide (Urner & Sakkas, 2003) apoyando la idea de que las condiciones utilizadas en los estudios de Lewis & Aitken (2001) no conducirían a una completa capacitación.

Existen evidencias que sugieren que la fosforilación de proteínas en tirosina en la cola podría estar relacionada con el desarrollo de la hiperactividad del espermatozoide (Mahony & Gwathmey, 1999; Nassar et al., 1999; Si & Okuno, 1999) requerida para la penetración del cúmulus y la ZP. Por otro lado, se ha observado que los espermatozoides de ratón unidos al oolema mantienen la fosforilación en el flagelo, razón por la cual se postuló que la misma podría estar asociada a una función espermática necesaria para la fusión de gametas (Urner & Sakkas, 2003). Asimismo, es posible que a diferencia de otros tipos celulares, el espermatozoide dependa más fuertemente de la fosforilación de proteínas en tirosina y de otras modificaciones post-traduccionales como reguladores de su función, ya que el mismo es transcripcionalmente inactivo e incapaz de sintetizar proteínas. La identificación de las proteínas que sufren fosforilación en tirosina ayudará a comprender el papel que cumple dicha modificación post-traduccional y su relevancia para la función espermática.

Los experimentos en los cuales los espermatozoides fueron incubados en un medio sin bicarbonato indicaron la importancia del anión para la fosforilación de proteínas en tirosina. Los extractos de proteínas provenientes de estos espermatozoides no mostraron el patrón característico de fosforilación en tirosina, exhibiendo únicamente una banda de aproximadamente 45 kDa que se encuentra fosforilada incluso en espermatozoides sin capacitar. En este sentido, se ha descripto una proteína de 116/95 kDa (con actividad hexoquinasa) en el ratón, y una de 32 kDa en el cerdo, cuyas fosforilaciones no son dependientes de bicarbonato (Tardif et al., 2003; Visconti et al., 1995a). Si bien el

Capítulo I -Discusión

requerimiento de bicarbonato para la fosforilación en la rata ha sido descripto simultáneamente en los otros dos trabajos mencionados anteriormente, el patrón de proteínas fosforiladas en presencia del ión fue diferente al observado en nuestros estudios (Baker et al., 2003; Roberts et al., 2003). Asimismo, en todas las especies estudiadas hasta el momento, exceptuando el cerdo (Tardif et al., 2003), el bicarbonato es esencial para la ocurrencia de este fenómeno (Visconti et al., 1995a; Carrera et al., 1996; Galantino-Homer et al., 1997; Visconti et al., 1999b; Baumber & Meyers, 2006). No sucede lo mismo para otros iones, ya que el papel que juega el calcio en la fosforilación es controversial pudiendo actuar tanto como regulador positivo (Visconti et al., 1995a; Leclerc et al., 1998; Jaiswal & Conti, 2003; Roberts et al., 2003) como negativo (Luconi et al., 1996; Baker et al., 2004) de este evento.

El efecto de la ausencia de bicarbonato en la fosforilación del espermatozoide de rata fue confirmado por la rápida (15 min) y completa recuperación del patrón de fosforilación luego del agregado del bicarbonato al medio de incubación. Esta recuperación en el patrón de fosforilación sugiere que otros componentes del medio podrían estimular los eventos requeridos para la ocurrencia de la fosforilación pero independientes de la presencia de bicarbonato en el medio, que prepararían al espermatozoide para el estímulo final con el ión.. En este sentido, existen evidencias en el ratón que demuestran una asociación entre la glucosa, y sus productos metabólicos ATP y NADPH, y la fosforilación en tirosina (Travis et al., 2001). El ATP es necesario para la fosforilación en sí misma y para la síntesis de cAMP (activada por bicarbonato) mientras que el NADPH es requerido para la activación de enzimas tales como la óxido nítrico sintasa.

A pesar de que la fosforilación de proteínas en tirosina representa un evento intracelular necesario para la capacitación, su ocurrencia no permite evaluar la compleción de este proceso (Visconti et al., 1999b). Teniendo en cuenta que únicamente el espermatozoide que está capacitado y reaccionado es capaz de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito, la capacidad fusogéncia del espermatozoide resulta un buen indicador de un proceso de capacitación completo.

Capítulo I -Discusión

Nuestros resultados aportan evidencias de que el bicarbonato también regularía la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide de rata ya que espermatozoides incubados en un medio sin bicarbonato fueron incapaces de penetrar ovocitos sin ZP independientemente de la presencia del anión durante la coincubación de las gametas. Dado que la capacitación y RA son necesarias para la fusión de gametas (Yanagimachi, 1994), nuestros resultados indican que el bicarbonato sería esencial para la compleción del proceso de capacitación en la rata. La presencia de bicarbonato durante la capacitación es también requerida para la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide de ratón (Lee & Storey, 1986) y humano (Aitken et al., 1998), pero es solamente beneficiosa para los espermatozoides de hámster (Boatman & Robbins, 1991) y cobayo (Bhattacharyya & Yanagimachi, 1988). De este modo, el requerimiento del bicarbonato para la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide para la expresión de spermatozoide durante la capacitación difiere según las especies.

Dado que en los experimentos recién descriptos, la ausencia de bicarbonato podría estar afectando a los espermatozoides en la capacitación y/o durante la coincubación de gametas, se llevaron a cabo nuevos ensayos con el fin de evaluar, por separado, el efecto de este ión sobre ambas etapas. La observación de que espermatozoides capacitados en presencia de bicarbonato y coincubados con ovocitos en ausencia del anión presentan un alto porcentaje de fertilización, indica que el bicarbonato no sería requerido para el evento en sí de fusión espermatozoide-ovocito. Este resultado está de acuerdo con los publicados por Bhattacharyya & Yanagimachi (1988), mostrando que los espermatozoides reaccionados de cobayo son capaces de fertilizar a ovocitos sin ZP en un medio sin bicarbonato. En este sentido, el bicarbonato difiere del Ca⁺², ya que este último es imprescindible para la ocurrencia de la fusión de gametas (Yanagimachi & Usui, 1974; Yanagimachi, 1978; Fraser, 1982).

Los experimentos de agregado de bicarbonato al medio luego de 3 hs de incubación de los espermatozoides en ausencia del ión, mostraron que la capacidad fusogénica del espermatozoide pudo ser parcialmente restablecida. Estos resultados indican que algunos eventos dependientes de bicarbonato y relevantes para la expresión de la capacidad fusogénica serían irreversibles.

Capítulo I -Discusión

En todas las especies estudiadas hasta el momento, el cAMP es el efector de la acción de bicarbonato sobre la capacitación. En la rata, existe únicamente un trabajo en el cual se describe una bajada, no estadísticamente significativa, en el contenido de este segundo mensajero en ausencia de bicarbonato en el medio de capacitación (Baker et al., 2003). Con el fin de investigar la relevancia del cAMP en nuestras condiciones de capacitación, primeramente determinamos su acumulación a lo largo de dicho proceso. Los resultados mostraron que los niveles de cAMP intracelulares aumentan rápidamente durante la capacitación alcanzando un pico máximo a los 30 min, y disminuyendo levemente a la hora. Esto no se debería a una degradación del mensajero dado que las fosfodiesterasas están siendo inhibidas por la incubación con PTX, siendo muy posiblemente debido a la captura del cAMP por sus proteínas efectoras. Dado que en ausencia de bicarbonato no se observa el aumento descripto en el contenido de cAMP, este ión sería esencial para la síntesis de cAMP.

Teniendo en cuenta evidencias en otras especies indicando que la acumulación de cAMP intracelular podría ser inducida por la presencia de ésteres de forbol durante la capacitación, se agregó PMA al medio de incubación de los espermatozoides. Los resultados muestran que el PMA estimula la acumulación de cAMP únicamente en presencia de bicarbonato, coincidiendo con observaciones previas realizadas en hámster (Visconti & Tezón, 1989; Visconti et al., 1990) y en el humano (Leclerc et al., 1996). Estos resultados indican que la acumulación de cAMP inducida por PMA sería bicarbonato dependiente, confirmando, además, que dicho ión activa la cascada de señalización intracelular de cAMP durante la capacitación del espermatozoide de rata.

Cabe mencionar que si bien la concentración utilizada de PMA en nuestros estudios fue superior al utilizado en la literatura, diversas evidencias sugieren que la permeabilidad del espermatozoide de rata sería diferente a la de otras especies. A modo de ejemplo, en otra serie de experimentos se probaron distintos inhibidores de las proteínas quinasas en tirosina tales como genisteína o tirfostina, sin obtener efecto alguno en nuestro sistema. Hasta el momento no se conocen los mecanismos por los cuales el PMA podría inducir la acumulación de cAMP libre. Este éster de forbol es un clásico inductor no fisiológico de la PKC, sugiriendo que la PKC podría estar involucrada en la estimulación de cAMP. En este
sentido, se ha demostrado que la vía intracelular dependiente de cAMP y la vía dependiente de la PKC están interrelacionadas y convergen en última instancia en la activación de la RA en espermatozoides humanos (Breitbart et al., 2006; Doherty et al., 1995). Por otra parte, no se puede descartar que el PMA esté activando otras enzimas relacionadas al metabolismo del cAMP ó bien directamente favoreciendo la entrada de bicarbonato al espermatozoide.

Existen controversias sobre los mecanismos moleculares implicados en la síntesis de cAMP en el espermatozoide. En otras células, el cAMP es sintetizado a partir de ATP por adenilato ciclasas transmembranas (tmAC) en respuesta a la activación de receptores de membranas. Sin cuestionar la esencialidad de estas tmAC para la función espermática (Livera et al., 2005), las evidencias indican que una isoforma testicular de la AC (Buck et al., 1999) sería el principal componente de la maquinaria de producción de cAMP en el espermatozoide de ratón (Hess et al., 2005; Xie et al., 2006). Esta forma soluble de la AC (sAC) se activa en respuesta al bicarbonato (Chen et al., 2000; Garty & Salomon, 1987; Okamura et al., 1985; Visconti et al., 1990) y es esencial para la función espermática ya que los machos deficientes en esta enzima son estériles (Esposito et al., 2004).

Recientemente, se ha identificado un inhibidor para la sAC de ratón a partir de una biblioteca de 15.300 moléculas lipofílicas, el cual puede mimetizar *in vitro* el fenotipo de esos ratones "knock out" (Hess et al., 2005). Nos pareció entonces muy interesante investigar el efecto de este inhibidor sobre los tres parámetros descriptos en este trabajo. Para ello, contactamos al Dr. Buck (Cornell University; NY; EEUU), quien gentilmente nos cedió el inhibidor. Los resultados indicaron, sin embargo, que este inhibidor no sería efectivo para los espermatozoides de rata, pudiendo reflejar diferencias de especie respecto a la permeabilidad de la membrana del espermatozoide, ó a las características propias de la sAC ó, menos probable, a la relevancia de sAC como productora de cAMP. Es interesante mencionar que en el caso de las fosfodiesterasas, el inhibidor IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) utilizado en diferentes especies, también carece de efecto en el espermatozoide de rata, sugiriendo la existencia de diferencias en cuanto a las características de las enzimas en la rata. El desarrollo de un inhibidor de la sAC funcional para el espermatozoide de rata permitirá, en el futuro, esclarecer el rol de esta enzima en este modelo animal.

72

Capítulo I -Discusión

Con el objetivo de determinar si el bicarbonato regulaba la migración de DE a través de la vía clásica de cAMP/PKA, agonistas de cAMP, como dbcAMP, junto con el inhibidor de la fosfodiesterasa PTX fueron agregados al medio de incubación de los espermatozoides en reemplazo del bicarbonato, sin observar efecto alguno sobre la redistribución de DE. Asimismo, la incubación de los espermatozoides en presencia del ión y del inhibidor H89 no modificó los niveles de migración de la proteína respecto del control. En conjunto, estos resultados sugieren que el bicarbonato regularía la redistribución de DE a través de procesos que forman parte de la capacitación pero que son independientes de cAMP. La reorganización de lípidos en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación parecería requerir la activación de la vía cAMP/PKA por el bicarbonato (revisión de trabajos: Harrison & Gadella, 2005). De este modo, esta desestabilización de la bicapa podría ser necesaria pero no suficiente para la migración de DE al SE.

Tal como se mencionara anteriormente, evidencias previas indican que la migración de DE sucedería concomitantemente con la ocurrencia de la RA (Rochwerger & Cuasnicú, 1992). En este sentido, el trabajo que describe al inhibidor KH7 de la sAC respaldaría nuestros resultados, dado que demuestra que la sAC estaría presente en la cola pero no en el acrosoma del espermatozoide y que la RA inducida por ZP no requeriría la activación de la sAC (Hess et al., 2005). Asimismo, a pesar de que los ratones deficientes en sAC (Esposito et al., 2004) muestran bajos niveles de fosforilación de proteínas en tirosina, poseen niveles normales de RA inducida por ionóforo ó ZP (Hess et al., 2005). Queda por demostrar si estas observaciones son independientes de cAMP/PKA, como en el caso de la migración de la proteína DE, ú ocurren por mecanismos alternativos a sAC pero dependientes de cAMP, tal como las tmAC.

Contrariamente a lo que se había observado para la relocalización de DE, dbcAMP y PTX fueron capaces de estimular completamente la fosforilación de proteínas en tirosina en un medio sin bicarbonato, al igual que en otras especies (Visconti et al., 1995b; Leclerc et al., 1996; Osheroff et al., 1999; Visconti et al., 1999b). Resulta interesante que los mismos investigadores que no observaban un incremento en la fosforilación durante la capacitación por agregado de bicarbonato, obtuvieron el mismo patrón de fosforilación de proteínas y la misma localización en la cola descripta en nuestro estudio cuando los

73

espermatozoides eran incubados durante 3 hs en presencia de bicarbonato y dbcAMP y PTX (Lewis & Aitken, 2001). Estos resultados difieren de los de Baker et al. (2003), quienes encontraron que, en presencia de los estimuladores, la fosforilación de proteínas en tirosina en la rata no alcanzaba los niveles del control. A pesar de que estos últimos autores proponen que esa observación se debe a un bajo pH intracelular, nuestros resultados indican que en la rata, como en el ratón (Visconti et al., 1995b), el efecto del bicarbonato sobre la fosforilación de proteínas en tirosina se debería a la capacidad del anión de activar la vía dependiente de cAMP.

En todas las especies estudiadas hasta el momento, la acción del cAMP sobre la fosforilación de proteínas en tirosina resulta de la activación de la PKA (Visconti et al., 1995b; Leclerc et al., 1996; Galantino-Homer et al., 1997; Kalab et al., 1998; Visconti et al., 1999b). Nuestros resultados mostrando que el H89, competidor de ATP por la PKA (Chijiwa et al., 1990), previno la fosforilación en los espermatozoides de rata, están de acuerdo con lo hallado en los otros modelos animales. La única banda observada en presencia de 30 μ M del inhibidor parecería corresponder a la que se encuentra presente en espermatozoides no capacitados, la cual no sería inducida por el bicarbonato. También para este inhibidor debimos utilizar una concentración un poco superior a la descripta en el ratón (10 μ M) (Visconti et al., 1995b) aunque inferior a la usada en el bovino (50 μ M) (Galantino-Homer et al., 1997), lo cual podría deberse nuevamente a diferencias especie-específicas en cuanto a la permeabilidad de la membrana, ó en este caso, a las concentraciones endógenas de ATP.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el bicarbonato estimularía a la fosforilación de proteínas en tirosina en el espermatozoide de rata a través de la vía clásica cAMP/PKA, tal como fuera descripto para otras especies. Estos resultados confirman que los reactivos empleados en nuestros estudios funcionan correctamente y que las condiciones de incubación son las adecuadas, garantizando así la conclusión de que la migración de DE ocurriría por una vía independiente de cAMP/PKA.

En los últimos años, se han descripto proteínas AKAP (A Kinase-Anchoring Proteins), en la cola del espermatozoide (Ficarro et al., 2003), las cuales pueden unirse a las

subunidades regulatorias de la PKA (Luconi et al., 2005). Las AKAP son fosforiladas en tirosina durante la capacitación (Carrera et al., 1996; Carr et al., 2001) y, por lo tanto, se cree que serían el nexo entre la vía de señalización de sAC/cAMP/PKA y las quinasas en tirosina (PTK). Recientemente, se demostró en el espermatozoide de ratón una asociación entre PKA y una PTK (denominada SRC), cuya fosforilación en tirosina es estimulada por esa asociación (Baker et al., 2006).

La capacidad fusogénica de los espermatozoides, por su parte, pudo ser sólo parcialmente restablecida reemplazando al anión por dbcAMP y PTX, como así también parcialmente inhibida por el agregado de H89, sugiriendo que el efecto del bicarbonato sobre este evento no sería únicamente a través de cAMP/PKA. Estos resultados estarían de acuerdo con recientes evidencias que demuestran que los ratones deficientes en sAC y con sólo un 15% del contenido de cAMP normal, son capaces de fusionarse con ovocitos sin ZP (Xie et al., 2006). Finalmente, dado que al inseminar los ovocitos se arrastra una cierta concentración de H89 que se encontraría presente durante la coincubación de las gametas, evaluamos el posible efecto de este inhibidor sobre la etapa específica de fusión. Los resultados indicando que el H89 inhibe la penetración sólo cuando está presente durante la capacidad fusogénica del espermatozoide durante dicho proceso ocurriría a través de la vía cAMP/PKA.

En conjunto, los resultados del presente trabajo indican que el bicarbonato sería esencial para regular la migración de la proteína DE al SE, como así también otros dos eventos asociados a la capacitación del espermatozoide de rata, tales como la fosforilación de proteínas en tirosina y la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide. Al respecto, resulta muy interesante el hallazgo de que la relevancia de la cascada de señalización intracelular dependiente de cAMP/PKA parecería ser diferente para los distintos eventos que ocurren durante la capacitación. Así, mientras la fosforilación de proteínas en tirosina estaría mediada por la via cAMP/PKA, y la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide parecería requerir más que la activación de esta vía, la migración de DE ocurriría por mecanismos no clásicos e independientes de la vía cAMP/PKA. (Esquema 1.1).

75



Esquema 1.1: Modelo de regulación del ión bicarbonato sobre la migración de DE al SE, fosforilación de proteínas y expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide de rata. Una vez dentro de la célula, el ión bicarbonato activaría a la enzima sAC, la cual convierte ATP en cAMP. Por otro mecanismo no conocido el PMA induciría la acumulación de cAMP de manera dependiente de bicarbonato. Este segundo mensajero activaría a la PKA, la cual estimularía indirectamente a la fosforilación de proteínas espermáticas en tirosina. Por otro lado, la enzima PKA activaría una cascada de señales que en última instancia estimularía la expresión de la capacidad fusogéncia del espermatozoide. Asimismo, y por algún otro ú otros mecanismos desconocidos, el bicarbonato regularía la expresión de la capacidad fusogéncia y la migración de la proteína DE al SE.

Una posibilidad es que el efecto del bicarbonato sobre el pH intracelular (revisión de trabajos: Visconti et al., 2002) juegue un papel importante en los dos últimos eventos funcionales. Por otro lado, el bicarbonato podría ser capaz de interactuar y modular la actividad de otras enzimas ó moléculas importantes para la desestabilización de la membrana plasmática del espermatozoide que ocurre durante la capacitación. En este sentido, existen evidencias de que el bicarbonato estimula a la enzima PLA₂ (Gadella & Harrison, 2000) a través de una vía desconocida, generando segundos mensajeros que actuarían como mediadores de la RA (Roldan & Fleming, 1989; Roldan & Fragio, 1993). De esta forma, el bicarbonato prepararía a la célula para eventos posteriores como la migración de proteínas, la RA y la fusión espermatozoide-ovocito.

Los resultados de este capítulo forman parte del trabajo publicado: "*Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability*". **Da Ros V**, Munuce M, Cohen D, Marín-Briggiler C, Busso D, Visconti P & Cuasnicu P. Biology of Reproduction (2004) 70: 1325-1332.

CAPITULO II

"DE y el proceso de fertilización"

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

Se utilizaron ratas macho adultas (3-9 meses de edad), y hembras prepúberes (25-30 días de edad) de la cepa Sprague-Dawley. Los mismos fueron mantenidos a 23°C en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, con alimento y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad. Los experimentos con animales fueron llevados a cabo siguiendo "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" publicada por NIH (Bethesda, MA, EEUU).

2. Producción de proteínas recombinantes

2.1. Clonado

2.1.1. PCR

Cada uno de los tubos utilizados contenía: 100 ng de ADNc de longitud completa de DE en el buffer apropiado; 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs; 0,5 μ M de cada "primer" específico y 1 U de la polimerasa termoestable *Pfu* (Promega, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 50 μ l. Los "primers" fueron diseñados mediante el programa "Oligo" (versión 6,45, Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO, EEUU) conteniendo sitios de corte para enzimas de restricción en el extremo 5′. Las secuencias de dichos "primers" fueron:

F6	forward: 5' TA <u>GGATCC</u> AGGTGCATTTACAATGACAG 3' (BamHI)
	reverse: 5' ACT <u>CTGCAG</u> TTATGGGCCGAAACCGAAGAC 3' (PstI, stop)
F7	forward: 5' GC <u>GGATCC</u> AAAGTTGGTGTTAAAGTCGGA 3' (BamHI)
	reverse: 5' TCTACAAGCTTAATTGCCACCAGGACAA 3' (HindIII, stop)

La amplificación se realizó en el termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para tubos eppendorfs, bajo las siguientes condiciones de tiempos y temperaturas:

2.1.2. Electroforesis en geles de agarosa

Alícuotas de las soluciones conteniendo ADN fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa en TBE 0,5 X (Tris borato 45 mM; EDTA 1 mM, pH 8) conteniendo 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. Se utilizó TBE 0,5 X como buffer de corrida y las bandas fueron visualizadas con un transiluminador de luz UV.

2.1.3. Purificación del ADN

El ADN fue precipitado con isopropanol 0,7 vol y 3 M acetato de sodio 0,1 vol (pH 5,2), lavado con etanol 70% y resuspendido en TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8). En otros casos, el ADN fue purificado por columnas de sephacrylTM S-400 (columnas "MicroSpinTM S-400 HR"; Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England) según instrucciones del proveedor.

2.1.4. Amplificación y obtención de plásmido

El vector pMAL-c2 (New England BioLabs, Beverly, MA, EEUU) fue introducido en bacterias *E.coli* DH5 α ó BL21 mediante la técnica de transformación. Las bacterias conteniendo el plásmido fueron seleccionadas y luego amplificadas. Para la purificación del plásmido a partir del cultivo de bacterias se utilizó la técnica de lisis por álcali detallada en Sambrook et al (1989). La preparación de bacterias competentes y la técnica de transformación se detallan a continuación.

Preparación de bacterias competentes: A partir de un stock de glicerol de bacterias se obtuvieron colonias independientes, una de las cuales fue utilizada como inóculo en 3 ml de medio LB (triptona 1%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 1%). El cultivo fue incubado a 37°C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm (DO₅₅₀) = 0,3. Luego el mismo fue utilizado para inocular 100 ml de medio LB incubándolo a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO₅₅₀ = 0,48. El cultivo fue enfriado en hielo y centrifugado a 3000 rpm en rotor GS3 (Sorvall) durante 5 min a 4°C. El medio fue descartado y el precipitado resuspendido cuidadosamente en hielo con 40 ml de Tfb I (acetato de potasio 30 mM; KCl 100 mM; CaCl₂ 10 mM; MnCl₂ 50 mM; glicerol 15%, pH 5,8 –ajustado con ácido acético glacial–). Las muestras fueron incubadas en hielo por 5 min y luego fueron centrifugadas en tubos tipo Corex de 30 ml a 3000 rpm en rotor SS34 (Sorvall) por 5 min a 4°C. El precipitado fue resuspendido cuidadosamente en hielo con 4 ml de Tfb II (MOPS 10 mM; CaCl₂ 75 mM; KCl 10 mM; glicerol 15%, pH-6,5–ajustado con KOH–) e incubado en hielo por 15 min. Finalmente, las células fueron fraccionadas en tubos eppendorf estériles guardándose los mismos a –70°C hasta su uso.

Transformación de células competentes: Una alícuota de 50 μ l de bacterias competentes fue descongelada en hielo y luego mezclada con 1 ng de plásmido. La mezcla fue incubada en hielo por 30 min seguido de un shock térmico a 42°C durante 90 seg. Al cabo de este tiempo, el tubo fue colocado rápidamente en hielo, adicionando 0,7 ml de LB. La mezcla de bacterias y plásmido fue incubada a 37°C durante 30 min, y luego centrifugada a 4000 rpm durante 2 min y resuspendida en 100 μ l de LB. Las células recuperadas fueron plaqueadas en LB agar (NaCl 1%; peptona 1%; extracto de levadura 0,5%; agar 2%) con 50 μ g/ μ l de ampicilina e incubadas a 37°C por 16 hs.

2.1.5. Digestiones enzimáticas

El ADN fue digerido con diferentes enzimas de restricción según las indicaciones de cada proveedor. La correcta digestión fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa.

2.1.6. Estimación de la masa de ADN

La masa de ADN fue estimada por absorbancia a 260 nm y/o por electroforesis en geles de agarosa comparando con un estándar de masa.

2.1.7. Ligación y transformación de bacterias

Veinte ng de vector fueron utilizados mientras que los insertos fueron agregado en diferentes proporciones molares con respecto al vector (1:1, 3:1 y 5:1). Las mezclas de vector e inserto fueron incubadas con 400 U de la ligasa de ADN del fago T4 (New England Biolabs) en el buffer de ligación provisto, que contiene ATP, en un volumen final de 10 μ l. Los tubos fueron incubados durante 4 hs a TA. Luego, alícuotas de 50 μ l de bacterias competentes *E.coli* DH5 α ó BL21 fueron transformadas con 5 μ l del producto de la ligación.

2.1.8. Secuenciación del inserto

Un μ g de cada construcción junto con 8 pmoles de cada uno de los "primers" comerciales malE y M13/pUC (New England Biolabs) (volumen final = 18 μ l) fue enviado al servicio de secuenciación del Biotechnology Resource Center, Cornell University, NY, EEUU. Estos "primers" aparean por afuera del sitio de clonado múltiple permitiendo una completa secuenciación del inserto.

2.2. Expresión de proteínas

Bacterias *E. coli* BL21 conteniendo las distintas construcciones fueron crecidas a 37°C en medio LB con ampicilina 2% y glucosa 0,2% hasta una $DO_{600} = 0,5$. Posteriormente, se adicionó a los cultivos 0,3 mM final de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG; Promega) y la incubación continuó por 5 hs a 26°C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación durante 20 min a 4000 x g y luego resuspendidas en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 1M; EDTA 1mM. Las células fueron luego sonicadas y centrifugadas a 9000 x g durante 30 min. El sobrenadante fue pasado por una columna de resina amilosa (New England Biolabs) equilibrada con Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 1M; EDTA 1 mM, eluyéndose la proteína de fusión con maltosa 10 mM. Las fracciones conteniendo el eluido fueron analizadas por espectrometría a 280 nm y geles de poliacrilamida 10% y luego dializadas 24 hs contra H₂O seguido de una liofilización.

La concentración proteica de las muestras se determinó utilizando el reactivo "Protein Assay" (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.3. Separación electroforética, tinción de proteínas y Western Blot

Los polipéptidos recombinantes fueron diluidos en buffer de siembra conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,1% y luego separados mediante electroforesis en geles de acrilamida 10% (tal como se describiera en el capítulo 1 punto 4.1). Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (ver capítulo 1 punto 4.1.) y sujetas a Western Blot.

Inmunodetección: se utilizó como primer anticuerpo un suero policional anti-MBP (1/500; New England Biolabs) y un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a biotina (1/500; Sigma). Luego de los lavados correspondientes, las membranas de nitrocelulosa fueron expuestas a extravidina conjugada con peroxidasa (1/1000 diluido en solución de bloqueo) durante 1 h. Por último, las bandas reactivas fueron reveladas utilizando el sustrato diaminobencidina (40 μ g/ml, H₂O₂ 0,01% en Tris-HCl 0,1 M pH 7,5), deteniéndose la reacción con un exceso de agua corriente. Tanto el bloqueo como las incubaciones con los anticuerpos y la enzima fueron realizados en presencia de un extracto proteico de bacterias *E. coli* con el fin de competir con sitios de unión inespecífica.

3. Producción de péptidos sintéticos

Los péptidos, conteniendo un residuo de biotina en su extremo N-terminal, fueron sintetizados por Yale University Peptide Synthesis Facility (New Haven, CT, EEUU). Las secuencias de cada péptido fueron: Péptido 1: GHYTQVVWNST Péptido 2: FYVCHYCPGGNY

Péptido scramble: VGCNYGPCHYYF

4. Evaluación de la actividad biológica de los fragmentos y péptidos

4.1. Capacidad de los fragmentos y péptidos de unirse a la membrana plasmática del ovocito. Inmunofluorescencia indirecta de ovocitos de rata

Los ovocitos sin ZP obtenidos tal como se describe en el punto 5.1. del capítulo 1, fueron incubados con 6 µM de cada fragmento recombinante, ó con 6 a 30 µM de cada péptido a 37°C. Al cabo de 30 min de incubación, los ovocitos fueron fijados en PFA 2% en PBS durante 45 min a TA y luego sometidos a 3 lavados con PBS-BSA 4 mg/ml. Para la detección de los fragmentos, los ovocitos fueron incubados en SCAN 5% en PBS-BSA 4 mg/ml durante 30 min a 37°C para bloquear los sitios inespecíficos y posteriormente incubados durante 1 h a 37°C con suero anti-MBP (1/100) diluído en SCAN 1% en PBS-BSA 4 mg/ml. Luego, los ovocitos fueron lavados tres veces en PBS-BSA 4 mg/ml, e incubados durante 30 min a 37°C con anticuerpos anti-IgG de conejo acoplados a FITC (1/50 en PBS-BSA 4 mg/ml). Para el caso de los péptidos, el bloqueo fue realizado con PBS-BSA 4 y los anticuerpos primario y secundario utilizados fueron anti-biotina (Vector Laboratories) y anti-IgG de cabra acoplados a FITC (Sigma) diluidos 1/100 en PBS-BSA 4. En todos los casos, luego del segundo anticuerpo, los ovocitos fueron sometidos a una segunda serie de lavados, montados con glicerol 90%, y finalmente observados en un microscopio Nikon Optiphot (Nikon) equipado con lentes epifluorescentes bajo un aumento de 250 x.

4.2. Capacidad de los fragmentos y péptidos de interferir en la fusión de gametas de rata

4.2.1. Obtención y tratamiento de los ovocitos con los fragmentos ó péptidos

Luego de la obtención de ovocitos sin ZP (tal como se describió anteriormente), los mismos fueron colocados en gotas de 50 μ l de medio RFM bajo aceite mineral e incubados a 37°C durante 30 min solos ó con diferentes concentraciones (6 a 60 μ M) de cada fragmento ó péptido en gotas de medio RFM.

4.2.2. Ensayo de fusión de gametas

- La técnica de transferencia de colorante Hoescht fue utilizada para determinar la ocurrencia de la fusión espermatozoide-ovocito en presencia de los fragmentos. Para ello,

ovocitos sin ZP fueron incubados durante 5 min en 500 μ l de RFM conteniendo 1 μ g/ml de Hoechst 33342 (Sigma) y luego lavados 3 veces en 500 μ l de medio fresco durante 20 min (cada lavado). Posteriormente, los ovocitos tratados con los fragmentos fueron inseminados con espermatozoides capacitados en medio con bicarbonato tal como se describe en el capítulo 1 (concentración final de 0,5 a 1 x 10⁵ espermatozoides/ml). La coincubación de las gametas continuó durante 30 min a 37°C en un incubador de gaseo automático conteniendo una atmósfera de 5% de CO₂. Seguidamente, los ovocitos fueron lavados e incubados con PFA 2% en PBS durante 10 min. Luego de ser fijados, los mismos fueron observados a 250 x en un microscopio Nikon Optiphot (Nikon) equipado con lentes de epifluorescencia y luz de mercurio, determinándose el porcentaje de ovocitos con espermatozoides fusionados (espermatozoide con cabeza fluorescente). Como control negativo, en cada experimento se agregó una gota de coincubación de gametas en medio sin Ca⁺², condición en la cual no ocurre fusión (Yanagimachi, 1978).

- El ensayo de penetración de ovocitos fue utilizado para el estudio de la actividad biológica de los péptidos sintéticos. Los ovocitos incubados con los péptidos fueron inseminados y tratados como se describió previamente en el capítulo 1 punto 5.2 (para estos experimentos sólo se utilizó medio con bicarbonato)

- Para evaluar el efecto de F7 sobre la penetrabilidad de los ovocitos, los ovocitos expuestos a Hoechst fueron incubados con F7 por 30 min, lavados y transferidos a gotas de medio fresco. Posteriormente, los mismos fueron inseminados como se describió anteriormente.

4.2.3. Determinación de la motilidad de los espermatozoides

La motilidad fue evaluada colocando una alícuota de las suspensiones de espermatozoides sobre portaobjetos precalentados, y por observación subjetiva de no menos de 100 células bajo microscopio óptico (400 x).

5. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como la media \pm SEM para cada grupo de experimentos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa "GraphPad Prism", (versión 3,02, GraphPad Software Inc.). Los porcentajes de ovocitos con espermatozoides fusionados, ovocitos penetrados y motilidad de los espermatozoides fueron analizados con el test X². Los resultados fueron considerados significativamente diferentes a un valor de *p* < 0,05.

RESULTADOS

Tal como se describe en el capítulo 1, durante la capacitación de los espermatozoides, la proteína epididimaria DE migra al SE, localización en la cual participa en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios presentes en la superficie del ovocito. En los últimos años, nuestro laboratorio ha llevado a cabo diferentes experimentos tendientes a comprender el mecanismo molecular por el cual DE se une a sus sitios en el ovocito. Estudios de estructura-función revelaron que la actividad biológica de DE, evaluada a través de su unión al ovocito y su capacidad de inhibir el proceso de fusión de gametas, residiría en la región peptídica de la misma (Ellerman et al., 2002). Dado que el análisis de la secuencia aminoacídica de DE no arrojó ningún dominio funcional conocido que pudiera explicar la actividad de la proteína, se generaron una serie de fragmentos recombinantes correspondientes a diferentes regiones de la molécula (Ellerman, 2001), basados en la estructura descripta para la proteína recombinante homóloga en ratón (Eberspaecher et al., 1995), la cual presenta un dominio N-terminal laxo (75% de la molécula), y una región C-terminal compacta con 10 de las 16 Cys conservadas de la familia CRISP. La actividad biológica de los fragmentos se estudió evaluando la capacidad de los mismos de unirse al oolema (por IFI) y de inhibir el proceso de fusión de gametas (mediante ensayos de fusión in vitro). Los distintos fragmentos generados, así como la actividad biológica de los mismos se muestran en el Esquema 2.1. Los resultados obtenidos permitieron acotar dicha función a una región de 97 aminoácidos ubicados en la región N-terminal de la molécula (Ellerman, 2001).

En base a lo observado, el segundo objetivo de esta Tesis ha consistido en identificar el sitio activo por el cual DE interactúa con los sitios complementarios en el oolema.



Esquema 2.1: Estudio del sitio activo de DE a través de fragmentos recombinantes.

Estructura propuesta para la proteína recombinante de ratón (Eberspaecher et al., 1995) y esquema de los fragmentos recombinates de la proteína de rata. Entre paréntesis se indica la posición de los aminoácidos de inicio y terminación de cada polipéptido siguiendo la numeración de la proteína completa sin péptido señal. A la derecha se indica si el fragmento mantiene (+) ó no (-) la actividad biológica de la proteína completa.

1. Determinación de la región de la proteína DE responsable de su unión al ovocito

1.1. Expresión y purificación de los fragmentos recombinantes

De los 5 fragmentos generados y analizados en trabajos previos, se concluyó que la actividad de la proteína estaría en el fragmento denominado F4 (fragmento 4) abarcando desde el aminoácido 62 al 158 (región N-terminal) de la proteína secretada (sin péptido señal) y conteniendo 6 de las 16 Cys de la molécula. A partir de estos resultados, decidimos

generar dos nuevos fragmentos denominándolos: F6 (aa: 62 a 116) y F7 (aa: 114 a 158) (Figura 2.1).



Figura 2.1: Diseño de los fragmentos recombinantes F6 y F7. Esquema de los fragmentos producidos (F6 y F7). Entre paréntesis se indica la posición de los aminoácidos de inicio y terminación de cada polipéptido siguiendo la numeración de la proteína completa sin péptido señal.

Para ello, la región codificante de cada fragmento fue amplificada por PCR a partir de ADNc de epidídimo de rata, utilizando "primers" diseñados específicamente para tal fin y una enzima polimerasa de alta fidelidad. Los fragmentos de ADN así obtenidos mostraron el tamaño esperado en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (**Figura 2.2A**). Con el fin de facilitar el clonado de estos fragmentos, los "primers" contenían sitios para enzimas de restricción en sus extremos 5′ coincidentes con dos de los que presenta el vector de expresión elegido.

Para la expresión de estos fragmentos recombinantes, se utilizó el sistema procariótico *Escherichia coli* junto al vector comercial pMAL-c2. Este vector de expresión ya ha sido utilizado previamente en nuestro laboratorio con buenos resultados. Luego de ocurrida la ligación entre los fragmentos de ADN y el vector, las distintas construcciones fueron utilizadas para transformar células BL21 y los clones recombinantes seleccionados fueron enviados al exterior para su secuenciación. Para ello, se utilizaron "primers" universales complementarios a regiones adyacentes al sitio de clonado, permitiendo verificar la correcta ubicación del fragmento insertado. Los resultados indicaron la ausencia de mutaciones y la correcta inserción de los fragmentos de ADN respecto al marco de lectura del vector (**Figura 2.2B**).



Figura 2.2: Producción de los plásmidos recombinantes.

(A) La secuencia codificante de cada fragmento fue amplificada por PCR y luego separada por electroforesis. Se muestran los marcadores de tamaño en pares de base. (B) Los plásmidos conteniendo las secuencias codificantes de cada fragmento fueron secuenciados, mostrándose un ejemplo de los resultados obtenidos para F7 con el "primer" M13/pUC. La secuencia del "primer" utilizado para la PCR se encuentra subrayada y el codón de terminación se indica en itálicas.

Los cultivos de *E. coli* conteniendo los vectores recombinantes fueron crecidos en presencia de IPTG para inducir la expresión del polipéptido deseado. El vector pMAL-c2 contiene la secuencia codificante para la proteína unidora de maltosa (maltose-binding protein: MBP), por lo que la proteína final es una fusión entre MBP y la proteína deseada (Figura 2.3A). Las proteínas recombinantes así generadas fueron luego purificadas mediante una cromatografía de afinidad utilizando una columna de resina acoplada a amilosa (polímero de maltosa) y la identidad de las proteínas purificadas fue confirmada por Western blot utilizando un suero anti-MBP. Los resultados presentados en la Figura 2.3B indicaron que el anticuerpo detectó una banda en cada uno de los cultivos correspondientes a los distintos fragmentos y otra de aproximadamente el doble del tamaño de cada polipéptido.



Figura 2.3: Expresión de las proteínas recombinantes.

(A) Esquema del método utilizado para la expresión de los polipéptidos recombinantes. (B) Bacterias transformadas con los plásmidos conteniendo las secuencias codificantes de F6 ó F7 fueron crecidas e incubadas con IPTG. Al cabo de 5 hs, las proteínas fueron extraídas y separadas por electroforesis e inmunodetectadas utilizando anti-MBP (6 μ g proteína total/calle). A la izquierda de cada panel, se muestran los marcadores de peso molecular en kDa.

1.2. Actividad biológica de los fragmentos recombinantes

Una vez obtenidos los fragmentos recombinantes, los mismos fueron evaluados en cuanto a su función biológica. En primera instancia, se investigó la capacidad de los mismos de unirse a los sitios complementarios presentes en el oolema. Para ello, ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con concentraciones equimolares de cada uno de los fragmentos, fijados y sometidos a IFI utilizando anti-MBP y anti-IgG acoplado a FITC. Los fragmentos F4 y F5, generados previamente, fueron utilizados como controles positivos y negativos, respectivamente. Tal como se muestra en la **Figura 2.4**, los ovocitos incubados con F7 mostraron marca fluorescente en toda la superficie de la célula con excepción de un área negativa, igual a la observada en aquellos incubados con F4. Por el contrario, los ovocitos incubados con F6 no presentaron marca fluorescente, al igual que los incubados con F5.





El próximo paso consistió en investigar si la unión de F7 al ovocito era capaz de inhibir el proceso de fusión espermatozoide-ovocito. Para ello, las gametas fueron coincubadas en presencia de F6 ó F7, evaluándose el porcentaje de ovocitos con espermatozoides fusionados. La premisa de este tipo de experimentos es que si la proteína ó fragmentos a estudiar presentan la actividad biológica de DE, podrían unirse a los mismos sitios a los que se une la proteína presente sobre el espermatozoide, e inhibir competitivamente la interacción de gametas (Esquema 2.2).



Según los trabajos anteriores realizados con fragmentos recombinantes, la concentración necesaria para inhibir el ensavo de fusión fue superior a la requerida para la IFI, por lo que la concentración de cada fragmento en estos nuevos experimentos, fue igual a la utilizada en los casos anteriores (60 µM). A diferencia de lo observado con el resto de los fragmentos, F7 produjo un efecto detrimental sobre la motilidad de los espermatozoides al cabo de 3 hs de incubación, por lo cual la fusión de gametas fue estudiada por la técnica de transferencia del colorante Hoechst, que evalúa específicamente la ocurrencia de la fusión de gametas luego de sólo 30 min de coincubación de las mismas. Para ello, los ovocitos fueron primeramente incubados con Hoechst, luego coincubados con los fragmentos y, finalmente, inseminados con espermatozoides capacitados, evaluándose a los 30 min el porcentaje de ovocitos con espermatozoides fusionados. Además de la disminución en el tiempo de coincubación, se probaron concentraciones menores de F7 para tratar de reducir al máximo el efecto tóxico. Bajo estas condiciones, F7 no afectó la motilidad de los espermatozoides en ninguna de las concentraciones utilizadas (F7 60 µM: 55% \pm 5; Control sin proteína: 63% \pm 6; n = 3; NS). Los resultados indicaron que, a diferencia de F6, F7 produjo una disminución significativa y dosis-dependiente en el porcentaje de ovocitos con espermatozoides fusionados (Figura 2.5).



Figura 2.5: Capacidad de F7 de inhibir la fusión espermatozoide-ovocito. Ovocitos de rata sin ZP preincubados con Hoechst 33342 fueron incubados en medio sólo (C) ó medio conteniendo diferentes concentraciones de F7 (6-60 μ M), ó F6 (60 μ M) durante 30 min. Los mismos fueron luego inseminados con espermatozoides de rata capacitados, evaluándose el % de ovocitos con espermatozoides fusionados al cabo de 30 min de coincubación. Cada barra representa el promedio de 3

experimentos independientes \pm SEM. a vs b, p< 0.05; a vs c, p<0.001.

Cabe aclarar que el hecho de que haya algún fragmento, como F6, que no presenta función biológica indica que MBP ó algún otro posible contaminante en común arrastrado de la expresión y purificación de los fragmentos, no sería responsable de la actividad biológica de F7.

Para descartar la posibilidad de que F7 tuviera un efecto tóxico sobre los ovocitos, los mismos fueron incubados con Hoechst y con los fragmentos, lavados y recién luego inseminados. Los resultados no mostraron diferencias en el porcentaje de ovocitos fusionados entre los controles sin proteína, y aquellos en los que F7 había sido removido por lavados previo a la inseminación (**Figura 2.6**).



Figura 2.6: Toxicidad de F7 sobre los ovocitos.

Ovocitos de rata sin ZP preincubados con Hoechst 33342 fueron incubados en medio sólo (control) ó medio conteniendo F7 (60 μ M) durante 30 min. Una fracción de los ovocitos controles (C) y de los incubados con F7 fueron luego lavados en medio fresco (Lavado). Posteriormente, se inseminaron todas las gotas con espermatozoides capacitados determinándose el % de ovocitos con espermatozoides fusionados al cabo de 30 min de coincubación. Cada barra representa el promedio de 3 experimentos independientes ± SEM. a,c vs b, p< 0,001; a vs c, NS.

En conjunto, estos resultados sugieren que la actividad biológica de DE residiría en una región de la molécula de 45 aminoácidos comprendida entre los residuos 114 y 158.

1.3. Actividad biológica de los péptidos sintéticos

Tal como se mencionará anteriormente, la proteína DE pertenece a la familia de proteínas CRISP, cuyos miembros comparten una alta homología de secuencia y poseen elementos estructurales conservados. Mediante el uso de una base de datos pública denominada PROSITE (<u>www.expasy.org/prosite</u>, (Hulo et al., 2006), se analizó la región de 45 aminoácidos de DE que mantiene la actividad biológica de la molécula completa. El estudio indicó que esta región contiene los dos motivos característicos de la superfamilia CAP, denominados Signature 1 y 2 (nº de acceso PROSITE: PS01009 y PS01010, respectivamente) (Tabla 2.1). Estos motivos poseen secuencias consenso de entre 11 y 12

aminoácidos que están presentes en todos los miembros de esta familia, aún en las proteínas más alejadas evolutivamente como las proteínas PR-1 de plantas y las V5 de insectos (ver *Introducción*).

Tabla 2.1: Signatures 1 y 2 de la superfamilia CAP. Se muestran las secuencias de los "Signatures" de algunas de las proteínas de la superfamilia. Los números a la izquierda de cada secuencia denotan la ubicación de estas regiones en la proteína completa (sin péptido señal). HLTX: Helotermina

		Signature 1		Signature 2
CRISP-1_RATA:	120-130	GHYTQVVWNST	148-159	FYVCHYCPGGNY
CRISP-1_RATON:	118-128	GHYTQVVWNST	146-157	YYVCHYCPVGNY
CRISP-1_HUMANO:	122-132	DHYTQIVWATS	151-162	LYVCHYCHEGND
CRISP-2_RATA:	116-126	GHYTQLVWYSS	145-156	FYVCHYCPMGNN
CRISP-2_RATON:	116-126	GHYTQLVWYSS	145-156	FYVCHYCPMGNN
CRISP-2_HUMANO:	116-126	GHYTQLVWYST	145-156	YYVCQYCPAGNN
CRISP-3_RATON:	118-128	GHHTQVVWKSN	146-157	FYVCRYCPVLNY
CRISP-3_HUMANO:	118-128	GHYTQVVWYSS	147-158	YYVCQYCPAGNW
CRISP-4_RATON:	123-133	DHYTQMVWAST	152-163	LYVCHYCHEGNH
CRISP-4_RATA:	127-137	YHYTQMVWAPS	156-167	LYVCHYCHEGNS
HLTX_LAGARTIJA:	116-126	GHYTQVVWYRS	144-155	YQVCQYCPGGNI
NATRINA_SERPIENT	E:113-123	GHYTQIVWYQT	141-152	FYVCQYCPSGNF
P14 TOMATE:	97-107	RHYTQVVWRNS	123-134	FISCNYDPVGNW
GAPR-1 HUMANO:	93-103	GHFTAMVWKNT	108-119	FVVARYFPAGNV
Vev 5_AVISPA:	159-169	GHYTQMVWANT	188-199	YLVCNYGPSGNF

Teniendo en cuenta estos dos motivos característicos de las CRISPs, se sintetizaron, dos péptidos biotinilados correspondientes a la secuencia de cada "Signature" presente en la proteína DE de rata (**Tabla 2.1**). Se generaron entonces el Péptido 1 (P1) y Péptido 2 (P2) correspondientes a los Signatures 1 y 2, respectivamente, con una pureza del 98%.

Con el fin de estudiar la actividad biológica de P1 y P2, en primer lugar se investigó la capacidad de los mismos de unirse al ovocito de rata. Para ello, ovocitos sin ZP fueron incubados con diferentes concentraciones de cada péptido, fijados y sometidos a IFI utilizando anti-biotina y anti-IgG acoplado a FITC como primer y segundo anticuerpo, respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron que, mientras todos los ovocitos incubados con P1 presentaron marcación negativa, los ovocitos incubados con 15 ó 30 μ M de P2 mostraron marca fluorescente sobre su superficie (**Figura 2.7**). Al igual que lo observado para la proteína completa ó F7, la fluorescencia se observaba sobre toda la superficie del ovocito, con excepción de un área discreta que no presentaba marca.

Para controlar que la secuencia, y no sólo la composición de aminoácidos en P2, fuera necesaria para su unión al ovocito, se sintetizó un nuevo péptido conteniendo los mismos aminoácidos que P2 pero ubicados de forma desordenada, y al que se denominó Scramble P2 (scP2). Cuando este péptido fue utilizado en ensayos de IFI, no se observó la marca característica observada ya sea para P2, F7 ó la proteína completa, sino que únicamente se detectaron algunos pocos puntos fluorescentes en la superficie del ovocito **(Figura 2.7)**.



Figura 2.7: Capacidad de unión de los péptidos a la membrana plasmática del ovocito.

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con 30 μ M de cada péptido durante 30 min, fijados, y sometidos a IFI utilizando anti-biotina. Nótese la presencia de un área negativa (flecha). Barra = 10 μ m.

A continuación se estudió la habilidad de estos tres péptidos de inhibir la fusión de las gametas *in vitro*. Los experimentos iniciales, utilizando los péptidos a una concentración de 15 ó 30 μ M, indicaron que ninguno de ellos fue capaz de inhibir el porcentaje de ovocitos penetrados. Sin embargo, al aumentar la concentración a 60 μ M, P2 produjo una inhibición significativa, no observada ni para los ovocitos incubados con P1 ó con scP2, ni para los controles (**Figura 2.8**). Para estos últimos experimentos, los péptidos debieron ser disueltos en DMSO, por lo que se agregó al ensayo de fusión un control adicional sin péptido pero con DMSO en el medio de cultivo.



Figura 2.8: Capacidad de los péptidos de inhibir la fusión espermatozoide-ovocito.

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados durante 30 min en medio sólo (C), ó medio conteniendo DMSO 1%, ó medio conteniendo P1, P2 ó scP2 (60 μ M). Los ovocitos fueron luego inseminados con espermatozoides de rata capacitados evaluándose el % de ovocitos penetrados al cabo de 3 hs de coincubación. Cada barra representa el promedio de 4 experimentos independientes ± SEM. a vs b, p< 0,0001; b vs c , p<0,001; a vs c, NS.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la unión de DE a sus sitios complementarios en el ovocito ocurriría a través de una región de 12 aminoácidos correspondientes al Signature 2 (S2) de la familia CRISP.

2. Especificidad de la interacción entre el Signature 2 y los sitios complementarios en el ovocito

Con el objeto de estudiar la especificidad de la asociación entre el S2 de DE y los sitios complementarios en el ovocito, se analizó la capacidad de diversas proteínas CRISP de unirse a ovocitos de rata en relación con la secuencia de aminoácidos de sus correspondientes S2. Para ello, en primer lugar, se analizaron los resultados de experimentos previos de IFI realizados por nuestro grupo de trabajo, en los cuales se incubaron ovocitos de rata con las proteínas: Tpx-1/CRISP-2 de ratón (Busso, 2005), ARP/hCRISP-1 de humano y helotermina de lagartija. Estos estudios mostraron que Tpx-1 de ratón, a diferencia de ARP y helotermina, fue capaz de unirse al ovocitos de otras especies, revelaron que la proteína DE de rata fue capaz de unirse a ovocitos de ratón pero no a ovocitos de humanos (Cohen et al., 2000a; Cohen et al., 2001) (Figura 2.9).

En segundo lugar, se compararon las secuencias de los S2 de estas proteínas respecto a la de DE (ver **Tabla 2.1**), observándose una correlación con lo hallado por IFI (**Tabla 2.2**). Más precisamente, la proteína Tpx-1 de ratón, capaz de reconocer el sitio complementario a DE en el ovocito de rata, presenta un S2 con sólo 2 aminoácidos diferentes a DE, mientras que las proteínas ARP y helotermina, que no lograron unirse al ovocito de rata, difieren en 4 aminoácidos en sus S2 respecto al de DE (**Tabla 2.2**). Del mismo modo, la proteína DE es capaz de unirse al ovocito murino y presenta un S2 con sólo 2 sustituciones respecto al de su homólogo en ratón (AEG-1/CRISP-1), mientras que no logra unirse al ovocito humano, y su S2 exhibe 4 sustituciones respecto al de su homólogo en humano (ARP/hCRISP-1) (**Tabla 2.2**).



Figura 2.9: Capacidad de unión de diferentes proteínas CRISP a la membrana plasmática del ovocito.

Ovocitos de rata sin ZP fueron incubados con DE (a), Tpx-1 (b), ARP (c) ó heloternima (HLTX) (d), ú ovocitos de ratón (e) ó humano (f) fueron incubados con DE de rata. Todos los ovocitos fueron sometidos a IFI utilizando anticuerpos específicos. Barra = $10 \mu m$.

proteína CRISP	ovocito (especie)	capacidad de unión al ovocito por IFI	nº de aa diferentes en S2 respecto a DE de rata
DE/CRISP-1 de rata	rata	+	-
Tpx-1/CRISP-2 de ratón	rata	+	2/12
ARP/hCRISP-1 de humano	rata	-	4/12
Helotermina de lagartija	rata	-	4/12
DE/CRISP-1 de rata	ratón	+	2/12 ^a
DE/CRISP-1 de rata	humano	-	4/12 ^b

Tabla 2.2. Correlación entre la capacidad de unión de las proteínas CRISP y sus secuencias aminoacídicas del Signature 2.

comparado con AEG-1/CRISP-1 de ratón

b comparado con ARP/hCRISP-1 de humano

En conjunto, los resultados de este capítulo indican que la región responsable de la unión de DE a la superficie del ovocito de rata residiría en una región de 12 aminoácidos correspondiente al Signature 2 de la superfamilia de proteínas CAP.

DISCUSION

Evidencias de nuestro laboratorio indican que la proteína DE participaría en la fusión espermatozoide-ovocito a través de su unión a sitios complementarios en la superficie del ovocito (Rochwerger et al., 1992). Estudios posteriores en los que se evaluó la capacidad de una serie de fragmentos recombinantes de DE de unirse a la superficie del ovocito e interferir con la fusión de gametas, lograron acotar a 97 aminoácidos la región que mantiene la actividad biológica de la proteína completa (Ellerman, 2001).

Con el fin de identificar el sitio activo por el cual DE se asocia al ovocito, en este trabajo se expresaron dos fragmentos adicionales (F6 y F7) comprendidos dentro de la región de 97 aminoácidos (denominada F4) del dominio N-terminal de DE. El sistema utilizado para la expresión y purificación de estos fragmentos fue el mismo que se utilizara en los trabajos anteriores dando un buen rendimiento y eficacia. La expresión en el modelo procariótico de E. coli presenta, por un lado, la ventaja de mejorar la solubilidad de la proteína de interés, y disminuir la probabilidad de que sufra proteólisis (Kapust & Waugh, 1999). Por otro lado, dado que la molécula recombinante se expresa como una proteína de fusión podría requerirse el clivaje con una proteasa específica para obtener la proteína libre. Sin embargo, los experimentos previos demuestran que dicho clivaje no seria necesario. Mientras varios fragmentos acoplados a MBP (F1, F3 y F4) resultaron biológicamente activos, indicando que MBP no representaría un impedimento estérico, otros fragmentos no retuvieron la actividad biológica de la proteína completa (F2 y F5), confirmando que el MBP presente en los fragmentos funcionales no sería responsable de la inhibición observada. Estos resultados validan la utilización de este método de expresión y purificación de fragmentos para la determinación del sitio activo de DE.

Tanto el clonado como la expresión y purificación de los fragmentos F6 y F7 fueron exitosos, obteniéndose buenos rendimientos de cada polipéptido. Con el fin de evaluar la actividad biológica de los dos fragmentos generados, los mismos fueron utilizados en experimentos de IFI y ensayos de fusión de gametas. Los resultados indicaron que únicamente F7, el fragmento más próximo al extremo C-terminal de esa región de 97 aminoácidos, fue capaz de unirse al oolema exhibiendo el mismo patrón de fluorescencia

previamente observado para la proteína DE nativa (Rochwerger et al., 1992), para la proteína recombinante entera (Ellerman et al., 2002) y para el fragmento recombinante F4 (Ellerman, 2001). En relación a los ensayos de fusión de gametas, el fragmento F7, a diferencia de F6, fue también capaz de competir con el espermatozoide y disminuir de manera concentración-dependiente el porcentaje de ovocitos fusionados. La concentración a la cual F7 inhibió la fusión fue mayor que la que se requirió para visualizar su unión al ovocito, observación que concuerda con lo hallado anteriormente para los otros fragmentos. Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que en los experimentos de IFI, los ovocitos son fijados inmediatamente luego de su exposición a los fragmentos, permitiendo así detectar asociaciones de baja afinidad. Por el contrario, en los ensayos de fusión, la proteína nativa presente sobre el espermatozoide compite con los fragmentos unidos al ovocito, desplazándolos de los sitios complementarios para DE.

Previamente, se había observado que al utilizar fragmentos de un tercio del tamaño de la proteína completa, se requería una concentración diez veces mayor para lograr la inhibición de la fusión, sugiriendo que otras regiones de la molécula que parecerían no ser esenciales, podrían ser relevantes para lograr la correcta configuración del sitio de unión al ovocito (Ellerman, 2001). En este caso, a pesar de que F7 tiene un tamaño de aproximadamente la mitad del último fragmento funcional identificado (F4) (45 vs 97), logró inhibir la fusión a la misma concentración que F4. Esta observación indicaría que en el caso de que otras regiones de la molécula fueran beneficiosas para formar el sitio activo, las mismas parecerían estar localizadas por fuera de la región correspondiente al F4.

Por último, la inhibición de fusión obtenida por F7 no se debería a un efecto deletéreo sobre las gametas, ya que ni la motilidad de los espermatozoides al cabo de 30 min de incubación, ni la penetrabilidad de los ovocitos, resultaron alteradas por exposición a este fragmento.

En conjunto, los resultados indican que a diferencia de F6, F7 es capaz de unirse a los sitios complementarios para DE en la superficie del ovocito, e inhibir en forma específica la fusión de las gametas, a través de su unión a los sitios en el ovocito.

103

Un hallazgo muy interesante fue el hecho de que la secuencia de 45 aminoácidos correspondiente a F7 contuviera los dos motivos característicos de la superfamilia CAP, denominados Signature 1 y Signature 2, y presentes en todos los miembros de la misma. Esta observación nos llevó a investigar si la actividad biológica de DE se encontraba en alguna de estas regiones conservadas de la molécula. El uso de péptidos sintéticos correspondientes a estos dominios (P1 y P2, respectivamente) en ensayos de IFI y fusión, indicó que P2, pero no así P1, fue capaz de unirse a la superficie del ovocito e interferir con la fusión de gametas. En este sentido, resulta muy importante el hecho de que un péptido conteniendo la misma composición aminoacídica que P2 pero en forma desordenada (scP2) no tuviera actividad biológica en ninguno de los dos ensayos utilizados, indicando que no sólo la composición sino la secuencia aminoacídica de la región correspondiente a P2 serían relevantes para su unión al ovocito.

Es interesante mencionar que, al igual que para los fragmentos generados en trabajos previos, tanto el fragmento F7 como el péptido P2, capaces de interactuar con el ovocito, fueron también capaces de inhibir la fusión de gametas, mientras que aquellos fragmentos ó péptidos que no se unieron al ovocito (F6, P1, scP2) tampoco lograron interferir con la interacción de gametas. Esta consistente correlación entre los dos parámetros apoya los resultados obtenidos y valida el uso de estos ensayos biológicos para evaluar la actividad de DE.

En resumen, los resultados obtenidos usando tanto los fragmentos recombinantes como los péptidos sintéticos indican que la actividad de DE residiría en una región de 12 aminoácidos correspondiente al S2 de la familia CRISP. Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describe un rol funcional para un motivo de la familia CRISP, y que se logra delimitar la actividad de una proteína CRISP a una región tan pequeña. Asimismo, estos resultados son particularmente interesante considerando que DE podría ser utilizada para el desarrollo de un método anticonceptivo. Tal como se mencionara anteriormente, evidencias de nuestro laboratorio indican que la inmunización de ratas machos y hembras con DE purificada (Cuasnicú et al., 1990; Perez Martínez et al., 1995; Ellerman et al., 1998) y recientemente con la proteína recombinante (Ellerman et al., en prensa) es capaz de producir una inhibición específica de la fertilidad en ambos sexos. Así,

104

el hecho de que la actividad de DE resida en una región de sólo 12 aminoácidos representa una contribución importante para el futuro diseño de métodos nuevos y más seguros de regulación de la fertilidad.

De acuerdo a lo obtenido, un modelo posible de participación de DE en las distintas etapas de la interacción de gametas sería el representado en el **esquema 2.3**: A: el espermatozoide capacitado e intacto se une al ovocito con la proteína DE localizada en la región dorsal de la cabeza, B: Como en todas las especies estudiadas hasta el momento, la ZP induce la RA del espermatozoide, lo cual gatilla la migración de DE al SE, C: localizada en la región fusogénica de la cabeza del espermatozoide, DE participaría en la etapa específica de fusión de gametas a través de la interacción del S2 con los sitos complementarios presentes en la superficie del ovocito



Esquema 2.3: Modelo de la participación de DE en el proceso de fusión. En color negro sobre el espermatozoide, se muestra la localización de la proteína DE, la cual se une a sus sitios complementarios sobre la membrana plasmática del ovocito a través del S2.

Tal como se comentara en la introducción, la superfamilia CAP (CRISP/Antigen-5/PR-1) está compuesta por proteínas CRISP presentes en mamíferos y reptiles, proteínas V5 en insectos y proteínas PR-1 en plantas y humanos. El alto grado de similitud entre las secuencias de las proteínas permite asumir que las estructuras tridimensionales de estas proteínas serían muy parecidas entre sí, pudiendo extrapolar los conocimientos de la estructura de una proteína hacia las demás. El análisis cristalográfico de algunos miembros PR-1 como P14 a de tomate (Fernandez et al., 1997), tex31 de caracol (Milne et al., 2003) y GAPR-1 recombinante de humano (Serrano et al., 2004), como así también de Vev5 de avispa (Henriksen et al., 2001) demostró la existencia de un plegamiento laxo en forma de sandwich α - β - α único presente en esta superfamilia. Recientemente, se han publicado las primeras estructuras cristalinas de miembros de la familia CRISP, stecrisp y natrina, las cuales constan de dos dominios que son estabilizados independientemente por puentes disulfuros y están conectados por una pequeña región que actúa de bisagra (Guo et al., 2005; Wang et al., 2005). El dominio N-terminal se asemeja a la única estructura hallada en las proteínas PR-1 y V5, denominándose así PR-1, mientras que el dominio C-terminal rico en Cys, denominado CRD (cysteine rich domain), es único de las CRISP. Dado que aún no se ha descripto la cristalografía de la proteína DE y, teniendo en cuenta la similitud de secuencia de DE con stecrisp y natrina, nuestros resultados indican que la capacidad de DE de unirse al ovocito residiría en lo que se conoce como el dominio PR-1. Resultados similares fueron descriptos para la proteína testicular Tpx-1/CRISP-2, cuya función propuesta es mediar la unión entre células espermatogénicas y de Sertoli a través de 101 aminoácidos localizados en la región N-terminal (Maeda et al., 1998).

El hecho de que estas proteínas de la superfamilia conserven una estructura similar entre ellas (dominio PR-1) sugiere que las mismas cumplirían una función también similar en los distintos organismos. En este sentido, existen evidencias que indican que el dominio PR-1 podría actuar como un modulador enzimático. Por un lado, los análisis de estructuras revelaron la existencia de un bolsillo en la superficie de las proteínas P14 a, GAPR-1, Vev5 y stecrisp, formado por dos pares de histidinas y glutamatos altamente conservados sugerido como un posible sitio enzimático. Por otro lado, estudios recientes indicaron que Tex31 posee actividad proteolítica dependiente de serina (Milne et al., 2003). Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado actividad enzimática para otras CRISPs (Guo et al., 2005), lo cual abre la posibilidad de que este dominio PR-1 esté implicado en funciones adicionales. En este sentido, los resultados de nuestro trabajo indicando que la capacidad de DE de unirse a la membrana del ovocito está localizada en una región de PR-1 diferente al sitio con actividad enzimática propuesto, apoya fuertemente la idea de que el dominio PR-1 contendría una variedad de funciones y sitios activos.

A pesar de lo expuesto anteriormente, no se puede descartar la relevancia del dominio CRD para otras posibles funciones de DE. Dada la inusual concentración de Cys en esta región, y la estricta conservación de las posiciones de este aminoácido entre los miembros de la familia CRISP, se ha sugerido que el dominio CRD cumpliría una función importante para la actividad de estas proteínas. Recientemente, se sugirió que una región conservada del dominio CRD podría mediar asociaciones entre proteínas CRISP y otras proteínas posiblemente localizadas en matrices extracelulares, postulando así al CRD como módulo de interacción con cofactores, sustratos específicos ó receptores, independiente del dominio PR-1 (Guo et al., 2005). Dado que DE se asocia al espermatozoide mientras transita por el epidídimo (Kohane et al., 1980b), a través de un mecanismo aún desconocido, existe la posibilidad de que el CRD sea requerido para dicha interacción. Asimismo, las evidencias indican que las proteínas CRISP de venenos de serpientes (Yamazaki & Morita, 2004; Wang et al., 2005; Wang et al., 2006), así como Tpx-1/CRISP-2 de ratón (Gibbs et al., 2006), poseen actividad reguladora de canales iónicos posiblemente localizada en el CRD. En este sentido, es interesante mencionar que DE parecería tener actividad inhibidora de la fosforilación de proteínas en tirosina en el espermatozoide (Roberts et al., 2003), evento que, tal como se mencionó en el capítulo anterior, depende de la regulación de diversos canales iónicos (revisión de trabajos: Visconti et al., 2002). Teniendo en cuenta la existencia de una población de DE débilmente unida al espermatozoide que se libera del mismo durante la capacitación (Cohen et al., 2000b), es posible que DE actúe como factor decapacitante, regulando canales iónicos a través de su dominio CRD.

Así, a pesar de compartir una organización estructural común, es posible que diferentes miembros de esta familia hayan evolucionado para llevar a cabo una variedad de funciones que dependen de diferentes regiones de la molécula (Esquema 2.4).


Esquema 2.4: Diagrama ilustrando los dominios estructurales de las proteínas CRISP y su relación con las actividades funcionales propuesta.

Los miembros de la familia CRISP contienen un dominio N-terminal denominado PR-1 y un dominio Cterminal conocido como CRD, conectados entre sí por una región que actúa de bisagra. La región de DE responsable de su unión al ovocito residiría en el Signature 2 (S2) localizado en el dominio PR-1.

Resultados de nuestro laboratorio indican que, al igual que DE de rata, los homólogos epididimarios en ratón y humano también participan de la fusión de gametas (Cohen et al., 2000a; Cohen et al., 2001). Mas aún, recientemente describimos que las proteínas Tpx-1/CRISP-2 de ratón y humano también estarían involucradas en el proceso de fusión a través de sitios complementarios en el ovocito (Busso et al., 2005; Busso et al., 2007). Ya que todas estas proteínas poseen un alto grado de conservación y, además, una actividad biológica en común, es lógico pensar que actúen a través de mecanismos moleculares muy similares. Sin embargo, el hecho de que la capacidad de DE de unirse al ovocito resida en una de las regiones más conservadas de la molécula, plantea la duda de cómo esta región común podría poseer la especificad necesaria para interactuar con diferentes ovocitos.

Para contestar esta pregunta, se analizó la capacidad de distintas CRISPs de unirse al ovocito en relación a la secuencia de aminoácidos de sus correspondientes S2. Este estudio reveló que, por un lado, en aquellos casos en los cuales la proteína era capaz de unirse al ovocito de otra especie (Tpx-1 de ratón a ovocitos de rata ó DE de rata a ovocitos de ratón), las secuencias del S2 de las proteínas de las dos especies poseían una alta homología (sólo 2 aminoácidos diferentes). Por otro lado, el estudio indicó que en aquellos casos en los cuales las proteínas no eran capaces de interactuar con los ovocitos (ARP ó helotermina con ovocitos de rata, ó DE de rata con ovocitos humanos) las secuencias de los S2 eran menos conservadas (4 aminoácidos diferentes). En conjunto, estas observaciones apoyan la participación del S2 en la fusión de gametas y sugieren que diferencias en la secuencia de aminoácidos de esta región podrían ser responsables de la especificidad de la unión de cada CRISP al ovocito de su correspondiente especie.

El hecho de que el S2 de DE y Tpx-1/CRISP-2 difieran en sólo 2 aminoácidos, y que ambas proteínas participen en el proceso de fusión de gametas a través de su unión a sitios complementarios en el ovocito, abrió la posibilidad de que dichas proteínas compartan los sitios de unión. En ese sentido, resultados recientes de nuestro grupo indican que DE y Tpx-1/CRISP-2 compiten por el mismo sitio de unión en el ovocito, sugiriendo la existencia de una cooperación funcional entre estas moléculas homólogas durante la fertilización (Busso et al., 2007).

Además de la interacción de las proteínas CRISP con el ovocito, otros miembros de la superfamilia CAP presentan capacidad de asociarse a membranas de diferentes células, tales como: *Na*-ASP-2 a fagocitos (Ehlers, 2000; Asojo et al., 2005), XCRISP a "hatching gland cells" (Schambony et al., 2003), ó allurina a espermatozoides (Olson et al., 2001). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en estas interacciones aún son desconocidos. Los resultados de este trabajo abren la posibilidad de que la región conservada del Signature 2 juegue un papel similar en la funciones de otras proteínas de la familia que interactúan con la membrana de células en diferentes sistemas biológicos.

En conclusión, el hecho de que la capacidad de DE/CRISP-1 de unirse al ovocito resida en una región de la molécula muy conservada evolutivamente, brinda nueva información sobre el mecanismo molecular involucrado en la participación de las proteínas CRISP-1 en la fusión de gametas de mamíferos, con importantes implicancias en la relación estructura-función de otros miembros de esta familia de proteínas ampliamente distribuida entre los organismos vivientes.

Los resultados de este capítulo forman parte del trabajo publicado: "*Sperm protein DE mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family*". Ellerman D, Cohen D, **Da Ros V**, Morgenfeld M, Busso D & Cuasnicu P. Developmental Biology (2006) 297: 228-237.

109

CAPITULO III

"DE y su relevancia para la fertilidad"

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

Los ratones generados y luego utilizados para los experimentos de este capítulo fueron mantenidos a 23°C en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, con alimento y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad. Los experimentos con animales fueron llevados a cabo siguiendo "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" publicada por NIH (Bethesda, MA, EEUU).

2. Identificación y aislamiento del gen murino CRISP-1

2.1. Estrategia de PCR

2.1.1. "Long PCR"

Diferentes reacciones de "Hot Start" PCR fueron llevadas a cabo utilizando como molde 100 ng de ADN genómico de células embrionarias totipotenciales de ratón de la cepa 129SvEv (cedido por el Dr. Diego Gelman, INGEBI) ó 5 μ l de un eluido de una PCR previa. Por cada tubo además se mezclaron: 1-2 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs; 0,5 μ M de cada "primer" específico y 2 μ l de la polimerasa termoestable Elongase® (Invitrogen Corporation, Carlsband, CA, EEUU) en un volumen final de 50 μ l. Las secuencias de los "primers" utilizados fueron:

2,8 kb	forward: 5' ACTTCCTGCAGAACAACGC 3'
	reverse: 5' CCATTAATGCCATGGCTAG 3'
2,45 kb	forward: 5' CAGACAAGGGTACCTTCAGT 3'
	reverse: 5' CGTCAGATGTCAGATCTTTG 3'
3,65 kb	forward: 5' GCCCAAGATCTTACATATGATG 3'
	reverse: 5' ACCAACTGCAGATGCAACT3'

La amplificación se realizó en el termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf) para tubos eppendorfs, bajo las siguientes condiciones de tiempos y temperaturas:

Los fragmentos amplificados fueron posteriormente separados por electroforesis en geles de agarosa 0,8% como se describiera anteriormente. En algunos casos, el ADN fue purificado del taco de agarosa utilizando el kit comercial "GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.1.2. Southern Blot

Al finalizar la separación por electroforesis de las reacciones de PCR antes descriptas, se tomó una foto del gel. Luego el mismo fue incubado en una solución de HCl 0,25 M durante 15 min seguido de una incubación en una solución desnaturalizante (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) por 40 min, ambas incubaciones con agitación suave. Posteriormente, el gel fue incubado en una solución neutralizante (Tris-HCl 0,5 M pH 7,4; NaCl 1,5 M; EDTA 1 mM), 2 veces por 30 min y luego el ADN fue transferido por capilaridad (Sambrook et al., 1989) a membranas de nylon no cargadas Hybond-N (Amersham Biosciences). A continuación, el ADN fue fijado a las membranas con luz UV y posteriormente prehibridizado en una solución conteniendo buffer fosfato 25 mM, pH 7,2; SSC 6X; EDTA 1 mM; Denhardt 5X; SDS 0,5%; formamida 50% y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón durante 4 hs a 42°C. Las hibridaciones fueron llevadas a cabo en la misma solución de prehibridación durante 16 hs a 42°C con el agregado de la sonda marcada. Al finalizar la hibridación, la membrana fue sometida a una serie de lavados, los cuales fueron realizados de la siguiente manera: 2 lavados iniciales de 15 min en SSC 2X; SDS 0,1%, a TA, y 2

lavados finales de alta rigurosidad con SSC 0,1X; SDS 0,1%, a 65 °C. Una vez finalizados los lavados, las membranas fueron expuestas a placas Biomax MS (Eastman Kodax Company), junto con pantallas intensificadoras de señal, a –70 °C. El tiempo de exposición de las películas autorradiográficas varió según la marca radioactiva detectada en los filtros luego de los lavados. Finalmente, las placas fueron reveladas por pasajes sucesivos en soluciones de revelador, lavado y fijador.

Como sonda se utilizaron 300 ng de oligonucleótidos complementarios a porciones de los exones 1 y 5 (exón 1: 5' CTCATTCTACTCTGAAGCCAGCA 3'; exón 5: 5' ATGTTGGCCCAAAGCAACCTGATAGTGTGGTGGACATTATACTCAG 3' y 5' GCATCATGGTCTTCTGCAATCCAAGGATGGTATAATG 3' marcados con ATP- γ^{32} P radioactivo por acción de la enzima polinucleótido quinasa (New England Biolabs) según las indicaciones del proveedor. Luego de 30 min de incubación a 37°C, el ADN fue precipitado a -70°C durante 15 min por la adición de 2 µl de sssDNA (20 µg/µl; Gibco BRL, Rockville, MD, EEUU); 50 µl de acetato de amonio 5 M y 2,5 vol de etanol 100%. A continuación, el mismo fue lavado con etanol 70% y resuspendido en 100 µl de TE. La incorporación de radioactivo al ADN fue estimado por medición de una alícuota de la solución en el contador Bioscan QC 2000 (Bioscan Inc, WA, EEUU).

2.1.3. Clonado en vectores comerciales

ADN amplificado y luego eluído según 2.1.1, fue sujeto a una ligación con el vector comercial pGEM-T (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. La técnica de transformación de bacterias se describió en el capítulo 1. Las colonias resistentes fueron crecidas, y sus ADN purificados y analizados por digestiones enzimáticas con Sal I y Not I (Gibco) y geles de agarosa 0,7% teñidos con bromuro de etidio.

2.1.4. "Colony Hybridization"

Al día siguiente del plaqueo de colonias, las placas fueron tratadas con el objetivo de transferir por duplicado el ADN a membranas de nitrocelulosa Hybond N (Amersham Bioscience) tal como se describe en Sambrook et al. (1989). El ADN fue luego fijado a las

membranas por exposición a luz UV y la hibridización se continuó tal como se describe en 2.1.2.

2.2. "Screening" de una biblioteca de cósmidos

2.2.1. Preparación de la sonda

La sonda fue obtenida por PCR utilizando como molde 100 ng del ADNc de CRISP-1/DE de rata. La reacción fue realizada tal como se describe en el punto 2.1.1. del capítulo 2 excepto por lo siguientes cambios: 2,5 U de taq ADN polimerasa (Gibco BRL) y 2 mM de MgCl₂. Las secuencias de los "primers" utilizados fueron: forward: 5' ACGGATCCCAAGATACCACTGATGAATG 3' y reverse: 5' TCTACAAGCTTAATTG CCACCAGGACAA 3'. Las condiciones en cada ciclo fueron:

5 min a 94°C 1 min a 94°C 1 min a 50°C 1 min a 72°C 5 min a 72°C

El ADN fue aislado por electroelución mediante una electroforesis preparativa en geles de agarosa 2%. Luego de efectuada la separación e identificadas las bandas, el taco de agarosa conteniendo el ADN deseado fue cortado y colocado dentro de un tubo de diálisis. El mismo fue colocado nuevamente en la cuba de electroforesis orientando la membrana de forma tal que el campo eléctrico generado sea perpendicular a la longitud máxima de la bolsa de diálisis, durante 30 min a 10-12 V/cm. Luego el medio líquido fue recuperado y sujeto a extracciones sucesivas con 1 vol de fenol (equilibrado con Tris-HCl pH 8) - cloroformo-isoamílico (25:24:1) y 1 vol de cloroformo-isoamílico (24:1). El ADN fue precipitado con 0,1 vol de acetato de sodio 3 M, pH 5,2 y 2,5 vol de etanol 100% a -70°C durante 10 min, lavado con etanol 70% y resuspendido en 50 µl de TE.

La marcación del ADN se llevó a cabo por el método de iniciación al azar (random priming) utilizando un kit comercial "RadPrime Labeling System" (Invitrogen Corporation)

siguiendo las indicaciones del proveedor. Luego del agregado del "Stop Buffer", el ADN fue precipitado tal como se describió en 2.1.3. del capítulo 2.

2.2.2. Titulación de la biblioteca

Una alícuota, de volumen conocido, fue recuperada del stock de la biblioteca de ADN genómico de ratón de la cepa 129/SvEv fabricada en cósmidos (SuperCos 1 cosmid vector, Stratagene, La Jolla, CA, EEUU) y luego diluida en medio LB sin ampicilina. Diluciones seriadas de esa solución fueron plaqueadas en placas de Petri de 90 mm de diámetro de LB agar incubando luego a las mismas durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se determinó el número de colonias por placa, y se calculó el título de la biblioteca (n° colonias/µl de biblioteca) conociendo el volumen utilizado de la misma. Esta titulación fue repetida 3 veces obteniéndose un número promedio. Dicho título fue utilizado para los plaqueos siguientes.

2.2.3. Hibridización

El plaqueo de las bacterias fue llevado a cabo tal como se describió para la titulación aunque en este caso se utilizaron placas de Petri de 150 mm. Se utilizó una concentración de bacterias tal que la cantidad de colonias en cada placa de Petri fuera de 100.000.

La transferencia e hibridización se continuó tal como se describe en 2.1.4. y 2.1.2, respectivamente. Las membranas fueron, finalmente, expuestas a placas Biomax MS (Eastman Kodax Company) por 3 días, con pantallas intensificadoras de señal, a –70°C y reveladas por pasajes sucesivos en soluciones de revelador, lavado y fijador.

2.3. "Screening" de una biblioteca de fagos

2.3.1. Preparación de la sonda

ARN de epidídimo de ratón fue extraído utilizando el reactivo Trizol® (Gibco BRL) siguiendo las instrucciones del proveedor. Luego, la integridad y cantidad del ARN fueron evaluadas por medio de una electroforesis en geles de agarosa 1% con formaldehído (Sambrook et al., 1989) y visualización en transiluminador con luz UV.

Cinco μ g del ARN total fueron incubados a 65°C durante 5 min, seguido de una incubación en hielo. Por otro lado, la mezcla de reacción contuvo 300 UI de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega); 2,5 μ M de un oligonucleótido de timidinas (oligo dT) utilizado como "primer"; 80 UI de un inhibidor de RNasas (Promega) y 0,3 mM de dNTPs. Todos estos reactivos fueron agregados en el buffer apropiado en un volumen final de 15 μ l. La mezcla de reacción, junto con el ARN, fue incubada durante 10 min a TA, seguido por 1 h a 37°C y por último 5 min a 94°C.

Dos µl del producto de la transcripción reversa fueron sometidos una PCR utilizando los siguientes "primers" específicos: forward: 5' ACTTCCTGCAGAACAACGC 3' y reverse: 5' ACCAACTGCAGATGCAACT 3'. La mezcla de reacción, las condiciones de amplificación, la eletroelución y la marcación fueron descriptas en el punto 2.2.1. de este capítulo.

2.3.2. Titulación de la biblioteca

Para el plaqueo de los bacteriófagos se creció un cultivo de células E. coli LE 392 en 50 ml de FRM (NaCl 0,5%; Mg₂SO₄ 0,2%; peptona 1%; extracto de levadura 0,5%; maltosa 0,2%) sin antibiótico, hasta alcanzar un DO₆₀₀ = 0,4. El cultivo fue centrifugado a 2000 rpm en rotor SS34 (Sorvall) por 10 min, y las células fueron resuspendidas en 18 ml de medio Mg₂SO₄ 10 mM. En un tubo estéril, se mezclaron 200 µl de esta suspensión de bacterias con diluciones en medio SM (Mg₂SO₄ 10 mM; NaCl 0,58%; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; gelatina 0,5%) de la biblioteca de ADN genómico de ratón de la cepa 129/SvEv fabricada en un derivado del fago λ (λ Dash® II vector kit, Stratagene) durante 25 min a 37°C. Luego, se agregaron 2,5 ml de "top agar FRM" (FRM adicionado con agarosa 0,7%) calentado a 55°C. Una vez homogenizado, el contenido del tubo fue esparcido rápidamente sobre una placa de 90 mm de LB agar. Luego de la solidificación del "top agar", la placa fue cultivada a 37°C durante 8 hs. Al cabo de ese tiempo, se colocaron las placas de petri en la heladera y luego de unas horas, se determinó el número de placas de lisis por placa de Petri. Según la dilución de los fagos sembrada en cada placa y el número de placas de lisis, se obtuvo el título de la biblioteca. Este procedimiento se realizó 3 veces obteniéndose un título de biblioteca promedio. Este número fue utilizado para los plaqueos siguientes.

2.3.3. Hibridización

El plaqueo de los fagos fue llevado a cabo tal como se describió para la titulación excepto por los siguientes cambios. En este caso, se utilizaron placas de Petri de 150 mm, por lo cual se plaquearon 600 μ l de bacterias y se agregaron 7 ml de "top agar". Se utilizó una concentración de bacteriofagos tal que la cantidad de placas de lisis en cada placa de Petri fuera de 50.000.

Dos hs después de colocar las placas de Petri en la heladera, se procedió a la transferencia y luego a la hibridización de la misma manera que fuera descripto en el punto 2.1.4. y 2.1.2, respectivamente.

Las placas de lisis positivas fueron extraídas del agar con un "tip" de 1 ml con el extremo cortado y colocadas en un tubo eppendorf conteniendo 200 µl de medio SM y 20 µl de cloroformo por 12 hs a 4°C. Estos fagos fueron utilizados para un nuevo "screening" empleando tres diluciones diferentes y placas de Petri de 100 mm. La transferencia y la hibridación fueron realizadas siguiendo los mismos pasos anteriores. Luego de tres rondas adicionales de "screening", los clones positivos fueron aislados y guardados en medio SM con cloroformo 10%.

2.4 Clonado del gen CRISP-1

2.4.1. Extracción del ADN a partir de bacteriofagos

El ADN contenido en los fagos fue extraído y purificado mediante la siguiente técnica. Primeramente, la cantidad de partículas de fagos presentes en cada taco positivo fue determinada como se mencionó anteriormente. Una vez obtenido el título, un cultivo de bacterias LE 392 ($DO_{600} = 0,5$) resuspendido en Mg₂SO₄ 10 mM, fue incubado con 2 x 10⁸ partículas en medio RFM líquido durante 8 hs con agitación. Seguidamente, se agregaron 4 ml de cloroformo por cada 200 ml de cultivo continuando la incubación con agitación. Al cabo de 30 min, el cultivo fue centrifugado a 8000 rpm en rotor GS3 (Sorvall) por 12 min, y el sobrenadante fue tratado con 600 µl de RNasa A (1 mg/ml) durante 30 min a 37°C. A continuación, se agregaron 11,68 gr de NaCl por cada 200 ml de cultivo disolviéndolo con agitación en un baño térmico a 37°C. Luego de 1 h en reposo en hielo, la solución fue centrifugada a 8000 rpm en rotor GS3 durante 10 min a 4°C y el sobrenadante fue incubado

con 20 gr de PEG 8000 por cada 200 ml de cultivo inicial durante toda la noche a 4°C con agitación. Al día siguiente, la solución fue centrifugada a 8000 rpm en rotor GS3 durante 20 min a 4°C y el precipitado resuspendido en medio SM. Luego de una nueva centrifugación a 6000 rpm en rotor SS34 (Sorvall) durante 10 min a 4°C, el sobrenadante fue recuperado y sujeto a una extracción con cloroformo. La fase acuosa fue recuperada y ultracentrifugada en rotor T865.1 (Sorvall) a 29000 rpm durante 2 hs a 4°C. Luego, el precipitado fue resuspendido en medio SM y la proteínas fueron digeridas por incubación con Proteinasa K 50 μ g/ml; SDS 0,5% y EDTA 1 mM durante 2 hs a 55°C con agitación. Posteriormente, el ADN fue purificado por 2 rondas de extracciones sucesivas de 1 vol de fenol (equilibrado con Tris-HC1 pH 8) -cloroformo-isoamílico (25:24:1) y 1 vol de cloroformo-isoamílico (24:1). Finalmente, el ADN fue precipitado por centrifugación luego del agregado de 1 vol de isopropanol a TA durante 10 min, lavado con etanol 70% y resuspendido en 100 µl de TE.

2.4.2. Estimación de la masa de ADN

La masa de ADN fue estimada por absorbancia a 260 nm y por electroforesis en geles de agarosa comparando con un estándar de masa.

2.4.3. Digestiones enzimáticas

Diez μ g de ADN fueron digeridos con 225 U de la enzima de restricción Not I (Gibco BRL) durante 3 hs a 37°C.

2.4.4. Preparación del vector

El vector pBluescript[®] II KS (Stratagene) fue amplificado en bacterias *E.coli* DH5 α y purificado mediante lisis por álcali, seguido de un gradiente continuo de CsCl y bromuro de etidio (Sambrook et al., 1989).

2.4.5. Purificación del ADN

El vector y los insertos fueron purificados de un gel de agarosa utilizando el kit comercial "GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del proveedor.

2.4.6. Remoción del grupo fosfato de extremos del ADN

Los extremos del vector (2,5 μ g) fueron desfosforilados por incubación con 5U de la enzima "shrimp alkaline phosphatase" (Promega) en el buffer apropiado durante 1 h a 37°C. La enzima fue luego inactivada a 65°C durante 15 min.

2.4.7. Ligación y transformación de bacterias

Se utilizaron 15 ng de vector mientras que el inserto fue agregado en diferentes proporciones molares con respecto al vector (1:1, 2:1 y 3:1). La mezcla fue incubada durante toda la noche a 16°C con 2 U de la ligasa de ADN del fago T4 (Gibco BRL) en el buffer correspondiente, en un volumen final de entre 10 a 30 μ l. Luego, bacterias competentes *E.coli* DH5 α fueron transformadas con el producto de la ligación según el protocolo descripto en 2.1.7. del capítulo 2.

3. Construcción del vector de recombinación homóloga

Para la construcción del vector de recombinación homóloga se partió del plásmido pBS32 (tamaño = 17,5 kb), el cual estaba formado por el vector pBluescript y el clon 32 (proveniente de la placa 15) obtenido por el "screening" de la biblioteca de fagos, que contiene las secuencias que flanquean al exón 2 del gen de *CRISP-1*.

3.1. Subclonado del brazo de homología 5'

1- Un fragmento de 8,1 kb liberado del plásmido pBS32 por doble digestión con Xba I y EcoR V, fue ligado sobre sí mismo, conformando el plásmido pBS32-8.

2- Un fragmento de 1,4 kb fue liberado del plásmido pBS32-8 por doble digestión con Sca I y Nco I. Por otro lado, el vector pUCtkneo (cedido por el Dr. E. Mitch Eddy, NIEHS-NIH, Research Triangle Park, NC, EEUU) fue digerido con la enzima Hpa I y luego sometido a "fill in". Este fragmento con este vector fueron ligados en "blunt", conformando el plásmido pUCtkneo-14. Únicamente una de las dos orientaciones posibles de inserción fue elegida.

3.1.1. Ligación

Se utilizaron 150 ng de vector mientras que el inserto fue agregado en proporción molar 1:2 ó 1:5 con respecto al vector, para ligaciones de extremos cohesivos o "blunt", respectivamente. La mezcla fue incubada durante 2 hs a TA con 1µl de la ligasa de ADN "Fast LinkTM" (Epicentre, Madison, WI, EEUU) y 0,75 µl de ATP (10 mM) en el buffer correspondiente en un volumen final de 15 µl, siguiendo las recomendaciones del proveedor

3.1.2. "Fill in"

Para rellenar los extremos salientes, se incubó durante 1 h a 37°C el ADN con la enzima polimersa del fago T4 (New England Biolabs), dNTPs 0,1 mM en el buffer apropiado y siguiendo las instrucciones del proveedor.

3.2. Subclonado del brazo de homología 3'

1- Un fragmento de 2,1 kb fue liberado del plásmido pBS32 por doble digestión con Xba I y EcoR V. Asimismo, el vector pBluescript fue digerido con las mismas enzimas de restricción siendo sometido luego a ligación con el fragmento. Este nuevo plásmido fue denominado pBS32-2.

2- Un fragmento de 2,6 kb fue liberado del plásmido pBS32 por digestión con Xba I. Por otro lado, el vector pBS32-2 fue digerido con la misma enzima y ligado con el fragmento, conformando el plásmido pBS32-46. Únicamente una de las dos orientaciones posibles de inserción fue elegida.

3.3. Armado del vector final

Un fragmento de 4,7 kb fue liberado del plásmido pBS32-46 por doble digestión con Not I y Cla I. Por otro lado, el vector pUCtkneo-14 fue digerido con la enzima Pme I y luego sometido a "fill in". Este fragmento con este vector fueron ligados en "blunt", conformando el plásmido KO que fue utilizado como vector de recombinación. Únicamente una de las dos orientaciones posibles de inserción fue elegida.

4. Electroporación de células y selección de clones positivos

4.1. Electroporación

Esta técnica fue realizada en el laboratorio del Dr E. Mitch Eddy. Para ello, se siguió el protocolo descripto anteriormente (Dix et al., 1996; Nagy et al., 2003).

4.2. Análisis del ADN de los clones resistentes

4.2.1. Extracción de ADN genómico

Los clones resistentes al tratamiento con G418 y ganciclovir fueron incubados en una solución de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 100 mM; SDS 0,5%) y Proteinasa K 0,5 mg/ml a 55°C por 16 hs. Las impurezas incluyendo las proteínas fueron extraídas sucesivamente con 1 vol de fenol (equilibrado con Tris-HCl pH 8) -cloroformo-isoamílico (25:24:1) y 1 vol de cloroformo-isoamílico (24:1). El ADN fue precipitado con 0,7 vol de isopropanol, lavado con etanol 70% y resuspendido en 50 µl de TE. Finalmente, la masa de ADN fue cuantificada mediante espectrofotometría a 260 nm.

4.2.2. PCR

La reacción fue realizada tal como se describe en el punto 2.2.1. de este capítulo excepto por lo siguientes cambios: 100 ng de ADN genómico, 1,25 U de amplitaq ADN polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, MA, EEUU), 1,5 mM de MgCl₂, en un volumen final de 20 μ l (pH 8,5). Las secuencias de los "primers" utilizados fueron: forward: 5' CAAACCAGTAGCCAACATCAAAGTAA 3' y reverse: 5' CTGCACGAGACTAGTGA GACGT 3'. Las condiciones en cada ciclo fueron:

Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1%.

4.2.3. Southern Blot

Se utilizaron diferentes sondas marcadas con un kit comercial "RadPrime Labeling System" (Invitrogen) ya descripto en el punto 2.2.1. Para el análisis del extremo 5' de la recombinación, se utilizó un fragmento (1,2 kb) complementario al intrón A amplificado con los "primers": forward: 5' ATAAGAACTTTGTGTTTGGGGGCAGAC 3' y reverse: 5' TGGATTTTAAGATGGGCTTGGTGAT 3'. Para el extremo 3', se amplificó un fragmento (440 pb) complementario al intrón C con los "primers": forward: 5' GTTTCTCCATCTGGCAGTGACTT 3' y reverse: 5' GAGAGGGAGAGGCAATAACAC AGT 3'.

Quince μ g de ADN genómico fueron digeridos con 50 UE de la enzima de restricción Pvu II, Hinc II ó Sca I por 12–14 hs. Luego se realizó una digestión adicional por 2 hs, agregando 20 UE de la misma enzima. El ADN digerido fue precipitado con 2,5 vol de etanol, resuspendido en TE y luego sembrado en geles de agarosa 0,8%. La transferencia e hibridización se detallan en 2.1.2.

5. Microinyección en blastocistos y transferencia embrionaria

Esta técnica fue realizada en el laboratorio del Dr E. Mitch Eddy. Para ello, se siguió el protocolo descripto en Nagy et al. (2003).

6. Análisis del genotipo

6.1. Extracción de ADN genómico

Para tal fin se cortaron trozos de colas de los animales híbridos C57BL/6 x 129SvEv, los cuales fueron incubados tal como se describe en el punto 4.2.1. de este capítulo. Por otro lado, pequeños trozos de orejas de los animales fueron tratados utilizando el kit comercial "Wizard® SV Genomic DNA purification" (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. En ambos casos, la masa de ADN fue cuantificada mediante espectrofotometría a 260 nm.

6.2. PCR

La reacción fue realizada tal como se describe en el punto 4.2.2. de este capítulo excepto por lo siguientes cambios: 100 ng de ADN genómico, 1,25 U de gotaq ADN polimerasa (Promega) en un volumen final de 20 µl. Las secuencias de los "primers" utilizados fueron: forward: 5'AGACAAAGAGACCACCAACAGATT 3' y reverse específico de *CRISP-1*: 5'AGTACAGCAGCCAAGAAGAACAAG 3' y reverse específico de "neo": 5'CTACCCG CTTCCATTGCTC 3'. Las condiciones de amplificación fueron iguales que en el punto 4.2.2. de este capítulo excepto que el tiempo de elongación en cada ciclo fue de 1 min. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 2%.

7. Análisis de expresión de la proteína CRISP-1

7.1. RT-PCR

La extracción de ARN y síntesis del ADNc se realizó tal como se detalló en el punto 2.3.1. de este capítulo. Para la PCR se utilizaron las mismas condiciones que en 6.2. con los siguientes "primers" forward:

1-8	forward: 5' ACTTCCTGCAGAACAACGC 3'
2-8	forward: 5' AAGCCATCAGAATTCCAAGATAGCTCTCAG 3'
4-8	forward: 5' CAGACAAGGGTACCTTCAGT 3'

En todos los casos, el "primer" reverse fue: 5' CTGCTGCAGGTCTGGAATTATTTCAAT GTC 3'. Como control del molde, se utilizaron "primers" comerciales para actina (Biodynamics SRL). Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1,5%.

7.2. Western Blot

Los epidídimos ó testículos fueron disgregados en frío, mediante cortes con tijeras, hasta obtener una preparación homogénea. Posteriormente, se agregaron 1,5 vol de una solución Tris-HCl 50 mM pH 7,4 conteniendo 0,2 mM de PMSF, completándose la homogeneización mediante la utilización de un homogeneizador Polytron (Omni International, Marietta, GA, EEUU). Finalmente, la preparación resultante fue centrifugada durante 20 min a 10000 x g a 4°C y el sobrenadante centrifugado nuevamente. Las fracciones obtenidas se dializaron en tube-o-dyalizer (Biosciences, St Louis, MO; EEUU) contra 200 ml de una solución de Tris-HCl 50 mM pH 6,8, durante 6 hs con un cambio de buffer. La concentración proteica de las muestras se determinó utilizando el reactivo "Protein Assay" (Bio-Rad Laboratories) siguiendo las instrucciones del proveedor.

La técnica de Western Blot se desarrolló siguiendo el protocolo ya descripto en el capítulo 1 punto 4.1., excepto que el primer anticuerpo utilizado fue anti-DE (1/200) ó anti-AA1 (concentración original: 4,95 mg/ml; 1/1000) (Busso et al., 2007).

8. Evaluación de la fertilidad

Un macho salvaje (CRISP-1^{+/+}), heterocigotas (CRISP-1^{-/+}) ú homocigotas (CRISP-1^{-/-}) para la mutación en el gen CRISP-1 (8-16 semanas de edad) fue puesto en apareo con 2 hembras wild type (al menos una de las dos de fertilidad comprobada) por un período de 14 días. Al cabo de ese período, las hembras fueron separadas en jaulas independientes y evaluadas en cuanto a signos de preñez o parición durante las siguientes 3 semanas. Este esquema se repitió 4 veces para cada macho. El comportamiento sexual fue evaluado por la presencia de tapón vaginal todas las mañanas durante el período de apareo. La tasa de fertilidad de cada macho fue determinada contando los animales nacidos por cada hembra y luego realizando un promedio entre todas las hembras por cada macho. De la misma manera, se analizó el peso de la camada como así también el tiempo que transcurrió desde el primer día de la puesta en apareo hasta la parición.

9. Análisis de parámetros funcionales del espermatozoide

9.1. Obtención y capacitación de espermatozoides

Los epidídimos fueron obtenidos, limpiados y los espermatozoides colectados por punción de los túbulos del cauda. El medio utilizado fue una modificación del descripto por Fraser y Drury (1975), al cual se le suplementó BSA 3%. La capacitación fue llevada a cabo en gotas de 200 μ l de medio bajo vaselina. En cada gota se sembró una alícuota de la suspensión original de forma tal que la concentración final resultó de 0,1-1 x 10⁷ células/ml determinada por conteo en hemocitómetro. La incubación continuó por un período de 90-120 min a 37°C en estufa con gaseo automático conteniendo una atmósfera de 5% de CO₂.

9.2. Evaluación de la motilidad

Para ello, alícuotas de 10 µl de suspenciones de espermatozoides fueron dispuestas entre portaobjetos y cubreobjetos mantenidos a 37°C, evaluándose el porcentaje de motilidad por microscopía óptica a un aumento de 400 x. En todos los casos se evaluó un mínimo de 100 células por determinación.

9.3. Evaluación de la reacción acrosomal

Alícuotas de 50 μ l de suspensiones de espermatozoides fueron tratadas con PFA 4% en PBS durante 1 h a 4° C, y luego sometidas a 3 lavados con acetato de amonio 0,1 M pH 9. La suspensión fue luego colocada en un portaobjetos, dejándose secar al aire. Los portaobjetos fueron lavados por inmersión consecutiva en agua, metanol y agua (5 min en cada uno) y, posteriormente, incubados en una solución de 0,22% Coomassie Brillant Blue en 50% metanol, 10% ácido acético durante 2 min. Al cabo de esa incubación, los portaobjetos fueron lavados con agua destilada, montados y observados inmediatamente al microscopio óptico (400 x) para evitar la difusión del colorante. En todos los casos se evaluó un mínimo de 100 células por determinación. Los espermatozoides fueron clasificados como intactos cuando presentaban una coloración azul intensa en la región acrosomal, y como reaccionados cuando esa región no presentaba color.

9.4. Evaluación histológica de los órganos reproductivos

Los ratones fueron anestesiados y sus testículos y epidídimos removidos y fijados por inmersión en solución de Boin durante 24 horas. Los órganos fueron luego incluidos en parafina, y cortados en micrótomo. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados bajo microscopio óptico.

9.5. Ensayos de interacción de gametas

9.5.1. Obtención de ovocitos de ratón

Hembras wild type adultas fueron superovuladas mediante la inyección de 5 UI de eCG seguida por una de 5 UI de hCG 48 hs más tarde. Doce a 15 hs luego de la administración de hCG, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical, sus oviductos recuperados y los cúmulos de ovocitos (CCO) obtenidos mediante una punción en la región de la ampulla. En algunos casos, dichos CCO fueron incubados con hialuronidasa 0,3 mg/ml en PBS BSA 4 mg/ml durante 5 min a 37°C con el fin de liberar las células del cúmulos, y lavados con medio fresco. En otros casos, con el objetivo de remover la ZP, los ovocitos fueron tratados con una solución de Tyrode ácida (pH 2,5) (Nicolson et al., 1975) durante 5 a 15 seg y posterior lavado con medio fresco. Todos los tratamientos y lavados fueron realizados bajo aceite mineral.

9.5.2. Fertilización in vitro

Los CCO ú ovocitos con ZP fueron inseminados con espermatozoides previamente capacitados *in vitro* (ver punto 9.1 de este capítulo) en una concentración final de 0,5-2 x 10^5 células/ml y las gametas fueron coincubadas a 37°C en estufa con gaseo automático por 3 hs. Los ovocitos sin ZP, en cambio, fueron inseminados con espermatozoides en una concentración final de 0,5-1 x 10^4 células/ml continuando la coincubación por 1 h. En todos los casos, al concluir la coincubación, los ovocitos fueron lavados en medio fresco con el fin de remover los espermatozoides débilmente unidos. Posteriormente, los mismos fueron fijados con PFA 2% durante 10 min a TA y teñidos con 1 µg Hoescht 33342 (1mg/ml) durante 10 min a TA. Todos los tratamientos fueron realizados bajo aceite mineral.

Finalmente, los ovocitos fueron lavados y observados a 250 x en un microscopio Nikon Optiphot (Nikon) equipado con lentes de epifluorescencia y luz de mercurio, determinándose el porcentaje de ovocitos con espermatozoides fusionados (espermatozoide con cabeza fluorescente).

9.5.3. Ensayos de competencia in vitro

Dos poblaciones de espermatozoides provenientes de animales de diferente genotipo fueron capacitados por 1,5 h, tal como se describiera previamente. Indistintamente, una población fue incubada con 100 nM de MitoTracker® Green FM (Invitrogen Corporation; preparado en 20 µM en DMSO) durante los últimos 15 min de la capacitación. Posteriormente, las poblaciones espermáticas (una marcada y la otro no) fueron utilizadas de forma individual o conjunta para inseminar ovocitos sin ZP, continuando el protocolo descripto en el punto anterior. En este caso, no se realizó la fijación de los ovocitos luego de la coincubación de las gametas.

10. Análisis estadístico

Los resultados están expresados como la media \pm SEM para cada grupo de experimentos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa "GraphPad Prism", (versión 3,02, GraphPad Software Inc). Los porcentajes de RA, ovocitos fertilizados y motilidad fueron analizados con el test X². Los datos del resto de los experimentos fueron analizados por el test de Student. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes a un valor de p < 0,05.

RESULTADOS

Tal como se describiera anteriormente, nuestros estudios indican que tanto la proteína epididimaria de rata DE (CRISP-1), como sus homólogos en ratón y humano, participan en el proceso de fusión de gametas a través de sitios complementarios en los respectivos ovocitos. (Rochwerger et al., 1992, Cohen et al., 2000a; Cohen et al., 2001). Estudios de inmunización de ratas con DE sugieren que esta proteína no sólo participaría en el proceso de interacción de gametas sino que podría ser relevante para la fertilidad de un individuo (Cuasnicú et al., 1990; Perez Martinez et al., 1995; Ellerman et al., 1998). Con el fin de investigar más profundamente la relevancia de DE/CRISP-1 tanto para la fertilidad como para el proceso de fertilización, el tercer objetivo de esta Tesis consistió en generar una línea de ratones "knock out" para la proteína CRISP-1 y analizar el fenotipo de los mismos. La estrategia utilizada para obtener esta línea murina fue interrumpir el gen correspondiente en el genoma de células embrionarias totipotenciales (Embryonic Stem Cells: células ES) mediante recombinación homóloga (revisión de la técnica: Muller, 1999).

Cabe aclarar que en este capítulo nos referiremos a la proteína DE como CRISP-1 ya que en el ratón la misma está descripta con los nombres AEG-1 ó CRISP-1 (Mizuki & Kasahara, 1992; Haendler et al., 1993), utilizando la denominación DE exclusivamente para la proteína de rata.

1. Generación de una línea de ratones "knock out" para CRISP-1

1.1. Construcción del vector de recombinación homóloga

El primer paso en la producción de animales "knock out" (ko) es la generación de un vector de recombinación homóloga. Para ello, se selecciona la región del gen que será eliminada, construyéndose luego el vector conteniendo las regiones flanqueantes denominadas brazos de homología. Para la construcción de este vector, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Marcelo Rubinstein (INGEBI), de reconocida experiencia en el desarrollo de esta metodología, quien nos brindó el asesoramiento técnico necesario.

Al comienzo de este trabajo no se conocía aún la secuencia del genoma de ratón, por lo que la estrategia utilizada para la construcción del vector fue diseñada en base a estudios previos en donde se describe la caracterización del gen *CRISP-1* (Schwidetzky et al., 1997). En dicho trabajo se describió la secuencia de los exones y únicamente el tamaño de los intrones, los cuales abarcan el 93,6% de la longitud total del gen. Con el fin de producir ratones con mutaciones nulas en el gen *CRISP-1*, se eligió eliminar al exón 2 debido a que en éste reside el sitio ATG de iniciación traduccional.

- Aislamiento del gen CRISP-1

Una vez elegida la región a eliminar, se procedió a la obtención de los brazos de homología. Para ello, se requería aislar el gen completo ó bien directamente producir estos fragmentos utilizando la técnica de PCR. Ya que disponíamos de algunos datos del gen para diseñar los "primers" correspondientes, se decidió obtener las regiones homólogas por PCR a partir de ADN genómico de células ES de la cepa 129SvEv de ratón. El objetivo consistía en amplificar tres fragmentos (**Esquema 3.1**): el primero de ellos, de aproximadamente 2,8 kb y conteniendo al intrón A, sería el brazo de homología 5′; los otros dos fragmentos, luego de ser ligados entre sí, formarían el brazo de homología 3′ con un tamaño total de 6,1 kb.



Esquema 3.1: Representación del gen CRISP-1.

Se muestran los exones representados por rectángulos verticales (con sus correspondientes números), los intrones (marcados con letras), y el sitio de inicio de la traducción (ATG). Los fragmentos que serán amplificados están marcados con flechas. Barra = 0.5 kb.

Ya que estos fragmentos eran de gran tamaño como para ser amplificados por las técnicas de PCR convencionales, se siguieron las indicaciones recomendadas para realizar "long PCR" utilizando enzimas ADN polimerasas especiales de diversos proveedores y ciclos de amplificación apropiados.

A pesar de haber probado diferentes temperaturas de "annealing", tiempos de elongación, diluciones del molde, y concentraciones de magnesio, como así también diferentes equipos de PCR y haber incluido glicerol en la mezcla de reacción de algunos experimentos, no se lograron visualizar los fragmentos deseados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Un inconveniente de esta estrategia fue que no existía la posibilidad de controlar correctamente la eficiencia de la "long PCR". Aún realizando una PCR sobre el ADNc de *CRISP-1* de ratón utilizando los mismos "primers", no hubiera funcionado como un buen control ya que los fragmentos esperados serían de un tamaño mucho menor por no haber intrones. El único control que se pudo realizar fue sobre el molde utilizando otros "primers" tales como el que se emplearía para el gen de la fibronectina. Al obtener una buena amplificación de este fragmento control, se descartó la posibilidad de que la preparación de ADN genómico contuviera algún inhibidor de la PCR.

Ya que existía la posibilidad de que la amplificación fuese poco eficiente y, por este motivo, no se lograsen obtener las bandas esperadas, se intentó compensar esta dificultad mediante varias metodologías diferentes. En primer lugar, luego de realizada la "long PCR" como en el caso anterior, la mezcla de la misma fue sometida a una segunda PCR y, finalmente separada en geles de agarosa sin obtener resultados positivos. Asimismo, se intentó sin éxito esta reamplificación a partir de un eluído del gel de agarosa a la altura esperada (en pares de base) proveniente de la primera PCR. La opción siguiente consistió en intentar visualizar los fragmentos esperados mediante la técnica de Southern Blot. Para ello, los productos de una única PCR fueron separados en geles de agarosa, transferidos a membranas de nylon e hibridizados con oligonucleótidos complementarios a porciones de los exones 1 y 5 marcados radioactivamente. Para los tres fragmentos se detectaron bandas de los tamaños esperados, aunque también otras a diferentes alturas (Figura 3.1). De todos modos, este resultado fue en cierta medida alentador ya que indicaba que la reacción de PCR había funcionado.



Figura 3.1: Detección de los brazos de homología por Southern Blot.

Los productos de PCR fueron sometidos a Southern Blot utilizando oligonucleótidos marcados como sondas. Para los dos primeros fragmentos se sembraron en el gel de agarosa diferentes reacciones de PCR. Las bandas de interés están marcadas con círculos.

Finalmente, se probó clonar los productos de PCR para aumentar la masa de ADN. Para ello, se eluyó el ADN proveniente de la primera "long PCR" del gel de agarosa a la altura esperada, y se sometió al mismo a una ligación con vectores comerciales diseñados a tal fin. Esta ligación fue luego utilizada para transformar bacterias, y el ADN de las colonias resistentes fue analizado por cortes con enzimas de restricción apropiadas. Al no encontrarse clones positivos mediante esta metodología, se analizaron las colonias resistentes mediante la técnica de "Colony Hybridization" en donde el ADN de las mismas se transfiere a membranas de nylon realizando luego una hibridización convencional. Con el fin de obtener una mejor sonda, se extrajo ARN de epidídimos de ratón, al cual se le realizó una RT-PCR utilizando los "primers" diseñados para la "long PCR". En esta oportunidad, se obtuvieron todos los fragmentos esperados confirmando que dichos "primers" habían sido adecuadamente diseñados (**Figura 3.2**)





De esos fragmentos obtenidos, se clonó uno de 500 pares de base (pb) que abarca desde el exón 1 al 6, el cual fue utilizado como sonda. Como control positivo, se incluyeron colonias conteniendo un plásmido con el fragmento de 500 pb. A pesar de haber realizado varios intentos, no se logró clonar los fragmentos deseados.

En conclusión, el tiempo y esfuerzo invertidos en tratar de obtener los brazos de homología mediante la técnica de PCR lamentablemente no brindaron resultados positivos, razón por la cual se realizó la estrategia más compleja que se detalla a continuación.

En este nuevo esquema se decidió aislar el gen *CRISP-1* a partir del "screening" de una biblioteca genómica de ratón 129SvEv. Para ello, contábamos con una biblioteca fabricada en cósmidos y otra en fagos provistas por nuestro colaborador, el Dr Rubinstein. El "screening" de una biblioteca se basa en la técnica de "Colony Hybridization" en la cual se analiza un número tal de colonias bacterianas ó placas de lisis (según contengan cósmidos o fagos) que contenga 4 veces todo el genoma de ratón. Para la biblioteca en cósmidos, estos valores correspondían a un total de 4 x 10⁵ clones crecidos en 4 placas de Petri de 15 cm de diámetro (1 x 10⁵ colonias/placa) mientras que para la biblioteca de fagos, correspondían 1 x 10⁶ clones en 18 placas de igual tamaño (5 x 10⁴ pfu/placa). Debido a la menor cantidad de placas que deberían ser analizadas, se comenzó utilizando la biblioteca de cósmidos.

Para ello, primeramente se determinó el título de la biblioteca, el cual fue $3,2 \times 10^5$ colonias/µl de biblioteca. Seguidamente, se procedió al plaqueo de las bacterias, a la transferencia del ADN a membranas de nylon (por duplicado, es decir, 2 membranas por cada placa) y, finalmente, a la hibridización utilizando la misma sonda y el mismo control positivo que cuando se realizó "Colony Hybridization" sobre los productos de PCR. A pesar de que la técnica funcionó correctamente, no se detectó ningún clon positivo para el gen *CRISP-1* en esta biblioteca. Se repitió el "screening" dos veces y se probaron diferentes temperaturas de hibridización sin hallar resultados positivos.

Finalmente, optamos por analizar la biblioteca fabricada en fagos, cuyo título resulto de 8 x 10^5 pfu/µl de biblioteca. En este caso, antes del plaqueo de las bacterias, se realizó la infección de las mismas con los fagos, y luego se continúo de igual manera que para el "screening" anterior, utilizando también la misma sonda y control positivo. Afortunadamente, en esta biblioteca se detectaron 10 posibles clones positivos (**Figura 3.3**), los cuales fueron sujetos a 3 rondas adicionales de "screening" hasta aislar 6 clones independientes positivos (**Tabla 3.1**). A continuación, se extrajo el ADN de los fagos positivos y, el inserto liberado con la enzima Not I, fue subclonado en el plásmido comercial pBluescript.



Figura 3.3: "Screening" de una biblioteca genómica construida en fagos. Se muestra un revelado de placa representativo, el cual pertenece al 4^{to} "screening" del clon positivo de la placa nº7. **Tabla 3.1: Resultados del "screening" de la biblioteca genómica.** Se muestran las placas y el resultado de cada ronda de "screening" para cada una de ellas. El signo + denota la presencia de una marca positiva en el relevado de la placa, mientras que el signo –, la ausencia de positivos.

Nº Placa	1 ^{er} "screening"	2 ^{do} "screening"	3 ^{ro} "screening"	4 ^{to} "screening"
	+	+	+	+
1	+	+	-	
		+	+	+
2	+	+	-	
L		+	-	
3	-			
4	-			
5	+	+	-	
0		+	-	
6	+	+	+	-
7	+	+	+	+
,	+	-		
8	-			
9	-			
10	-			
11	-			
12	-			
13	-			
14	+	+	-	
		+	+	+
		+	+	_
15	+	+	+	+
	+	+	+	-
		+	+	+
16	-			
17	-			
18	-			

Con el objeto de caracterizar cada uno de los clones positivos, se realizaron mapeos de restricción con diversas enzimas e hibridizaciones con sondas complementarias a regiones específicas de los exones. En ese momento, grupos internacionales completaron la secuenciación del genoma de ratón y, por ende, la secuencia del gen CRISP-1 fue finalmente publicada (http://www.informatics.jax.org, IDs: MGI: 102553). Esta secuencia, junto con los datos obtenidos por los mapeos de restricción e hibridizaciones, reveló el contenido de cada uno de clones, encontrándose que el clon nº32 (proveniente de la placa 15) contenía las regiones génicas de interés que se requerían para la construcción del vector de recombinación. Por otro lado, el análisis de la secuencia completa del gen identificó una discrepancia entre esta información y la previamente reportada por Schwidetzky et al. (1997) con respecto a la longitud del intrón A. La última secuenciación arrojó un tamaño de 6,1 kb mientras que el trabajo del año 1997 había descripto un tamaño de 2,8 kb. Este dato era de suma importancia para nuestro estudio ya que parte de este intrón sería el brazo 5' de homología. Por esta razón, mediante mapeos de restricción y secuenciación, se determinó la longitud de este intrón en la cepa de nuestro estudio 129/SvEv, coincidiendo con el tamaño descripto en el proyecto genoma de ratón (comparar Esquema 3.1 con Figura 3.4).

- Construcción del vector final

Tal como se adelantara previamente, dado que se eligió delecionar al exón 2 del gen, los brazos de homología debían incluir regiones adyacentes a ese exón. Teniendo en cuenta que el clon nº32 abarca desde la mitad del intrón A hasta casi el final del intrón E (ver Esquema 3.1), se lo utilizó como base del vector de recombinación. Sin embargo, la obtención de los brazos 5' y 3' de homología no fue una tarea sencilla, debiéndose probar diferentes estrategias ya sea por PCR o utilizando diferentes enzimas de restricción y de ligación, para lograr finalmente clonar dichos fragmentos en el vector pUCtkneo (cedido por el Dr. E. Mitch Eddy, NIEHS-NIH, Research Triangle Park, NC, EEUU). Brevemente el procedimiento exitoso consistió en:

 El brazo de homología 5' (1,4 kb) fue obtenido por digestiones enzimáticas a partir del clon nº32 aislado de la biblioteca de fagos, y clonado en el vector pUCtkneo. 2- El brazo de homología 3' (4,7 kb) fue obtenido en dos pasos de subclonados en vectores intermedios. Finalmente, el fragmento completo fue ligado al vector pUCtkneo que ya contenía al brazo de homología 5'.

Por lo tanto, la construcción final posee el gen de la timidina kinasa (TK) del virus Herpes simple (selección negativa), el brazo 5' de homología conteniendo una región del intrón A del gen *CRISP-1*, el gen de resistencia a neomicina (selección positiva), y el brazo 3' de homología que abarca desde el intrón B hasta el intrón D del gen *CRISP-1* (Figura 3.4). El fin de esta construcción es que una vez ocurrida la recombinación homóloga, el gen "neo" se intercambiará por una región de 2 kb que incluye al exón 2 interfiriendo así con la traducción normal del gen en estudio.



Figura 3.4: Esquema del alelo salvaje, mutado y vector de recombinación homóloga.

Se muestra el alelo salvaje para el gen CRISP-1, el vector de recombinación, y el alelo mutado luego de la recombinación. En ellos se indican los exones como rectángulos verticales, con sus correspondientes números, el sitio de inicio de la traducción (ATG), y los genes de selección timidina quinasa (tk) y de resistencia a neomicina ("neo"). Barra = 0,5 kb.

1.2. Recombinación homóloga en células embrionarias totipotenciales

Una vez obtenida la construcción, la misma fue utilizada para la electroporación de células ES. Para ello, iniciamos una colaboración con el Dr. E. Mitch Eddy (NIEHS-NIH,

Research Triangle Park, NC, EEUU), quien ha utilizado esta metodología desde hace 10 años para el estudio de diversos genes asociados a la fertilidad. En este sentido cabe mencionar que debido a sus conocimientos y experiencia en el tema, el Dr Eddy ha colaborado con numerosos grupos de investigación para la generación de animales ko dentro del área de reproducción. Luego de la electroporación, las células ES de ratón 129SvEv fueron plaqueadas en presencia de G418 y ganciclovir, recuperándose el ADN de 288 clones que sobrevivieron a la selección.

- Determinación de clones positivos

La ocurrencia de la recombinación homóloga entre el vector y el gen *CRISP-1* y, por ende, la interrupción del gen, fue evaluada en nuestro laboratorio mediante las técnicas de PCR y Southern Blot.

En primer lugar, se analizó el extremo 5' de la recombinación, para lo cual se llevó a cabo una PCR alelo-específica sobre el ADN de todas las colonias resistentes incluyendo sólo un set de "primers". Uno de los "primers" es complementario al brazo 5' de homología, mientras que el otro aparea únicamente con el alelo mutado. En este caso, la banda esperada en las células en donde había ocurrido la recombinación, era de 1,75 kb (Figura 3.5A). De este modo, se obtuvieron 7 clones independientes y positivos para la mutación (Figura 3.5B). Luego de haber descartado un gran número de clones, se analizaron los 7 clones positivos mediante Southern Blot. Para ello, se digirió al ADN con las enzimas de restricción Hinc II ó Pvu II y se utilizó un fragmento de 1,2 kb complementario a una región del intrón A, como sonda de la hibridización. Así se obtendría una banda de 5,3 kb con Hinc II y 14,3 con Pvu II para el alelo salvaje, y de 7,1 kb y 6,3 kb, respectivamente, para el alelo mutado (Figura 3.5A). Debido a que la sonda que se utilizó era externa a la región de homología, este segundo análisis permitió descartar los clones que se hubieran insertado al azar en el genoma y no específicamente en el gen CRISP-1. Los resultados indicaron que la recombinación había sido correcta en el extremo 5' en 4 de los 7 clones identificados por la PCR (J25, L44, M22 y N43) (Figura 3.5C).



Figura 3.5: Identificación de clones positivos para el extremo 5' de la recombinación.

A) Esquema de los alelos salvaje y mutado mostrando el fragmento que será amplificado con un "primer" específico del neo que no aparea en el alelo salvaje. También se indican la posición de los sitios de cortes de las enzimas de restricción y de las sondas utilizadas en el Southern Blot, y los fragmentos que serán revelados para cada alelo mediante dicha metodología. H: Hinc II, P: Pvu II. Barra = 0,5 kb. B) El ADN de los clones resistentes fue sometido a una amplificación utilizando los "primers" antes descriptos y luego analizado por electroforesis. En el control (C), no se incluyó ADN. A la derecha, se muestran los marcadores de tamaño en kb. C) El ADN de los clones positivos para la PCR anterior fue digerido con la enzima de restricción Hinc II (izquierda) ó Pvu II (derecha) y luego sometido a Southern Blot utilizando una sonda complementaria al intrón A. A la derecha, se muestran los marcadores de tamaño en kb.

Respecto a la recombinación en el extremo 3', la misma fue verificada mediante Southern Blot sobre el ADN de los clones que fueron positivos en el extremo 5'. Para ello, se digirió al ADN utilizando 2 enzimas diferentes (Pvu II y Sca I) empleando como sonda un fragmento de 400 pb amplificado por PCR, complementario a una parte del exón 3 y del intrón C (sonda interna a la región de homología). De esta forma, el alelo salvaje generaría una banda de 14,3 kb con Pvu II y 6,6 kb con Sca I, mientras que el alelo mutado la haría de 6,4 kb y 8,5 kb, respectivamente (Figura 3.6A). Los resultados indicaron que los mismos 4 clones que mostraron una correcta recombinación en el extremo 5' (J25, L44, M22 y N43), fueron positivos para el "screening" 3' (Figura 3.6B). En resumen, 4 clones sobre un total de 288 (eficiencia = 1,4%) resultaron positivos mediante las técnicas utilizadas.



Figura 3.6: Identificación de clones positivos en el extremo 3'.

A) Esquema de los alelos salvaje y mutado en donde se indican la posición de los sitios de cortes de las enzimas de restricción y de la sonda utilizadas en el Southern Blot, y los fragmentos que serán revelados para cada alelo mediante dicha metodología. P: Pvu II, S: Sca I. Barra = 0,5 kb. B) El ADN de los clones positivos para la PCR anterior fue digerido con la enzima de restricción Pvu II (derecha) ó Sca I (izquierda) y luego sometido a Southern Blot utilizando una sonda complementaria al exón 3 e intrón C. En el control (C) no se incluyó ADN. A la derecha, se muestran los marcadores de tamaño en kb.

1.3. Microinyección en blastocitos y obtención de quimeras

En el laboratorio del Dr. Eddy se microinyectaron los 4 clones positivos en un total de 428 blastocistos de ratón C57BL/6, los cuales fueron transferidos al útero de hembras pseudopreñadas C57BL/6. Como resultado nacieron 39 quimeras de ambos sexos y con diferentes grados de quimerismo (**Tabla 3.2**). Cabe aclarar que los animales quimera se distinguen de los restantes por la presencia de dos colores diferentes (agouti y negro) en su pelaje (**Figura 3.7**).

línea	cant. blastocistos	crías	quimeras	sexo* y % quimerismo ^{&}
J25	44	8	4	3M >90%, 1M 30-60%
	34	3	2	1M 1H >90%,
L44	48	6	3	3M>90%
	64	3	3	3M>90%
M22	46	24	14	9M 5H <30%
	36	12	8	4M <30%, 3M 60-90%,
				1H < 30%
	42	8	4	1M >90%, 3M <30%
N43	38	5	0	
	45	2	1	1M <30%
	31	5	0	

Tabla 3.2. Resultados de la microinyección de blastocistos.

* M = macho, H = hembra.

 $^{\&}$ el % de quimerismo se evalúa de forma subjetiva sobre el pelaje del animal, agrupándolo en <30%, entre 30-60%, entre 60-90%, ó.>90%.



Figura 3.7: Quimera. Fotografía de un ratón quimera. Nótese los distintos colores del pelaje.

Las quimeras macho fueron puestas a aparear con hembras C57BL/6 y la progenie fue analizada en cuanto al genotipo para el gen *CRISP-1* (ver más adelante, **Figura 3.10**). Dos machos provenientes de 2 clones celulares independientes (L44 y J25) transmitieron la mutación a su descendencia. Por otro lado, estas 2 quimeras produjeron alrededor de un 60% de animales portadores y una proporción normal de crías macho y hembra.

- Obtención de animales carentes de CRISP-1

Los animales heterocigotas (CRISP-1^{+/-}) provenientes de las dos líneas celulares fueron enviados al bioterio de nuestro instituto (IByME). Dichos animales crecieron normalmente y sin ninguna anomalía evidente. Con el fin de obtener animales homocigotas para la mutación (CRISP-1^{-/-}), se pusieron en apareo parejas de heterocigotas manteniendo separados los animales según el origen clonal. El análisis del genotipo de la cría indicó una distribución normal de individuos salvaje ó "wild type" (CRISP-1^{+/+}), heterocigotas y homocigotas para la mutación, según las leyes de herencia de Mendel (**Tabla 3.3**). Asimismo, estos datos indicaron que la mutación no produce ningún efecto letal a nivel embrionario.

Tabla 3.3. Análisis de la distribución de genotipos para el gen CRISP-1 en la progenie de la cruza CRISP-1^{+/-} x CRISP-1^{+/-}. Se indica la cantidad de animales y, entre paréntesis, el porcentaje de cada genotipo. A la derecha se muestra la distribución por sexo: H = hembra, M = macho. Cantidad total de animales analizados = 366.

	CRISP-1 ^{+/+}	CRISP-1 ^{+/-}	CRISP-1 ^{-/-}	Sexo (H / M)
línea J25	34 (18)	100 (54)	51 (27)	42% / 58%
línea L44	44 (24)	86 (48)	50 (28)	46% / 54%
total	78 (21)	186 (51)	101 (28)	44% / 56%

Los ratones CRISP-1^{-/-}, tanto machos como hembras, se desarrollaron normalmente, no encontrándose diferencias significativas en cuanto al peso de los mismos comparando con animales salvajes de la misma edad (**Figura 3.8**).



Figura 3.8: Determinación del peso corporal de los animales.

Ratones tanto hembras (A) como machos (B) fueron pesados al mes de su nacimiento. Los datos representan el promedio \pm SEM de por lo menos 4 experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos. wt: animales CRISP-1^{+/+}; het: animales CRISP-1^{+/-}; ko: animales CRISP-1^{-/-}.

- Análisis del genotipo de los animales

El genotipo de los animales fue determinado por la técnica de PCR. En dicha reacción se incluyeron un "primer" que aparea con los dos alelos, un "primer" que aparea con el alelo mutado, y uno complementario al alelo salvaje. De este modo, se obtuvo una banda de 894 pb para el alelo salvaje y otra de 611 pb para el alelo mutado en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, distinguiéndose así los animales de cada genotipo **(Figura 3.9)**.



Figura 3.9: Análisis del genotipo de los ratones.

El ADN extraído de biopsias de colas de los ratones fue sometido a amplificación utilizando 3 "primers". Uno de ellos complementario a una región homóloga entre el alelo salvaje y mutado, y los otros dos específicos de cada alelo. Las muestras amplificadas fueron analizadas en geles de agarosa. A la izquierda se muestran los marcadores de tamaño en kb.

- Verificación de la ausencia de CRISP-1

La confirmación de que la mutación en el gen *CRISP-1* impedía efectivamente la expresión de la proteína correspondiente, se analizó tanto a nivel de ARNm como de proteína. En primer lugar, se extrajo ARN de epidídimos de ratones de los tres genotipos, cuya integridad fue evaluada en geles de agarosa (Figura 3.10A). Posteriormente, se realizó RT-PCR utilizando el "primer" oligo dT para la RT y diferentes combinaciones de "primers" para la PCR: un set que aparea en los exones 1 y 8 (860 pb) (a); 2 y 8 (780 pb) (b); y 4 y 8 (620 pb) (c). Como control del molde de la PCR, se llevó a cabo una
amplificación sobre el ADNc de cada genotipo incluyendo "primers" para el gen de actina. Como se muestra en la **Figura 3.10B**, se observó la banda de 290 pb correspondiente a actina en los tres genotipos, mientras que para la amplificación del gen *CRISP-1* se obtuvieron diferentes resultados para cada set de "primers" y genotipo. En todos los casos, los animales CRISP-1^{+/+} mostraron las bandas esperadas. Sin embargo, los ratones CRISP-1^{-/-} produjeron una banda de menor tamaño que la observada en los animales salvajes, al emplear el set de "primers" (a), probablemente debido a la falta del exón 2. Como era de esperar, no se observó ninguna banda para el set (b) en los animales ko. Para el tercer set de "primers", se amplificó a partir del ARNm de los ratones ko una banda de igual tamaño que en los ratones salvajes, debido a que el "primer forward" aparea después del sitio eliminado.





(A) El ARN fue extraído de ratones de los tres genotipos y analizados en geles de agarosa. (B) El ARN fue utilizado como molde en una RT-PCR utilizando diferentes combinaciones de "primers" en la amplificación, y luego separado por electroforesis. Las letras en la parte inferior del gel indican el set de "primer" empleado. A ambos lados del gel se muestran los marcadores de tamaño en kb.

Para analizar la expresión de la proteína, se realizaron extractos proteicos de epididímos de ratones de los tres genotipos, los cuales fueron luego sometidos a separación electroforética e inmunodetección utilizando anti-DE y anti-tubulina como control. Tanto en las muestras de epidídimos de los animales salvajes como en las de los heterocigotas, se

observaron las bandas de tamaños esperados para las proteínas CRISP-1 y tubulina, mientras que en las de los animales CRISP-1^{-/-} únicamente se detectó la banda de tubulina (**Figura 3.11**). La posible expresión de fragmentos menores de CRISP-1 se investigó utilizando geles de poliacrilamida de mayor concentración. Bajo estas condiciones, tampoco se detectó ninguna bandas que pudieran corresponder a CRISP-1





Teniendo en cuenta resultados previos revelando que una proteína originalmente identificada como específica de epidídimo presentaba cierta expresión a nivel testicular (Gaudreault et al., 1999), también se analizó la posible presencia de CRISP-1 en extractos testiculares. Los resultados indicaron la ausencia de bandas correspondientes a CRISP-1 en las muestras de los tres genotipos (datos no mostrados).

Trabajos recientes en animales ko para proteínas espermáticas detectaron modificaciones en los niveles de expresión de otras proteínas pertenecientes a la misma familia que la proteína eliminada (Drabent et al., 2000; Stein et al., 2005; Kim et al., 2006a). En base a estas observaciones, se evaluó la expresión del homólogo testicular Tpx-1/CRISP-2, el cual participa en el proceso de fusión a través de su interacción con los

mismos sitios a los que se une CRISP-1 en el ovocito (Busso et al., 2005; Busso et al., 2007). El ensayo de Western Blot utilizando un anticuerpo específico contra CRISP-2 (anti-AA1) detectó una banda del tamaño esperado para dicha proteína en las muestras provenientes de animales de los tres genotipos. La cuantificación de las bandas observadas indicó que la expresión de esta proteína no se modificada por la ausencia de CRISP-1 (Figura 3.12).



Figura 3.12: Determinación del nivel de expresión de la proteína CRISP-2.

Las proteínas fueron extraídas de testículos de ratones de los tres genotipos y sometidas a Western Blot utilizando anti-AA1 (panel izquierda) ó anti-tubulina (panel derecha) como primer anticuerpo. A la izquierda del gel se muestran los marcadores de peso molecular en kDa. La cuantificación de las bandas observadas se muestra en el histograma. Los datos representan el promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos.

En conjunto, los resultados correspondientes a la primera parte de este objetivo muestran la falta de expresión de CRISP-1 en los epidídimos de los animales ko, indicando que la estrategia de eliminación del gen *CRISP-1* murino fue exitosa.

2. Evaluación de la ausencia de CRISP-1 sobre la fertilidad de los animales y sobre diversos parámetros funcionales del espermatozoide

2.1. Evaluación de la fertilidad de los animales

Con el fin de evaluar el efecto de la falta de CRISP-1 sobre la fertilidad de los animales, se establecieron apareos entre machos de los tres genotipos con hembras CRISP- $1^{+/+}$ y/ó CRISP- $1^{+/-}$. El esquema consistió en colocar un macho con dos hembras (al menos una de fertilidad comprobada) en la misma jaula durante dos semanas registrando la presencia de tapón vaginal cada mañana. Al cabo de ese período, las hembras fueron separadas y observadas periódicamente en cuanto a signos de preñez ó parición. Este esquema se repitió 4 veces analizando un total de entre 6 y 8 hembras por macho.

Los resultados mostraron que los machos carentes de la proteína en estudio, presentaban un comportamiento sexual normal en comparación con los machos control, a juzgar por la presencia de tapón vaginal en las hembras apareadas al cabo del mismo período de apareo. Asimismo, no se registraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al promedio de crías por camada entre los animales con distinto genotipo (**Tabla 3.4**). El peso promedio de la camada y tiempo desde el inicio del apareo hasta la parición tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos (**Tabla 3.4**).

	CRISP-1 ^{+/+}	CRISP-1 ^{+/-}	CRISP-1 ^{-/-}
crías/camada*	7,3 ± 0,3 (6)	6,3 ± 0,5 (7)	6,5 ± 0,4 (12)
peso/camada* (gr)	14,1 ± 1 (7)	15,5 ± 0,4 (19)	14,8 ± 0,4 (22)
días hasta parición*	27,4 ± 3 (6)	31,7 ± 3 (5)	28,5 ± 2 (11)

Tabla 3.4. Análisis de la fertilidad de los animales. Los datos representan el promedio ± SEM de los animales estudiados, cuyo número se indica entre paréntisis.

* no se encontraron diferencias significativas entre los genotipos.

2.2. Histología de los órganos reproductivos

Con el fin de analizar si la falta de CRISP-1 producía algún efecto a nivel de los órganos reproductivos, se llevó a cabo el análisis histológico de los testículos y epidídimos provenientes de ratones salvajes y ko. Dicho estudio fue gentilmente realizado por la Dra. Livia Lustig (FCM, UBA). Los resultados obtenidos indicaron la ausencia de diferencias en los tejidos provenientes de ambos grupos de animales, observándose túbulos seminíferos y epididimarios con un diámetro normal y abundantes células espermatogénicas y/o espermatozoides en el lumen (Figura 3.13).

2.3. Evaluación de parámetros funcionales de los espermatozoides

Habiendo analizado la fertilidad de los animales, el próximo paso consistió en la evaluación de diferentes parámetros espermáticos de los animales que no presentaban expresión de CRISP-1 (ko), respecto a aquellos en los que se detectó expresión de la proteína ("wild type"/heterocigotas) y a los que nos referiremos de aquí en adelante como animales control (C). El fin de estos experimentos fue detectar la existencia de alguna falla en el funcionamiento de los espermatozoides de los ratones ko que pudiera haber sido compensada en el sistema *in vivo*, resultando finalmente en una fertilidad no modificada.

- Morfología y Motilidad

La morfología de los espermatozoides epididimarios fue estudiada bajo microscopio óptico, no encontrándose diferencias entre los tres grupos analizados. Por su parte, la motilidad de los espermatozoides fue analizada tanto inmediatamente luego de su recuperación del epidídimo, como al cabo de un período de capacitación *in vitro*. Tal como se resume en la **Tabla 3.5** los porcentajes de motilidad hallados en cada grupo no fueron significativamente diferentes entre sí.



Figura 3.13: Histología de los órganos reproductivos.

Cortes de testículo y epidídimo de ratones wt y ko fueron analizados bajo microscopio óptico a 10 x (a, b, e y f) y 20x (c, d, g y h). Barra = 10 μ m.

 Tabla 3.5. Determinación de la motilidad de los espermatozoides. Los datos representan el promedio ± SEM de los animales estudiados cuyo número se indica entre paréntesis.

	animales control	animales ko
frescos	63,2 ± 3,8 (5)	66,7 ± 4,3 (6)
capacitados*	58,9 ± 3,3 (5)	63,8 ± 4,2 (6)

* no se encontraron diferencias significativas entre genotipos.

- Reacción acrosomal

A continuación, se evaluó la capacidad de los espermatozoides de sufrir la RA espontánea durante el proceso de capacitación. Para ello, espermatozoides epididimarios fueron incubados bajo condiciones capacitantes, recuperándose alícuotas de los mismos a diversos tiempos durante la incubación. Dichas células fueron teñidas con Coomassie Blue y luego contabilizadas en cuanto a la presencia o ausencia del acrosoma teñido de azul. Los resultados mostrados en la **Figura 3.14** indican que tanto los espermatozoides de animales ko como de los controles presentan un incremento en el porcentaje de células reaccionadas a medida que transcurre la capacitación, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos grupos a ningún tiempo estudiado.



Figura 3.14: Evaluación de la ocurrencia de la RA en los espermatozoides.

Espermatozoides epididimarios fueron incubados bajo condiciones capacitantes recuperándose alícuotas cada 30 min. Las células fueron fijadas y teñidas con Coomassie Blue evaluándose el % de aquellas que no presentaban el acrosoma. Los datos representan el promedio \pm SEM de 5 experimentos independientes. □: animales control; : animales ko

- Capacidad fertilizante

Con el objetivo de estudiar la capacidad fertilizante de los espermatozoides de animales sin CRISP-1, se llevaron a cabo, en paralelo, tres esquemas diferentes de fertilización *in vitro* que se describen a continuación:

a) Fertilización de ovocitos con cúmulus

En este caso, se utilizó un sistema completo en donde los ovocitos directamente recuperados de la ampulla de hembras superovuladas fueron inseminados con espermatozoides capacitados. De este modo, los ovocitos se encontraban rodeados tanto de células del cúmulus y su matriz extracelular, como de ZP al momento de la inseminación. Al cabo de 3 hs de coincubación en medio de fertilización y bajo condiciones apropiadas, los ovocitos fueron recuperados y lavados en medio fresco para remover los espermatozoides que estuvieran débilmente unidos. Posteriormente, los ovocitos fueron fijados, teñidos con el colorante Hoechst 33342 de unión al ADN, y observados al microscopio, registrándose el número de aquellos que presentaban al menos un núcleo espermático descondensado en su citoplasma. Los resultados de estos experimentos se muestran en la **Figura 3.15** e indican que, bajo estas condiciones, los espermatozoides provenientes de animales carentes de CRISP-1 poseen la misma capacidad de fertilizar a los ovocitos que los espermatozoides de animales control.

b) Fertilización de ovocitos con ZP y sin cúmulus

En un segundo esquema, se utilizaron ovocitos desprovistos de las células del cúmulus y su matriz extracelular, con el fin de examinar el posible efecto de la ausencia de CRISP-1 sobre la etapa de interacción espermatozoide-ZP. Los ovocitos rodeados sólo de su ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados y, al cabo de 3 hs, fueron recuperados, teñidos con Hoechst como se describiera anteriormente, y observados al microscopio. Bajo estas condiciones, tampoco se observaron diferencias en el porcentaje de ovocitos fertilizados entre los grupos estudiados (**Figura 3.16**).



Figura 3.15: Evaluación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides en un sistema completo.

Espermatozoides epididimarios de los ratones fueron capacitados por 120 min y luego utilizados para inseminar complejos cumulos-ovocitos (CCO). Al cabo de 3 hs de coincubación, los CCO fueron teñidos con Hoescht 33342 determinándose el % de ovocitos fertilizados. Los datos representan el promedio \pm SEM de 8 experimentos independientes. c vs ko: NS.



Figura 3.16: Evaluación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides con ovocitos con ZP.

Espermatozoides epididimarios fueron capacitados por 120 min y luego utilizados para inseminar ovocitos con ZP. Al cabo de 3 hs de coincubación, los ovocitos fueron teñidos con Hoescht 33342 determinándose el % de ovocitos fertilizados. Los datos representan el promedio \pm SEM de 8 experimentos independientes. c vs ko: NS.

c) Fertilización de ovocitos sin ZP

Como se mencionara a lo largo de este trabajo, los estudios *in vitro* de nuestro laboratorio apoyan la participación de CRISP-1 en la etapa de fusión de gametas. Por este motivo, finalmente, se estudió si la falta de la proteína CRISP-1 afectaba la capacidad fusogénica de los espermatozoides. Para ello, ovocitos desprovistos tanto de células de cúmulus como de ZP, fueron inseminados con espermatozoides capacitados. Luego de 1 h de coincubación, los ovocitos fueron lavados, teñidos con Hoechst y observados al microscopio. En este caso, los espermatozoides provenientes de ratones ko mostraron una reducción significativa en su capacidad de fusionarse con los ovocitos respecto a los espermatozoides control, apoyando nuestros resultados previos obtenidos *in vitro* (Figura 3.17).





independientes. c vs ko, p<0,0001.

Como otra aproximación al estudio de la capacidad fusogénica de los espermatozoides de animales ko, se llevaron a cabo ensayos de competencia *in vitro* en los

cuales los ovocitos sin zona fueron inseminados al mismo tiempo con concentraciones iguales de espermatozoides de animales control y ko. Para distinguir las diferentes poblaciones espermáticas, una de las mismas fue previamente marcada con un colorante fluorescente que se detecta al momento de la evaluación de la fusión. Los resultados indicaron que, en presencia de espermatozoides de animales control, los espermatozoides de animales ko exhibieron una capacidad de fusionarse con los ovocitos significativamente menor que la descripta previamente (Figura 3.18) indicando que en una situación de competencia, los espermatozoides de animales ko poseen una clara desventaja frente a los espermatozoides control. Cabe aclarar que los resultados obtenidos fueron iguales independientemente de la población espermática que estuviera marcada.



Figura 3.19: Evaluación de la capacidad fusogénica de los espermatozoides en ensayos de competencia.

Espermatozoides epididimarios provenientes de anímales controles y ko fueron capacitados por 90 min, marcados con Mito Tracker (una de las dos poblaciones) y luego utilizados para inseminar ovocitos sin ZP en forma individual (a) o en forma conjunta (b). Al cabo de 1 h de coincubación, los ovocitos fueron teñidos con Hoescht 33342, determinándose el % de ovocitos fertilizados por espermatozoides marcados o control. Los datos representan el promedio \pm SEM de 7 experimentos independientes. a vs b, p<0,05; a vs c, p<0,0001; b vs c, p<0,05.

En conclusión, en el presente trabajo hemos logrado generar con éxito una línea de ratones knock out para la proteína CRISP-1. La caracterización de estos animales indicó que si bien la proteína no sería esencial para la fertilidad de los machos, sería requerida para la etapa de fusión de gametas durante el proceso de fertilización.

DISCUSION

El presente trabajo describe la generación de una línea murina carente en la proteína CRISP-1, homóloga a la proteína DE de rata (82%), ambas implicadas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito (Rochwerger et al., 1992; Cohen et al., 2000a). Según nuestro conocimiento, este es el primer animal ko generado para una proteína identificada en el país. Asimismo, y dado la gran cantidad de miembros que posee la familia CRISP, el presente trabajo representa una contribución importante al estudio de estas proteínas y sus funciones biológicas, ya que constituye también la primera línea de animales ko producido para una proteína de este familia.

La metodología empleada para modificar el gen *CRISP-1* de ratón se basó en la recombinación homóloga en células ES. Desde sus inicios, 15 años atrás, esta técnica ha revolucionado el campo de la genética murina permitiendo el análisis de diversos aspectos de la función génica en el contexto del animal completo. A pesar de que esta tecnología ha sido mejorada a lo largo de los años, la recombinación homóloga en células ES es aún muy ineficiente, requiriendo mucho esfuerzo y tiempo para lograr obtener la línea de ratones modificados. Esto se ve reflejado en la literatura dado que sólo el 10% de los 30.000 genes murinos ha sido analizado mediante este abordaje (Coumoul & Deng, 2006).

En los últimos cinco años, varios laboratorios han desarrollado la tecnología de "knock down" mediante ARN interferencia (ARNi), como una opción alternativa al clásico "knock out". La ventaja más importante de esta segunda metodología es la rapidez con la cual se alcanza el objetivo. Sin embargo, la dificultad del ARNi reside en lograr un método eficiente que incorpore al ARN en la célula deseada. Recientemente, Fox y colaboradores (2006) describieron la electrotransferencia de construcciones dominantes negativas a las células del segmento inicial del epidídimo. Sin embargo, la aplicación de esta técnica a nuestro sistema presenta el inconveniente de que el silenciamiento de *CRISP-1* en las células epididimarias debería durar lo suficiente como para lograr una oleada de espermatozoides sin la proteína. Otra opción para nuestro caso sería generar animales transgénicos portadores del ARNi tal como se describió recientemente para la fosfolipasa $C\zeta$ espermática (Knott et al., 2005), metodología que conlleva la desventaja de las

consecuencias de la inserción al azar del transgen en el genoma (Kioussis & Festenstein, 1997). Asimismo, se debe tener en cuenta que el silenciamiento de genes por ARNi no es total, habiendo alrededor de un 10% de expresión del gen endógeno (Coumoul & Deng, 2006). Por lo tanto, hasta el momento, y para nuestro modelo de estudio, la estrategia elegida para estudiar la función biológica de CRISP-1 *in vivo* continúa siendo la más apropiada.

La caracterización del gen CRISP-1 murino había sido reportada previamente por el grupo de investigación de los Laboratorios Schering (Schwidetzky et al., 1997). La misma reveló que el gen está organizado en 8 exones cuyos tamaños varían entre 55 y 750 pb, y 7 intrones entre 1 y 4 kb. Posteriormente, la secuenciación completa del genoma de ratón evidenció una diferencia en cuanto a la longitud del intrón A, siendo de 6 kb en vez de 2,8 arrojando un tamaño génico total de 25 kb (http://www.informatics.jax.org, IDs: MGI: 102553). El gen está localizado en el cromosoma 17, muy cerca de otros miembros de la familia CRISP, como CRISP-2 y CRISP-3, con los cuales comparte además una estructura génica muy similar. El análisis de la secuencia de CRISP-1 mediante la base de datos del proyecto "Ensembl" indicó la existencia de un único transcripto de 1,4 kb (http://www.ensembl.org, ID: ENSMUSG0000025431). El estudio del promotor mostró sitios de unión al factor de transcripción PEA3 específico de epidídimo y cerebro como así también sitios funcionales respondedores a andrógenos (Schwidetzky et al., 1997). En concordancia con estos datos, la presencia de la proteína fue detectada en epidídimos de ratones desde los 22 días de edad, con un fuerte aumento en los niveles de expresión alrededor del día 40 (Haendler et al., 1997).

La construcción del vector de recombinación homóloga para llevar a cabo la modificación en el gen *CRISP-1* fue sumamente ardua. La obtención de los brazos de homología implicó mayor tiempo y esfuerzo del esperado. Por un lado, la discrepancia en el tamaño del intrón A retrasó el trabajo ya que la estrategia utilizada para la obtención del brazo 5' contemplaba un tamaño de intrón menor al real. Por otro lado, los intrones del gen representando el 93,6% del tamaño total del mismo, no fueron secuenciados hasta un año y medio después de comenzado el trabajo. Asimismo, los intrones contienen una importante cantidad de secuencias repetitivas especialmente el intrón A (<u>http://genome.ucsc.edu</u>,

chr17:39,757,235-39,782,674), las cuales complicaron el clonado de los fragmentos homólogos. Nuestro colaborador, el Dr Eddy, resaltó el esfuerzo y trabajo invertido en la construcción del vector dado la dificultad del clonado de este gen. En este sentido, es interesante mencionar que un grupo de investigadores australianos ha estado generando una línea de ratones modificados para el gen *CRISP-2*, teniendo tantas dificultades para el clonado de los brazos de homología como en nuestro caso. Hasta el momento, dicho laboratorio no ha logrado la generación de los animales ko para la proteína testicular.

La recombinación homóloga del vector generado en el genoma de células ES murinas ocurrió en un 1,4 % de los clones resistentes. El "screening" de las células fue exhaustivo con el fin de discriminar entre una integración al azar y una correcta recombinación homóloga. Para ello, se analizaron los clones tanto en los extremos 5′ como 3′ de los puntos de recombinación. La técnica de PCR empleada en un primer paso descartó un gran número de clones negativos, permitiendo luego analizar el resto de los mismos por Southern Blot, metodología que implica mayor tiempo y mayores recursos.

De los cuatro clones con una correcta recombinación microinyectados en blastocistos, únicamente dos produjeron quimeras con la mutación en la línea germinal. Los animales heterocigotas nacidos a partir de estas quimeras fueron los progenitores de las colonias establecidas para este estudio en nuestro instituto. Dado que contábamos con animales provenientes de dos quimeras, es decir de dos clones en los cuales la recombinación había ocurrido independientemente, se establecieron y mantuvieron las dos colonias separadas entre sí. Esta disposición suponía la ventaja de analizar el fenotipo de los animales de ambas colonias por separado y, en el caso de que los fenotipos fueran coincidentes, nos aseguraba que los mismos hubieran sido obtenidos por la falta de CRISP-1 y no por alguna otra mutación originada espontáneamente.

Los animales ko generados por la cruza entre heterocigotas fueron analizados mediante RT-PCR en cuanto a la presencia de transcriptos de *CRISP-1*, utilizando diferentes combinaciones de "primers" para la PCR. Los resultados obtenidos confirmaron la ausencia de ARNm para *CRISP-1* en los animales ko al utilizar el juego de "primers" 2 y 8. El empleo de los "primers" 1 y 8, por su parte, dio origen a una banda en los animales

ko, de tamaño menor a la de los animales control y similar al que se obtendría por ausencia del exón 2. Este resultado, junto a la ausencia de banda en el ko al emplear el juego de "primers" 2 y 8, indica que estos transcriptos no poseerían la secuencia proveniente del exón 2. Asimismo, el gen "neo" incluido entre los exones 1 y 3 sufriría "splicing" junto con los intrones adyacentes (A y B) dando origen así a la banda de menor tamaño con los "primers" 1 y 8 en los ratones CRISP-1^{-/-}.

Teniendo en cuenta estos resultados, era de suma importancia confirmar la ausencia de la proteína completa ó de formas truncadas de la misma, antes de analizar el fenotipo de los ratones. Para ello, se analizaron por Western Blot extractos proteicos de epidídimos provenientes de animales de los tres genotipos. El hecho de que la proteína se encontrara ausente en los epididimos de únicamente los ratones ko, validó la estrategia utilizada para la generación de estos animales. Más aún, el análisis de extractos testiculares de los tres genotipos permitió también descartar una eventual expresión de CRISP-1 a nivel testicular como se hubiera descripto para otras proteínas epididimarias (Gaudreault et al., 1999) confirmado de este modo, la total ausencia de CRISP-1 en los animales ko.

El análisis del fenotipo de los ratones carentes de CRISP-1 demostró que los mismos resultaron normales en cuanto a su viabilidad y crecimiento. Por otro lado, los machos exhibieron un comportamiento sexual y una capacidad reproductiva normales. El hecho de no haber hallado diferencias en la fertilidad de los ratones ko para CRISP-1 fue desalentador pero no sorprendente dado que muy pocos de estos modelos animales generan infertilidad. Más aún, hasta el momento, las proteínas del espermatozoide que resultaron esenciales para la fertilidad de un individuo fueron aquellas que se encuentran ensambladas dentro de la membrana plasmática de la gameta y cuya eliminación produce una desorganización en la estructura de la bicapa lipídica (Cho et al., 1998; Shamsadin et al., 1999; Nishimura et al., 2001; Nishimura et al., 2004). En este sentido, cabe mencionar que aún no se han descripto animales ko infértiles para proteínas epididimarias que se asocian a la superfície del espermatozoide.

El estudio histológico de los órganos reproductivos no mostró diferencias entre los animales ko y los controles ya que en ambos casos se pudieron observar túbulos

seminíferos y epididimarios de diámetros normales con presencia de células espermatogénicas y/ó espermatozoides en el lumen de los mismos. El análisis de diversos parámetros funcionales de los espermatozoides, tales como morfología, motilidad y capacidad de sufrir la RA, tampoco detectó diferencias entre los animales ko y control. Resulta interesante mencionar que durante el transcurso de la escritura de esta Tesis y, continuando con el análisis del fenotipo de los animales ko, se observó que los espermatozoides de estos animales presentan una clara disminución en el nivel de fosforilación de proteínas en tirosina durante la capacitación respecto a los controles. El mecanismo por el cual la ausencia de CRISP-1 podría afectar este parámentro está actualmente siendo investigado en nuestro laboratorio.

En relación a la capacidad fertilizante, se observó que los espermatozoides de los animales carentes de CRISP-1 fertilizaron *in vitro* un porcentaje de ovocitos similar al de los espermatozoides control cuando los ovocitos se encontraban rodeados de células de cúmulus y ZP o bien solo de ZP, confirmando que los espermatozoides habrían sufrido un completo proceso de capacitación y RA. Sin embargo, ensayos de fusión de gametas *in vitro* revelaron que los espermatozoides de los animales ko presentaban una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos sin ZP fertilizados. Esta diferencia se vio significativamente incrementada cuando los espermatozoides de animales ko fueron puestos en una situación de competencia con espermatozoides de animales control, evidenciándose así mas claramente la desventaja que tiene una población carente de CRISP-1 respecto a aquella que presenta la proteína. Esta misma observación fue descripta para animales ko para la proteína acrosina, los cuales a pesar de no mostrar diferencias en cuanto a su fertilidad, presentan espermatozoides con un claro retardo en su capacidad de fertilizar ovocitos *in vitro* (Adham et al., 1997).

En conjunto, nuestros resultados indican que, a pesar de no encontrarse diferencias en la fertilidad de los animales ko respecto a los controles, los espermatozoides carentes de la proteína CRISP-1 muestran una disminución significativa en su capacidad fusogénica, confirmando nuestras observaciones previas *in vitro* indicando que CRISP-1 participaría en el proceso de fusión de gametas (Rochwerger et al., 1992).

El hecho de que los espermatozoides de los animales ko exhiban *in vitro* una deficiencia funcional que *in vivo* no se evidencia ha sido también observado en otros ratones ko para proteínas espermáticas tales como PH-20 (Baba et al., 2002), galactosiltransferasa (Lu & Shur, 1997) y acrosina (Baba et al., 1994; Adham et al., 1997). En estos tres modelos murinos, si bien la fertilidad de los machos no estaba afectada, los espermatozoides mostraron fallas *in vitro* de acuerdo al rol descripto previamente para cada proteína (ver *Introducción*). Existen varias explicaciones no excluyentes que podrían justificar el efecto en el fenotipo sin afectar la fertilidad de los animales.

Estudios recientes mostraron que una mutación puede producir fenotipos marcadamente diferentes dependiendo del origen genético (Erickson, 1996). En este sentido, los animales generados por recombinación homóloga en células ES son híbridos entre las cepas 129/Sv (proveniente de las células ES) y C57BL/6. La población, en su conjunto, posee un 50% de su ADN proveniente de cada cepa. En la literatura, existen varios ejemplos de modelos animales portadores de una mutación que exhiben un fenotipo normal cuando su origen genético es mixto, pero presentan un defecto funcional cuando el ADN es homogéneo (Muller, 1999). Esto ocurre para CD81, tetraspanina esencial para la fertilidad de hembras C57BL/6 ó BALB/c pero dispensable en los ratones híbridos originales (Maecker & Levy, 1997; Rubinstein et al., 2006). Asimismo, se ha descripto para la proteína radixina de la corteza cerebral, que el mantenimiento a largo plazo de la población bajo un origen genético híbrido, puede suavizar el efecto de la mutación, restableciéndose el mismo cuando los ratones son retrocruzados hasta obtener un contenido génico homogéneo (Fukumoto et al., 2006).

Una posible explicación para esta variabilidad en los fenotipos surgió a partir de un modelo animal de fibrosis quística. Estos ratones deficientes en CFTR mostraban diferencias en cuanto a la severidad de la enfermedad y el grado de supervivencia según el origen genético. Posteriormente, se descubrió que otro factor génico presente en algunas cepas de ratones, podría compensar parcialmente la función de la proteína mutada (Rozmahel et al., 1996). Esto sugiere que para el caso anterior de CD81, podría existir un alelo específico de la cepa 129 que interactúe con la mutación en la tetraspanina, ocasionando así un fenotipo normal.

En base a estos resultados, no se descarta la posibilidad de que la falta de CRISP-1 provoque un efecto sobre la fertilidad de ratones con un origen genético puro. Para evaluar esta hipótesis, se prevé realizar las retrocruzas necesarias para alcanzar un alto grado de homogeneidad en la composición génica. Con un esquema de 12 cruzas con animales salvajes de la cepa elegida (129/Sv ó C57BL/6) se obtiene un 99,99% de homogeneidad.

El fenómeno de redundancia funcional es otro motivo posible por el cual el fenotipo producido por la falta de la proteína en estudio no se haga evidente. El ejemplo más fácil de comprender involucra a familias de proteínas cuyos miembros, estructuralmente similares, pueden compensar funcionalmente a la proteína faltante. En la familia de proteínas APP (amyloid precursor protein), la supresión de cualquiera de sus tres miembros casi no produce efecto alguno en los animales, mientras que la eliminación combinada de dos de ellos, causa letalidad postnatal (Muller, 1999). En este sentido, es interesante recordar que CRISP-1 de ratón y su homólogo DE en rata, pertenecen a la familia de proteínas CRISP con alta homología de secuencia entre sus miembros, pudiendo alguno de ellos neutralizar el efecto ocasionado por la deficiencia en CRISP-1.

Recientes resultados revelaron que, además de CRISP-1, CRISP-2 también participaría en la etapa de fusión espermatozoide-ovocito en humano (Busso et al., 2005) y en ratón (Busso et al., 2007). Estas observaciones, junto con el hecho de que las secuencias del Signature 2 de estas dos proteínas difieran solamente en 2 de los 12 aminoácidos requeridos para la unión al ovocito (capítulo 2 del presente trabajo) y compiten por los mismos sitios complementarios en el ovocito (Busso et al., 2007), apoyan la idea de que ambas proteínas participarían en fusión a través del mismo mecanismo molecular. De este modo CRISP-2, además de ser una proteína que actúe conjuntamente con CRISP-1 durante el proceso de fusión, podría reemplazarla cuando la misma se encuentre ausente. Una situación muy parecida a la de CRISP-1 y CRISP-2 ocurre para las tetraspaninas murinas CD151 y BAB22942, con 57% de identidad entre ellas (Wright et al., 2004). La región por la cual CD151 interactúa con su ligando, la integrina $\alpha 3\beta 1$, fue restringida a un motivo de 11 aminoácidos (Berditchevski et al., 2001) que difiere únicamente en 2 aminoácidos del motivo presente en BAB22942. Dado que los animales deficientes en CD151 no presentan

cambios groseros en el fenotipo, los autores postularon un posible efecto compensatorio en algunas de las funciones de CD151 por BAB22942 (Wright et al., 2004).

A diferencia de lo observado en otros modelos de animales ko, tales como ratones carentes de H1t (Histona específica de testículo), los cuales no muestran ningún cambio en su fenotipo comparado con animales salvajes excepto la sobreexpresión de otras histonas: H1.2, H1.2 y H1.4 (Drabent et al., 2000), los animales ko para CRISP-1 no presentaron aumento en el nivel de expresión de CRISP-2. Asimismo, en estos animales tampoco se detectó disminución en la expresión de CRISP-2, tal como se había observado para proteínas de la familia ADAM cuando algún miembro de dicha familia era eliminado (Stein et al., 2005; Kim et al., 2006a). Sin embargo, el hecho de que CRISP-2 esté expresada en los animales ko, mantiene en pie la posibilidad de que esta proteína compense la ausencia de CRISP-1.

Recientemente se ha identificado la proteína CRISP-4 en epidídimo rata y ratón (Jalkanen et al., 2005; Nolan et al., 2006). Si bien su función biológica aún no ha sido descripta, su origen epididimario la hace también una candidata probable para compensar funcionalmente a CRISP-1. El análisis de su secuencia arrojó datos muy interesantes indicando que esta proteína presenta una mayor homología de secuencia (70%) con CRISP-1 humana (Hayashi et al., 1996; Kratzschmar et al., 1996), que con CRISP-1 de rata ó ratón (40%), razón por la cual la llamada CRISP-1 humana debería considerarse el ortólogo humano de CRISP-4 (Nolan et al., 2006). Teniendo en cuenta la ya descripta participación de CRISP-1 humana en el proceso de fusión de gametas (Cohen et al., 2001), podemos inferir que muy probablemente las proteínas CRISP-4 también participen en el proceso de fusión en roedores, pudiendo compensar la falta de CRISP-1 en los animales ko descriptos en este trabajo.

La generación de animales ko para CRISP-2 y CRISP-4, y de dobles ko con CRISP-1, brindarán importante información sobre los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de fertilización. En este sentido, cabe mencionar que los dos laboratorios que se encuentran realizando los animales ko para CRISP-2 y CRISP-4 ya han acordado realizar una colaboración con nuestro grupo con el fin de obtener ratones dobles ko en el caso de que sus animales también resulten fértiles.

Más allá de la posible compensación de la ausencia de CRISP-1 por proteínas de la familia CRISP, existe la posibilidad de que la falta de dicha proteína sea compensada por otras proteínas con función biológica similar. En este sentido, hasta el momento sólo se ha descripto a la proteína testicular Izumo como molécula indispensable para la etapa de fusión de gametas (Inoue et al., 2005), resultando interesante evaluar en el futuro la expresión de dicha proteína en los ko para CRISP-1. Por otro lado, la observación de que los sistemas biológicos son degenerados, por lo cual elementos estructuralmente diferentes pueden cumplir la misma u otra función dependiendo del entorno biológico (Edelman & Gally, 2001), abre la posibilidad de que otras proteínas que, *a priori*, no tendrían ninguna relación con la proteína eliminada, compensen la falta de dicha proteína. Dado que en la literatura existen varios ejemplos de animales ko con deficiencias a nivel reproductivo en los cuales hay disminución o aumento de la expresión de otras proteínas no relacionadas (Wassarman et al., 2001; Cooper et al., 2003), sería también interesante estudiar en los ratones ko para CRISP-1 modificaciones en el patrón de expresión de otras proteínas epididimarias.

A pesar de que los ratones deficientes en CRISP-1 son fértiles, no se descarta el potencial uso de esta proteína como método de regulación de la fertilidad de un individuo. En este caso, se bloquearía ó inhibiría la actividad de CRISP-1 en individuos adultos normales que presentan la proteína sobre sus espermatozoides. Esta posibilidad esta apoyada por los experimentos de inmunización de ratas adultas con DE/CRISP-1 en los cuales se observa una disminución significativa en la fertilidad de los animales a través de un efecto de los anticuerpos anti-CRISP-1 sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Cuasnicú et al., 1990; Perez Martinez et al., 1995; Ellerman et al., 1998). Esta inhibición de la actividad de una proteína en un individuo normal es claramente diferente a la situación que se presenta en animales genéticamente modificados desde su concepción, en los cuales, como se describiera anteriormente, existirían diversos mecanismos de adaptación o ajuste por los cuales otras proteínas podrían cumplir la función de la proteína eliminada.

En conclusión, los resultados de este capítulo indican que ratones carentes de la proteína epididimaria CRISP-1 son fértiles a pesar de mostrar una menor capacidad fusogéncia *in vitro*. Sin embargo, la gran cantidad de evidencia previa obtenida *in vitro* a favor de un rol para esta proteína en el proceso de fusión, sugiere que la misma podría estar siendo reemplazada funcionalmente en el modelo experimental del ratón "knock out". En este sentido, es lógico pensar que para un proceso tan importante para la especie, como lo es la fertilización, existan varios mecanismos moleculares alternativos que aseguren el éxito de la misma. Una opción podría ser la síntesis de proteínas muy homólogas cuyas funciones sean intercambiables.

Los resultados de este capítulo forman parte del trabajo: "*Mice Deficient in the Cysteine-Rich Secretory Protein-1 (CRISP-1) Exhibit a Reduction in Sperm Fusion Ability in vitro*". **Da Ros V**, Maldera J, Willis W, Cohen D, Goulding E, Gelman D, Rubinstein M, Eddy EM & Cuasnicu P, manuscrito en preparación.

CONCLUSION

Conclusión

El presente trabajo ha tenido tres objetivos principales los cuales se centraron en ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la fertilización a través del estudio de la proteína epididimaria DE/CRISP-1. Para ello, se llevaron a cabo tanto estudios *in vitro* relacionados con el comportamiento de la proteína DE durante los procesos de capacitación (objetivo 1) y fusión de gametas (objetivo 2), como estudios *in vivo* en una línea de animales "knock out" para DE/CRISP-1 generados en el laboratorio (objetivo 3).

El primer objetivo consistió en investigar la influencia del bicarbonato, ión indispensable para la ocurrencia de la capacitación, sobre la migración de la proteína DE al SE que ocurre durante dicho proceso. Los resultados hallados indicaron que si bien la migración de DE seria un evento dependiente de bicarbonato, ocurriría a través de vías alternativas a la clásica cAMP/PKA, involucrada tanto en la fosforilación de proteínas en tirosina como en la expresión de la capacidad fusogénica del espermatozoide. Estos hallazgos, además de novedosos, brindan importante información sobre los mecanismos de capacitación del espermatozoide de rata, especie en la cual este proceso ha sido muy poco investigado.

El segundo capítulo de esta Tesis tuvo como objetivo la identificación del sitio activo por el cual la proteína DE interactúa con sus sitios complementarios en el ovocito. La delimitación de la actividad de DE a un sitio de solo 12 aminoácidos correspondiente al motivo denominado "Signature 2" de la familia CRISP provee importante información sobre el mecanismo molecular involucrado en la participación de las proteínas CRISP-1 en el proceso de fusión. Este hallazgo describe por primera vez la función biológica del motivo de la familia CRISP abriendo la posibilidad de que otros miembros de la familia ejerzan sus funciones a través de esta región de la molécula.

Finalmente, el tercer objetivo de este trabajo involucró el análisis de la funcionalidad *in vivo* de la proteína CRISP-1 en un modelo de ratones genéticamente modificados. Este capítulo representa la parte más importante de esta Tesis, no sólo a nivel de trabajo experimental, sino en relación a la relevancia de estos estudios para el campo de la reproducción. Los resultados indicando que a pesar de no encontrarse efecto sobre la

fertilidad, la falta de CRISP-1 afecta la capacidad fusogénica de los espermatozoides, apoyan la existencia de mecanismos compensatorios destinados a asegurar el éxito de la fertilización.

En conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral contribuirán a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de fertilización como así también al desarrollo de nuevos y más seguros métodos de regulación de la fertilidad.

ABREVIATURAS

aa	aminoácido	
AC	adenilato ciclasa	
BSA	albúmina sérica bovina	
cAMP	AMP cíclico	
ССО	complejos cúmulos-ovocitos	
Cys	cisterna	
dbcAMP	dibutiril AMP cíclico	
DMSO	dimetilsulfóxido	
DO	densidad óptica	
eCG	gonadotrofina coriónica equina	
FITC	isocianato de fluoresceína	
GalT I	β1,4-galactosiltransferasa I	
hCG	gonadotrofina coriónica humana	
IFI	inmunofluorescencia indirecta	
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido	
ko	"knock out"	
MBP	maltose-binding protein	
NS	no significativo	
P4	progesterona	
pb	pares de base	
PFA	paraformaldehído	
РКА	proteína quinasa A	
РКС	proteína quinasa C	
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate	
РТК	quinasas en tirosina	
PTX	pentoxifilina	
RA	reacción acrosomal	
S2	Signature 2	
sAC	adenilato ciclasa soluble	
SE	segmento ecuatorial	
ТА	temperatura ambiente	
TE	Tris EDTA	

tmACadenilato ciclasa transmembranaZPzona pelúcida

REFERENCIAS

Referencias

- Adham, I M; Nayernia, K & Engel, W. (1997) "Spermatozoa Lacking Acrosin Protein Show Delayed Fertilization". Mol Reprod Dev, 46: 370-6.
- Aitken, R J; Harkiss, D; Knox, W; Paterson, M & Irvine, S. (1998) "On the Cellular Mechanisms by Which the Bicarbonate Ion Mediates the Extragenomic Action of Progesterone on Human Spermatozoa". Biol Reprod, 58: 186-96.
- Alfieri, J A; Martin, A D; Takeda, J; Kondoh, G; Myles, D G & Primakoff, P. (2003) "Infertility in Female Mice With an Oocyte-Specific Knockout Of GPI-Anchored Proteins". J Cell Sci, 116: 2149-55.
- Almeida, E A C; Huovila, A-P J; Sutherland, A E; Stephens, L E; Calarco, P G; Shaw, L M; Mercurio, A M; Sonnenberg, A; Primakoff, P; Myles, D G & White, J M. (1995) "Mouse Egg Integrin α6β1 Functions As a Sperm Receptor". Cell, 81: 1095-104.
- Arts, E G J M; Kuiken, J; Jager, S & Hoekstra, D. (1993) "Fusion of Artificial Membranes With Mammalian Spermatozoa- -Specific Involvement of the Equatorial Segment After Acrosome Reaction". Eur J Biochem, 217: 1001-9.
- Ashworth, P J; Harrison, R A; Miller, N G; Plummer, J M; Watson, P F. (1995) "Flow Cytometric Detection of Bicarbonate-Induced Changes in Lectin Binding in Boar and Ram Sperm Populations". Mol Reprod Dev, 40:164-76.
- Asojo, O A; Goud, G; Dhar, K; Loukas, A; Zhan, B; Deumic, V; Liu, S; Borgstahl, G E & Hotez, P J. (2005) "X-Ray Structure of Na-ASP-2, a Pathogenesis-Related-1 Protein From the Nematode Parasite, Necator Americanus, and a Vaccine Antigen for Human Hookworm Infection". J Mol Biol, 346: 801-14.
- Asquith, K L; Baleato, R M; McLaughlin, E A; Nixon, B; Aitken, R J. (2004) "Tyrosine Phosphorylation Activates Surface Chaperones Facilitating Sperm-zona Recognition". J Cell Sci, 117:3645-57.
- Austin, C R. (1952) "The "Capacitation" of the Mammalian Sperm". Nature, 170: 326.
- 10. Austin, C R. (1961) "The Mammalian Egg". Thomas, C C (eds); Sprimgfield III.

- Austin, C R. (1985) "Sperm Maturation in the Male and Female Genital Tracts". En: Metz, C B & Monroy, A (eds.), Biology of Fertilization. NY: Academic Press; vol 2 121-55.
- Baba, D; Kashiwabara, S; Honda, A; Yamagata, K; Wu, Q; Ikawa, M; Okabe, M & Baba, T. (2002) "Mouse Sperm Lacking Cell Surface Hyaluronidase PH-20 Can Pass Through the Layer of Cumulus Cells and Fertilize the Egg". J Biol Chem, 277: 30310-4.
- Baba, T; Azuma, S; Kashiwabara, S & Toyoda, Y. (1994) "Sperm From Mice Carrying a Targeted Mutation of the Acrosin Gene Can Penetrate the Oocyte Zona Pellucida and Effect Fertilization". J Biol Chem, 269: 31845-9.
- Baker, M A; Hetherington, L & Aitken, R J. (2006) "Identification of SRC As a Key PKA-Stimulated Tyrosine Kinase Involved in the Capacitation-Associated Hyperactivation of Murine Spermatozoa". J Cell Sci, 119: 3182-92.
- Baker, M A; Hetherington, L; Ecroyd, H; Roman, S D & Aitken, R J. (2004) "Analysis of the Mechanism by Which Calcium Negatively Regulates the Tyrosine Phosphorylation Cascade Associated With Sperm Capacitation". J Cell Sci, 117: 211-22.
- Baker, M A; Lewis, B; Hetherington, L & Aitken, R J. (2003) "Development of the Signalling Pathways Associated With Sperm Capacitation During Epididymal Maturation". Mol Reprod Dev, 64: 446-57.
- Baker, T S. (1982) "Oogenesis and Ovulation". En: Austin, C R & Short, R V (eds.), Reproduction in Mammals. Cambridge: Cambridge University Press; 17-45.
- Baumber, J & Meyers, S A. (2006) "Changes in Membrane Lipid Order With Capacitation in Rhesus Macaque (Macaca Mulatta) Spermatozoa". J Androl, 27: 578-87.
- Bedford, J M. (1979) "Evolution of the Sperm Maturation and Sperm Storage Functions of the Epididymis". En: Fawcett, D W & Bedford, J M (eds.), The Spermatozoon. Baltimore: Urban and Schwarzenberg; 7-21.
- Bedford, J M. (2004) "Enigmas of Mammalian Gamete Form and Function". Biol Rev Camb Philos Soc, 79: 429-60.

- Bedford, J M & Cooper, G W. (1978) "Membrane Fusion Events in Fertilization of Vertebrate Eggs". En: Poste,G & Nicolson, G L (eds.), Membrane surface reviews (Membrane fusion). Amsterdam: North-Holland; vol 5 65-125.
- Bedford, J M & Kim, H H. (1993) "Cumulus Oophorus As a Sperm Sequestering Device, in Vivo". J Exp Zool, 265: 321-8.
- Berditchevski, F; Gilbert, E; Griffiths, M R; Fitter, S; Ashman, L & Jenner, S J. (2001) "Analysis of the CD151-α3β1 Integrin and CD151-Tetraspanin Interactions by Mutagenesis". J Biol Chem, 276: 41165-74.
- Bhattacharyya, A & Yanagimachi, R. (1988) "Synthetic Organic Buffers Can Support Fertilization of Guinea Pig Eggs, but Not As Efficiently As Bicarbonate Buffer". Gam Res, 19: 123-9.
- 25. Bi, M; Hickox, J R; Winfrey, V P; Olson, G E & Hardy, D M. (2003) "Processing, Localization and Binding Activity of Zonadhesin Suggest a Function in Sperm Adhesion to the Zona Pellucida During Exocytosis of the Acrosome". Biochem J, 375: 477-88.
- Bigler, D; Takahashi, Y; Chen, M S; Almeida, E A; Osbourne, L & White, J M. (2000) "Sequence-Specific Interaction Between the Disintegrin Domain of Mouse ADAM 2 (Fertilin β) and Murine Eggs. Role of the α6 Integrin Subunit". J Biol Chem 275(16):11576-84.
- Blackmore, P F. (1993) "Rapid Non-Genomic Actions of Progesterone Stimulate Ca²⁺ Influx and the Acrosome Reaction in Human Sperm". Cell Signal, 5: 531-8.
- Blaquier, J A; Cameo, M S & Burgos, M H. (1973) "The Role of Androgens in the Maturation of Epididymal Spermatozoa in the Guinea Pig". Endocrinology, 90: 839-42.
- Bleil, J D & Wassarman, P M. (1990) "Identification of a ZP3-Binding Protein on Acrosome-Intact Mouse Sperm by Photoaffinity Crosslinking". Proc Natl Acad Sci USA, 87: 5563-7.
- Blobel, C P; Wolfsberg, T G; Turck, C W; Myles, D G; Primakoff, P & White, J M. (1992) "A Potential Fusion Peptide and an Integrin Ligand Domain in a Protein Active in Sperm-Egg Fusion". Nature, 356: 248-52.

- Boatman, D E & Robbins, R S. (1991) "Bicarbonate: Carbon-Dioxide Regulation of Sperm Capacitation, Hyperactivated Motility, and Acrosome Reactions". Biol Reprod, 44: 806-13.
- Bork, P & Sander, C. (1992) "A Large Domain Common to Sperm Receptors (Zp2 and Zp3) and TGF-β Type III Receptor". FEBS Lett, 300: 237-40.
- 33. Breitbart, H; Rubinstein, S & Etkovitz, N. (2006) "Sperm Capacitation Is Regulated by the Crosstalk Between Protein Kinase A and C". Mol Cell Endocrinol, 252: 247-9.
- 34. Brooks, D E; Means, A R; Wright, E J; Singh, S P & Tiver, K K. (1986) "Molecular Cloning of the cDNA for Androgen-Dependent Sperm-Coating Glycoproteins Secreted by the Rat Epididymis". Eur J Biochem, 161: 13-8.
- 35. Buck, J; Sinclair, M L; Schapal, L; Cann, M J & Levin, L R. (1999) "Cytosolic Adenylyl Cyclase Defines a Unique Signaling Molecule in Mammals". Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 79-84.
- 36. Busso, D. (2005) Tesis Doctoral, FCEN-UBA.
- Busso, D; Cohen, D J; Hayashi, M; Kasahara, M & Cuasnicu, P S. (2005) "Human Testicular Protein TPX1/CRISP-2: Localization in Spermatozoa, Fate After Capacitation and Relevance for Gamete Interaction". Mol Hum Reprod, 11: 299-305.
- Busso, D; Goldweic, N M; Hayashi, M; Kasahara, M & Cuasnicu, P S. (2007) "Evidence for the Involvement of Testicular Protein CRISP2 in Mouse Sperm-Egg Fusion". Biol Reprod (en prensa).
- Cameo, M S & Blaquier, J A. (1976) "Androgen-Controlled Specific Proteins in Rat Epididymis". J Endocr, 69: 317-24.
- Carr, D W; Fujita, A; Stentz, C L; Liberty, G A; Olson, G E & Narumiya, S. (2001) "Identification of Sperm-Specific Proteins That Interact With A-Kinase Anchoring Proteins in a Manner Similar to the Type II Regulatory Subunit of PKA". J Biol Chem, 276: 17332-8.
- 41. Carrera, A; Moos, J; Ning, X P; Gerton, G L; Tesarik, J; Kopf, G S & Moss, S B. (1996) "Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm by a

Calcium/Calmodulin-Dependent Mechanism: Identification of A Kinase Anchor Proteins As Major Substrates for Tyrosine Phosphorylation". Dev Biol, 180: 284-96.

- 42. Chang, M C. (1951) "Fertilizing Capacity of Spermatozoa Deposited into Fallopian Tubes". Nature, 168: 697-8.
- Charest, N J; Joseph, D R; Wilson, E M & French, F S. (1988) "Molecular Cloning of Complementary Deoxyribonucleic Acid for an Androgen-Regulated Epididymal Protein: Sequence Homology With Metalloproteins". Mol Endo, 2: 999-1004.
- Chen, M S; Tung, K S; Coonrod, S A; Takahashi, Y; Bigler, D; Chang, A; Yamashita, Y; Kincade, P W; Herr, J C & White, J M. (1999) "Role of the Integrin-Associated Protein CD9 in Binding Between Sperm ADAM 2 and the Egg Integrin α6β1: Implications for Murine Fertilization.". Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 11830-5.
- Chen, Y; Cann, M J; Litvin, T N; Iourgenko, V; Sinclair, M L; Levin, L R & Buck, J. (2000) "Soluble Adenylyl Cyclase As an Evolutionarily Conserved Bicarbonate Sensor". Science, 289: 625-8.
- 46. Cherr, G N; Lambert, H; Meizel, S & Katz, D F. (1986) "In Vitro Studies of the Golden Hamster Sperm Acrosome Reaction: Completion on the Zona Pellucida and Induction by Homologous Solubilized Zona". Dev Biol, 114: 119-31.
- Cherr, G N; Meyers, S A; Yudin, A I; Vandevoort, C A; Myles, D G; Primakoff, P & Overstreet, J W. (1996) "The PH-20 Protein in Cynomolgus Macaque Spermatozoa: Identification of Two Different Forms Exhibiting Hyaluronidase Activity". Dev Biol, 175: 142-53.
- 48. Chijiwa, T; Mishima, A; Hagiwara, M; Sano, M; Hayashi, K; Inoue, T; Naito, K; Toshioka, T & Hidaka, H. (1990) "Inhibition of Forskolin-Induced Neurite Outgrowth and Protein Phosphorylation by a Newly Synthesized Selective Inhibitor of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase, N-[2-(p-Bromocinnamylamino)Ethyl]-5-Isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D Pheochromocytoma Cells". J Biol Chem, 265: 5267-72.

- 49. Cho, C; Bunch, D O; Faure, J E; Goulding, E H; Eddy, E M; Primakoff, P & Myles, D G. (1998) "Fertilization Defects in Sperm From Mice Lacking Fertilin β". Science, 281: 1857-9.
- 50. Cohen, D J; Ellerman, D A; Busso, D; Morgenfeld, M; Piazza, A; Hayashi, M; Young, E T; Kasahara, M & Cuasnicu, P S. (2001) "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: 1000-5.
- Cohen, D J; Ellerman, D A & Cuasnicú, P S. (2000a) "Mammalian Sperm-Egg Fusion: Evidence That Epididymal Protein DE Plays a Role in Mouse Gamete Fusion". Biol Reprod, 63: 462-8. 4.
- 52. Cohen, D J; Munuce, M J & Cuasnicú, P S. (1996) "Mammalian Sperm-Egg Fusion: The Development of Rat Oolemma Fusibility During Oogenesis Involves the Appearance of Binding Sites for Sperm Protein "DE"". Biol Reprod, 55: 200-6.
- Cohen, D J; Rochwerger, L; Ellerman, D A; Morgenfeld, M; Busso, D & Cuasnicu, P
 S. (2000b) "Relationship Between the Association of Rat Epididymal Protein DE
 With Spermatozoa and the Behavior and Function of the Protein". Mol Reprod Dev, 56: 180-8.
- 54. Cooper, T G. (1986) "The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization". Berlin: Springer Verlag.
- 55. Cooper, T G; Wagenfeld, A; Cornwall, G A; Hsia, N; Chu, S T; Orgebin-Crist, M C; Drevet, J; Vernet, P; Avram, C; Nieschlag, E & Yeung, C H. (2003) "Gene and Protein Expression in the Epididymis of Infertile c-ros Receptor Tyrosine Kinase-Deficient Mice". Biol Reprod, 69: 1750-62.
- Coumoul, X & Deng, C X. (2006) "RNAi in Mice: a Promising Approach to Decipher Gene Functions in Vivo". Biochimie, 88: 637-43.
- 57. Cowan, A E; Myles, D G; Koppel, D E. (1991) "Migration of the Guinea Pig Sperm Membrane Protein PH-20 from One Localized Surface Domain to Another Does Not Occur by a Simple Diffusion-Trapping Mechanism". Dev Biol, 144:189-98.

- Crosby, J A; Jones, R; Barros, C & Carvallo, P. (1998) "Characterization of the Functional Domains of Boar Acrosin Involved in Nonenzymatic Binding to Homologous Zona Pellucida Glycoproteins". Mol Reprod Dev, 49: 426-34.
- Cross, N L. (1998) "Role of Cholesterol in Sperm Capacitation". Biol Reprod, 59: 7-11.
- 60. Cuasnicú, P S; Conesa, D & Rochwerger, L. (1990) "Potential Contraceptive Use of an Epididymal Protein That Participates in Fertilization". 143-53.
- De Blas, G A; Roggero, C M; Tomes, C N & Mayorga, L S. (2005) "Dynamics of SNARE Assembly and Disassembly During Sperm Acrosomal Exocytosis". PLoS Biol, 3: e323.
- 62. Del Punta, K; Charreau, E H; Pignataro, O P. (1996) "Nitric Oxide Inhibits Leydig Cell Steroidogenesis". Endocrinology, 137:5337-43.
- De Vries, K J; Wiedmer, T; Sims, P J & Gadella, B M. (2003) "Caspase-Independent Exposure of Aminophospholipids and Tyrosine Phosphorylation in Bicarbonate Responsive Human Sperm Cells". Biol Reprod, 68: 2122-34.
- 64. Diaz-Perez, E & Meizel, S. (1992) "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: 122-30.
- Diaz-Perez, E; Thomas, P & Meizel, S. (1988) "Evidence Suggesting a Role for Sperm Metalloendoprotease Activity in Penetration of Zona-Free Hamster Eggs by Human Sperm". J Exp Zool, 248: 213-21.
- 66. Dix, D J; Allen, J W; Collins, B W; Mori, C; Nakamura, N; Poorman-Allen, P; Goulding, E H & Eddy, E M. (1996) "Targeted Gene Disruption of Hsp70-2 Results in Failed Meiosis, Germ Cell Apoptosis, and Male Infertility". Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 3264-8.
- 67. Doherty, C M; Tarchala, S M; Radwanska, E & De Jonge, C J. (1995)
 "Characterization of Two Second Messenger Pathways and Their Interactions in Eliciting the Human Sperm Acrosome Reaction". J Androl, 16: 36-46.
- 68. Drabent, B; Saftig, P; Bode, C & Doenecke, D. (2000) "Spermatogenesis Proceeds Normally in Mice Without Linker Histone H1t". Histochem Cell Biol, 113: 433-42.
- Ducibella, T. (1991) "Mammalian Egg Cortical Granules and Cortical Reaction". En: Wassarman, P M (eds.), Elements of Mammalian Fertilization. Boca Raton, Florida: CRC Press; vol 1 205-31.
- 70. Ducibella, T; Kurasawa, S; Duffy, P; Kopf, G S & Schultz, R M. (1993) "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: 1251-7.
- Dube, C; Leclerc, P; Baba, T; Reyes-Moreno, C; Bailey, J L. (2005) "The Proacrosin Binding Protein, sp32, Is Tyrosine Phosphorylated During Capacitation of Pig Sperm". J Androl, 26:519-28.
- Dyson, A L & Orgebin-Crist, M C. (1973) "Effect of Hypophysectomy, Castration and Androgen Replacement Upon Fertilizing Ability of Rat Epididymal Spermatozoa". Endocrinology, 93: 391-5.
- Ebensperger, C & Barros, C. (1984) "Changes at the Hamster Oocyte Surface From Germinal Vesicle Stage to Ovulation". Gam Res, 9: 387-97.
- 74. Eberspaecher, U; Roosterman, D; Krätzschmar, J; Haendler, B; Habenicht, U F; Becker, A; Quensel, C; Petri, T; Schleuning, W D; Donner, P & Kratzschmar, J. (1995) "Mouse Androgen-Dependent Epididymal Glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): Isolation, Biochemical Characterization, and Expression in Recombinant Form". Mol Reprod Dev, 42: 157-72.
- Eddy, E M & O'Brien, D A. (1994) "The Spermatozoon". En: Knobil, E & Neill, J D (eds.), The Physiology of Reproduction, 2da edición. NY: Raven Press; 29-78.
- Edelman, G M & Gally, J A. (2001) "Degeneracy and Complexity in Biological Systems". Proc Natl Acad Sci U S A, 98:13763-8.
- Ehlers, M R. (2000) "CR3: a General Purpose Adhesion-Recognition Receptor Essential for Innate Immunity". Microbes Infect, 2: 289-94.
- 78. Ellerman, D. (2001) Tesis Doctoral, FCEN-UBA.

- Ellerman, D A; Brantua, V S; Martinez, S P; Cohen, D J; Conesa, D & Cuasnicu, P S. (1998) "Potential Contraceptive Use of Epididymal Proteins: Immunization of Male Rats With Epididymal Protein DE Inhibits Sperm Fusion Ability". Biol Reprod, 59: 1029-36.
- Ellerman, D A; Da Ros, V G; Cohen, D J; Busso, D; Morgenfeld, M M & Cuasnicu, P S. (2002) "Expression and Structure-Function Analysis of DE, a Sperm Cysteine-Rich Secretory Protein That Mediates Gamete Fusion". Biol Reprod, 67: 1225-31.
- Ellerman, D A; Busso, D; Maldera, J; Cuasnicu, P S. "Immunocontraceptive Properties of Recombinant Sperm Protein DE: Implications for the Development of Novel Contraceptives". Fertil Steril (en prensa).
- Ensslin, M A & Shur, B D. (2003) "Identification of Mouse Sperm SED1, a Bimotif EGF Repeat and Discoidin-Domain Protein Involved in Sperm-Egg Binding". Cell, 114: 405-17.
- 83. Ensslin, M; Vogel, T; Calvete, J J; Thole, H H; Schmidtke, J; Matsuda, T & Topfer-Petersen, E. (1998) "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: 1057-64.
- Erickson, R P. (1996) "Mouse Models of Human Genetic Disease: Which Mouse Is More Like a Man?". BioEssays, 18: 993-8.
- 85. Esposito, G; Jaiswal, B S; Xie, F; Krajnc-Franken, M A; Robben, T J; Strik, A M; Kuil, C; Philipsen, R L; Van Duin, M; Conti, M & Gossen, J A. (2004) "Mice Deficient for Soluble Adenylyl Cyclase Are Infertile Because of a Severe Sperm-Motility Defect". Proc Natl Acad Sci U S A, 101: 2993-8.
- Evans, J P. (1999) "Sperm Disintegrins, Egg Integrins, and Other Cell Adhesion Molecules of Mammalian Gamete Plasma Membrane Interactions". Front Biosci, 4: D114-31.
- Fernandez, C; Szyperski, T; Bruyere, T; Ramage, P; Mosinger, E & Wuthrich, K. (1997) "NMR Solution Structure of the Pathogenesis-Related Protein P14a". J Mol Biol, 266: 576-93.

- Ficarro, S; Chertihin, O; Westbrook, V A; White, F; Jayes, F; Kalab, P; Marto, J A; Shabanowitz, J; Herr, J C; Hunt, D F & Visconti, P E. (2003) "Phosphoproteome Analysis of Capacitated Human Sperm. Evidence of Tyrosine Phosphorylation of a Kinase-Anchoring Protein 3 and Valosin-Containing Protein/P97 During Capacitation". J Biol Chem, 278: 11579-89.
- Flesch, F M; Brouwers, J F; Nievelstein, P F; Verkleij, A J; van Golde, L M; Colenbrander, B & Gadella, B M. (2001) "Bicarbonate Stimulated Phospholipid Scrambling Induces Cholesterol Redistribution and Enables Cholesterol Depletion in the Sperm Plasma Membrane". J Cell Sci, 114: 3543-55.
- 90. Foster, J A; Friday, B B; Maulit, M T; Blobel, C; Winfrey, V P; Olson, G E; Kim, K S & Gerton, G L. (1997) "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: 12714-22.
- 91. Fox, S A; Yang, L & Hinton, B T. (2006) "Identifying Putative Contraceptive Targets by Dissecting Signal Transduction Networks in the Epididymis Using an *in vivo* Electroporation (Electrotransfer) Approach". Mol Cell Endocrinol, 250: 196-200.
- Fraser, L R. (1982) "Ca²⁺ Is Required for Mouse Capacitation and Fertilization in Vitro". J Androl, 3: 412-9.
- Fraser, L R & Drury, L M. (1975) "The Relationship Between Sperm Concentration and Fertilization *in vitro* of Mouse Eggs". Biol Reprod, 13: 513-8.
- 94. Fraser, L R; Harrison, R A P & Herod, J E. (1990) "Characterization of a Decapacitation Factor Associated With Epididymal Mouse Spermatozoa". J Reprod Fertil, 89: 135-48.
- 95. Fukumoto, K; Kikuchi, S; Itoh, N; Tamura, A; Hata, M; Yamagishi, H; Tsukita, S & Tsukita, S. (2006) "Effects of Genetic Backgrounds on Hyperbilirubinemia in Radixin-Deficient Mice Due to Different Expression Levels of Mrp3". Biochim Biophys Acta (en prensa).
- 96. Furlong, L I; Hellman, U; Krimer, A; Tezon, J G; Charreau, E H & Vazquez-Levin, M H. (2000) "Expression of Human Proacrosin in *Escherichia coli* and Binding to Zona Pellucida". Biol Reprod, 62: 606-15.

- Gaddum-Rosse, P. (1985) "Mammalian Gamete Interactions: What Can Be Gained From Observations on Living Eggs?". Am J Anat, 174: 347-56.
- 98. Gadella, B M & Harrison, R A. (2000) "The Capacitating Agent Bicarbonate Induces Protein Kinase A-dependent Changes in Phospholipid Transbilayer Behavior in the Sperm Plasma Membrane. Development, 127:2407-20.
- 99. Gadella, B M & Harrison, R A. (2002) "Capacitation Induces Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent, but Apoptosis-Unrelated, Exposure of Aminophospholipids at the Apical Head Plasma Membrane of Boar Sperm Cells". Biol Reprod, 67: 340-50.
- 100. Gadella, B M; Miller, N G; Colenbrander, B; van Golde, L M & Harrison, R A. (1999) "Flow Cytometric Detection of Transbilayer Movement of Fluorescent Phospholipid Analogues Across the Boar Sperm Plasma Membrane: Elimination of Labeling Artifacts". Mol Reprod Dev, 53: 108-25.
- 101. Gadella, B M & van Gestel, R A. (2004) "Bicarbonate and Its Role in Mammalian Sperm Function". Anim Reprod Sci, 82-83: 307-19.
- 102. Galantino-Homer, H L; Visconti, P E & Kopf, G S. (1997) "Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation During Bovine Sperm Capacitation by a Cyclic Adenosine 3'5'-Monophosphate-Dependent Pathway". Biol Reprod, 56: 707-19.
- 103. Garberi, J C; Fontana, J D & Blaquier, J A. (1982) "Carbohydrate Composition of Specific Rat Epididymal Protein". Int J Androl, 5: 619-26.
- 104. Garberi, J C; Kohane, A C; Cameo, M S; Blaquier, J A.(1979) "Isolation and Characterization of Specific Rat Epididymal Proteins". Mol Cell Endocrinol, 13:73-82.
- 105. Garcia-Ortega, L; De, l R, V; Martinez-Ruiz, A; Onaderra, M; Lacadena, J; Martinez, d P & Gavilanes, J G. (2005) "Anomalous Electrophoretic Behavior of a Very Acidic Protein: Ribonuclease U2". Electrophoresis, 26: 3407-13.
- 106. Garty, N B & Salomon, Y. (1987) "Stimulation of Partially Purified Adenylate Cyclase From Bull Sperm by Bicarbonate". FEBS Lett, 218: 148-52.

- 107. Gatti, J L; Castella, S; Dacheux, F; Ecroyd, H; Metayer, S; Thimon, V & Dacheux, J
 L. (2004) "Post-Testicular Sperm Environment and Fertility". Anim Reprod Sci, 82-83: 321-39.
- 108. Gaudreault, C; Legare, C; Berube, B; Sullivan, R. (1999) "Hamster Sperm Protein, P26h: a Member of the Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Superfamily". Biol Reprod, 61:264-73.
- 109. Gibbs, G M; Scanlon, M J; Swarbrick, J; Curtis, S; Gallant, E; Dulhunty, A F & O'Bryan, M K. (2006) "The Cysteine-Rich Secretory Protein Domain of Tpx-1 Is Related to Ion Channel Toxins and Regulates Ryanodine Receptor Ca²⁺ Signaling". J Biol Chem, 281: 4156-63.
- 110. Gmachl, M; Sagan, S; Ketter, S & Kreil, G. (1993) "The Human Sperm Protein PH-20 Has Hyaluronidase Activity". FEBS Lett, 336: 545-8.
- 111. Go, K J & Wolf, D P. (1985) "Albumin-Mediated Changes in Sperm Sterol Content During Capacitation.". Biol Reprod, 32: 145-53.
- 112. Guo, M; Teng, M; Niu, L; Liu, Q; Huang, Q & Hao, Q. (2005) "Crystal Structure of the Cysteine-Rich Secretory Protein Steerisp Reveals That the Cysteine-Rich Domain Has a K+ Channel Inhibitor-Like Fold". J Biol Chem, 280: 12405-12.
- 113. Haendler, B; Habenicht, U F; Schwidetzky, U; Schuttke, I & Schleuning, W D. (1997) "Differential Androgen Regulation of the Murine Genes for Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISP)". Eur J Biochem, 250: 440-6.
- 114. Haendler, B; Kratzschmar, J; Theuring, F & Schleuning, W D. (1993) "Transcripts for Cysteine-Rich Secretory Protein-1 (CRISP-1; DE/AEG) and the Novel Related CRISP-3 Are Expressed Under Androgen Control in the Mouse Salivary Gland". Endocrinology, 133: 192-8.
- Hanada, A & Chang, M C. (1972) "Penetration of Zona-Free Eggs by Spermatozoa of Different Species". Biol Reprod, 6: 300-9.
- 116. Hardy, D M & Garbers, D L. (1995) "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: 26025-8.

- 117. Hardy, D M; Huang, T T F; Driscoll, W J; Tung, K S K & Wild, G C. (1988)
 "Purification and Characterization of the Primary Acrosomal Autoantigen of Guinea
 Pig Epididymal Spermatozoa". Biol Reprod, 38: 423-37.
- 118. Harrison, R A P; Ashworth, P J C & Miller, N G A. (1996) "Bicarbonate/CO₂, an Effector of Capacitation, Induces a Rapid and Reversible Change in the Lipid Architecture of Boar Sperm Plasma Membranes". Mol Reprod Dev, 45: 378-91.
- Harrison, R A; Gadella, B M. (2005) "Bicarbonate-Induced Membrane Processing in Sperm Capacitation". Theriogenology, 63:342-51.
- Hashimoto, H; Shintani, N; Nishino, A; Okabe, M; Ikawa, M; Matsuyama, S; Itoh, K; Yamamoto, K; Tomimoto, S; Fujita, T; Hagihara, N; Mori, W; Koyama, Y; Matsuda, T; Nagata, S & Baba, A. (2000) "Mice With Markedly Reduced PACAP (PAC(1)) Receptor Expression by Targeted Deletion of the Signal Peptide". J Neurochem, 75: 1810-7.
- 121. Hatanaka, Y; Nagai, T; Tobita, T & Nakano, M. (1992) "Changes in the Properties and Composition of Zona Pellucida of Pigs During Fertilization *in vitro*". J Reprod Fertil, 95: 431-40.
- 122. Hayashi, M; Fujimoto, S; Takano, H; Ushiki, T; Abe, K; Ishikura, H; Yoshida, M; Kirchhoff, C; Ishibashi, T & Kasahara, M. (1996) "Characterization of a Human Glycoprotein With Potential Role in Sperm-Egg Fusion: cDNA Cloning, Immunohistochemical Localization, and Chromosomal Assignment of the Gene (AEGL1)". Genomics, 32: 367-74.
- 123. Hayashi, T & Nagai, Y. (1980) "The Anomalous Behavior of Collagen Peptides on Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Is Due to the Low Content of Hydrophobic Amino Acid Residues". J Biochem (Tokyo), 87: 803-8.
- 124. He, Z Y; Brakebusch, C; Fassler, R; Kreidberg, J A; Primakoff, P & Myles, D G. (2003) "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: 226-37.
- 125. Henriksen, A; King, T P; Mirza, O; Monsalve, R I; Meno, K; Ipsen, H; Larsen, J N; Gajhede, M & Spangfort, M D. (2001) "Major Venom Allergen of Yellow Jackets,

Ves v 5: Structural Characterization of a Pathogenesis-Related Protein Superfamily". Proteins, 45: 438-48.

- 126. Hess, K C; Jones, B H; Marquez, B; Chen, Y; Ord, T S; Kamenetsky, M; Miyamoto, C; Zippin, J H; Kopf, G S; Suarez, S S; Levin, L R; Williams, C J; Buck, J & Moss, S B. (2005) "The "Soluble" Adenylyl Cyclase in Sperm Mediates Multiple Signaling Events Required for Fertilization". Dev Cell, 9: 249-59.
- 127. Hinrichsen, M & Blaquier, J A. (1980) "Evidence Supporting the Existence of Sperm Maturation in the Human Epididymis". J Reprod Fertil, 60: 291-4.
- Hoodbhoy, T & Dean, J. (2004) "Insights into the Molecular Basis of Sperm-Egg Recognition in Mammals". Reproduction, 127: 417-22.
- 129. Hoodbhoy, T & Talbot, P. (1994) "Mammalian Cortical Granules: Contents, Fate, and Function". Mol Reprod Dev, 39: 439-48.
- Horvath, P M; Kellom, T; Caulfield, J & Boldt, J. (1993) "Mechanistic Studies of the Plasma Membrane Block to Polyspermy in Mouse Eggs". Mol Reprod Dev, 34: 65-72.
- 131. Howes, E; Pascall, J C; Engel, W & Jones, R. (2001) "Interactions Between Mouse ZP2 Glycoprotein and Proacrosin; a Mechanism for Secondary Binding of Sperm to the Zona Pellucida During Fertilization". J Cell Sci, 114: 4127-36.
- Hulo, N; Bairoch, A; Bulliard, V; Cerutti, L; De Castro, E; Langendijk-Genevaux, P
 S; Pagni, M & Sigrist, C J. (2006) "The PROSITE Database". Nucleic Acids Res, 34: D227-D230.
- 133. Ikawa, M; Nakanishi, T; Yamada, S; Wada, I; Kominami, K; Tanaka, H; Nozaki, M;
 Nishimune, Y & Okabe, M. (2001) "Calmegin Is Required for Fertilin α/β
 Heterodimerization and Sperm Fertility". Dev Biol, 240: 254-61.
- 134. Ikawa, M; Wada, I; Kominami, K; Watanabe, D; Toshimori, K; Nishimune, Y & Okabe, M. (1997) "The Putative Chaperone Calmegin Is Required for Sperm Fertility". Nature, 387: 607-11.

- Inoue, N; Ikawa, M; Isotani, A & Okabe, M. (2005) "The Immunoglobulin Superfamily Protein Izumo Is Required for Sperm to Fuse With Eggs". Nature, 434: 234-8.
- 136. Ishikawa, H; Tomomasa, H; Yoshii, S; Koiso, K; Tajima, Y; Okamura, N & Sugita,Y. (1989) "Correlation Between the Sperm Motility and the Adenylate Cyclase Activity in Infertile Men". Andrologia, 21: 437-40.
- 137. Jaiswal, B S & Conti, M. (2003) "Calcium Regulation of the Soluble Adenylyl Cyclase Expressed in Mammalian Spermatozoa". Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 10676-81.
- 138. Jalkanen, J; Huhtaniemi, I & Poutanen, M. (2005) "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: 1268-74.
- 139. Jha, K N; Shivaji, S. (2002) "Identification of the Major Tyrosine Phosphorylated Protein of Capacitated Hamster Spermatozoa as a Homologue of Mammalian Sperm a Kinase Anchoring Protein". Mol Reprod Dev, 61:258-70.
- 140. Johnson, J; Bagley, J; Skaznik-Wikiel, M; Lee, H J; Adams, G B; Niikura, Y; Tschudy, K S; Tilly, J C; Cortes, M L; Forkert, R; Spitzer, T; Iacomini, J; Scadden, D T & Tilly, J L. (2005) "Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood". Cell, 122: 303-15.
- 141. Johnson, J; Canning, J; Kaneko, T; Pru, J K & Tilly, J L. (2004) "Germline Stem Cells and Follicular Renewal in the Postnatal Mammalian Ovary". Nature, 428: 145-50.
- 142. Johnson, M H; Eager, D; Muggleton-Harris, A & Grave, H M. (1975) "Mosaicism in Organisation of Concanavalin A Receptors on Surface Membranes of Mouse Eggs". Nature, 257: 321-2.
- 143. Jovine, L; Darie, C C; Litscher, E S & Wassarman, P M. (2005) "Zona Pellucida Domain Proteins". Annu Rev Biochem, 74: 83-114.
- 144. Jovine, L; Qi, H; Williams, Z; Litscher, E & Wassarman, P M. (2002) "The ZP Domain Is a Conserved Module for Polymerization of Extracellular Proteins". Nat Cell Biol, 4: 457-61.

- 145. Kaji, K; Oda, S; Shikano, T; Ohnuki, T; Uematsu, Y; Sakagami, J; Tada, N; Miyazaki, S & Kudo, A. (2000) "The Gamete Fusion Process Is Defective in Eggs of CD9-Deficient Mice". Nat Genet, 24: 279-82.
- 146. Kalab, P; Peknicova, J; Geussova, G & Moos, J. (1998) "Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Boar Sperm Through a cAMP-Dependent Pathway". Mol Reprod Dev, 51: 304-14.
- 147. Kaplan, R & Kraicer, P F. (1978) "Effect of Elevated Calcium Concentration on Fertilization of Rat Oocytes *in vitro*". Gam Res, 1: 281-5.
- 148. Kapust, R B & Waugh, D S. (1999) "Escherichia coli Maltose-Binding Protein Is Uncommonly Effective at Promoting the Solubility of Polypeptides to Which It Is Fused". Protein Sci, 8: 1668-74.
- 149. Kasahara, M; Gutknecht, J; Brew, K; Spurr, N & Goodfellow, P N. (1989) "Cloning and Mapping of a Testis-Specific Gene With Sequence Similarity to a Sperm-Coating Glycoprotein Gene". Genomics, 5: 527-34.
- 150. Kim, E; Baba, D; Kimura, M; Yamashita, M; Kashiwabara, S & Baba, T. (2005)
 "Identification of a Hyaluronidase, Hyal5, Involved in Penetration of Mouse Sperm Through Cumulus Mass". Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 18028-33.
- 151. Kim, E; Yamashita, M; Nakanishi, T; Park, K E; Kimura, M; Kashiwabara, S & Baba, T. (2006a) "Mouse Sperm Lacking ADAM1b/ADAM2 Fertilin Can Fuse With the Egg Plasma Membrane and Effect Fertilization". J Biol Chem, 281: 5634-9.
- 152. Kim, K S; Cha, M C & Gerton, G L. (2001) "Mouse Sperm Protein Sp56 Is a Component of the Acrosomal Matrix". Biol Reprod, 64: 36-43.
- 153. Kim, K S & Gerton, G L. (2003) "Differential Release of Soluble and Matrix Components: Evidence for Intermediate States of Secretion During Spontaneous Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm". Dev Biol, 264: 141-52.
- 154. Kim, T; Oh, J; Woo, J M; Choi, E; Im, S H; Yoo, Y J; Kim, d H; Nishimura, H & Cho, C. (2006b) "Expression and Relationship of Male Reproductive ADAMs in Mouse". Biol Reprod, 74: 744-50.

- 155. Kioussis, D & Festenstein, R. (1997) "Locus Control Regions: Overcoming Heterochromatin-Induced Gene Inactivation in Mammals". Curr Opin Genet Dev, 7: 614-9.
- 156. Kjeldsen, L; Cowland, J B; Johnsen, A H; Borregaard, N. (1996) "SGP28, a Novel Matrix Glycoprotein in Specific Granules of Human Neutrophils with Similarity to a Human Testis-Specific Gene Product and a Rodent Sperm-Coating Glycoprotein". FEBS Lett, 380:246-50.
- 157. Klemme, L M; Roberts, K P; Hoffman, L B; Ensrud, K M; Siiteri, J E & Hamilton, D
 W. (1999) "Cloning and Characterization of the Rat Crisp-1 Gene". Gene, 240: 279-88.
- 158. Knott, J G; Kurokawa, M; Fissore, R A; Schultz, R M & Williams, C J. (2005)
 "Transgenic RNA Interference Reveals Role for Mouse Sperm Phospholipase Cζ in Triggering Ca²⁺ Oscillations During Fertilization". Biol Reprod, 72: 992-6.
- 159. Kohane, A C; Cameo, M S; Piñeiro, L; Garberi, J C & Blaquier, J A. (1980a)"Distribution and Site of Production of Specific Proteins in the Rat Epididymis". Biol Reprod, 23: 181-7.
- 160. Kohane, A C; Garberi, J C; Cameo, M S & Blaquier, J A. (1979) "Quantitative Determination of Specific Proteins in Rat Epididymis". J Steroid Biochem, 11: 671-4.
- 161. Kohane, A C; Gonzalez Echeverria, F; Piñeiro, L & Blaquier, J A. (1980b)
 "Interaction of Proteins of Epididymal Origin With Spermatozoa". Biol Reprod, 23: 737-42.
- 162. Kohane, A C; Piñeiro, L & Blaquier, J A. (1983) "Androgen-Controlled Synthesis of Specific Protein in the Rat Epididymis". Endocrinology, 112: 1590-6.
- 163. Kratzschmar, J; Haendler, B; Eberspaecher, U; Roosterman, D; Donner, P & Schleuning, W D. (1996) "The Human Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) Family. Primary Structure and Tissue Distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3". Eur J Biochem, 236: 827-36.
- 164. Kurokawa, M; Sato, K & Fissore, R A. (2004) "Mammalian Fertilization: From Sperm Factor to Phospholipase Cζ". Biol Cell, 96: 37-45.

- Laemmli, U K. (1970) "Cleavege of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". Nature, 227: 680-5.
- 166. Leclerc, P; De Lamirande, E & Gagnon, C. (1996) "Cyclic Adenosine 3',5'Monophosphate-Dependent Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Relation to Human Sperm Capacitation and Motility". Biol Reprod, 55: 684-92.
- 167. Leclerc, P; De Lamirande, E & Gagnon, C. (1997) "Regulation of Protein-Tyrosine Phosphorylation and Human Sperm Capacitation by Reactive Oxygen Derivatives".
 Free Radic Biol Med, 22: 643-56.
- 168. Leclerc, P; De Lamirande, E & Gagnon, C. (1998) "Interaction Between Ca²⁺, Cyclic 3',5' Adenosine Monophosphate, the Superoxide Anion, and Tyrosine Phosphorylation Pathways in the Regulation of Human Sperm Capacitation". J Androl, 19: 434-43.
- Lee, M A & Storey, B T. (1986) "Bicarbonate Is Essential for Fertilization of Mouse Eggs: Mouse Sperm Require It to Undergo the Acrosome Reaction.". Biol Reprod, 34: 349-56.
- Le Naour, F; Rubinstein, E; Jasmin, C; Prenant, M & Boucheix, C. (2000) "Severely Reduced Female Fertility in CD9-Deficient Mice.". Science, 287: 319-21.
- Lewis, B & Aitken, R J. (2001) "Impact of Epididymal Maturation on the Tyrosine Phosphorylation Patterns Exhibited by Rat Spermatozoa". Biol Reprod, 64: 1545-56.
- Leyton, L & Saling, P M. (1989a) "95kd Sperm Proteins Bind ZP3 and Serve As Tyrosine Kinase Substrates in Response to Zona Binding". Cell, 57: 1123-30.
- 173. Leyton, L & Saling, P. (1989b) "Evidence That Aggregation of Mouse Sperm Receptors by ZP3 Triggers the Acrosome Reaction". J Cell Biol, 108: 2163-8.
- 174. Lin, Y; Mahan, K; Lathrop, W F; Myles, D G & Primakoff, P. (1994) "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: 1157-63.
- 175. Litman, G W; Scheffel, C; Gerber-Jenson, B; Litman, R & Middaugh, C R. (1981)"Molecular Basis for the Temperature-Dependent Insolubility of Cryoglobulins. XII.

Anomalous Mobility of Monoclonal Cryoimmunoglobulin Heavy Chains Accompanying Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate". Immunol Commun, 10: 707-18.

- Livera, G; Xie, F; Garcia, M A; Jaiswal, B; Chen, J; Law, E; Storm, D R & Conti, M. (2005) "Inactivation of the Mouse Adenylyl Cyclase 3 Gene Disrupts Male Fertility and Spermatozoon Function". Mol Endocrinol, 19: 1277-90.
- 177. Lopez, L C & Shur, B D. (1987) "Redistribution of Mouse Sperm Surface Galactosyltransferase After the Acrosome Reaction.". J Cell Biol, 105: 1663-70.
- 178. Lu, Q X & Shur, B D. (1997) "Sperm From B1,4-Galactosyltransferase-Null Mice Are Refractory to ZP3-Induced Acrosome Reactions and Penetrate the Zona Pellucida Poorly.". Development, 124: 4121-31.
- 179. Luconi, M; Krausz, C; Forti, G & Baldi, E. (1996) "Extracellular Calcium Negatively Modulates Tyrosine Phosphorylation and Tyrosine Kinase Activity During Capacitation of Human Spermatozoa". Biol Reprod, 55: 207-16.
- 180. Luconi, M; Porazzi, I; Ferruzzi, P; Marchiani, S; Forti, G & Baldi, E. (2005) "Tyrosine Phosphorylation of the a Kinase Anchoring Protein 3 (AKAP3) and Soluble Adenylate Cyclase Are Involved in the Increase of Human Sperm Motility by Bicarbonate". Biol Reprod, 72: 22-32.
- 181. Maas, D H; Storey, B T & Mastroianni, L, Jr. (1977) "Hydrogen Ion and Carbon Dioxide Content of the Oviductal Fluid of the Rhesus Monkey (*Macaca mulatta*)". Fertil Steril, 28: 981-5.
- 182. Maecker, H T & Levy, S. (1997) "Normal Lymphocyte Development but Delayed Humoral Immune Response in CD81-Null Mice". J Exp Med, 185: 1505-10.
- 183. Maeda, T; Sakashita, M; Ohba, Y & Nakanishi, Y. (1998) "Molecular Cloning of the Rat Tpx-1 Responsible for the Interaction Between Spermatogenic and Sertoli Cells". Biochem Biophys Res Commun, 248: 140-6.
- 184. Mahony, M C & Gwathmey, T. (1999) "Protein Tyrosine Phosphorylation During Hyperactivated Motility of Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Spermatozoa". Biol Reprod, 60: 1239-43.

- Maxfield, F R. (2002) "Plasma Membrane Microdomains". Curr Opin Cell Biol, 14: 483-7.
- 186. Miller, B J; Georges-Labouesse, E; Primakoff, P & Myles, D G. (2000) "Normal Fertilization Occurs With Eggs Lacking the Integrin α6β1 and Is CD9-Dependent". J Cell Biol, 149: 1289-96.
- 187. Milne, T J; Abbenante, G; Tyndall, J D; Halliday, J & Lewis, R J. (2003) "Isolation and Characterization of a Cone Snail Protease With Homology to CRISP Proteins of the Pathogenesis-Related Protein Superfamily". J Biol Chem, 278: 31105-10.
- 188. Mitra, K; Shivaji, S. (2004) "Novel Tyrosine-Phosphorylated Post-Pyruvate Metabolic Enzyme, Dihydrolipoamide Dehydrogenase, Involved in Capacitation of Hamster Spermatozoa". Biol Reprod, 70:887-99.
- 189. Miyado, K; Yamada, G; Yamada, S; Hasuwa, H; Nakamura, Y; Ryu, F; Suzuki, K; Kosai, K; Inoue, K; Ogura, A; Okabe, M & Mekada, E. (2000) "Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization". Science, 287: 321-4.
- 190. Mizuki, N & Kasahara, M. (1992) "Mouse Submandibular Glands Express an Androgen-Regulated Transcript Encoding an Acidic Epididymal Glycoprotein-Like Molecule". Mol Cell Endocrinol, 89: 25-32.
- 191. Moller, C C & Wassarman, P M. (1989) "Characterization of a Proteinase That Cleaves Zona Pellucida Glycoprotein ZP2 Following Activation of Mouse Eggs". Dev Biol, 132: 103-12.
- 192. Morrissette, J; Kratzschmar, J; Haendler, B; El-Hayek, R; Mochca-Morales, J; Martin, B M; Jitandrakumar, R P; Moss, R L; Schleuning, W D; Coronado, R & Possani, L D. (1995) "Primary Structure and Properties of Helothermine, a Peptide That Blocks Ryanodine Receptors". Biophys J, 68: 2280-8.
- 193. Muller, K; Pomorski, T; Muller, P; Zachowski, A & Herrmann, A. (1994) "Protein-Dependent Translocation of Aminophospholipids and Asymmetric Transbilayer Distribution of Phospholipids in the Plasma Membrane of Ram Sperm Cells". Biochemistry, 33: 9968-74.
- 194. Muller, U. (1999) "Ten Years of Gene Targeting: Targeted Mouse Mutants, From Vector Design to Phenotype Analysis". Mech Dev, 82: 3-21.

- 195. Myles, D G & Primakoff, P. (1997) "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: 320-7.
- 196. Nagdas, S K; Winfrey, V P; Olson, G E. (2005) "Tyrosine Phosphorylation Generates Multiple Isoforms Of The Mitochondrial Capsule Protein, Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (Phgpx), During Hamster Sperm Capacitation". Biol Reprod, 72:164-71.
- 197. Nagy, A; Gertsenstein, M; Vintersten, K; Behringer, R. (2003) "Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual", 3^{era} edición. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 198. Nakanishi, T; Isotani, A; Yamaguchi, R; Ikawa, M; Baba, T; Suarez, S S & Okabe, M. (2004) "Selective Passage Through the Uterotubal Junction of Sperm From a Mixed Population Produced by Chimeras of Calmegin-Knockout and Wild-Type Male Mice". Biol Reprod, 71: 959-65.
- 199. Nassar, A; Mahony, M; Morshedi, M; Lin, M H; Srisombut, C & Oehninger, S. (1999) "Modulation of Sperm Tail Protein Tyrosine Phosphorylation by Pentoxifylline and Its Correlation With Hyperactivated Motility". Fertil Steril, 71: 919-23.
- 200. Naz, R K; Ahmad, K & Kumar, R. (1991) "Role of Membrane Phosphotyrosine Proteins in Human Spermatozoal Function". J Cell Sci, 99 (Pt 1): 157-65.
- 201. Nicolson, G; Yanagimachi, H & Yanagimachi, R. (1975) "Ultrastuctural Localization of Lectin-Binding Sites on the Zonae Pellucidae and Plasma Membrane of Mammalian Egg". J Cell Biol, 66: 263-73.
- 202. Nishimura, H; Cho, C; Branciforte, D R; Myles, D G & Primakoff, P. (2001)
 "Analysis of Loss of Adhesive Function in Sperm Lacking Cyritestin or Fertilin β". Dev Biol, 233: 204-13.
- 203. Nishimura, H; Kim, E; Nakanishi, T & Baba, T. (2004) "Possible Function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin Complex in the Appearance of ADAM3 on the Sperm Surface". J Biol Chem, 279: 34957-62.

- 204. Nixon, B; Asquith, K L & John, A R. (2005) "The Role of Molecular Chaperones in Mouse Sperm-Egg Interactions". Mol Cell Endocrinol, 240: 1-10.
- 205. Nolan, J P; Magargee, S F; Posner, R G & Hammerstedt, R H. (1995) "Flow Cytometric Analysis of Transmembrane Phospholipid Movement in Bull Sperm". Biochemistry, 34: 3907-15.
- 206. Nolan, M A; Wu, L; Bang, H J; Jelinsky, S A; Roberts, K P; Turner, T T; Kopf, G S & Johnston, D S. (2006) "Identification of Rat Cysteine-Rich Secretory Protein 4 (Crisp4) As the Ortholog to Human CRISP1 and Mouse Crisp4". Biol Reprod, 74: 984-91.
- 207. O'Bryan, M K; Loveland, K L; Herszfeld, D; McFarlane, J R; Hearn, M T & De Kretser, D M. (1998) "Identification of a Rat Testis-Specific Gene Encoding a Potential Rat Outer Dense Fibre Protein". Mol Reprod Dev, 50: 313-22.
- 208. Okamura, N; Tajima, Y; Ishikawa, H; Yoshii, S; Koiso, K & Sugita, Y. (1986) "Lowered Levels of Bicarbonate in Seminal Plasma Cause the Poor Sperm Motility in Human Infertile Patients". Fertil Steril, 45: 265-72.
- 209. Okamura, N; Tajima, Y; Soejima, A; Masuda, H & Sugita, Y. (1985) "Sodium Bicarbonate in Seminal Plasma Stimulates the Motility of Mammalian Spermatozoa Through Direct Activation of Adenylate Cyclase". J Biol Chem, 260: 9699-705.
- Oliphant, G. (1976) "Removal of Sperm-Bound Seminal Plasma Components As a Prerequisite to Induction of Acrosome Reaction". Fertil Steril, 9: 404-14.
- 211. Oliphant, G & Brackett, B G. (1973) "Capacitation of Mouse Spermatozoa in Media With Elevated Ionic Strengh and Reversible Capacitation With Epididymal Extracts". Fertil Steril, 24: 948-55.
- 212. Oliphant, G; Reynolds, A B & Thomas, T S. (1985) "Sperm Surface Components Involved in the Control of the Acrosome Reaction". Am J Anat, 174: 269-83.
- 213. Olson, J H; Xiang, X; Ziegert, T; Kittelson, A; Rawls, A; Bieber, A L & Chandler, D
 E. (2001) "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: 11205-10.

- 214. O'Rand, M G; Welch, J E & Fisher, S J. (1986) "Sperm Membrane and Zona Pellucida Interactions During Fertilization". 131-44.
- 215. Osheroff, J E; Visconti, P E; Valenzuela, J P; Travis, A J; Alvarez, J & Kopf, G S. (1999) "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: 1017-26.
- 216. Parinaud, J; Labal, B & Vieitez, G. (1992) "High Progesterone Concentrations Induce Acrosome Reaction With a Low Cytotoxic Effect". Fertil Steril, 58: 599-602.
- 217. Perez Martinez, S; Conesa, D & Cuasnicú, P S. (1995) "Potential Contraceptive Use of Epididymal Proteins: Evidence for the Participation of Specific Antibodies Against Rat Epididymal Protein DE in Male and Female Fertility Inhibition". J Reprod Immunol, 29: 31-45.
- 218. Primakoff, P; Hyatt, H & Myles, D G. (1985) "A Role for the Migrating Sperm Surface Antigen PH-20 in Guinea Pig Sperm Binding to the Egg Zona Pellucida". J Cell Biol, 101: 2239-44.
- Pukazhenthi, B S; Long, J A; Wildt, D E; Ottinger, M A; Armstrong, D L & Howard, J. (1998) "Regulation of Sperm Function by Protein Tyrosine Phosphorylation in Diverse Wild Felid Species". J Androl, 19: 675-85.
- 220. Rankin, T L; Coleman, J S; Epifano, O; Hoodbhoy, T; Turner, S G; Castle, P E; Lee, E; Gore-Langton, R & Dean, J. (2003) "Fertility and Taxon-Specific Sperm Binding Persist After Replacement of Mouse Sperm Receptors With Human Homologs". Dev Cell, 5: 33-43.
- 221. Rankin, T; Familari, M; Lee, E; Ginsberg, A; Dwyer, N; Blanchette-Mackie, J; Drago, J; Westphal, H & Dean, J. (1996) "Mice Homozygous for an Insertional Mutation in the Zp3 Gene Lack a Zona Pellucida and Are Infertile". Development, 122: 2903-10.
- 222. Rankin, T L; Tong, Z B; Castle, P E; Lee, E; Gore-Langton, R; Nelson, L M & Dean, J. (1998) "Human ZP3 Restores Fertility in Zp3 Null Mice Without Affecting Order-Specific Sperm Binding". Development, 125: 2415-24.

- 223. Rathi, R; Colenbrander, B; Bevers, M M & Gadella, B M. (2001) "Evaluation of in Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa". Biol Reprod, 65: 462-70.
- 224. Richardson, R T & O'Rand, M G. (1996) "Site-Directed Mutagenesis of Rabbit Proacrosin - Identification of Residues Involved in Zona Pellucida Binding". J Biol Chem, 271: 24069-74.
- 225. Roberts, K P; Ensrud, K M & Hamilton, D W. (2002) "A Comparative Analysis of Expression and Processing of the Rat Epididymal Fluid and Sperm-Bound Forms of Proteins D and E". Biol Reprod, 67: 525-33.
- 226. Roberts, K P; Ensrud, K M; Wooters, J L; Nolan, M A; Johnston, D S & Hamilton, D
 W. (2006) "Epididymal Secreted Protein Crisp-1 and Sperm Function". Mol Cell Endocrinol, 250: 122-7.
- 227. Roberts, K P; Hoffman, L B; Ensrud, K M & Hamilton, D W. (2001) "Expression of Crisp-1 MRNA Splice Variants in the Rat Epididymis, and Comparative Analysis of the Rat and Mouse Crisp-1 Gene Regulatory Regions". J Androl, 22: 157-63.
- 228. Roberts, K P; Wamstad, J A; Ensrud, K M & Hamilton, D W. (2003) "Inhibition of Capacitation-Associated Tyrosine Phosphorylation Signaling in Rat Sperm by Epididymal Protein Crisp-1". Biol Reprod, 69: 572-81.
- 229. Roblero, L S; Guadarrama, A; Ortiz, M E; Fernandez, E & Zegers-Hochschild, F. (1990) "High Potassium Concentration and the Cumulus Corona Oocyte Complex Stimulate the Fertilizing Capacity of Human Spermatozoa". Fertil Steril, 54: 328-32.
- 230. Rochwerger, L; Cohen, D J & Cuasnicú, P S. (1992) "Mammalian Sperm-Egg Fusion: The Rat Egg Has Complementary Sites for a Sperm Protein That Mediates Gamete Fusion". Dev Biol, 153: 83-90.
- 231. Rochwerger, L & Cuasnicu, P S. (1992) "Redistribution of a Rat Sperm Epididymal Glycoprotein After *in vivo* and *in vitro* Capacitation". Mol Reprod Dev, 31: 34-41.
- 232. Roldan, E R & Fleming, A D. (1989) "Is a Ca²⁺ -ATPase Involved in Ca²⁺ Regulation during Capacitation and the Acrosome Reaction of Guinea Pig Spermatozoa?" J Reprod Fertil, 85:297-308.

- 233. Roldan, E R & Fragio, C. (1993) "Phospholipase A₂ Activation and Subsequent Exocytosis in the Ca²⁺/Ionophore-induced Acrosome Reaction of Ram Spermatozoa". J Biol Chem, 268:13962-70.
- 234. Roldan, E R S; Murase, T & Shi, Q X. (1994) "Exocytosis in Spermatozoa in Response to Progesterone and Zona Pellucida". Science, 266: 1578-81.
- 235. Rozmahel, R; Wilschanski, M; Matin, A; Plyte, S; Oliver, M; Auerbach, W; Moore, A; Forstner, J; Durie, P; Nadeau, J; Bear, C & Tsui, L C. (1996) "Modulation of Disease Severity in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Deficient Mice by a Secondary Genetic Factor". Nat Genet, 12: 280-7.
- 236. Rubinstein, E; Ziyyat, A; Prenant, M; Wrobel, E; Wolf, J P; Levy, S; Le Naour, F & Boucheix, C. (2006) "Reduced Fertility of Female Mice Lacking CD81". Dev Biol, 290: 351-8.
- 237. Saling, P M & Storey, B T. (1979) "Mouse Gamete Interactions During Fertilization *in vitro*. Chlortetracycline As a Fluorescent Probe for the Mouse Sperm Acrosome Reaction". J Cell Biol, 83: 544-55.
- Sambrook, J; Fritsch, E F; Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". En: Nolan, C (ed), 2^{da} edición. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 239. Schambony, A; Hefele, J A; Gentzel, M; Wilm, M & Wedlich, D. (2003) "A Homologue of Cysteine-Rich Secretory Proteins Induces Premature Degradation of Vitelline Envelopes and Hatching of *Xenopus laevis* Embryos". Mech Dev, 120: 937-48.
- 240. Schroer, S C; Yudin, A I; Myles, D G & Overstreet, J W. (2000) "Acrosomal Status and Motility of Guinea Pig Spermatozoa During in Vitro Penetration of the Cumulus Oophorus". Zygote, 8: 107-17.
- 241. Schwidetzky, U; Schleuning, W D & Haendler, B. (1997) "Isolation and Characterization of the Androgen-Dependent Mouse Cysteine- Rich Secretory Protein-1 (CRISP-1) Gene". Biochem J, 321: 325-32.
- 242. Serrano, R L; Kuhn, A; Hendricks, A; Helms, J B; Sinning, I & Groves, M R. (2004) "Structural Analysis of the Human Golgi-Associated Plant Pathogenesis Related

Protein GAPR-1 Implicates Dimerization As a Regulatory Mechanism". J Mol Biol, 339: 173-83.

- 243. Setchell, B. (1982) "Spermatogenesis and Spermatozoa". En: Austin, C R & Short, R
 V (eds.), Reproduction in Mammals. Cambridge: Cambridge University Press; 63-101.
- 244. Shabanowitz, R B & O'Rand, M G. (1988) "Characterization of the Human Zona Pellucida From Fertilized and Unfertilized Eggs". J Reprod Fertil, 82: 151-61.
- 245. Shalgi, R; Kaplan, R; Nebel, L & Kraicer, P F. (1981) "The Male Factor in Fertilization of Rat Eggs *in vitro*". J Exp Zool, 217: 319-402.
- 246. Shalgi, R & Phillips, D M. (1980) "Mechanics of Sperm Entry in Cycling Hamsters". J Ultrastruct Res, 71: 154-61.
- 247. Shamsadin, R; Adham, I M; Nayernia, K; Heinlein, U A; Oberwinkler, H & Engel,
 W. (1999) "Male Mice Deficient for Germ-Cell Cyritestin Are Infertile". Biol
 Reprod, 61: 1445-51.
- 248. Shur, B D; Hall, N G. (1982) "A Rol for Mouse Sperm Surface Galactosyltransferase in Sperm Binding to the Egg Zona Pellucida". J Cell Biol, 95: 574-9.
- Si, Y & Okuno, M. (1999) "Role of Tyrosine Phosphorylation of Flagellar Proteins in Hamster Sperm Hyperactivation". Biol Reprod, 61: 240-6.
- 250. Smith, D M; Collins-Racie, L A; Marigo, V A; Roberts, D J; Davis, N M; Hartmann, C; Schweitzer, R; LaVallie, E R; Gamer, L; McCoy, J & Tabin, C J. (2001) "Cloning and Expression of a Novel Cysteine-Rich Secreted Protein Family Member Expressed in Thyroid and Pancreatic Mesoderm Within the Chicken Embryo". Mech Dev, 102: 223-6.
- 251. Stein, K K; Go, J C; Primakoff, P & Myles, D G. (2005) "Defects in Secretory Pathway Trafficking During Sperm Development in Adam2 Knockout Mice". Biol Reprod, 73: 1032-8.
- 252. Stein, K K; Primakoff, P & Myles, D. (2004) "Sperm-Egg Fusion: Events at the Plasma Membrane". J Cell Sci, 117: 6269-74.

- 253. Stewart-Savage, J & Bavister, B D. (1988) "A Cell Surface Block to Polyspermy Occurs in the Golden Hamster Eggs". Dev Biol, 128: 150-7.
- Suarez, S S & Ho, H C. (2003) "Hyperactivation of Mammalian Sperm". Cell Mol Biol, 49: 351-6.
- 255. Tachibana, I & Hemler, M E. (1999) "Role of Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Proteins CD9 and CD81 in Muscle Cell Fusion and Myotube Maintenance". J Cell Biol, 146: 893-904.
- 256. Takano, H; Yanagimachi, R & Urch, U A. (1993) "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.
- 257. Talbot, P. (1985) "Sperm Penetration Through Oocyte Investments". Am J Anat, 174: 331-46.
- 258. Talbot, P & Dandekar, P. (2003) "Perivitelline Space: Does It Play a Role in Blocking Polyspermy in Mammals?". Microsc Res Tech, 61: 349-57.
- 259. Talbot, P; Dicarlantonio, G; Zao, P; Penkala, J & Haimo, L T. (1985) "Motile Cells Lacking Hyaluronidase Can Penetrate the Hamster Oocyte Cumulus Complex". Dev Biol, 108: 387-98.
- 260. Tanghe, S; Van Soom, A; Nauwynck, H; Coryn, M & de Kruif, A. (2002)
 "Minireview: Functions of the Cumulus Oophorus During Oocyte Maturation, Ovulation, and Fertilization". Mol Reprod Dev, 61: 414-24.
- 261. Tardif, S; Dube, C & Bailey, J L. (2003) "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: 207-13.
- 262. Towbin, H; Staehelin, T & Gordon, J. (1979) "Electrophoretic Transfer of Proteins From Polyacrilamyde Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications.". Proc Natl Acad Sci USA, 76: 4350-60.
- 263. Travis, A J; Jorgez, C J; Merdiushev, T; Jones, B H; Dess, D M; Diaz-Cueto, L; Storey, B T; Kopf, G S & Moss, S B. (2001) "Functional Relationships Between

Capacitation-Dependent Cell Signaling and Compartmentalized Metabolic Pathways in Murine Spermatozoa". J Biol Chem, 276: 7630-6.

- 264. Udby, L; Bjartell, A; Malm, J; Egesten, A; Lundwall, A; Cowland, J B; Borregaard, N; Kjeldsen, L. (2005) "Characterization and Localization of Cysteine-Rich Secretory Protein 3 (CRISP-3) in the Human Male Reproductive Tract". J Androl, 26:333-42.
- 265. Urner, F; Leppens-Luisier, G & Sakkas, D. (2001) "Protein Tyrosine Phosphorylation in Sperm During Gamete Interaction in the Mouse: the Influence of Glucose". Biol Reprod, 64: 1350-7.
- 266. Urner, F & Sakkas, D. (2003) "Protein Phosphorylation in Mammalian Spermatozoa". Reproduction, 125: 17-26.
- 267. van Gestel, R A; Brewis, I A; Ashton, P R; Helms, J B; Brouwers, J F & Gadella, B
 M. (2005) "Capacitation-Dependent Concentration of Lipid Rafts in the Apical Ridge Head Area of Porcine Sperm Cells". Mol Hum Reprod, 11: 583-90.
- 268. Visconti, P E; Bailey, J L; Moore, G D; Pan, D; Olds-Clarke, P & Kopf, G S. (1995a)
 "Capacitation of Mouse Spermatozoa. I. Correlation Between the Capacitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation". Development, 121: 1129-37.
- 269. Visconti, P E; Moore, G D; Bailey, J L; Leclerc, P; Connors, S A; Pan, D; Olds-Clarke, P & Kopf, G S. (1995b) "Capacitation of Mouse Spermatozoa. II. Protein Tyrosine Phosphorylation and Capacitation Are Regulated by a cAMP-Dependent Pathway". Development, 121: 1139-50.
- 270. Visconti, P E; Muschietti, J P; Flawia, M M & Tezon, J G. (1990) "Bicarbonate Dependence of cAMP Accumulation Induced by Phorbol Esters in Hamster Spermatozoa". Biochim Biophys Acta, 1054: 231-6.
- 271. Visconti, P E; Ning, X; Fornes, M W; Alvarez, J G; Stein, P; Connors, S A & Kopf, G S. (1999a) "Cholesterol Efflux-Mediated Signal Transduction in Mammalian Sperm: Cholesterol Release Signals an Increase in Protein Tyrosine Phosphorylation During Mouse Sperm Capacitation". Dev Biol, 214: 429-43.
- 272. Visconti, P E; Stewart-Savage, J; Blasco, A; Battaglia, L; Miranda, P; Kopf, G S & Tezon, J G. (1999b) "Roles of Bicarbonate, cAMP, and Protein Tyrosine

Phosphorylation on Capacitation and the Spontaneous Acrosome Reaction of Hamster Sperm". Biol Reprod, 61: 76-84.

- 273. Visconti, P E & Tezon, J G. (1989) "Phorbol Esters Stimulate Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate Accumulation in Hamster Spermatozoa During in Vitro Capacitation". Biol Reprod, 40: 223-31.
- 274. Visconti, P E; Westbrook, V A; Chertihin, O; Demarco, I; Sleight, S & Diekman, A
 B. (2002) "Novel Signaling Pathways Involved in Sperm Acquisition of Fertilizing Capacity". J Reprod Immunol, 53: 133-50.
- Vishwakarma, P. (1962) "The pH and Bicarbonate-Ion Content of the Oviduct and Uterine Fluids". Fertil Steril, 13: 481-5.
- 276. Wang, D; King, S M; Quill, T A; Doolittle, L K & Garbers, D L. (2003a) "A New Sperm-Specific Na⁺/H⁺ Exchanger Required for Sperm Motility and Fertility". Nat Cell Biol, 5: 1117-22.
- 277. Wang, F; Li, H; Liu, M N; Song, H; Han, H M; Wang, Q L; Yin, C C; Zhou, Y C; Qi, Z; Shu, Y Y; Lin, Z J & Jiang, T. (2006) "Structural and Functional Analysis of Natrin, a Venom Protein That Targets Various Ion Channels". Biochem Biophys Res Commun, 351: 443-8.
- 278. Wang, J; Shen, B; Guo, M; Lou, X; Duan, Y; Cheng, X P; Teng, M; Niu, L; Liu, Q; Huang, Q & Hao, Q. (2005) "Blocking Effect and Crystal Structure of Natrin Toxin, a Cysteine-Rich Secretory Protein From Naja Atra Venom That Targets the BKCa Channel". Biochemistry, 44: 10145-52.
- 279. Wang, L; Beserra, C & Garbers, D L. (2004) "A Novel Aminophospholipid Transporter Exclusively Expressed in Spermatozoa Is Required for Membrane Lipid Asymmetry and Normal Fertilization". Dev Biol, 267: 203-15.
- 280. Wang, X F; Zhou, C X; Shi, Q X; Yuan, Y Y; Yu, M K; Ajonuma, L C; Ho, L S; Lo, P S; Tsang, L L; Liu, Y; Lam, S Y; Chan, L N; Zhao, W C; Chung, Y W & Chan, H C. (2003b) "Involvement of CFTR in Uterine Bicarbonate Secretion and the Fertilizing Capacity of Sperm". Nat Cell Biol, 5: 902-6.
- Wassarman, P M. (1987) "The Biology and Chemistry of Fertilization". Science, 235: 553-4.

- 282. Wassarman, P M. (1988) "Zona Pellucida Glycoproteins". Annu Rev Biochem, 57: 415-42.
- Wassarman, P M. (2005) "Contribution of Mouse Egg Zona Pellucida Glycoproteins to Gamete Recognition During Fertilization". J Cell Physiol, 204: 388-91.
- 284. Wassarman, P M; Bleil, J D; Florman, H M; Greve, J M; Roller, R J; Salzmann, G S & Samuels, F G. (1985) "The Mouse Egg's Receptor for Sperm: What Is It and How Does It Work?". Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 50: 11-9.
- 285. Wassarman, P M; Jovine, L & Litscher, E S. (2001) "A Profile of Fertilization in Mammals". Nat Cell Biol 3(2):E59-64.
- Wassarman, P M & Litscher, E S. (2001) "Towards the Molecular Basis of Sperm and Egg Interaction During Mammalian Fertilization". Cells Tissues Organs, 168: 36-45.
- 287. Wilson, M R; Wang, A C; Fish, W W & Warr, G W. (1985) "Anomalous Behavior of Goldfish IgM Heavy Chain in Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis". Comp Biochem Physiol B, 82: 41-9.
- 288. Wright, M D; Geary, S M; Fitter, S; Moseley, G W; Lau, L M; Sheng, K C; Apostolopoulos, V; Stanley, E G; Jackson, D E & Ashman, L K. (2004)
 "Characterization of Mice Lacking the Tetraspanin Superfamily Member CD151". Mol Cell Biol, 24: 5978-88.
- 289. Xie, F; Garcia, M A; Carlson, A E; Schuh, S M; Babcock, D F; Jaiswal, B S; Gossen, J A; Esposito, G; Van Duin, M & Conti, M. (2006) "Soluble Adenylyl Cyclase (sAC) Is Indispensable for Sperm Function and Fertilization". Dev Biol, 296: 353-62.
- 290. Xu, W & Hamilton, D W. (1996) "Identification of the Rat Epdidymis-Secreted 4E9 Antigen As Protein E: Further Biochemical Characterization of Highly Homologous Epididymal Secretory Proteins D and E". Mol Reprod Dev, 43: 347-57.
- 291. Yanagimachi, R. (1978) "Calcium Requirement for Sperm-Egg Fusion in Mammals". Biol Reprod, 19: 949-58.
- Yanagimachi, R. (1994) "Mammalian Fertilization.". En: Knobil, E & Neill, J D (eds.), The Physiology of Reproduction, 2^{da} edición. NY: Raven Press; 189-317.

- 293. Yanagimachi, R & Usui, N. (1974) "Calcium Dependence on the Acrosome Reaction and Activation of Guinea Pig Spermatozoa". Exp Cell Res, 89: 161-74.
- 294. Yamazaki, Y & Morita, T. (2004) "Structure and Function of Snake Venom Cysteine-Rich Secretory Proteins". Toxicon, 44: 227-31.
- 295. Yudin, A I; Cherr, G N & Katz, D F. (1988) "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: 555-64.
- 296. Yudin, A I; Vandevoort, C A; Li, M W & Overstreet, J W. (1999) "PH-20 but Not Acrosin Is Involved in Sperm Penetration of the Macaque Zona Pellucida". Mol Reprod Dev, 53: 350-62.
- 297. Zhang, L; Jiang, S; Wozniak, P J; Yang, X & Godke, R A. (1995) "Cumulus Cell Function During Bovine Oocyte Maturation, Fertilization, and Embryo Development *in vitro*". Mol Reprod Dev, 40: 338-44.
- 298. Zhu, G Z; Miller, B J; Boucheix, C; Rubinstein, E; Liu, C C; Hynes, R O; Myles, D G & Primakoff, P. (2002) "Residues SFQ (173-175) in the Large Extracellular Loop of CD9 Are Required for Gamete Fusion". Development, 129: 1995-2002.
- 299. Zhuo, L & Kimata, K. (2001) "Cumulus Oophorus Extracellular Matrix: Its Construction and Regulation". Cell Struct Funct, 26: 189-96.

Fe de erratas

- En la página 13 la frase "ramas de un árbol" se cambia por "procesos aplanados".
- En las páginas 36 y 37 las citas "Cuasnicu et al., 1989" y "Cuasnicu et al., 1991", deberían ser "Cuasnicu et al., 1990" publicada en "Alexander NJ, Griffin D, Spieler JM, Waites GMH (eds.), Gamete interaction. NY: Wiley-Liss. Por otro lado, se agrega la siguiente referencia: Cuasnicú, P S; Gonzalez Echeverria, F; Piazza, A D; Cameo, M S; & Blaquier, J A. (1984) "Antibodies against epididymal glycoproteins block fertilizing ability in rat". J Reprod Fertil, 72:467-71.
- En la página 31 se incorporan modificaciones en el primer párrafo tendientes a clarificar el rol de las proteínas ADAM en la fertilización: "Más aún, animales ko para calmegina, chaperona no perteneciente a la familia ADAM y requerida para el proceso de fertilización (Ikawa et al., 1997; Ikawa et al., 2001; Nakanishi et al., 2004), presenta el mismo fenotipo que los animales deficientes en ADAM1a, como así también disminución o ausencia de alguna de estas proteínas ADAM. En base a estos resultados, los autores concluyeron que la infertilidad hallada en las líneas de animales ko para ADAM1a y ADAM2, podría no deberse a un efecto directo causado por la falta de la proteína eliminada, ya que otras proteínas de la familia tampoco están presentes en la superfície de los espermatozoides. Las evidencias presentadas, junto al análisis de la expresión de otras proteínas de la familia ADAM sugieren que, por lo menos en el ratón, el heterodímero ADAM1b/ADAM2 no sería necesario para el transporte de los espermatozoides a través del oviducto ni para el proceso de fertilización. Por otro lado, ADAM1a/ADAM2 sería esencial…"
- En la Figura 1.4B de la página 56: a vs b: p<0,001; a vs c: p<0,05; b vs c: p<0,05.