

Tesis Doctoral

Caracterización de distintos miembros de la familia de proteínas CAP en tracto reproductor masculino y femenino y su participación en el proceso de fertilización

Ernesto, Juan Ignacio

2012-10

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

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

Cita tipo APA:

Ernesto, Juan Ignacio. (2012-10). Caracterización de distintos miembros de la familia de proteínas CAP en tracto reproductor masculino y femenino y su participación en el proceso de fertilización. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ernesto, Juan Ignacio. "Caracterización de distintos miembros de la familia de proteínas CAP en tracto reproductor masculino y femenino y su participación en el proceso de fertilización". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-10.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Caracterización de distintos miembros de la
familia de proteínas CAP en tracto
reproductor masculino y femenino y su
participación en el proceso de fertilización**

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

Juan Ignacio Ernesto

Director de Tesis: Dra. Patricia S. Cuasnicu
Consejero de estudios: Dr. Jorge Muschietti

Instituto de Biología y Medicina Experimental
(IBYME-CONICET)

Buenos Aires, 2012

Caracterización de distintos miembros de la familia de proteínas CAP en tracto reproductor masculino y femenino y su participación en el proceso de fertilización.

A pesar de la importancia del proceso de fertilización, es aún muy escasa la información disponible acerca de las moléculas involucradas. Las evidencias de nuestro laboratorio indican que las proteínas de la familia CRISP, miembro de la superfamilia CAP, serían claros mediadores del proceso de interacción de gametas. Teniendo en cuenta que las CRISP se expresan principalmente en el tracto reproductor masculino, el primer objetivo de esta Tesis ha sido investigar si las mismas también se expresan en el tracto reproductor femenino y cumplen un rol en el proceso de fertilización. Los resultados obtenidos utilizando los modelos de rata y ratón indicaron que mientras CRISP1 se encuentra presente en útero, oviducto, ovario, y células del cúmulus, CRISP2 se detecta sólo en ovario, y CRISP4 no se expresaría en el tracto de la hembra. Ensayos de fertilización *in vitro* utilizando espermatozoides y COC (complejos ovocito-cúmulus) provenientes de ratones knockout para CRISP1 indicaron que la proteína presente en el cúmulus cumpliría una función en el proceso de fertilización. Estudios posteriores revelaron que CRISP1 exhibe propiedades quimioattractantes hacia los espermatozoides, sugiriendo que éste podría ser el mecanismo por el cual CRISP1 del cúmulus participa en el proceso de fertilización. Dada la gran homología entre las CRISP y las GLIPR1, las cuales constituyen las dos familias mejor caracterizadas de la superfamilia CAP, el segundo objetivo de este trabajo consistió en estudiar la presencia de proteínas GLIPR1 en el tracto reproductor masculino y su participación en la fertilización. Los resultados indicaron la expresión de GLIPR1L1 a nivel testicular y de GLIPR1L2 tanto en testículo como en epidídimo de ratón. La generación de ambas proteínas en forma recombinante y de sus correspondientes anticuerpos confirmó la presencia de las mismas en el espermatozoide y su participación específica en la primera etapa de unión a la zona pellucida. La información obtenida acerca del rol de las proteínas CRISP y GLIPR1 contribuirá a una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de gametas como así también al desarrollo de futuros métodos de regulación de la fertilidad tanto en animales como en el humano.

Palabras claves: espermatozoide, cúmulus, ovocito, fertilización, quimiotaxis, CRISP, GLIPR1, CAP.

Characterization of different members of the CAP protein family in male and female reproductive tract and their participation in the fertilization process.

Despite the importance of the fertilization process, there is still little information about the molecules involved in it. Evidence from our laboratory indicates that proteins from the CRISP family, members of the CAP super family, would be clear mediators of the gamete interaction process. Considering that the CRISP are expressed primarily in the male reproductive tract, the first objective of this thesis was to investigate whether these proteins are expressed in the female reproductive tract and if they play a role in the fertilization process. The results indicated that while CRISP1 is present in uterus, oviduct, ovary and cumulus cells, CRISP2 is detected only in the ovary and CRISP4 is not expressed in the female reproductive tract. In vitro fertilization assays using both sperm and COC (oocyte-cumulus complex) from CRISP1 knockout mice indicated that the protein present in the cumulus fulfill a role in the fertilization process. Further studies revealed that CRISP1 exhibit sperm chemoattractant properties, suggesting that this might be the mechanism by which CRISP1 present in the cumulus participates in the fertilization process. Given the high homology between CRISP and GLIPR1, which are the two best characterized families from the CAP super family, the second objective of the present work was to study the presence of GLIPR1 proteins in the male reproductive tract and their participation in the fertilization process. Our results indicated that GLIPR1L1 is expressed in the testis while GLIPR1L2 is present in the testis and the epididymis. The generation of both recombinant proteins and their corresponding antibodies confirmed the presence of these proteins in the sperm (human and mouse) and their specific involvement in the first stage of binding to the zona pellucida. The information obtained about the role CRISP and GLIPR1 proteins will contribute to a greater understanding of the molecular mechanisms involved in gamete interaction as well as to the development of future methods to regulate fertility both in animals and humans.

Key words: sperm, cumulus, oocyte, fertilization, chemotaxis, CRISP, GLIPR1, CAP.

Agradecimientos

A mi directora de Tesis Patricia Cuasnicu por todas sus enseñanzas durante estos años y por haberme dado la oportunidad de desarrollar esta Tesis en su laboratorio.

A todos mis compañeros del Laboratorio: Débora, Marian, Juli, Petu, Agus, Gus, Augusto, Vani, Gaby, Fer y Victor, por toda su ayuda y los momentos de disfrute compartidos. A Diego y Nacho por su colaboración.

A la Dra. Laura Giojalas y el Dr. Pablo Visconti por su colaboración en los estudios realizados en esta Tesis.

A todos mis compañeros del IBYME, en especial a Martin, Lucas, Chuky, Wendy, CeciFer, Mauro, por innumerables momentos de trabajo, compañerismo, futbol y amistad.

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

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Concejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por haberme otorgado el apoyo económico para la realización de esta tesis.

A mi familia y amigos, por todo su apoyo.

A Caro por todo su amor y su paciencia permanente.

A Santi por ser mi compañero incondicional.

A mis papás por todo!, los amo.

Abreviaturas

AC	adenilato ciclasa
AH	ácido hialurónico
BSA	albúmina sérica bovina
cAMP	AMP cíclico
COC	complejos cúmulus-ovocitos
DMSO	dimetilsulfóxido
DTT	ditiotreitól
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GPI	glicosilfosfatidilinositol
HT	<i>Crisp1</i> ^{+/-}
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IgG	inmunoglobulina G
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
KO	<i>Crisp1</i> ^{-/-}
P	progesterona
PLC-PI	fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol
PNGasa F	Péptido N-glicosidasa F
PFA	paraformaldehído
PKA	proteína quinasa A
RA	reacción acrosomal
sAC	adenilato ciclasa soluble
ZP	zona pellucida

Índice

Introducción.....	8
Anatomía y función del tracto reproductor y la gameta femenina.....	8
Anatomía y función del tracto reproductor y la gameta masculina	15
Capacitación de los espermatozoides	19
Mecanismos involucrados en la capacitación.....	20
Hiperactivación.....	22
Quimiotaxis.....	23
Reacción acrosomal.....	24
Proceso de fertilización.....	27
Penetración del espermatozoide a través del cúmulus oophorus.....	27
Interacción espermatozoide-ZP.....	28
Fusión espermatozoide-ovocito.....	32
Superfamilia de proteínas CAP.....	37
Proteínas CRISP.....	39
Proteínas GLIPR1.....	45
Objetivos.....	49
Materiales y métodos.....	53
Resultados.....	74
Capítulo I: Identificación de proteínas CRISP en el tracto reproductor femenino y su participación en el proceso de fertilización	
Capítulo II: Presencia de proteínas GLIPR1 en el tracto reproductor y su participación en el proceso de fertilización	
Discusión.....	135
Conclusiones.....	164
Bibliografía.....	167

Introducción

La fertilización es el proceso por el cual gametas haploides, espermatozoides y ovocitos se unen para producir un individuo genéticamente distinto. Se sabe que la fertilización es el resultado de una secuencia precisamente ordenada de interacciones celulares, y que el desenlace de esos mecanismos subyacentes puede aportar al conocimiento general de diferentes procesos celulares. Esto último es uno de los motivos por los cuales este área de investigación ha crecido con el paso de los años (Florman and Ducibella, 2006). Otros motivos son los intereses sociales, ya que la población mundial estimada supera los 7.1 mil millones de personas (Población mundial, Censos de USA, <http://www.census.gov/population/popclockworld.html>), lo que genera una necesidad creciente de desarrollar nuevos métodos de anticoncepción para controlar el crecimiento poblacional, lo cual trae aparejado la exploración de las bases moleculares de la fertilización (Nass and Strauss, III, 2004). Además, la existencia de una conciencia creciente de que las fallas ocurridas en la interacción espermatozoide-óvulo son la raíz de ciertos tipos de infertilidad, es el último motivo que aporta al aumento del estudio de las bases moleculares de la fertilización (Liu and Baker, 2000; Liu and Baker, 2003). Cabe destacar que, en septiembre de 2010 esta área de investigación, personificada en el Dr. Robert Edwards, fue galardonada con el Premio Nobel por el desarrollo de la técnica de fertilización *in vitro* (FIV) humana. Desde el éxito del primer bebé “probeta” que nació el 25 de julio 1978 (Steptoe and Edwards, 1978), más de cuatro millones de bebés fueron concebidos mediante esta metodología. Este excepcional hito representado por el nacimiento de Louise Joy Brown fue alcanzado casi 100 años después de los primeros intentos de FIV en mamíferos.

Con el fin de ampliar los conocimientos sobre los mecanismos involucrados en el proceso de fertilización, el presente trabajo se ha enfocado en el estudio e identificación de nuevos mediadores de este importante proceso.

Anatomía y función del tracto reproductor y la gameta femenina

Tracto reproductor femenino

El *tracto reproductor femenino* está compuesto por los *ovarios*, *oviductos*, *útero*, *cérvix* y *vagina* (**Figura 1**). Dependiendo de las especies, la deposición de los espermatozoides puede darse en la vagina/cérvix o el útero. El útero es el lugar donde

se implanta y desarrolla el embrión. Otra importante función del útero son las suaves contracciones musculares de este órgano causados por la estimulación nerviosa del apareamiento. Como resultado de estas contracciones, los espermatozoides son impulsados hacia adelante, permitiendo alcanzar los segmentos superiores del oviducto (lugar de la fertilización) dentro de los primeros minutos siguientes al apareamiento. A diferencia de los ovarios y oviductos que son estructuras pares, el útero es una estructura única en primates, y bicornia en la mayoría de los mamíferos (Larsen et al., 1986). Anatómicamente, comienza en el oviducto y recorre la cavidad abdominal dorsal, conectándose a la vagina por el cérvix. En el caso murino, si bien los cuernos uterinos parecen estar unidos, se mantienen separados por un septo medio y cada uno de ellos desemboca, por su respectivo conducto cervical, en el extremo superior de la vagina. Histológicamente, las paredes del útero están compuestas por tres capas de tejido diferentes: la externa o serosa, la media muscular o miometrio y la mucosa interna o endometrio (Ham et al., 1970).

El oviducto es el lugar del aparato reproductor femenino donde se crea el microambiente necesario para la fecundación, regulado por las hormonas esteroideas. Además, suceden una diversidad de eventos reproductivos cronológicamente controlados como el almacenamiento y la capacitación de los espermatozoides, la liberación y transporte de las gametas masculinas hacia el sitio de fecundación, el transporte y maduración final de los ovocitos, la fertilización, el desarrollo embrionario temprano y el transporte del embrión al útero (Hunter et al, 1982; Buih et al., 2000). Para que esta secuencia de acontecimientos fisiológicos ocurra satisfactoriamente se requiere de un sistema de control muy dinámico y bien sincronizado. El oviducto está cubierto de una mucosa ciliada la cual ayuda a movilizar al ovocito hacia su encuentro con los espermatozoides, o al cigoto hacia su sitio de implantación en el endometrio. Desde el ovario hasta el útero, se puede separar al oviducto en 4 regiones: la porción fímbrica (donde se encuentra el infundíbulo) es una región que posee unas digitaciones “fimbrias” que palpan la superficie del ovario para determinar dónde se va a producir la ovulación y aspiran al ovocito hacia su interior; la región de la ámpulla, que es la sección más ancha de todo el oviducto y en la cual permanecerá el ovocito hasta ser fecundado; la región ístmica, que es una porción de gran longitud y estrechez, donde los espermatozoides terminan de capacitarse y aguardan la ovulación y, por último, la región intramural que es una pequeña porción que se une al útero y donde se encuentra la unión útero-tubaria.

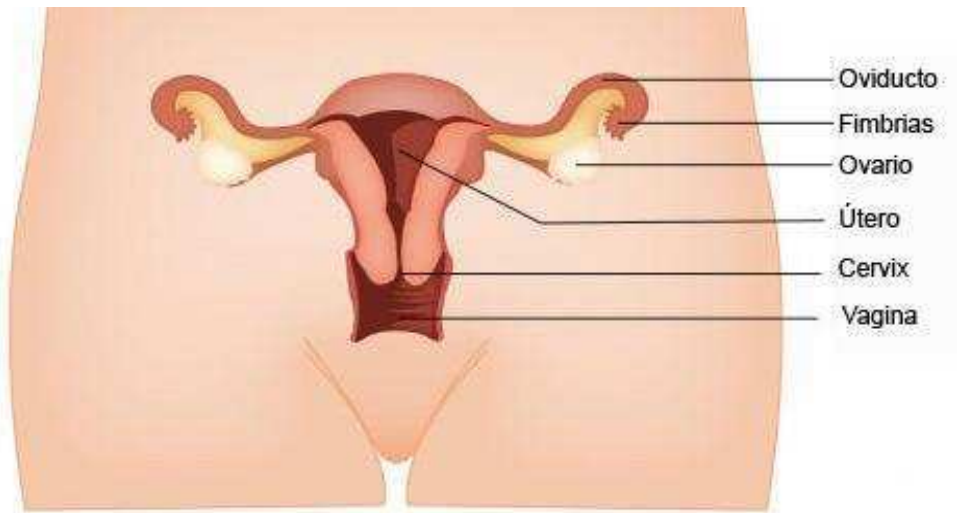


Figura 1: Esquema representativo del tracto reproductor femenino.

El ovario está constituido por un tejido en constante transformación; posee una estructura multi-compartimental caracterizada por propiedades biológicas diferentes y dinámicas. En los mamíferos, el ovario es el sitio de almacenamiento y desarrollo de los ovocitos formados durante la vida embrionaria/fetal o alrededor del momento del nacimiento. La principal función de la gónada femenina es la maduración del ovocitos para la fertilización y exitosa propagación de la especie (McGee and Hsueh, 2000). Para ello, genera un ambiente propicio para la instalación del cigoto, ligado a cambios inducidos por la transformación del folículo ovulatorio en el cuerpo lúteo (Thibault, 1991); Knobil et al., 2005). Además, el ovario constituye el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra, así como también las características adecuadas durante la preñez. A partir de la pubertad, se producen variaciones hormonales cíclicas que afectarán tanto al ovario como al cuerpo lúteo y útero, preparándolos para la expulsión del ovocito y la potencial implantación del blastocito.

Durante la adultez, la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa mono estratificada de células cúbicas o poliédricas, llamada epitelio germinal (Maekawa, 1990). Esta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente, llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues, hoyos ó criptas. Por debajo, se encuentran dos zonas: la zona cortical y la zona medular; el límite entre ambas no se encuentra bien definido. La primera comprende al estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de

células tecales), y a folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular, que se encuentra muy vascularizada e innervada contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo (Bloom, 1984) (**Figura 2**).

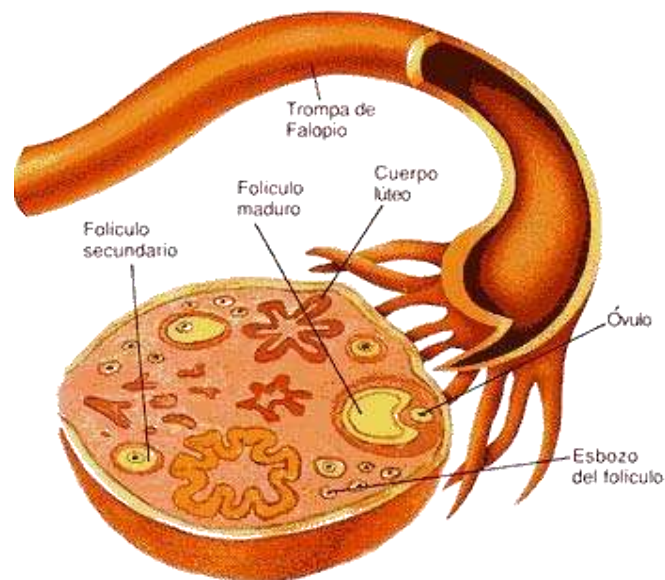


Figura 2: Esquema de un corte transversal de ovario resaltando diferentes estadios foliculares presentes durante la ovogénesis.

La gameta femenina

El ovocito de los mamíferos euterianos consiste en una masa esférica de citoplasma de unos 70-120 μm de diámetro limitada por la membrana plasmática (oolema) que, a su vez, está contenida por una envoltura glicoproteica, la zona pellúcida (ZP) (**Figura 3A**). Entre la ZP y el oolema se encuentra un espacio lleno de fluido, el espacio perivitelino. El ovocito ovulado se encuentra inmerso en una matriz de ácido hialurónico y células de la granulosa, estructura que se conoce como *cúmulus oophorus* (**Figura 3B**).

El ovocito se encuentra conformado por la membrana plasmática (oolema) rodeando al citoplasma (ooplasma), el cual contiene al núcleo y una variedad de organelas. Si bien se supone que la composición del oolema es similar a la membrana plasmática de otros tipos celulares, la dificultad en la obtención de material proveniente de ovocitos ha obstaculizado su estudio. Una característica particular del oolema radica en la presencia de microvellosidades en toda su superficie, con excepción de un área libre

de microvellosidades que coincide con la región que recubre al huso meiótico, y a través de la cual raramente ocurre la fusión del espermatozoide (Johnson et al., 1975). Al igual que en otras células, dentro del ooplasma se encuentran las mitocondrias, el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, organelas importantes para los diferentes procesos metabólicos que debe cumplir el ovocito. En la región cortical del ovocito maduro, por debajo de la zona de microvellosidades, se encuentran los gránulos corticales, pequeñas organelas esféricas rodeadas de membrana (Ducibella, 1991). La aparición de dichos gránulos se encuentra asociada a la expansión del aparato de Golgi durante el crecimiento del ovocito (Ducibella et al., 1994). El papel de los gránulos corticales sería importante para el desarrollo de un embrión viable, ya que su liberación luego de la fertilización aseguraría la entrada de un único espermatozoide dentro del ovocito (Yanagimachi, 1994).

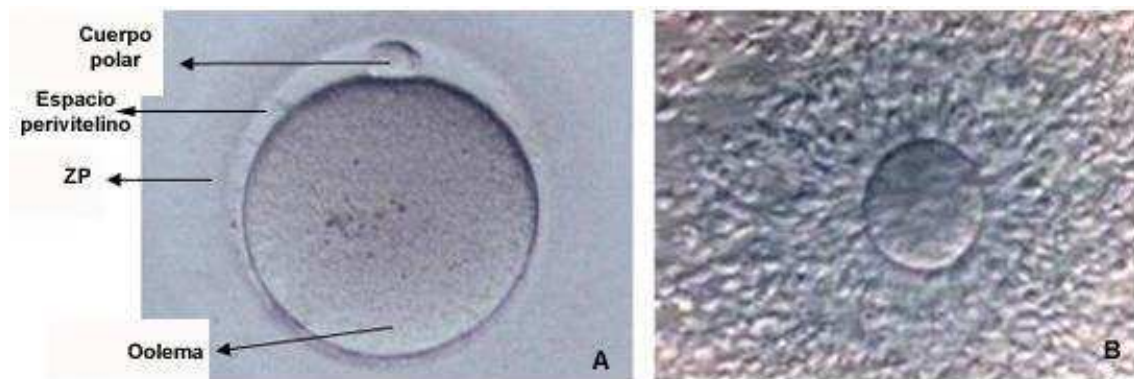


Figura 3: La gameta femenina. A) Microfotografía de un ovocito sin células del cúmulo donde se distinguen la zona pellucida, el espacio perivitelino y el primer cuerpo polar. B) Fotografía de microscopio electrónico de barrido de un complejo cúmulo-ovocito.

La ZP es una matriz transparente, relativamente gruesa, que rodea al ovocito. Si bien durante mucho tiempo no se sabía exactamente si los componentes de la ZP eran sintetizados por las células del folículo o por la misma gameta, diversas evidencias han demostrado que sería el ovocito el responsable de producir la ZP (Haddad y Nagai, 1977; Wassarman, 1988b). Dicha matriz se deposita alrededor del ovocito durante la etapa de crecimiento y aumenta su espesor a medida que la célula aumenta su diámetro (Mashiach et al., 1992). A pesar de la presencia de la ZP, las células foliculares continúan en contacto con el ovocito a través de uniones de tipo *gap*, formadas entre el oolema y extensiones de las células del cúmulo (Austin y Short F.R.S., 1972), las cuales serían importantes en el mantenimiento de las funciones nutricionales y regulatorias que ejercen las células foliculares sobre el ovocito. La ZP

está compuesta, principalmente por entre dos y cuatro glicoproteínas mayoritarias, según la especie (Wassarman, 1988b; Lefievre et al., 2004). Gran parte de la información sobre la naturaleza bioquímica, estructura, y función de la ZP provienen de los laboratorios de los Dres. Paul Wassarman y Jurrien Dean, quienes han utilizado al ratón como modelo para la mayoría de sus estudios (Wassarman, 1988a; Wassarman y Litscher, 2001; Hoodbhoy y Dean, 2004). En esta especie, tres proteínas altamente glicosiladas conforman la ZP: ZP1, ZP2 y ZP3, siendo las dos últimas las más abundantes. La glicosilación diferencial de las tres proteínas produce una alta heterogeneidad de carga en las mismas. Mientras que tanto ZP3 (83 kDa) como ZP2 (120- 140 kDa) son monómeros, la proteína minoritaria ZP1 (185-200 kDa) se encuentra formando parte de un dímero de cadenas polipeptídicas asociadas por puentes disulfuro. Hace más de dos décadas, Wassarman postuló un modelo para explicar la estructura de la ZP de ratón basándose en resultados provenientes de experimentos de microscopía electrónica e inmunolocalización de proteínas en la ZP (Wassarman, 1988b). Dicho modelo, sugirió que la ZP estaría compuesta por filamentos constituidos por heterodímeros de ZP2 y ZP3, intercomunicados por homodímeros de ZP1. Un elemento estructural presente en todas estas proteínas, denominado dominio ZP (Bork y Sander, 1992), sería el responsable del ensamblaje de estos filamentos (Jovine et al., 2002; Jovine et al., 2005).

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

ZP2). Funcionalmente, la ZP sería la encargada de brindar la especie-especificidad durante la fertilización, impedir la polispermia, impedir la separación de las blastómeras y proteger al ovocito y embrión de daños físicos, especialmente durante el clivaje.

Rodeando la ZP, en la mayoría de los mamíferos, se encuentra el *cúmulus oophorus*, conformado por las células del cúmulus embebidas en una matriz extracelular. Como se mencionara anteriormente, en el folículo ovárico, las células del cúmulus se encuentran asociadas entre sí por uniones de tipo *gap*. Como respuesta al pico de gonadotrofinas que precede a la ovulación, dichas células depositan abundante matriz extracelular y, en consecuencia, los complejos cúmulus-ovocito aumentan en volumen de 20 a 40 veces respecto de su tamaño inicial. Por este motivo, se denomina a este proceso “expansión del cúmulus” (Zhuo y Kimata, 2001). Originalmente, el ácido hialurónico era considerado el componente principal de la matriz del cúmulus (Eppig, 1979). Diversos estudios han descrito otros componentes de dicha matriz, particularmente glicosaminoglicanos y proteínas, sintetizados por las células de la granulosa, que también serían parte importante del cúmulus (Zhuo y Kimata, 2001). Además de las moléculas antes mencionadas, existen factores extra foliculares, de origen plasmático, cuyo papel en la composición y la estabilización de la matriz del cúmulus sería importante. Es sabido que los ovocitos euterianos son capaces de ser fertilizados desprovistos de las células del cúmulus tanto *in vitro* como *in vivo* (Yanagimachi, 1994; Bedford, 2004). Teniendo ésto en cuenta, el cúmulus parecería no ser esencial para la interacción de las gametas. No obstante, numerosos trabajos han informado acerca del efecto beneficioso del cúmulus durante la fertilización (Yanagimachi, 1994; Chen et al., 1993; de Mouzon et al., 1985). Se ha propuesto que existirían factores solubles en el cúmulus que estimularían tanto la motilidad de los espermatozoides como la ocurrencia de la reacción acrosomal (Roblero et al., 1990; Schroer et al., 2000). Además, se ha sugerido que el cúmulus tendría otras funciones tales como aumentar el tamaño del blanco a ser ubicado por los espermatozoides en el oviducto (Bedford and Kim, 1993), guiar al espermatozoide hacia el ovocito en un proceso denominado quimiotaxis (Kaupp et al., 2008; Yoshida y Yoshida, 2011), favorecer la penetración de la ZP (Yudin et al., 1988), prolongar la vida fértil de los espermatozoides, seleccionar aquellos con mayor capacidad fertilizante (Roblero et al., 1990; Tanghe et al., 2002) y favorecer el desarrollo embrionario (Zhang et al., 1995). De esta manera, aunque no esencial para la interacción de gametas, la

presencia de las células del cúmulus incrementa el éxito de la fertilización (Florman and Ducibella, 2006).

Anatomía y función del tracto reproductor y la gameta masculina

Tracto reproductor masculino

El *tracto reproductor masculino* de los mamíferos está compuesto por una serie de órganos y conductos que, en conjunto, cumplen la función de producir espermatozoides, contribuir con las distintas secreciones del líquido seminal y transportar las gametas hacia el tracto genital femenino.

Los *testículos* están ubicados fuera de la cavidad abdominal en un saco de piel denominado escroto, y son los encargados de la producción de andrógenos y de proporcionar el entorno adecuado para la producción de los espermatozoides. Del testículo emerge el *conducto eferente*, el cual desemboca en el *epidídimo*, y se continúa con el *conducto deferente* por donde son transportados los espermatozoides. Cada conducto deferente desemboca en un *conducto eyaculador* corto que, luego de atravesar la próstata, se comunica con la *uretra*. Las *glándulas sexuales accesorias*, que incluyen la *vesícula seminal*, la *próstata*, las *glándulas coagulantes*, las *glándulas bulbo uretrales o de Cowper* y las *glándulas uretrales o de Littré*, aportan secreciones que constituyen la fracción principal del líquido seminal (**Figura 4**) (Geneser 2000a). Los testículos de los mamíferos se pueden dividir funcional y estructuralmente en dos compartimientos: el tubular y el intersticial. La mayor parte del volumen testicular está ocupado por los túbulos seminíferos, los cuales conforman la unidad productora de espermatozoides y están compuestos por un epitelio seminífero que contiene dos tipos principales de células: las *células de Sertoli*, y las células de la serie espermatogénica, que comprenden las *espermatogonias*, *espermatocitos primarios y secundarios*, *espermátidas* y *espermatozoides* (Geneser 2000a). El tejido intersticial que completa los espacios entre los túbulos seminíferos contiene las células de Leydig, principal fuente productora de andrógenos, mastocitos y macrófagos, vasos sanguíneos y linfáticos y terminaciones nerviosas. Las células de Leydig se asocian a los vasos sanguíneos y a las paredes de los túbulos seminíferos, y su número varía según la especie, observándose mayor producción de andrógenos en aquellas especies donde existe un mayor número de células de Leydig (Setchell, 1982).

El epidídimo consiste en un largo conducto con muchas circunvoluciones, del que habitualmente se distinguen tres regiones: *caput* (o cabeza), *corpus* (o cuerpo) y *cauda* (o cola). El *caput* es la región más próxima al testículo, el *corpus* es la región media, y el *cauda* es la región distal al testículo, que actúa como lugar de almacenamiento de espermatozoides.

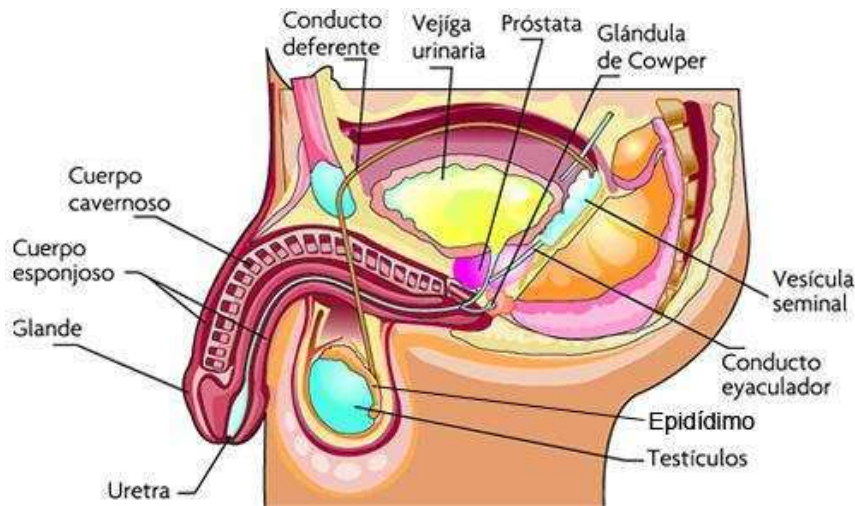


Figura 4: El tracto reproductor masculino. Se muestra una representación simple del tracto reproductor masculino.

A diferencia de los invertebrados y vertebrados inferiores (tales como teleósteos y anfibios anuros), en los mamíferos, los espermatozoides testiculares no tienen la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito (Yanagimachi, 1994). Esta capacidad se adquiere durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo, proceso que se conoce como maduración epididimaria (Orgebin-Crist and Fournier-Delpech, 1982; Cooper, 1986; Austin, 1985; Bedford, 1990; Amann et al., 1993). Es difícil determinar el lugar exacto del epidídimo donde se adquiere la capacidad fertilizante, ya que no todos los espermatozoides la adquieren simultáneamente, y existe variación entre las distintas especies. Sin embargo, como regla general, la gran mayoría de los espermatozoides obtiene el potencial fertilizante al llegar al *cauda* epididimario. Otra diferencia fisiológica entre espermatozoides testiculares y epididimarios consiste en su capacidad de movimiento. Mientras que los espermatozoides testiculares son inmóviles o débilmente móviles, los espermatozoides del *cauda* exhiben una motilidad progresiva y direccional que se adquiere durante su tránsito por el epidídimo (Yanagimachi, 1994).

En este proceso de maduración, ocurren numerosos cambios en la membrana plasmática del espermatozoide, que involucran tanto a lípidos como a proteínas. Mediante la utilización de distintas estrategias experimentales, se ha estudiado la síntesis y secreción de proteínas de origen epididimario, como así también su unión o integración a diferentes dominios de la membrana plasmática del espermatozoide (Cuasnicú et al., 2001). De este modo, se ha descrito que la gran mayoría de las nuevas proteínas adquiridas por los espermatozoides son proteínas de superficie que se unen a la membrana de los espermatozoides a través de interacciones electrostáticas (Cooper, 1998). Sin embargo, también existen evidencias que indican que algunas proteínas adquiridas durante la maduración se comportan como proteínas integrales de membrana (Kirchhoff y Hale, 1996; Legare et al., 1999; Cohen et al., 2000b). Muchas de estas proteínas asociadas fuertemente a la superficie de los espermatozoides se encuentran ancladas a la membrana mediante uniones GPI (Legare et al., 1999; Frenette y Sullivan, 2001; Zhang y Martin-Deleon, 2003). En ese sentido, el laboratorio del Dr. Robert Sullivan describió la participación de unas vesículas membranosas en la transferencia de proteínas epididimarias ancladas mediante uniones GPI a la superficie de los espermatozoides durante la maduración (Legare et al., 1999; Frenette y Sullivan, 2001; Frenette et al., 2002). Estas vesículas denominadas “epididimosomas” han sido descritas en el epidídimo de distintos mamíferos, tales como la rata (Fornes et al., 1991), el toro (Frenette y Sullivan, 2001; D’Amours et al., 2012), el ratón (Griffiths et al., 2008b; Krapf et al., 2012), e inclusive el humano (Frenette et al., 2005; Thimon et al., 2008).

Por su parte, la función biológica de las distintas proteínas epididimarias asociadas a los espermatozoides durante la maduración también ha sido ampliamente estudiada. Mientras que algunas de estas proteínas mediarían la interacción del espermatozoide con el ovocito (Cuasnicú et al., 2002; Dun et al., 2012), otras, que reciben el nombre de “factores decapacitantes”, estabilizarían la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia del proceso de capacitación (Oliphant et al., 1985; Fraser et al., 1990; Chau y Cornwall., 2011; Krutskikh et al., 2012).

La gameta masculina

Los espermatozoides de las distintas especies, aunque presentan un tamaño variable que no guarda relación con el tamaño corporal, comparten una estructura general similar. Estas células altamente diferenciada, poseen básicamente dos componentes

morfológicos: la cabeza que contiene el material genético, y la cola que le confiere motilidad (**Figura 5**).

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

El núcleo se encuentra envuelto en su parte anterior por el acrosoma, que es una estructura membranosa que contiene enzimas involucradas en la penetración del ovocito. La membrana acrosomal puede ser diferenciada en externa o interna, de acuerdo a su aposición con la membrana plasmática o nuclear, respectivamente. Como toda célula, el espermatozoide, está limitado por la membrana plasmática. La región donde se ubica el acrosoma se conoce como región acrosomal, mientras que la región por debajo del acrosoma recibe el nombre de post-acrosomal. La región acrosomal anterior se conoce como capuchón acrosomal, mientras que la porción posterior corresponde al segmento ecuatorial. A diferencia de lo que se observa en el capuchón acrosomal, el segmento acrosomal no se vesiculiza durante la reacción acrosomal y es la región por la cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito .

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

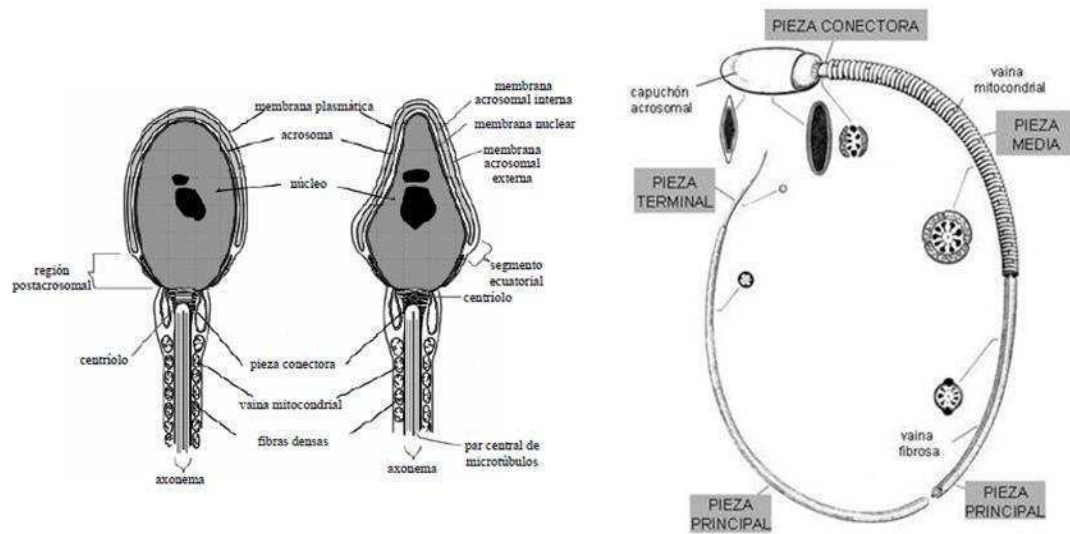


Figura 5: La gameta masculina. (A) Se muestra un esquema de un espermatozoide humano de frente y de perfil. En el mismo se puede observar las estructuras de la cabeza. (B) Esquema de un espermatozoide humano en el que se indican las diferentes estructuras internas de la cola

Capacitación de los espermatozoides

Los espermatozoides eyaculados han completado el proceso de maduración epididimaria, pero permanecen limitados en su capacidad de fertilizar. El requerimiento de una maduración adicional fue reconocido por M. C. Chang (Chang, 1951) y C. R. Austin (Austin, 1951; Austin, 1952), quienes observaron, independientemente, que los espermatozoides de los mamíferos recién eyaculados no eran capaces de fertilizar ovocitos *in vivo* hasta tanto no hubieran residido por un período de tiempo dentro del tracto reproductor femenino. A los espermatozoides que han completado este proceso se los denomina “capacitados” (Austin, 1952).

La fertilización continúa siendo la prueba definitiva de la capacitación de los espermatozoides, si bien se han propuesto otras definiciones. Por ejemplo, Austin observó en sus estudios iniciales que la penetración del espermatozoide en la ZP del ovocito (zona) *in vivo* era específicamente regulada por capacitación (Austin, 1951). Más tarde se reconoció que los espermatozoides deben llevar a cabo la reacción

acrosómal para entrar a la zona (Austin, 1985) y que este evento excitótico puede ser provocado por la ZP (Florman and Storey, 1982).

Concordantemente, la capacitación puede, operacionalmente, ser definida como aquellos eventos por los cuales el espermatozoide adquiere la habilidad de sufrir la reacción acrosomal en respuesta a señales estimuladoras de la zona (Storey, 1991). Otras definiciones también han sido propuestas basándose en la observación del aumento en la fosforilación en tirosina de las proteínas del espermatozoide, a pesar de que hoy en día se sabe que no son marcadores exactos de una completa capacitación (Yanagimachi, 1994; Ward and Kopf, 1993).

Mecanismos involucrados en la capacitación

Uno de los mayores cambios que ocurre durante el proceso de capacitación implica la desestabilización de la membrana plasmática. En diversas especies se ha demostrado que la membrana de los espermatozoides muestra una distribución asimétrica de lípidos (Muller et al., 1994; Gadella et al., 1999), la cual sería distorsionada por acción del ion bicarbonato durante la capacitación (Gadella y Harrison, 2002; Baumber y 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) (**Figura 6**). La albúmina, presente en el tracto femenino, fue propuesta como uno de los agentes removedores del colesterol (Go y Wolf, 1985; Cross, 1998; Visconti et al., 1999). Sin embargo, posteriormente, se demostró que la albúmina sólo puede remover el colesterol 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 (Simons y Toomre, 2000). 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 pérdida de colesterol, aumenta la fluidez de la membrana y, de este modo, podrían explicarse algunos fenómenos de redistribución de proteínas que se han asociado con la capacitación (Travis y Kopf, 2002), entre los que puede mencionarse a la proteína

fertilina de cobayo (Cowan et al., 2001), la galactosiltransferasa de ratón (Lopez y Shur, 1987), y la proteína epididimaria de rata CRISP1 (Rochwerger y Cuasnicu, 1992). Asimismo, esta desestabilización de la membrana plasmática, probablemente, debilita la unión de los mencionados factores decapacitantes, proteínas de superficie que están débilmente asociadas al espermatozoide epididimario y al eyaculado, las cuales inhiben la capacitación y son removidas durante el tránsito por el tracto femenino (Oliphant et al., 1985; Fraser et al., 1990). Tanto el aumento de la fluidez de la membrana como la relocalización de proteínas de membrana y la pérdida de proteínas de superficie estarían relacionados a eventos intracelulares involucrados en la capacitación. Además, ahora está bien establecido que los fosfolípidos de la bicapa se estructuran de manera asimétrica (Daleke, 2003) y esta asimetría es mantenida por las flipasas (Tanaka et al., 2011). En ciertos momentos esta asimetría colapsa, exponiéndose en la membrana externa tanto a la fosfatidil serina como a la fosfatidil etanolamina. Este evento se observa al inicio de la capacitación, y si bien no está del todo claro como participa en la capacitación se sugiere que facilitaría la remoción del colesterol de la membrana (Gadella y Harrison, 2000; Flesch et al., 2001; Boerke et al 2012).

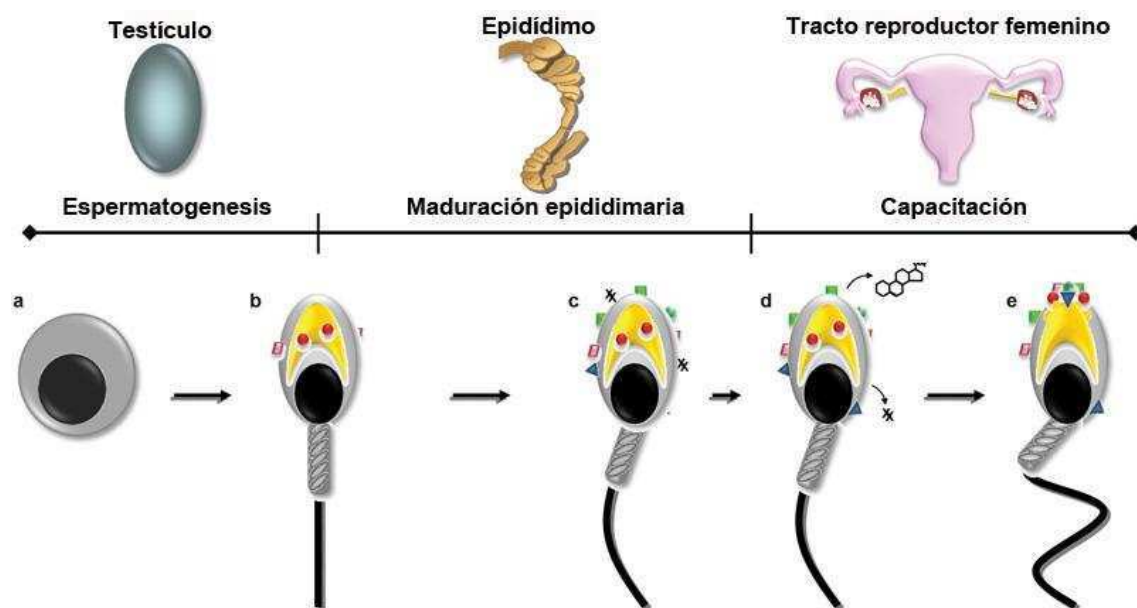


Figura 6: Espermátogenesis, maduración y capacitación espermática: El esquema muestra la formación de los espermatozoides, y cómo una vez madurados los espermatozoides, los mismos pierden colesterol y se modifica la distribución de moléculas sobre la membrana plasmática

Numerosos estudios en diferentes especies han demostrado que, además de un aceptor de colesterol como la albúmina, la capacitación sería altamente dependiente

de los iones bicarbonato (HCO_3^-) (Boatman y Robbins, 1991; Visconti et al., 1995a; Da Ros et al., 2004). El movimiento de dichos iones a través de transportadores específicos en la membrana estaría relacionado con la regulación del metabolismo del AMP cíclico (cAMP) a través de la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa del espermatozoide (Kopf et al., 2002). En el ratón, se demostró que el HCO_3^- podría entrar al espermatozoide a través de un co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Una vez dentro de la célula, el HCO_3^- interactuaría con una isoforma testicular y soluble de la enzima adenilato ciclasa (sAC), la cual aumentaría los niveles intracelulares de cAMP activando de esta forma a la proteína quinasa A (PKA). De este modo, PKA fosforilaría diversas proteínas en residuos serina y treonina para, finalmente, activar una cascada de señalización que conduciría al aumento en la fosforilación de proteínas en residuos tirosina en el espermatozoide (Visconti, 2009). A excepción de alguna de estas proteínas (Arcelay et al., 2008), queda aún por estudiar la identidad y función de esta gran cantidad de proteínas que sufren esta modificación post-traducciona durante la capacitación. La capacitación no sólo sería dependiente de aceptores de colesterol y de los iones. Recientemente ha sido demostrado la necesidad de un correcto estatus oxidativo de los espermatozoides. Esto fue observado en la disminución de los porcentajes de fertilización en espermatozoides deficientes en la enzima superóxido dismutasa (SOD), los cuales mostraron deficiencias en los patrones de fosforilación en tirosina, demostrando un rol en la capacitación espermática (Tsunoda et al., 2012).

Cambios funcionales asociados a la capacitación

Como se observó anteriormente, la mayor consecuencia de la capacitación incluye cambios en la movilidad flagelar, en la estructura de la cabeza y en la habilidad de los espermatozoides para interactuar con los ovocitos, más precisamente en la hiperactividad, quimiotaxis y reacción acrosomal:

Hiperactivación. Luego de su liberación del cauda epididimario, los espermatozoides muestran un movimiento flagelar relativamente simétrico, de baja amplitud y larga longitud de onda. El resultado es el movimiento lineal de los espermatozoides en forma progresiva hacia adelante. En contraste, el espermatozoide que fue incubado bajo condiciones capacitantes *in vitro* o que fue recuperado del oviducto cuando ya estaba capacitado *in vivo*, muestra patrones de movilidad que consisten en un incremento de la velocidad de batido flagelar; una disminución del movimiento progresivo, un correspondiente aumento en el desplazamiento lateral de la cabeza; y

un movimiento flagelar asimétrico e intenso, de gran amplitud (Yanagimachi, 1994; Cross and Razy-Faulkner, 1997; Osheroff et al., 1999; Travis et al., 2001). Se han sugerido varios roles potenciales para este tipo de motilidad. Por un lado, el espermatozoide hiperactivado desarrolla una fuerza que le permite penetrar más eficientemente las sustancias visco elásticas, como moco oviductal y la matriz extracelular del cúmulus oophorus y la ZP que rodean al ovocito (Suarez, 1996). Además de facilitar el pasaje por las células del cúmulus y la ZP, la hiperactivación podría ayudar a los espermatozoides a desprenderse de la unión que establecen con el epitelio oviductal, permitiéndoles ascender desde el oviducto al sitio de fertilización (Suarez, 1996; Yanagimachi, 1994), aumentar la probabilidad del encuentro entre los espermatozoides y el ovocito dentro de la ampúlla (Yanagimachi 1994). La hiperactivación actúa, entonces, como un filtro ya que acceden al sitio de fertilización sólo a aquellos espermatozoides que han completado el proceso de capacitación y están hiperactivados.

La comprensión de los mecanismos de hiperactivación aún no ha sido esclarecida. Se ha sugerido que la transición del modo de movilidad activada a hiperactivada podría estar regulada por factores presentes en el tracto reproductor femenino al momento de la fertilización, incluyendo fluidos foliculares o factores liberados por el complejo cúmulus oophorus que rodea al ovocito ovulado. Sin embargo aún hoy, no hay consenso respecto de las identidades de dichos factores (Fetterolf et al., 1994; Oehninger et al., 1994). Asimismo, la cascada de señales que regulan la hiperactivación tampoco se haya completamente descripta, aunque se sabe que el Ca^{2+} sería fundamental, y que la interacción de este ion con el axonema de la cola del espermatozoide sería capaz de desencadenar la hiperactivación. Además del Ca^{2+} , tanto el cAMP como el ATP serían requisitos fundamentales para el mantenimiento del movimiento hiperactivado. La relevancia de la hiperactividad para la fertilidad está dada por resultados indicando que ratones mutantes para canales de Ca^{2+} (Ho et al., 2009) o enzimas involucradas en la glicolisis (Kota et al., 2010) tienen espermatozoides incapaces de hiperactivarse y son infértiles.

Quimiotaxis. Las gametas, antes de establecer el contacto (físico) requerido para la fertilización, establecen un contacto (químico) a distancia. Dentro de este último tipo de comunicación, se encuadra la espermo-quimiotaxis, la que se define como el movimiento direccional de los espermatozoides guiado por un gradiente de

concentración de moléculas atrayentes, producidas por el ovocito o el microambiente ovular. La quimiotaxis espermática hacia factores del ovocito o del tracto reproductor femenino, se ha observado en especies marinas, en anfibios y en mamíferos (Vacquier, 1998; Eisenbach, 2004). En este último grupo se ha reportado que los espermatozoides de humano (Eisenbach, 1999), y de ratón (Giojalas and Rovasio, 1998; Oliveira et al., 1999), entre otros, responden quimiotácticamente hacia factores presentes en el fluido folicular. El fenómeno quimiotáctico se observa generalmente en una subpoblación de espermatozoides de entre 10%-20%, dependiendo de la especie, cuando el fluido folicular se encuentra diluido entre 1.000 y 10.000 veces (Fabro et al., 2002). Este grupo de células quimiotácticas está constituido sólo por espermatozoides capacitados, siendo dicho estado quimiotáctico-capacitado de carácter transitorio. Más aun, trabajos recientes indican que las señales quimiotácticas estarían modulando el movimiento de los espermatozoides ya hiperactivados que se desprenden del isthmus, dirigiéndolos hacia el cúmulus (Chang y Suarez, 2010). Aunque se desconoce la identidad del (los) atrayente(s) presente(s) en el fluido folicular, se ha sugerido como posibles candidatos, entre otros, al aldehído aromático bourgeonal que activa los receptores olfatorios OR1D2 en el espermatozoide (Gakamsky et al., 2009; Spehr et al., 2003; Spehr et al., 2004), y péptidos pequeños de hasta 8 kDa denominados quemoquinas, tales como RANTES, CCL7 (Isobe et al., 2002; Tamba et al., 2008) y la hormona esteroidea progesterona (Teves et al., 2006) por ser ésta el principal esteroide del fluido folicular que además, continúa siendo secretado por las células del cúmulus oophorus después de la ovulación. En ese sentido, es sabido que la progesterona regula los canales de calcio "CatSper" presentes en el flagelo de los espermatozoides humanos, abriendo la posibilidad de que dichos canales también estén involucrados en la regulación de las señales de calcio del flagelo durante la quimiotaxis (Lishko et al., 2011; Strunker et al., 2011).

Reacción acrosomal. Tal como se mencionara anteriormente, el acrosoma es una estructura membranosa que cubre la porción anterior del núcleo del espermatozoide. Dentro del acrosoma, existe una complicada matriz proteica así como diversas enzimas hidrolíticas, principalmente la proteasa acrosina y la hialuronidasa (Yudin et al., 1999b). La reacción acrosomal (RA) consiste en la liberación del contenido acrosomal, constituyendo un proceso de exocitosis. La reacción comienza con la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos, con excepción del segmento ecuatorial (**Figura 7**). En los sitios de fusión, la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa forman vesículas, creándose

poros por los que se libera el contenido acrosomal. Al igual que la fusión de membranas en otros sistemas tales como la que tiene lugar 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 este sentido, muy recientemente, se descubrió la participación de Rab27 conjuntamente con Rab3A en la formación de los poros al comienzo de la RA (Bustos et al., 2012). Además, se ha encontrado que las GTPasas dinamina 1 y dinamina 2, participarían en la RA controlando la dinámica de los poros por los cuales comienza la exocitosis acrosomal (Reid et al., 2012). Como resultado de la RA, la membrana acrosomal interna adquiere continuidad con la membrana plasmática.

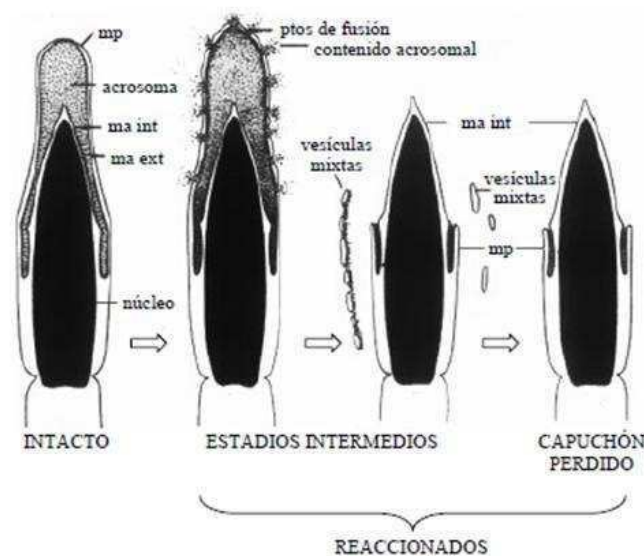


Figura 7: Progresión de la reacción acrosomal. Se muestra un diagrama representando las etapas de la RA en la cabeza del espermatozoide de ratón. mp: membrana plasmática, ma int: membrana acrosomal interna, ma ext: membrana acrosomal externa.

A diferencia de la capacitación, la RA es muy rápido e irreversible. El estado capacitado de los espermatozoides es una condición esencial para que los mismos puedan sufrir una RA fisiológica (Fraser, 1998). Es importante diferenciar la RA fisiológica o verdadera de la RA falsa, que consiste en la pérdida del capuchón acrosomal por muerte de los espermatozoides. Existen dos tipos de RA verdadera, una inducida por el ovocito y una espontánea, que se produce en ausencia del ovocito. El principal inductor de la RA, y el que ha sido más estudiado en numerosas especies, es la ZP (Florman and Storey, 1982; Uto et al., 1988). Se ha demostrado que sus componentes solubilizados también son eficientes inductores de la RA (Florman and Storey, 1982; Bleil and Wassarman, 1983; Cherr et al., 1986; O'Rand and Fisher,

1987; Florman and First, 1988; Berger et al., 1988; Cross et al., 1988). Es ampliamente aceptado que la glicoproteína ZP3 sería el receptor para el espermatozoide en la ZP responsable de la RA inducida (Yanagimachi, 1994). La actividad de receptor sería ejercida por los residuos glicosílicos que se unirían a componente/s de la membrana del espermatozoide. La unión de los oligosacáridos de ZP3 a distintos sitios en el espermatozoide produciría la agregación de dichos sitios, lo cual induciría la RA (Leyton and Saling, 1989). Si bien la ZP sería el inductor principal de la RA, existen evidencias de que la progesterona que se encuentra en el fluido folicular que acompaña a las células del cúmulus también tiene la capacidad de inducirla (Parinaud et al., 1992; Blackmore, 1993; Roldan et al., 1994). Se ha postulado un efecto sinérgico entre elementos presentes en el cúmulus y la ZP sobre el espermatozoide para completar la reacción (Cherr et al., 1986). Por lo tanto, no existiría en el medio de fertilización un único componente crucial para el desencadenamiento de la RA.

Los Dres. Kim y Gerton (2003) propusieron un modelo denominado “de exocitosis acrosomal”, en el que replantearon el mecanismo de la RA y el papel de las moléculas acrosomales en la interacción con las cubiertas del ovocito. Según estos autores, la RA sería un proceso gradual, espontáneo, que sería acelerado por la ZP pero no iniciado por la misma (**Figura 8**). Según este modelo, los espermatozoides no deben estar intactos para unirse a la ZP. A favor de esta teoría, recientemente se demostró que la mayoría de los espermatozoides que fertilizan a los ovocitos comenzarían a reaccionar sobre el cúmulus y no sobre la ZP (Jin et al., 2011). Esto fue apoyado con la reciente demostración de que los espermatozoides perivitelinos (ya reaccionados y sin capuchón acrosomal) fueron capaces de fertilizar ovocitos *in vitro* (Inoue et al., 2011).

Por ultimo, 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 (Huang and Yanagimachi, 1985). Por lo tanto, la RA tendría una función dual: permitir que el espermatozoide pueda atravesar la ZP y el cúmulus y, posteriormente, pueda fusionarse con el oolema.

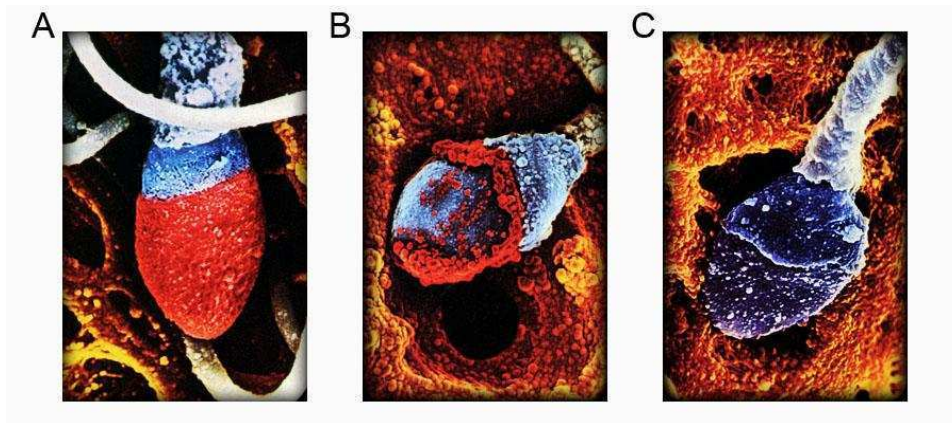


Figura 8: Reacción acrosomal. Fotografía de microscopio electrónico de barrido. (A) sin reaccionar, (B) reaccionado, estadio intermedio (C) reaccionado, sin capuchon acrosomal.

Proceso de fertilización

Penetración de los espermatozoides a través del cúmulus oophorus

El cúmulus que rodea al ovocito durante las últimas etapas de folículoogénesis posee funciones tanto previas (durante la folículoogénesis) como durante la ovulación (captura del ovocito ovulado por el oviducto) (Yanagimachi, 1994; Bedford, 2004; Talbot et al., 2003). En mamíferos euterianos (a excepción de los ungulados), una vez en el oviducto, las células del cúmulus son retenidas ya que participan en las primeras etapas de la interacción espermatozoide-ovocito (**Figura 9**).

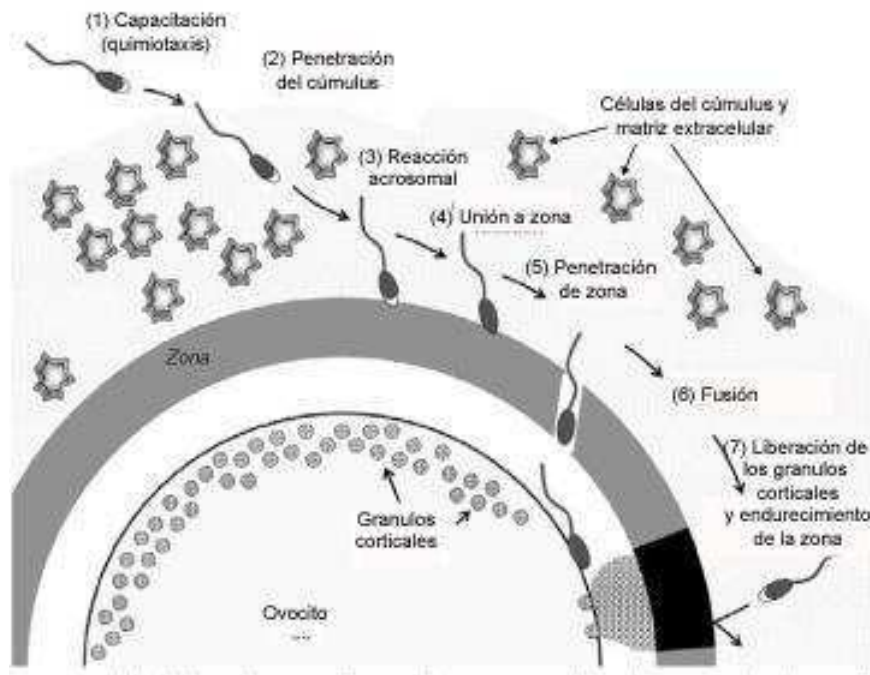


Figura 9: Esquema general del proceso de de fertilización.

El primer modelo que intentó explicar la penetración del cúmulus observó que la actividad dispersora de la matriz del cúmulus por parte del espermatozoide se debía a la hialuronidasa (Lin et al., 1994) presente en el acrosoma (Overstreet et al., 1995) ya que esta enzima era detectada en forma soluble en la matriz del cúmulus cuando los espermatozoides habían reaccionado dentro del mismo (Yanagimachi, 1972; Bedford, 1970). Como resultado, se propuso que la reacción acrosomal, necesariamente, ocurría mientras el espermatozoide estaba entrando en la matriz del cúmulus y que, la subsiguiente liberación del contenido acrosomal localmente, dispersaba aquella matriz y facilitaba el pasaje del espermatozoide hacia la ZP (Yanagimachi, 1994).

Actualmente, se propone que la reacción acrosomal no sería absolutamente requerida para la actividad de las hialuronidasas hacia substratos extracelulares. Algunas evidencias han sugerido la presencia de un pool de hialuronidasas sobre la superficie del espermatozoide sumadas a las presentes en el acrosoma (O'Rand et al., 1986). En este sentido, se ha descrito que SPAM1 (sperm adhesion molecule 1, originalmente denominada PH-20), una proteína testicular identificada por primera vez en la superficie del espermatozoide de cobayo (Primakoff et al., 1985), presenta actividad de hialuronidasa en las diferentes especies en las que ha sido detectada (Li et al., 1997; Gmachl et al., 1993; Lin et al., 1994). La relevancia de esta proteína para la penetración del cúmulus ha sido replanteada en vista de que los ratones knockout para SPAM1 son fértiles, a pesar de sufrir un retardo en la dispersión de las células del cúmulus respecto de los animales normales (Baba et al., 2002). 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 SPAM1 y HYAL5, por lo que entonces HYAL5 estaría compensando la función de SPAM1 en los animales knockout antes descritos (Kim et al., 2005). Más aún, la reciente generación de ratones doble knockout para SPAM1 y las serin-proteasas TESP5 o ACR (acrosina) sugieren que ambas proteínas actuarían cooperativamente junto a SPAM1 en la penetración del al cúmulus (Zhou et al., 2012).

Interacción espermatozoides-ZP

Unión de los espermatozoides a la ZP. Durante la fertilización in vivo, el espermatozoide que ha atravesado el cúmulus encuentra la ZP. Esta matriz es porosa con respecto a moléculas no sólo pequeñas sino también de gran tamaño tales como

anticuerpos, e incluso partículas virales. Pero aún así, representa una barrera para el espermatozoide. Para alcanzar la membrana plasmática del ovocito, el espermatozoide se adhiere al borde exterior de la ZP y luego, se mueve dentro y a través de la matriz de la ZP (**Figura 10**). La etapa de unión es mediada por la interacción entre moléculas de la superficie del espermatozoide y de la ZP. El modelo clásico, aceptado durante varios años, comprende dos pasos: 1) la “unión primaria” del espermatozoide intacto a la ZP3, que desencadenaría la RA, y 2) la “unión secundaria” del espermatozoide reaccionado, a través de ZP2. Sin embargo, algunos autores proponen un nuevo modelo en el cual el espermatozoide interactuaría con una estructura supramolecular compuesta por ZP2 y ZP3, en vez de con alguna única glicoproteína en particular (Rankin et al., 2003; Hoodbhoy and Dean, 2004). Asimismo, estos trabajos indican que la unión del espermatozoide a la ZP estaría dada sólo por el estado de ZP2, ya que una ZP2 intacta permitiría la unión, mientras que una ZP2 clivada, impediría dicha interacción (Gahalay et al., 2010).

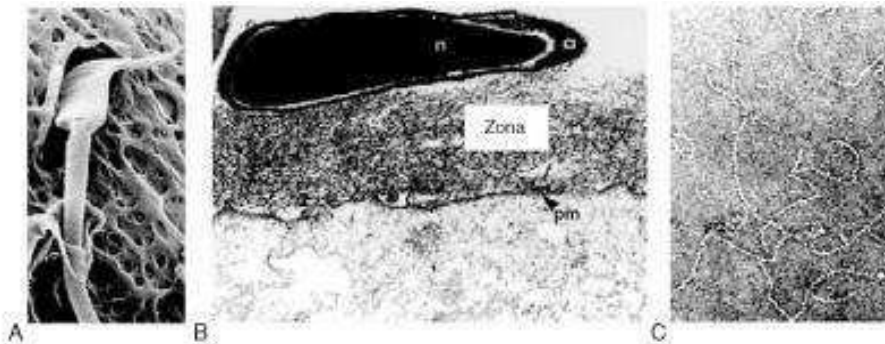


Figura 10: Interacción espermatozoide-ovocito en el ratón. A) Fotografía de microscopio electrónico de barrido de un espermatozoide penetrando ZP de un ovocito. B) Fotografía de microscopio electrónico de transmisión de la cabeza de un espermatozoide unido a la ZP de un ovocito. pm: membrana plasmática, ZP: zona pellucida, n: núcleo, a: acrosoma. C) Surcos dejados sobre la zona transitada por espermatozoides

Moléculas involucradas. Existe controversia en cuanto a la identidad del ligando para la ZP presente en el espermatozoide. Uno de los candidatos más extensamente estudiados ha sido la b-1,4-galactosiltransferasa 1 (Shur and Hall, 1982; Lopez and Shur, 1987), aunque su relevancia para la fertilidad ha sido luego replanteada en vista de que los ratones knockout para esta proteína son fértiles, a pesar de presentar niveles muy bajos tanto de RA inducida por ZP3 como de fertilización de ovocitos *in vitro* (Lu and Shur, 1997). Otros candidatos alternativos propuestos son sp56 (Bleil and Wassarman, 1990) y zonadhesina (Hardy and Garbers, 1995) pero debido a su

localización intra-acrosomal (Foster et al., 1997; Kim et al., 2001b) existían controversias en cuanto a su disponibilidad para interactuar con ZP3. Cabe aclarar que, recientemente, se mostró que zonadhesina si bien participa en la interacción con la ZP, su un rol principal sería en la regulación de la especie/especificidad (Tardiff y Cornier, 2011). Según el modelo clásico, estas moléculas intra-acrosomales no podrían actuar en la “unión primaria” ya que el espermatozoide se encontraría intacto al momento de unirse a ZP3, mientras considerando los modelos actuales en los cuales la reacción inicia antes de contactar la ZP, las moléculas de la matriz acrosomal podrían asociarse a la ZP sin ser considerado una unión secundaria. Se ha descrito un cuarto candidato, denominado SED1 (Ensslin et al., 1998) para el cual recientemente, se ha identificado un homólogo en ratón y cuyos estudios con animales KO para SED1 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 and Shur, 2003).

Otras moléculas del espermatozoide involucradas en la unión a la ZP, incluyen algunas proteínas tales como SPAM1 (Myles and Primakoff, 1997; Yudin et al., 1999) y proacrosina/acrosina (Richardson et al., 1994; Crosby et al., 1998; Furlong et al., 2000; Howes et al., 2001a). En cuanto a SPAM1, tal como se mencionara anteriormente, los machos KO para esta proteína resultaron fértiles (Baba et al., 2002), probablemente por redundancia funcional con la hialuronidasa HYAL5 (Kim et al., 2005). Asimismo, se postula que esta nueva proteína, que es liberada durante la RA, podría “despolimerizar” localmente a la matriz del cúmulus cerca o en la superficie de la ZP, permitiendo así que la cola del espermatozoide se mueva libremente, 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 unión/penetración de la ZP 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 control (Adham et al., 1997). No obstante, una combinación de estudios posteriores a nivel genético, bioquímico y funcional apoya la hipótesis de 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., 2001a). Posteriormente, el grupo del Dr. Baba demostró que los espermatozoides deficientes en acrosina conservaban aún la actividad de proteasa, sugiriendo que otra proteasa podría estar involucrada en la unión/penetración de la ZP, e identificando cinco enzimas

denominadas Tesp1-5 (testis-specific serine proteases) (Honda et al., 2002). Sin embargo, los ratones KO para Tesp5 son fértiles a pesar de tener una muy disminuida capacidad para interactuar con la ZP (Yamashita et al., 2008).

Penetración de la zona pelúcida. La interacción entre el espermatozoide y la ZP continúa con la etapa de penetración de la ZP para la cual han sido propuestas dos hipótesis (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 ZP 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 ZP. La segunda hipótesis, denominada hipótesis mecánica, propone que la RA permitiría la exposición del *perforatorium*, una estructura rígida, que "cortaría" la ZP y que, conjuntamente con la motilidad hiperactivada presente en los espermatozoides, favorecería 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. En este sentido, el grupo de Dean y colaboradores propuso que el espermatozoide intacto reaccionaría al atravesar la ZP por un efecto mecánico de los poros de la misma (Baibakov et al., 2007). Sin embargo, actualmente, y por los trabajos comentados de Hirohashi, esta teoría no tendría tanto consenso (Jin et al., 2011).

Cada vez crece más la idea de que la unión a la ZP y la especie especificidad no están dados por una sola proteína sino por varias, concepto también apoyado por la observación de la agregación de varias proteínas que participan en la interacción espermatozoide-ZP localizadas en la región de la cabeza del espermatozoide por donde ocurre dicha interacción (Reid et al., 2011).

Fusión del espermatozoide con el ovocito

Mecanismo de Fusión. La fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito constituye un evento clave en el proceso de fertilización, ya que sólo luego de la ocurrencia de la fusión un ovocito puede considerarse fertilizado. La etapa de fusión 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, seguida luego de un breve período, por una abrupta declinación o cesación del movimiento de la cola (Gaddum-Rosse, 1985) como consecuencia de la depolarización de membranas que ocurre luego de la fertilización. Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi and 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 11**).

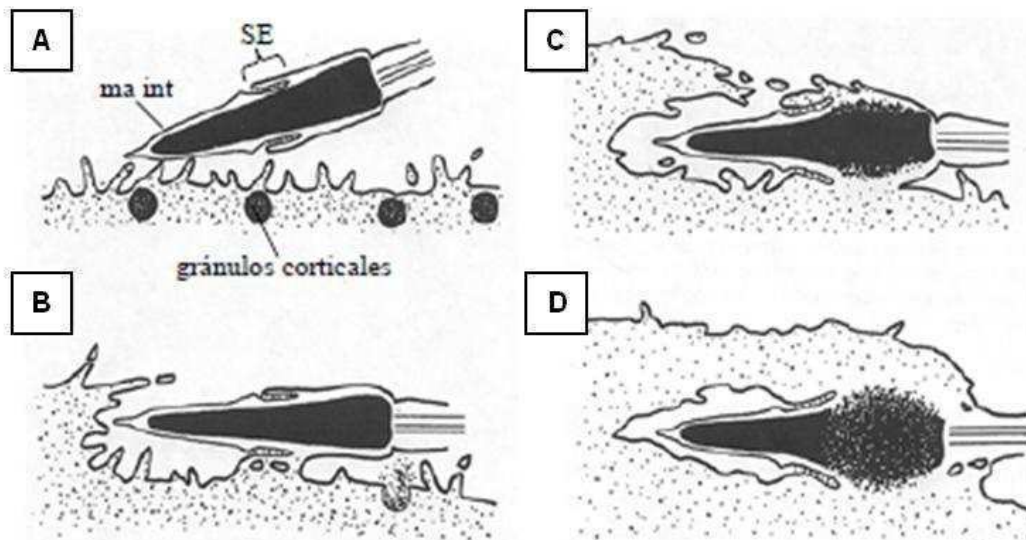


Figura 11: Fusión espermatozoide-ovocito. Se muestra un esquema de los eventos involucrados en el proceso de fusión de gametas. ma int: membrana acrosomal interna, SE: segmento ecuatorial.

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 and Barros, 1984), a través de la cual, raramente, ocurre la fusión con el espermatozoide (Johnson et al., 1975; Ebensperger and Barros, 1984). Si bien el espermatozoide al asociarse al oolema entra en contacto con las microvellosidades, aún no se conoce si las mismas son esenciales para la ocurrencia de la fusión (Bedford and Cooper, 1978). En el caso del espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al segmento ecuatorial es la que primero se fusiona con el ovocito (Arts et al., 1993; Yanagimachi, 1994). La motilidad parecería no ser un requisito para la ocurrencia de la fusión, ya que ha sido demostrado que espermatozoides inmóviles o de muy baja motilidad son capaces de fusionarse con el ovocito. 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).

Moléculas involucradas. 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 de 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 replanteada en vista de que un estudio, utilizando diferentes combinaciones de animales *knockout* 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 de que esta tetraspanina haya sido implicada en la fusión de membranas en otros sistemas celulares (Tachibana and 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 *knockout* 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 con el espermatozoide. Estos estudios fueron los primeros en identificar a una molécula del ovocito esencial para la fusión de gametas y para la fertilidad femenina. 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 que CD9 generaría sitios específicos de adhesión que regularían la fusión espermatozoide-ovocito acercando y reuniendo a todos los intermediarios de este proceso (Jégou et al., 2011) y que la porción C terminal de esta molécula estaría involucrada en la formación de dichos complejos y sitios de adhesión (Wang et al.,

2011). Además, se ha descrito la existencia de vesículas membranosas secretadas por el ovocito y presentes en el espacio perivitelino. Estas vesículas conteniendo CD9 serían capaces de interactuar con el espermatozoide y participarían en la fusión de gametas (Miyado et al., 2008). Si bien, los animales KO para proteínas del ovocito unidas al oolema vía glicosilfosfatidilinositol (GPI) también presentan ovocitos con la fusogenicidad altamente afectada (Alfieri et al., 2003), la identidad de las proteínas que pudieran ser relevantes para la fusión, aún se desconoce.

Respecto a las moléculas del espermatozoide implicadas en fusión es importante mencionar a la familia de proteínas denominada ADAM (a disintegrin and a metalloprotease domain) está compuesta por alrededor de 40 miembros (revisión de trabajos en (Kim et al., 2006)), 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 (Evans, 1999).

Los estudios en los cuales la carencia de la proteína en los espermatozoides resulta en animales infértiles, se limita únicamente a una proteína denominada Izumo. La proteína Izumo corresponde a un miembro de expresión testicular de la familia de inmunoglobulinas IgSF localizado en el acrosoma del espermatozoide. 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. Los machos mutantes resultaron infértiles y, más aún, la capacidad fusogénica de los espermatozoides fue el único parámetro espermático comprometido que presentaron estos animales (Inoue et al., 2005). Asimismo, se observó que, luego de la RA, la proteína Izumo se relocizaba en la región por la cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito. En este sentido, resultados utilizando ratones knockout para *Tssk6* (testis-specific serine kinase 6) mostraron que los espermatozoides *Tssk6*^{-/-} eran incapaces de fusionarse con el ovocito debido a que la proteína Izumo no se redistribuía correctamente (Sosnik et al., 2009).

Cabe destacar que otras proteínas espermáticas involucradas en el proceso de fusión son las proteínas, CRISP1 y CRISP2, sobre las que ahondaremos más adelante.

Consecuencias de la fusión

Luego de la fusión, el ovocito inicia una serie de eventos conocidos, conjuntamente, como “activación” y que incluyen el reinicio de la meiosis detenida en metafase II desde la ovulación, la extrusión del segundo corpúsculo polar conteniendo la mitad del contenido cromosómico, la replicación del ADN y, finalmente, la primera división mitótica (Kurokawa et al, 2004). Dichos cambios son de vital importancia ya que darán origen a un individuo nuevo y, a su vez, desencadenarán mecanismos tendientes a evitar la entrada de más de un espermatozoide al ovocito, impidiendo la polispermia y asegurando así la viabilidad del embrión. En todos los animales, la señal universal responsable de la activación del ovocito es el aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma de la gameta femenina unos segundos luego de que la fusión ha ocurrido (Yanagimachi, 1994). Sin embargo, el mecanismo por el cual se desencadena esta liberación de Ca^{2+} aún no ha sido completamente dilucidado (revisión de trabajos en (Kurokawa et al., 2004).

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). Pocos minutos luego de producida la fusión, más del 95% de los gránulos corticales ha sido expulsado por exocitosis (reacción cortical) (Ducibella, 1991; Hoodbhoy and Talbot, 1994). Su función es modificar tanto la ZP (“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 and O’Rand, 1988; Hatanaka et al., 1992; Ducibella et al., 1993). Sin embargo, se desconocía la identidad de dichas proteasas hasta la reciente identificación de “ovastacina” la cual clivaría a la ZP2 (Burkart et al., 2012). Por otro lado, se ha determinado que, durante la liberación de los gránulos corticales, las membranas de los mismos se fusionan con el oolema, afectando la composición de la membrana de los ovocitos fertilizados (Stewart-Savage and Bavister, 1988; Horvath et al., 1993). El contenido liberado por los gránulos también afectaría componentes del oolema, en particular a aquellos involucrados en la unión y la fusión de las gametas (Hoodbhoy and Talbot, 1994). La contribución de la ZP y el oolema al bloqueo de la polispermia es variable según la especie. En algunos animales como el hámster, humano y perro, la prevención de polispermia depende principalmente de la reacción de zona. En otras especies, como el conejo y el murciélago, el bloqueo depende, principalmente, de la

modificación del oolema, por lo cual estos ovocitos presentan normalmente espermatozoides supernumerarios en el espacio perivitelino. Existe, además, un tercer grupo de especie, que incluye a la rata, ratón y cobayo, en el que el bloqueo de polispermia depende de ambos (Austin, 1961; Yanagimachi, 1994).

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 descondensa y se transforma en el pronúcleo masculino. En ambos pronúcleos comienza la síntesis de ADN. Una vez que los pronúcleos han completado su desarrollo, migran al centro del ovocito, sus envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar lugar a la primera división mitótica.

Durante más de treinta años, nuestro grupo se ha dedicado al estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de la interacción de gametas, utilizando como modelo a la proteína epididimaria DE identificada por nuestro laboratorio (Cameo y Blaquier 1976) y, posteriormente, denominada CRISP1 por ser el primer miembro descrito de la familia CRISP (Proteínas Secretorias Ricas en Cisteínas). Las evidencias encontradas indican que CRISP1 sería un claro mediador del proceso de fertilización (Cohen et al., 2011). La familia CRISP es miembro de la superfamilia CAP, compuesta por múltiples familias, de las cuales las dos mejor caracterizadas son las familias CRISP y GLIPR1 (Glioma Patogenesis Relacionadas 1). Considerando que las proteínas CRISP y GLIPR1 son altamente homólogas entre sí, y que existen evidencias sugiriendo la presencia de posibles péptidos pertenecientes a las GLIPR1 en los espermatozoides (Sleight et al., 2005), nuestros estudios se han centrado en estas dos familias, cuyas características se describen a continuación.

Superfamilia CAP

La superfamilia de proteínas CAP fue originalmente definida por el agrupamiento de tres grandes familias de proteínas que poseen una gran similitud de secuencia entre sí: la familia CRISP (Cysteine-Rich Secretory Proteins), la familia Ag5 (Antigen 5) y la familia Pr-1 (Pathogenesis-related 1). Las proteínas CRISP se encuentran altamente

enriquecidas tanto en el tracto reproductivo masculino de mamíferos (Gibbs et al., 2008) como en los venenos de reptiles y otros vertebrados (Yamazaki and Morita, 2004). Por su parte, las proteínas Ag5 son las más abundantes e inmunogénicas presentes en los venenos de insectos (King and Spangfort, 2000) y las Pr-1, las más expresadas en plantas en respuesta a una invasión por patógenos (Van Loon et al., 2006). Si bien, originalmente, la superfamilia CAP se encontraba formada por estas tres familias, un reciente análisis filogenético indica que serían nueve las familias que integran la superfamilia CAP: CRISP, GLPR1, GLIPR2, PI15, PI16, CRISPLD1, CRISPLD2, MRL y R3HDML.

Las proteínas CAP estructuralmente están caracterizadas por compartir un dominio N-terminal común denominado PR-1 el cual contiene los dos motivos o secuencias consenso denominados "Signature 1" y "Signature 2". La gran mayoría, pero no todos los miembros de la superfamilia CAP, poseen una secuencia denominada HINGE, que es muy rica en cisteínas y que sigue el esquema Cx2Cx5Cx4C. La región C-terminal es distintiva de cada familia en particular y, mientras que en algunas esta región es variable, muy extensa y particular, en otras es muy pequeña o no se encuentra presente. Las CAP representan un caso de evolución "mosaico" ya que poseen regiones que han permanecido constantes a lo largo de la evolución, indicativas de funciones altamente conservadas (PR-1, Signatures y Hinge), como así también regiones con una significativa diversificación entre las subfamilias (C-terminal) (**Figura 12**). Estos dos patrones evolutivos, aparentemente opuestos, han dado origen a una superfamilia con una estructura terciaria formada por dos porciones (una conservada y una variable), lo que aporta una gran diversidad de funciones. En términos generales, las proteínas CAP han sido identificadas en tres ambientes: 1) como componentes normales de una célula o tejido, 2) incrementadas durante la enfermedad o 3) introducidas por un agente externo produciendo un efecto tóxico o de evasión inmune. En el caso específico de mamíferos, las proteínas CAP han sido identificadas en numerosos tejidos de ratón y de humanos, habiéndoseles propuesto roles en reproducción, desarrollo y sistema inmune, como así también en patologías tales como el cáncer, daño neuronal, pancreatitis, y fallas cardíacas, por lo cual las CAP son cada día más reconocidas como componentes claves en la fertilidad, la salud y la enfermedad.

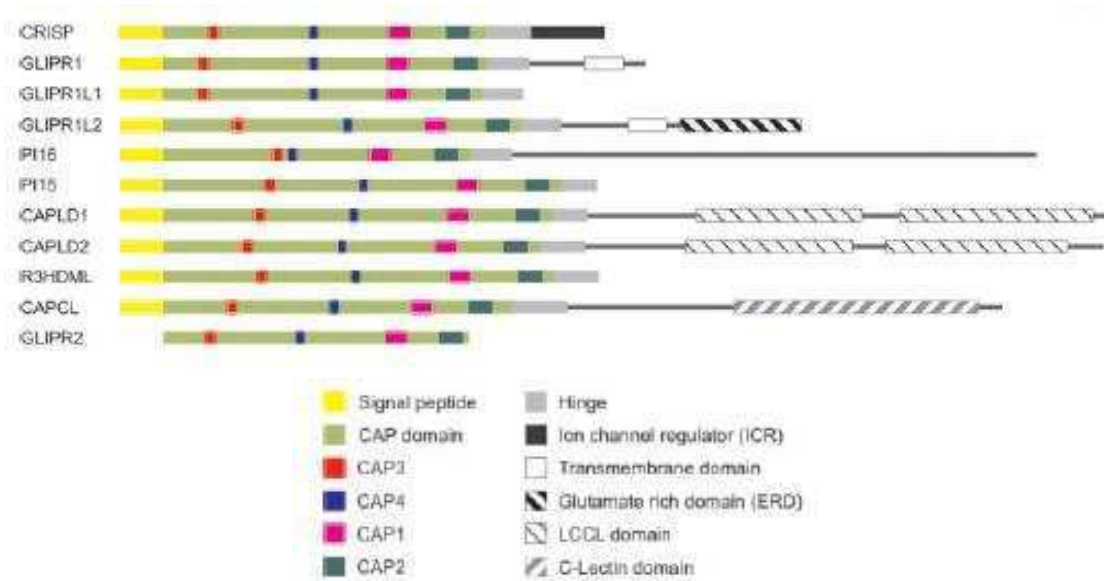


Figura 12. Esquema de las familias que forman la superfamilia CAP. En colores se muestran las regiones consenso que forman parte de la superfamilia, y, en escala de grises, las terminaciones propias de cada familia.

Pese a la constante incorporación de nuevas proteínas a la superfamilia CAP, aún existe un conocimiento muy limitado acerca de la función biológica de la mayoría de sus miembros. En ese sentido, las dos familias mejor caracterizadas son la familia CRISP, la cual consta de cuatro proteínas descritas en mamíferos y la familia GLIPR1 formada por tres proteínas identificadas.

Proteínas CRISP

Las proteínas CRISP se encuentran presentes en diversas especies de mamíferos, como así también en los venenos de diferentes serpientes, lagartos y caracoles (Morrissette et al., 1995; Milne et al., 2003; Yamazaki and Morita, 2004), en huevos y embriones de rana (Olson et al., 2001; Schambony et al., 2003), y en embriones de gallina (Smith et al., 2001). Reciben este nombre por ser proteínas secretorias ricas en cisteínas, conteniendo un total de 16 cisteínas, 10 de las cuales se localizan en el extremo carboxi-terminal de la molécula (Cohen et al., 2000b). El análisis cristalográfico de algunos miembros de la familia CRISP indicó que estas proteínas presentan una estructura general caracterizada por la presencia de dos dominios

definidos conectados por una pequeña región que actúa de bisagra. Los dominios han sido caracterizados como: el C-terminal, que recibe el nombre de Cysteine Rich Domain (CRD) o dominio CRISP, y el N-terminal, llamado Pathogenesis Related (PR-1) o dominio CAP (Guo et al., 2005). De acuerdo a las evidencias obtenidas hasta el momento, se ha sugerido que cada uno de estos dominios tendría funciones biológicas independientes. Si bien existen numerosos miembros de la familia CRISP expresados en diversos sistemas y organismos, en esta Tesis nos centraremos en las cuatro presentes en mamíferos.

CRISP1

La proteína epididimaria de rata CRISP1 (32 kDa), es una de las principales glicoproteínas secretadas por el epidídimo de rata, y ha sido identificada (Cameo and Blaquier, 1976), caracterizada y purificada en nuestro laboratorio (Garberi et al., 1979; Garberi et al., 1982). CRISP1 es sintetizada, en forma andrógeno-dependiente en los segmentos proximales del epidídimo (Kohane et al., 1983) y se asocia a la región dorsal de la cabeza del espermatozoide a medida que los mismos transitan por el epidídimo (Kohane et al., 1980a; Kohane et al., 1980b). La inseminación de hembras superovuladas con espermatozoides previamente expuestos al anticuerpo específico contra CRISP1 resultó en una inhibición significativa del porcentaje de ovocitos fertilizados, indicando que CRISP1 jugaría un rol importante en el proceso de fertilización (Cuasnicu et al., 1984). La relevancia de CRISP1 para la fertilidad fue confirmada, posteriormente, por experimentos en los cuales la inmunización de ratas hembras y machos con CRISP1 produjo anticuerpos específicos contra la proteína en más del 90% de los animales, como así también una inhibición significativa de la fertilidad en ambos sexos (Cuasnicú et al., 1990; Ellerman et al., 1998a; Perez Martinez et al., 1995; Ellerman et al., 2008).

CRISP1, originalmente localizada en la región dorsal del acrosoma, migra al segmento ecuatorial concomitantemente con la ocurrencia de la reacción acrosomal (RA) (Rochwerger and Cuasnicu, 1992). Dado que el segmento ecuatorial es la región por la cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito, se investigó el posible papel de CRISP1 en este paso específico de la fertilización. Los resultados indicaron que, tanto la presencia de anti-CRISP1 como de la proteína CRISP1 purificada durante la co-

incubación de gametas, inhibía significativamente la fusión espermatozoide-ovocito sin afectar la etapa de unión entre ambas gametas (Cuasnicú et al., 1990; Rochwerger et al., 1992). Estos resultados confirmaron la participación de CRISP1 en un evento posterior a la unión de gametas y conducente a fusión, como así también la existencia de sitios complementarios para esta proteína en la membrana plasmática del ovocito (oolema). Ensayos posteriores de inmunofluorescencia indirecta (IFI) permitieron detectar la presencia de dichos sitios en toda la superficie del ovocito, excepto en una región a la que se denominó área negativa y que resultó coincidente con la región de membrana que recubre el huso meiótico y por la cual el espermatozoide no se fusiona con el ovocito (Cohen et al., 1996; Rochwerger et al., 1992). De este modo, mientras la proteína CRISP1 estaría localizada en la región fusogénica del espermatozoide, sus sitios complementarios se localizarían en la región fusogénica del ovocito. Estos resultados representaron una importante contribución al campo de la fusión de gametas ya que constituyeron la primera evidencia de la existencia de sitios específicos para una proteína del espermatozoide en la superficie del ovocito de mamíferos. Posteriores resultados indicaron que CRISP1 se asociaría a la membrana del espermatozoide con dos afinidades diferentes, dando lugar a la existencia de dos poblaciones sobre la gameta: una población mayoritaria, asociada débilmente por interacciones iónicas y que se libera de la célula durante el proceso de capacitación, y una población fuertemente unida por un mecanismo aún desconocido, que corresponde a la proteína que migra al segmento ecuatorial y que participa en el proceso de fertilización (Cohen et al., 2000b).

El análisis de la secuencia de CRISP1 reveló que la misma presentaba una significativa homología con otras dos proteínas epididimarias: la proteína AEG de ratón (Haendler et al., 1993; Mizuki and Kasahara, 1992) y la proteína ARP/hCRISP1 de humano (Hayashi et al., 1996; Kratzschmar et al., 1996). Resultados de nuestro laboratorio indican que, al igual que CRISP1 de rata, las proteínas de ratón y humano también participan en el proceso de fusión de gametas a través de sitios de unión en la superficie de los respectivos ovocitos (Cohen et al., 2000a; Cohen et al., 2001). Posteriores estudios de nuestro grupo revelaron que, además de su rol en el proceso de fusión de gametas, CRISP1 también participaría en la etapa previa de interacción espermatozoide-ZP, más específicamente en la primera etapa de unión a la ZP a través de su interacción con sitios complementarios presentes en la ZP tanto de roedores (Busso et al., 2007a), como de humano (Tesis Doctoral Dra. Julieta Maldera).

Mientras se ha encontrado que el dominio CRD de varias proteínas CRISP presenta la capacidad de regular canales iónicos (Gibbs et al., 2006; Guo et al., 2005), resultados de nuestro laboratorio utilizando la proteína recombinante expresada en bacterias, así como fragmentos recombinantes y péptidos sintéticos, indican que el dominio N-terminal contendría el sitio por el cual CRISP1 se une a la membrana plasmática del ovocito (Ellerman et al., 2006). Más aún, hemos encontrado que dicha actividad reside en una región de sólo 12 aminoácidos que corresponde a una secuencia consenso compartida por todas las proteínas CRISP denominada Signature 2 (S2) (Ellerman et al., 2006). Por su parte, nuestras observaciones indican que la capacidad de CRISP1 de interactuar con la ZP no residiría en una región específica de la molécula sino que dependería de la conformación de la misma (Busso et al., 2007a). En conjunto, no sólo habría dos poblaciones de CRISP1 sobre el espermatozoide, sino también dos dominios en la molécula con dos actividades diferentes. En base a lo expuesto, es posible que mientras la capacidad de unirse al ovocito se encuentre asociada a la proteína fuertemente unida y resida en el dominio PR-1, la proteína CRISP1 débilmente unida al espermatozoide cumpla un rol en el proceso de capacitación regulando canales iónicos a través del dominio CRD. Recientes resultados indican que la población de CRISP1 débilmente unida al espermatozoide se asociaría a través de la formación de un complejo entre la proteína y el Zinc (Maldera et al., 2011), mientras que la población fuertemente unida, lo haría a través de la transferencia de CRISP1 desde unas vesículas denominadas epididimosomas presentes en el fluido epididimario (Tesis doctoral Julieta Maldera).

La generación de animales KO para la proteína CRISP1 indicó que si bien los animales KO para CRISP1 eran fértiles, los espermatozoides presentaban una marcada disminución en el nivel de fosforilación de proteínas en tirosina, evento clave dentro del proceso de capacitación de los espermatozoides, como así también una disminución significativa en su capacidad de interactuar con la ZP y fusionarse con el oolema, consistente con los roles propuestos para CRISP1 en el proceso de fertilización (Da Ros et al., 2008). Asimismo, la exposición de ovocitos a espermatozoides KO en presencia de diversas proteínas CRISP disponibles en el laboratorio indicó que, además de CRISP1, otras proteínas homólogas estarían cooperando con CRISP1 para garantizar el éxito de la fertilización, siendo CRISP2 por su homología la candidata más probable a compensar CRISP1 en la etapa de fusión.

CRISP2

Esta proteína fue inicialmente descubierta como el mayor auto-antígeno en ratones a los que se les había practicado una vasectomía (Hardy et al., 1988), enfatizando nuevamente la alta antigenicidad de las proteínas CRISP. Inicialmente conocida como Tpx-1, es una proteína de origen testicular la cual se ha localizado en al menos tres regiones del espermatozoide: en la superficie de los espermatocitos donde se cree actúa como una proteína de adhesión entre los espermatocitos y las células de Sertoli (Maeda et al., 1998), en la parte externa de la vaina fibrosa del flagelo del espermatozoide maduro (O'Bryan et al., 2001), y como un componente del acrosoma espermático (Foster and Gerton, 1996). En la cola, se encontró que la proteína interactúa con una MAP quinasa (MAP kinase kinase kinase 11 (MAP3K11)), y que tiene la capacidad de regular el flujo de calcio a través de canales rianodínicos, sugiriendo su participación en las vías de señalización, si bien aún no se comprende exactamente cuál es su función (Gibbs and O'Bryan, 2007). En ese sentido, se han encontrado dos nuevas proteínas que interactúan con CRISP2 en la cola y participarían en las vías de señalización, la proteína gametogenetina 1 (Jamsai et al., 2008) y la proteína SHTAP (Jamsai et al., 2010). Siendo un componente del acrosoma, se cree que se expone durante la reacción acrosomal. En nuestro laboratorio hemos observado que CRISP2, al igual que CRISP1, estaría involucrada en el proceso de fusión de gametas a través de su unión a sitios complementarios en el ovocito (Busso et al., 2005; Busso et al., 2007b). Más aún, estudios de competencia indicaron que CRISP2 se uniría a los mismos sitios que CRISP1 en el ovocito (Busso et al., 2007b) y, muy posiblemente, por el mismo mecanismo, ya que exhibe sólo dos aminoácidos diferentes en su Signature 2 respecto al de CRISP1, sugiriendo la existencia de una cooperación funcional entre ambas proteínas con el fin de garantizar el éxito de la fertilización (Da Ros et al., 2008). Basados en los ensayos de estudio para la fertilidad con la proteína CRISP1 y, considerando las función de CRISP2 durante la interacción de gametas, se evaluó la posibilidad de que la generación de anticuerpos contra esta proteína pudiera servir como un método de anticoncepción, observando que CRISP2 no fue capaz de disminuir la fertilidad, muy probablemente debido a su localización intra-acrosomal (Weigel et al., 2012).

CRISP3

A diferencia de CRISP1 y CRISP2, la proteína CRISP3 no se encuentra presente en el genoma de la rata y tiene un amplio rango de expresión con una detección principal en neutrófilos, glándulas salivales, en el epitelio secretor de todo el tracto reproductor masculino, desde el testículo hasta la próstata y en espermatozoides humanos. Esta proteína fue originalmente caracterizada como SG28 (28-kDa), un componente específico de gránulos de neutrófilos (Udby et al., 2002b; Udby et al., 2002a) y, posteriormente, caracterizada como un componente importante de los fluidos prostáticos en caballos y vacas (Topfer-Petersen et al., 2005). Se han llevado a cabo considerables estudios para determinar si alguno de los polimorfismos detectados para esta proteína en caballos correlaciona con el éxito reproductivo (Hamann et al., 2007; Schambony et al., 1998a; Schambony et al., 1998b). En ese sentido, se demostró que CRISP3 es el principal componente del fluido prostático que inhibe la interacción de los neutrófilos con los espermatozoides y, por lo tanto, se especula que su presencia podría contribuir a la protección de los espermatozoides del ataque inmunológico en el tracto reproductivo femenino (Bjartell et al., 2006). Más aún, existen resultados que demuestran que los niveles de CRISP3 están elevados en el suero sanguíneo de pacientes con cáncer prostático, sugiriendo que podría utilizarse como un biomarcador de esta enfermedad (Udby et al., 2005). Recientemente, se encontró que CRISP3 estaría unida a la glicoproteína α 1B en el suero, postulándose que esta interacción podría enmascarar a CRISP3 del sistema inmune, protegiéndola del ataque de macrófagos, o bien que podría cumplir alguna otra función aún desconocida (Udby et al., 2010).

CRISP4

El gen de esta proteína no ha sido encontrado en humanos y fue descubierto en roedores durante la secuenciación completa del genoma (Jalkanen et al., 2005). La comparación de secuencias sugiere que este gen representaría el ortólogo de *Crisp1* en humanos, y que el gen *Crisp1* podría ser en realidad un ortólogo del *Crisp3* en ratones (Nolan et al., 2006). Esta proteína se expresa solamente en el epidídimo y asociándose a la región dorsal de la cabeza de los espermatozoides durante la maduración (Jalkanen et al., 2005). Recientemente, se ha demostrado que CRISP4

regula el canal espermático TRPM8, y cumple una función en la regulación de la reacción acrosomal inducida por progesterona (Gibbs et al., 2011; Martinez-Lopez et al., 2011) como así también en la unión de los espermatozoides a la ZP (Turunen et al., 2012), siendo la proteínas más probable a compensar la ausencia de CRISP1 en ratones KO para esta proteína durante esta etapa . El hecho de que CRISP4 pudiera ser una duplicación de CRISP1 y la alta homología entre todas las proteínas CRISP, abre la posibilidad de que las mismas hayan aparecido durante la evolución por duplicación de genes. Si este fenómeno hubiera ocurrido en una etapa inicial en la evolución de los vertebrados, habría llevado a la aparición de CRISP 1, 2 y 3, mientras que un suceso de duplicación posterior podría haber originado la aparición de la cuarta proteína CRISP sólo en roedores.

Proteínas GLIPR1

La segunda familia mejor caracterizada dentro de la superfamilia CAP en mamíferos, es la familia de proteínas GLIPR1. Estas proteínas fueron originalmente llamadas “Proteínas Relacionadas con Testículo, Vespíd y Patogénesis relacionado-1 (RTVP1)”. Al igual que las CRISP, las GLIPR1 son una familia multigénica que consta de tres genes en la mayoría de las especies, y de cuatro en el ratón. El análisis filogenético muestra que las GLIPR1 de mamíferos forman un solo *cluster* de genes compuesto por tres subclades distintos (**Figura 13**): GLIPR1, GLIPR1-tipo1 (GLIPR1L1), y GLIPR1-tipo 2 (GLIPR1L2). GLIPR1-tipo 3 (GLIPR1L3) se encontraría únicamente en el ratón y sería una duplicación de *Glipr11*, según lo observado al analizar ESTs de esta especie (Ren et al., 2006). Estos genes en humano se agrupan en el cromosoma 12q21, mientras que los de ratón se localizan en el cromosoma 10D1 (Ren et al., 2006). Cada uno de los genes humanos y de ratón tiene en su región promotora elementos respondedores al factor de transcripción p53 (Ren et al., 2006; Ren et al., 2002). Los análisis genómicos identificaron probables ortólogos de *Glipr1*, *Glipr11* y *Glipr112* en muchos grupos taxonómicos que van desde peces teleóstos a pollos.

El primer gen *Glipr1* fue identificado luego de un estudio en el cual se buscaban los genes más expresados en la forma más agresiva de cáncer de cerebro humano, el glioblastoma multiforme/astrocitoma, y en líneas celulares de glioma (Murphy et al., 1995; Rich et al., 1996). El transcripto de este gen no fue identificado en otras líneas

de cáncer neuronal o en cerebro sano, lo que sugiere que la expresión de *Glipr1* es derivada de la célula en la cual se originó el cáncer y, como tal, puede ser importante para dicha patogénesis. El mismo gen pero denominado RTVP-1, fue identificado más adelante en líneas celulares de cáncer de próstata, observándose que podía ser regulado por p53 y proteínas proapoptóticas (Ren et al., 2002). Contrariamente a lo observado en el glioblastoma, en el cáncer de próstata, la regulación de *Glipr1* fue negativa (Ren et al., 2004). Posteriormente a estos estudios, la expresión génica de *Glipr1* humano fue observada en el riñón fetal y en múltiples tejidos en adultos (Ren et al., 2006; Rosenzweig et al., 2006). RT-PCR cuantitativas mostraron que la expresión de *Glipr1* fue mayor en el pulmón, seguido por los testículos, médula ósea, próstata, vejiga, y riñón (Ren et al., 2006). *Glipr11* se expresa casi exclusivamente en los testículos, con pequeñas cantidades en la vejiga (Ren et al., 2006). De manera similar a *Glipr1*, *Glipr12* tiene una amplia expresión con niveles más altos en los testículos y los niveles más bajos en riñón, próstata, pulmón, vejiga y médula ósea (Ren et al., 2006).

En cuanto a las proteínas, cada grupo de GLIPR1 tiene claras diferencias en su extremo C-terminal, y dentro de esta familia se encuentran los únicos dos miembros (GLIPR1 y GLIPR1L2) entre todas las proteínas CAP de mamíferos que poseen un dominio transmembrana predicho (Ren et al., 2006), por el cual se podría anclar la proteína a las membranas. Además, es interesante mencionar que GLIPR1L2 tendría un dominio rico en glutamato (Ren et al., 2006), cuya función es desconocida (**Figura 13**). La localización celular de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en los seres humanos es actualmente desconocida. Del mismo modo, si bien los perfiles de expresión de los genes de estas proteínas no han sido completados en ratón, los datos de EST son consistentes con lo descrito en el humano. En cuanto a las proteínas de ratón, un trabajo realizado en “rafts” de espermatozoides reveló que, posiblemente, GLIPR1L1 y GLIPR1L2 se encuentren presentes en estas regiones lipídicas de membrana (Sleight et al., 2005).

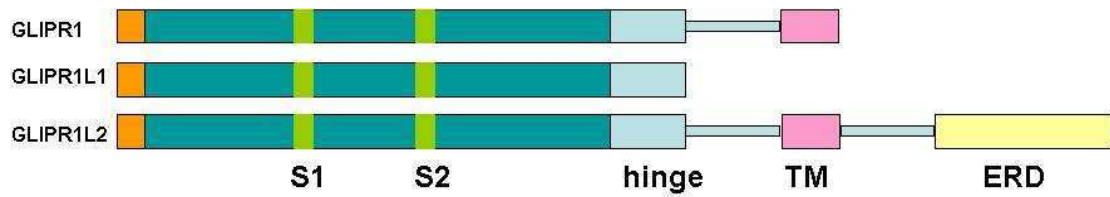


Figura 13: Comparación de la estructura secundaria de las tres GLIPRs. Esquema de GLIPR1, GLIPR1L1 y GLIPR1L2 con sus dominios conservados. Signature 1 (S1) y Signature 2 (S2), TM, dominio transmembrana y ERD dominio rico en glutamato.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos hasta el momento en cuanto al rol de las proteínas CAP en reproducción, el presente trabajo ha tenido dos objetivos principales que se detallan en la próxima sección.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis de Doctorado ha sido aportar nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en la interacción entre el espermatozoide y el ovocito mediante la identificación de nuevos mediadores de este proceso. Para ello, los estudios realizados se han centrado en las familias de proteínas CRISP y GLIPR1, miembros de la superfamilia CAP.

Objetivo 1-Identificación de proteínas CRISP en el tracto reproductor femenino y su participación en el proceso de fertilización

Tal como se mencionara anteriormente, en mamíferos, se han caracterizado cuatro miembros de la familia de proteínas CRISP: CRISP1 de expresión epididimaria, CRISP2 de expresión testicular, CRISP3, que se expresa en diferentes glándulas de secreción exocrina, y CRISP4 también de origen epididimario. Existen numerosas evidencias acerca de la presencia de proteínas CRISP en el tracto reproductor masculino, como así también sobre su participación en el proceso de interacción de gametas. Por el contrario, si bien se ha descrito la existencia de un miembro de la familia CRISP presente en el tracto reproductor femenino de *Xenopus* (Olson et al., 2001), se desconoce aún la posible presencia de proteínas CRISP en el tracto reproductor femenino de mamíferos.

En base a ello, **el primer objetivo de esta Tesis ha sido investigar la presencia de alguna de las proteínas CRISP en el tracto reproductor femenino de mamíferos, como así también, su posible rol en el proceso de fertilización.**

Objetivo 2- Presencia de proteínas GLIPR1 en el tracto reproductor y su participación en el proceso de fertilización

Como se indicara en la introducción, la secuenciación de pequeños péptidos provenientes de proteínas presentes en “rafts” de membrana de espermatozoides de ratón reveló la posible presencia de dos proteínas desconocidas (Sleight et al., 2005), las cuales, por comparación de secuencias, podían pertenecer a la familia de proteínas GLIPR1. Teniendo en cuenta la participación de las proteínas CRISP en el proceso de fertilización y la gran homología de secuencia entre los miembros de las

familias GLIPR1 y CRISP, nuestra hipótesis es que, además de las proteínas CRISP, las proteínas GLIPR1 podrían estar interviniendo en el proceso de fertilización con el fin de garantizar el éxito de este importante proceso reproductivo.

En base a lo expuesto, **el segundo objetivo de esta tesis ha sido la caracterización de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2, y el estudio de su participación en el proceso de fertilización.**

Materiales y Métodos

Animales

Para los ensayos descritos en esta Tesis, se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley y Wistar (machos adultos de 3 a 12 meses y hembras prepúberes de 26 a 29 días de edad), ratones de la cepa CF1 (machos adultos de 3 a 12 meses) y ratones de la línea KO para CRISP1 (machos adultos de 3 a 12 meses y hembras de entre 45 y 90 días). Cabe aclarar que los ratones KO para CRISP1 fueron generados en nuestro laboratorio y presentan un “background” híbrido C57BL/6N x 129/SvEv.

Todos los animales fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), 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 la “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” publicada por NIH (Bethesda, MA, Estados Unidos).

Proteína CRISP1 nativa

La proteína CRISP1 utilizada en este trabajo fue purificada de acuerdo a lo descrito por Garberi y colaboradores (1979; 1982) con pequeñas modificaciones. Brevemente, la purificación incluye la precipitación del citosol epididimario con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seguido de una cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-Concanavalina A (Farmacia LKB, Uppsala, Suecia) y un paso final de cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, Estados Unidos). Cuando la preparación obtenida es sometida a electroforesis y tinción con plata, sólo se detectan las bandas correspondientes a CRISP1.

Proteína CRISP3 nativa

La proteína CRISP3 utilizada en este trabajo fue donada gentilmente por el grupo del Dr Töpfer-Petersen, y purificada del caballo de acuerdo a lo descrito por Schambony y colaboradores (1998).

Expresión de proteínas recombinantes CRISP1 y MBP

La expresión de la proteína recombinante CRISP1 fue producida a partir de la secuencia codificante de CRISP1, que fue clonada anteriormente en nuestro laboratorio (Ellerman et al., 2002) en el vector de expresión pMAL-C2 (New England

Biolabs, EEUU), a partir de una biblioteca de ADNc de epidídimo de rata en λ gt11, cedida por el Dr. D. Hamilton (Universidad de Minnesota, EE.UU.). Dicho sistema produce una proteína de fusión con la proteína unidora de maltosa “MBP” (“maltose binding protein”). La expresión de la proteína MBP fue realizado utilizando el plásmido comercial (New England Biolabs) pMAL-C2, sin inserto.

Tanto en el caso de la proteína recCRISP1 como MBP, los plásmidos respectivos fueron utilizados para transformar bacterias *E. coli* BL21, las cuales fueron crecidas a 37°C en LB-ampí 2% glucosa hasta una $DO_{600nm} = 0,5$ y, luego de la adición de IPTG 0,1mM, incubadas durante 4-5 h a 26°C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación durante 20 minutos (min) a 4000 x g, resuspendidas en buffer 20 mM Tris (pH 7,4), 1M NaCl, 1mM EDTA, y, finalmente, sonicadas. La suspensión final fue centrifugada durante 30 min a 12000 x g, y el sobrenadante pasado por una columna de resina amilosa equilibrada con 20 mM Tris (pH 7,4), 1M NaCl, 1 mM EDTA, eluyéndose la proteína de fusión con maltosa 10mM. Las fracciones conteniendo el eluído fueron analizadas por DO_{280} o por Bradford, y luego dializadas 24 h contra H₂O y liofilizadas.

Generación de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 recombinantes

Las secuencias correspondientes al mRNA total de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 de ratón dentro del vector pGEX (GE Healthcare Life Sciences, EEUU) fueron cedidas por el Dr. P. Visconti (Universidad de Massachusetts, EEUU). Estos vectores fueron usados como templado para obtener las secuencias mediante PCR, las cuales se prepararon a partir de 1 μ g/ μ l de la solución madre de cada vector diluida 50 veces en agua. A partir estos moldes, fueron realizadas las PCRs, y los productos separados por electroforesis en geles de agarosa 1 %. Se utilizó la polimerasa “Taq” (Promega) y el siguiente programa de ciclado: 5 min a 94°C; 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 1,5 min a 72°C por 30 ciclos; 5 min a 72°C. El producto de PCR fue chequeado mediante la secuenciación del mismo utilizando los primers para su amplificación y, una vez chequeado, 1 μ l del producto de PCR fue introducido dentro del vector pTOPO (Invitrogen, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Subclonado del ADNc de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 al vector pGemT

El ADNc de longitud completa de ambas proteínas fue amplificado por PCR como se describiera anteriormente para cada uno de los clones dentro de pTOPO, utilizando en ambos casos primers que contienen las secuencias de enzimas de

restricción, BamHI y HindIII en el extremo 5' y 3', respectivamente. Ambos fragmentos amplificados fueron concentrados mediante precipitación con etanol, digeridos con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, y purificados mediante las columnas Wizard PCR (Promega). Obtenidos así los fragmentos, los mismos fueron luego ligados al vector pGemT previamente digerido con las enzimas utilizadas para los fragmentos.

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

Para el caso del subclonado al vector pET-28c, la estrategia se realizó del mismo modo que el subclonado en el vector pGemT, utilizando este último vector como fuente de las secuencias a subclonar en el pET.

Expresión de pET-28c GLIPR1L1 y pET-28c GLIPR1L2

Los plásmidos pET provenientes de colonias independientes fueron utilizados para transformar bacterias competentes de la cepa BL21 (pLYS S). Colonias aisladas de bacterias BL21 transformadas con pET-28c fueron crecidas en LB-Kan a 37°C durante toda la noche. Con el fin de evaluar la expresión de las proteínas recombinantes y la capacidad de inducción de las bacterias transformadas, el cultivo saturado fue diluido 1:100 en LB-Kan y crecido hasta una $DO_{600nm}=0.5$, momento en que fue dividido en dos fracciones, una de las cuales recibió IPTG (0,3-1 mM) durante 2-3 hs (a 27 o 37°C), mientras que la otra fue utilizado como control. Posteriormente, las bacterias fueron colectadas mediante centrifugación por 10 min a 12000 rpm y el pellet resuspendido en buffer de siembra (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1% Azul de bromofenol), analizándose la expresión de las proteínas recombinantes mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Purificación de las proteínas recombinantes pET-28cGLIPR1L1 y pET-28cGLIPR1L2

Ambas construcciones recombinantes fueron crecidas a 37°C en LB-Kan 2% glucosa hasta una $DO_{600nm}=0.5$, y, luego de la adición de IPTG 0.3mM, fueron incubadas durante 5 hs a 27°C. Las bacterias así inducidas fueron concentradas por centrifugación durante 20 minutos a 4000 x g, y el pellet resuspendido en

buffer de lisis (8 M urea; 0.1 M NaH₂PO₄; 0.01 Tris-Cl, pH 8.0), seguido de sonicación. Esta suspensión fue agitada durante 10 minutos en hielo y centrifugada a 8000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado durante 30 min a 12000 x g para clarificarlo, y luego pasado por una columna de resina de níquel (NiNTA his, Novagen, EEUU), la cual une residuos polihistidina presentes en las proteínas recombinantes generadas. La resina fue equilibrada (previa y posteriormente al agregado de las proteínas recombinantes) con el buffer de lisis a pH 8.0, sometido a lavado con buffer de lisis pH 6.3, y las proteínas recombinantes eluidas con el mismo buffer a pH 5.9 y pH 4.5. Las fracciones conteniendo el eluido fueron dializadas 24 hs contra PBS, bajando la concentración de urea 8M hasta 0,015625M. Considerando que luego de la elución tanto recGLIPR1L1 como recGLIPR1L2 no salen con el nivel de pureza deseado, se agregó un paso más de purificación, por el cual las proteínas recombinantes fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida nativo, y recuperadas del gel mediante elución pasiva, método detallado más adelante. Por último, las proteínas recuperadas por elución pasiva fueron dializadas contra una solución con la composición salina del medio utilizado para ensayos de fertilización *in vitro* de ratón y concentradas por liofilización. Alternativamente, las proteínas fueron dializadas contra H₂O y luego liofilizadas. En todos los casos, las proteínas quedan guardadas a -20°C hasta su utilización.

Anticuerpo anti-CRISP1

El anticuerpo policlonal anti-CRISP1 (concentración: 7,2 mg/ml) fue desarrollado mediante la inmunización de conejos con la proteína epididimaria de rata CRISP1 purificada tal como se describiera anteriormente (Kohane et al., 1983).

Suero anti-CRISP2

El suero anti-CRISP2 (concentración: 3 mg/ml) fue desarrollado mediante la inmunización de ratas con la proteína de fusión recombinante MBP-CRISP2 (Weigel et al., 2012).

Anticuerpo anti-hGLIPR1L1

El anticuerpo policlonal anti-hGLIPR1L1 (concentración: 1 mg/ml) fue desarrollado contra la proteína humana recombinante en ratón por la compañía Abnova (Catalog # : H00256710-B03P).

Anticuerpo anti-hGLIPR1L2

El suero anti-hGLIPR1L2 fue desarrollado contra la proteína humana recombinante en ratón por la compañía Abnova (Catalog # : H00144321-B01).

Anticuerpos comerciales

Para los ensayos descritos en este trabajo se utilizaron diversos anticuerpo comerciales que se detallan a continuación: **anti-His tag** (Sigma), este anticuerpo fue utilizado para inmunodetectar a las proteínas de fusión conteniendo dicha molécula (GLIPR1L1 y GLIPR1L2 recombinantes); **anti- β tubulina** (clone D66, Sigma) y **Anti-beta Actina antibody** (clone AC-15, abcam), estos anticuerpos fueron utilizados en ensayos de Western blot para detectar la presencia de tubulina y actina respectivamente, en distintas preparaciones como control de siembra y **IgG de conejo normal** (5 mg/ml, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EEUU) el cual fue utilizado como control negativo en algunos experimentos.

Generación de IgG de rata normal, y anticuerpos anti-recGLIPR1L1 y anti-recGLIPR1L2

Los IgG control y los anticuerpos contra GLIPR1L1 y GLIPR1L2 se obtuvieron po la inmunización de ratas Wisar con las proteínas recombinantes y posterior purificación, tal como se describe a continuación:

Inmunización

Las ratas fueron inmunizadas 3 veces (separada la primera de la segunda por tres semanas y luego cada dos semanas, ver esquema del capítulo 2) con 80 μ g de cada una de las proteínas recombinantes. Cada inyección se preparó disolviendo las proteínas en 300 μ l de solución fisiológica, realizando luego una emulsión con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (ACF) para la primera

inyección, y con adyuvante incompleto de Freund (AIF) para las restantes. Se administraron 300 μ l de la emulsión en forma subcutánea en la región dorsal y 300 μ l en forma intramuscular en un miembro trasero.

Obtención y almacenamiento de los sueros

Previo a las inmunizaciones fueron realizados los primeros sangrados, a partir de los cuales se obtienen los sueros normales. Para la obtención de los sueros, las ratas fueron anestesiadas y sangradas a blanco por punción cardíaca. Se extrajeron entre 5 y 10 ml de sangre por animal, utilizándose jeringa y aguja N° 21. La sangre se incubó durante 30 minutos a 37°C, para favorecer la coagulación, y luego durante 16 hs a 4°C. Los sueros fueron separados del coágulo por centrifugación durante 15 minutos a 1700 rpm a 4 °C, y luego fraccionados y almacenados a -20°C.

Purificación de los sueros

Con el fin de obtener la fracción IgG de los sueros se utilizó una columna HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, Life Sciences, EEUU), a través de la cual se pasaron los sueros con la ayuda de una bomba peristáltica. Las fracciones IGs fueron obtenidas por pasaje del buffer de elución provisto por el fabricante (0,1M glicina-HCl pH 2,7). Las IgG aisladas a partir de los sueros preinmunes, corresponden a las denominadas IgGs de rata normal.

Separación electroforética de las proteínas

La separación electroforética de las proteínas se llevó a cabo utilizando geles de poliacrilamida al 7,5%-15% y de 1,5 mm de espesor, ya sea nativos (Hames 1981) o desnaturalizantes conteniendo SDS (Laemmli 1970) para los geles. Las muestras fueron diluidas, ya sea en buffer de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 conteniendo 10% glicerol y azul de bromofenol) sin SDS, o diluidas y hervidas durante 8 min en buffer de siembra con 2% SDS. En algunos casos, las muestras fueron hervidas además en presencia de 70 mM β -mercaptoetanol. Las corridas se realizaron bajo condiciones de corriente constante (25 mA por gel) a temperatura ambiente.

Tinción de proteínas en geles

Azul de Coomasie: una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron sumergidos y agitados en Azul de Coomasie R250 (CBB) (0,25% en 45% metanol, 10% ácido acético) durante 2 h a temperatura ambiente. El exceso de colorante fue eliminado mediante sucesivas incubaciones en destañidor (50% metanol, 10% ácido acético).

Nitrato de plata: los geles fueron fijados durante 1 h en una solución 40% metanol-10% ácido acético, y sometidos a dos incubaciones de 30 min en 10% etanol 5% ácido acético y a una incubación de 10 min en 0,1% $K_2Cr_2O_7$, 0,03% HNO_3 . Luego de tres lavados con agua, los geles fueron incubados durante 30 min con 0.2% $AgNO_3$ y lavados con agua durante 10 min. El revelado se inició mediante una incubación de 30 segundos con 3% Na_2CO_3 , 0,02% formaldehído, seguida de una segunda incubación hasta la aparición del color. La reacción se finalizó con el agregado de ácido acético al 5%.

Para su conservación, los geles teñidos con cualquiera de las dos técnicas fueron secados mediante vacío y calor, sobre un papel de filtro.

Transferencia a nitrocelulosa

Una vez finalizada la separación electroforética, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo la técnica descrita por Towbin y colaboradores (1979). La transferencia fue realizada en buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%, a 4°C a voltaje constante durante toda la noche (35 V), o durante una hora (100 V). Previo al Western blot, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar la correcta transferencia de las proteínas. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 5 min en Ponceau 0,1% en ácido acético 5%, y el exceso de colorante removido mediante lavados con agua desionizada.

Western blot

Para la detección inmunológica de las proteínas mediante la técnica de Western blot, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con una solución de leche en polvo descremada 2% en PBS Tween 20 0,1% (PBS-Tween), seguida de una incubación con el anticuerpo primario correspondiente en PBS-Tween a la correspondiente dilución. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-Tween y las membranas fueron

incubadas con anti-IgG de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario, acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories, Burlingame, CA, Estados Unidos), diluido 1:4000 en PBS-Tween. Finalizada la incubación, las membranas fueron lavadas nuevamente. Con el fin de eliminar el Tween 20, se realizó un lavado adicional con PBS. Por último, las bandas reactivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial "ECL plus" (Amersham Life Science, Oakville, ON, Canadá). Las membranas con el reactivo de quimioluminiscencia fueron expuestas a placas AGFA durante pocos minutos, y luego reveladas por pasajes sucesivos en soluciones de revelador, lavado y fijador. Todas las incubaciones fueron realizadas por un período de 60 min a temperatura ambiente con agitación. En la inmunodetección de proteínas recombinantes, tanto el bloqueo como las incubaciones con los anticuerpos fueron realizados en presencia de un extracto proteico de bacterias *E. coli* con el fin de competir con sitios de unión inespecífica.

Elución pasiva de proteínas de un gel

Las bandas escindidas de un gel fueron colocadas en tubos de centrifuga, al cual se le agregó 0,5-1 ml de buffer de elución (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, y 0,1 mM EDTA; pH 7,5) por calle, de manera que las mismas quedaron totalmente sumergidas. A continuación, las bandas fueron cortados con un bisturí en trozos lo más pequeños posibles que fueron presionados contra las paredes del tubo con un mortero, y los tubos sometidos a agitación a 30°C, 24 hs con el fin de facilitar la elución de las proteínas. Al día siguiente, las suspensiones fueron centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos y separando cuidadosamente el sobrenadante, conteniendo las proteínas.

Preparación de citosoles de órganos de rata y de ratón

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

muestra. Las fracciones obtenidas se dializaron contra 100 volúmenes de una solución de Tris 50 mM, pH 6.8, y la concentración proteica de las muestras se determinó como se describe a continuación.

Cuantificación de proteínas

En todos los casos, la concentración proteica de las muestras se determinó utilizando el reactivo "Protein Assay" (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). Para ello se realizó una curva midiendo la absorbancia (620 nm) de una proteína estándar a concentración conocida (0 a 10 mg/ml), la cual fue utilizada como patrón para calcular la concentración de la muestra al medir su absorbancia (620 nm).

Obtención y preparación de gametas

Ovocitos

Las hembras de rata (prepúberes 26-29 días) y ratón (entre 2 y 4 meses) fueron superovuladas con una inyección de gonadotrofina coriónica equina (eCG) (20U en rata, 5U en ratón) (Syntex), seguida, a las 48 -72 h, por una inyección de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (25U en rata, 5U en ratón) (Sigma). Las hembras fueron sacrificadas a las 12-15 h luego de la inyección de hCG, y ambos oviductos fueron extraídos cuidadosamente y colocados en el medio de capacitación de espermatozoides correspondiente a cada especie; el medio denominado "Rat Fertilization Medium" (RFM) (Kaplan and Kraicer, 1978) para los ovocitos de rata, y el medio Fraser y Drury para los de ratón (Fraser and Drury, 1975). Los complejos ovocito-cúmulus (COCs) fueron obtenidos mediante punción de la ampulla. En los casos en que se requirieron ovocitos sin cúmulus, los mismos fueron tratados con hialuronidasa 0,1% (type IV, Sigma) a temperatura ambiente, para la disociación de las células del cúmulus. Para la remoción de la ZP, los ovocitos fueron sometidos a un tratamiento con solución ácida de Tyrode (pH 2,5) durante 10-20 segundos. Luego de cada tratamiento, los ovocitos fueron rápidamente lavados en el medio correspondiente, y utilizados en los diferentes ensayos.

Espermatozoides de ratón

Para la obtención de espermatozoides epididimarios de las distintas especies utilizadas, los animales adultos fueron anestesiados, y cada epidídimo expuesto a través de un corte efectuado en la región escrotal. Los órganos fueron liberados de grasa y sangre, manteniéndose permanentemente humedecidos con solución fisiológica. La obtención de espermatozoides de ratón se realizó en el medio de Fraser y Drury (Fraser y Drury, 1975), suplementado con 0,3% BSA. Los espermatozoides fueron obtenidos del cauda epidimario, colocado en una gota de 300 μ l de medio equilibrado, bajo aceite de parafina

Capacitación de espermatozoides de ratón

La capacitación fue llevada a cabo en gotas de 300 μ l de medio bajo aceite a una concentración final de $0,1-1 \times 10^7$ espermatozoides /ml, los cuales fueron incubados por un período de 90-120 min a 37°C y 5% CO₂ en una estufa con gaseo automático. La concentración de espermatozoides se determinó mediante la utilización de un hemocitómetro.

Espermatozoides humanos

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

Capacitación de espermatozoides humanos

Luego de la licuefacción, el semen fue diluido con 6 vol de medio Biggers, Whitten, Whittingham (BWW) (Biggers et al, 1971). Los espermatozoides fueron centrifugados 10 min a 300 x g, y luego lavados una vez más con 1 ml de BWW conteniendo 3,5% de albúmina sérica humana (BWW-ASH) (Sigma). Una vez lavada, la suspensión de espermatozoides concentrados fue colocada en el fondo de un tubo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de BWW-ASH y el mismo fue incubado durante 1 h a 37°C. Los espermatozoides móviles recuperados de la superficie del medio luego de una hora ("swim up") fueron diluidos en BWW-ASH a una concentración final de $0,5-1 \times 10^7$ cels/ml e incubados por 18-22 h a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂.

Extracción de proteínas de espermatozoide

Las suspensiones de espermatozoides provenientes de la región del cauda epididimario de ratón, fueron lavadas dos veces por centrifugación y resuspensión en PBS. Luego, los espermatozoides fueron separados en alícuotas y cada una de ellas fue expuesta a los distintos tratamientos entre los que se incluyen: 0,6-2 M NaCl, 1% Tritón X-100 en PBS, 250 mM DTT, 5 U/ml PLC-PI (fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, Sigma), o PBS, durante 30 min con agitación. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente, a excepción del tratamiento enzimático con PLC-PI que fue llevado a cabo a 37°C. Terminadas las distintas incubaciones, las suspensiones fueron centrifugadas a temperatura ambiente por 8 min a 500 x g de manera tal de obtener los sobrenadantes y los pellets. En todos los casos, con el fin de concentrar los extractos proteicos para su análisis electroforético, los sobrenadantes fueron dializados contra agua desionizada y tratados ya sea con un volumen de ácido tricloroacético (TCA) 10% o con 10 volúmenes de acetona, y luego centrifugados para la separación de las proteínas.

Evaluación de la motilidad de los espermatozoides

Los espermatozoides incubados en presencia de las proteínas y los anticuerpos correspondientes, según cada experimento, fueron sometidos a centrifugación, resuspendidos en una gota de 10 µl de medio a 37°C, montados sobre portaobjetos pre-calentados a 37°C, y examinados al microscopio evaluándose el número de espermatozoides motiles. Para cada tratamiento se contó un número igual o superior a 100 células, por duplicado.

Evaluación de la ocurrencia de la reacción acrosomal (RA)

Los espermatozoides de ratón fueron fijados en un volumen de PFA 8% en PBS durante 1 h a 4°C, y luego lavados por centrifugación 3 veces con acetato de amonio 0,1M pH 9, y extendidos sobre portaobjetos. Los preparados fueron lavados por inmersión en agua, metanol y agua (5 min en cada uno) y, posteriormente, incubados en una solución de 0,22% Coomassie Brilliant Blue G en 50% metanol, 10% ácido acético. Al cabo de esa incubación, los preparados fueron lavados con agua destilada, montados y observados inmediatamente para evitar la difusión del colorante. 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. En aquellos casos en que se evaluó el porcentaje de RA inducida los espermatozoides de cualquier especie fueron expuestos a ionóforo de calcio A23187 (10 μ M concentración final de un tock 10 mM, resuspendido en dimetilsulfóxido (DMSO)), a espermatozoides capacitados de ratón, 30 min antes del final del período de capacitación.

Evaluación de la viabilidad de los espermatozoides

Con el fin de evaluar la viabilidad de los espermatozoides de ratón, alícuotas de 10 μ l de las suspensiones obtenidas fueron dispuestas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C. A continuación se agregó un volumen de 0,5% eosina en solución fisiológica. Mientras que los espermatozoides vivos excluyen el colorante y no se colorean, los espermatozoides muertos incorporan el colorante y se tiñen de rosa. El porcentaje de viabilidad se evaluó por microscopía óptica utilizando un aumento de 40 x. En todos los casos se evaluó un mínimo de 100 células por determinación.

Inmunohistoquímica

Con el fin de realizar un análisis histológico, las ratas y ratones, fueron anestesiados y sus órganos removidos y fijados por inmersión en solución de Bouin durante 24 horas. Los órganos fueron luego incluidos en parafina, y cortados con un espesor de 7 micrones con micrótomo. La parafina fue removida de los preparados mediante la inmersión sucesiva de los mismos por 5 min en xileno, etanol 100%, etanol 96%, etanol 70% y PBS. A continuación, los preparados fueron bloqueados con SCAN 5% en PBS por un período de 30 min a 37°C, seguido por una incubación con el anticuerpo primario a la concentración indicada para cada anticuerpo durante 2 h a 37°C. Luego de 3 lavados con PBS, las muestras fueron incubadas con el anti-IgG correspondiente acoplado a peroxidasa (1:100 en PBS) por 30 min a 37°C. Terminada la incubación, las muestras fueron nuevamente lavadas 3 veces con PBS e incubadas hasta la aparición de color con diaminobencidina (50 μ g/ml, H₂O₂ 0,01% en Tris 0,1 M pH 7,5), y la reacción fue frenada con agua. Posteriormente, los preparados fueron co-teñidos con hematoxilina y deshidratados por tratamiento con concentraciones crecientes de alcohol y xileno de manera inversa a lo antes indicado. Una vez deshidratados los preparados fueron secados, montados con bálsamo de Canadá y observados bajo microscopio óptico.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) de células del cúmulus

Las células del cúmulus disgregadas por hialuronidasa 0,1% (type IV, Sigma) fueron incubados en SCAN 5% en PBS durante 30 min a 37°C para bloquear los sitios inespecíficos y posteriormente sometidos a 3 lavados con PBS-BSA 4 mg/ml con leve agitación e incubadas con los anticuerpos contra CRISP1 durante 1 h a 37°C. Luego los cúmulus fueron lavados en PBS-BSA4 e incubados durante 30 min a 37°C con un segundo anticuerpo acoplado a FITC en PBS-BSA4. Al finalizar, las células fueron lavadas con PBS-BSA4, montados en portaobjetos, y observados bajo microscopio de fluorescencia (Nikon Optiphot), acoplado a una cámara digital. Se tomaron microfotografías de las células del cúmulus utilizando los objetivos de 10X, 20X y 40X.

IFI de espermatozoides

Frescos: Los espermatozoides fueron lavados del fluido epididimario por una centrifugación suave a 500 rpm, incubados con SCAN5% en PBS por 30 min a 37°C y, luego resuspendidos en PBS-BSA4 conteniendo el anticuerpo primario a una dilución de 1/:50 o 1:10. Luego de 30 min, los espermatozoides fueron lavados 2 veces por centrifugación con un volumen de 300 µl de medio, e incubados con el anti-IgG correspondiente acoplado a FITC (1:50) por 30 min. Finalmente, los espermatozoides fueron montados en medio sobre portaobjetos pre-calentados a 37°C, y examinados con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot) con los objetivos de 40x o 100x. Con el fin de conservar la viabilidad de los espermatozoides, todas las incubaciones y manipulaciones inherentes a esta técnica fueron realizadas a 37°C.

Fijados: En los casos de IFI de muestras fijadas, los espermatozoides fueron incubados en un volumen de PFA 4% durante 10 min, lavados tres veces por centrifugación con PBS conteniendo 4 mg/ml de BSA y finalmente, extendidos sobre portaobjetos. Para la permeabilización de los espermatozoides, los extendidos fueron sumergidos en metanol a -20°C durante 5 min, incubadas con SCAN 5% en PBS por un período de 30 min a 37°C, seguido por una incubación con el anticuerpo primario a la concentración indicada durante 2 h a 37°C. Luego de tres lavados con PBS, las muestras fueron incubadas con el anti-IgG correspondiente acoplado a FITC (1:100 en PBS) por 30 min a 37°C. Terminada la incubación, las muestras fueron nuevamente lavadas tres veces con PBS, montadas con glicerol 90% y los cubreobjetos sellados con esmalte. Los

preparados fueron examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot).

Ensayo de fertilización *in vitro*

- con ovocitos con ZP

Ovocitos de ratón con ZP (con o libres de cúmulus) fueron inseminados con espermatozoides previamente capacitados en una concentración final de 5×10^5 células/ml, y las gametas co-incubados durante 24 hs en una estufa a 37°C y 5% CO₂. Al concluir la co-incubación, los ovocitos fueron lavados en medio fresco con el fin de remover los espermatozoides débilmente unidos. Todos los tratamientos fueron realizados bajo aceite mineral. Finalmente, los ovocitos fueron observados a 60 x en una Lupa (Nikon), determinándose el porcentaje de embriones en 2 células, como control se utilizaron ovocitos no expuestos a espermatozoides con el fin de cuantificar la activación espontánea.

- con ovocitos sin ZP

Ovocitos de ratón sin ZP fueron inseminados con espermatozoides de ratón capacitados en una concentración final de $0,5-1 \times 10^4$ células/ml, y las gametas co-incubadas durante 1 h en una estufa a 37°C y 5% CO₂. Al concluir la co-incubación, los ovocitos fueron lavados en medio fresco con el fin de remover los espermatozoides débilmente unidos, fijados con PFA 2% durante 10 min a temperatura ambiente y teñidos con 1 µg/µl Hoescht 33342 durante 10 min a temperatura ambiente. Todos los tratamientos fueron realizados bajo aceite mineral. Finalmente, los ovocitos fueron lavados, montados y observados en un microscopio Nikon Optiphot (Nikon) equipado con lentes de epifluorescencia, determinándose el porcentaje de ovocitos fertilizados. Los ovocitos se consideraron fertilizados si presentaban en el citoplasma al menos un núcleo espermático descondensado.

Ensayo de unión a la ZP

Ovocitos intactos de ratón fueron inseminados con espermatozoides capacitados, y las gametas fueron co-incubadas en una estufa a 37°C y 5% CO₂ por 30 min, luego de lo cual los ovocitos fueron lavados por pasajes sucesivos en tres gotas de medio, utilizando la misma pipeta para todos los ovocitos del experimento. Finalmente, los

ovocitos fueron fijados en PFA 2%, montados, y observados al microscopio óptico, determinándose el número de ovocitos con espermatozoides unidos y el número de espermatozoides unidos a la ZP de cada ovocito.

Ensayo de dispersión de las células del cúmulus

COCs de ratón fueron obtenidos por ruptura de la ampulla de hembras superovuladas, lavados en medio Fraser y Drury (1975) y colocados en gotas de 100 µl de medio solo o conteniendo diferentes proteínas según se indica en cada caso. Al cabo del 15, 30 o 60 min, la integridad del cúmulus de cada COC fue determinada bajo lupa siguiendo el esquema de clasificación descrito en la sección resultados (ver sección resultados, capítulo 1, figura 14).

Ensayo de penetración de cúmulus:

Complejos cúmulus-ovocitos de ratón fueron inseminados con una concentración de $0,3 \times 10^4$ células/ml de espermatozoides capacitados previamente teñidos con 0,01 µg/µl Hoescht 33342 durante 5 min a temperatura ambiente y lavados 3 veces con PBS. Las gametas fueron co-incubadas durante 15 minutos en una estufa a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual, los COCs fueron fijados con paraformaldehído 4%, lavados con PBS, y montados determinándose el número total de espermatozoides dentro del cúmulus por observación al microscopio de fluorescencia.

Reducción y alquilación de la proteína CRISP1

La proteína CRISP1 fue resuspendida en Tris 50 mM (pH 8,5) y luego incubada con DTT 250 mM durante 2 h a 37°C. Al cabo de ese período, se agregó a la solución un 10% del volumen de ácido iodoacético 1,5 M, seguido de una incubación de 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, la proteína fue dializada durante 24 h contra agua deionizada, y la eficiencia del tratamiento analizada mediante Western blot.

Obtención de uterosomas de rata

El aislamiento de los uterosomas, se realizó a partir de fluidos uterinos, de ratas hembra adultas obtenidos por perfusión con 1-1,5 ml de PBS realizada desde la unión

utero-tubaria hacia una incisión realizada en el otro extremo de cada cuerno uterino. La suspensión obtenida fue sometida a centrifugación a 4°C por 15 min a 10000 x g para eliminar restos de debris celular y los fluidos fueron ultracentrifugados a 4°C por 45 min a 47000 x g para obtener los pellets conteniendo las vesículas membranosas y guardados a -20°C hasta el día del experimento. El día del experimento, los pellets así obtenidos fueron lavados dos veces por ultracentrifugación y resuspensión en PBS para remover restos de fluido. Los sobrenadantes conteniendo el fluido uterino libre de vesículas, fueron utilizados como control.

Microscopía electrónica

Con el fin de mantener las propiedades de la muestra intactas, los uterosomas fueron fijados en solución de 3% glutaraldehído, 2% PFA, 10% solución saturada de ácido pícrico en buffer fosfato 0,05 M pH 7,2 por al menos 4 hs a temperatura ambiente. A continuación, la muestra fue lavada con PBS, deshidratada en una serie gradual de soluciones alcohólicas de concentraciones crecientes (70-100%), y embebida en una resina hidrofóbica (EPON). Después de la polimerización, la preparación fue seccionada en cortes delgados con un ultramicrotomo con hoja de diamante. Una vez preparados, los cortes fueron montados sobre rejillas de cobre, doblemente teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y, finalmente, examinados con un microscopio electrónico de transmisión.

Quimiotaxis

Para la evaluación de la quimiotaxis se utilizó una cámara Zigmund. Para el armado de las cámaras 100 µl de soluciones conteniendo las diferentes muestras a evaluar fueron dispuestas en uno de los hoyos, mientras que en el otro lugar de siembra se agregó una solución de 100 µl de espermatozoides capacitados de ratón a una concentración de 2×10^6 espermatozoides/ml. Luego de permitir que se genere un gradiente por 15 minutos a 37°C y 5% CO₂ se registró, mediante videomicroscopía, la zona del puente de la cámara por 210 segundos. Los videos luego fueron analizados con el programa Image J, determinándose el porcentaje de espermatozoides que se encontraban orientados hacia el gradiente.

RT-PCR

El ARN total de distintos tejidos de rata y ratón fueron extraídos utilizando el reactivo Trizol® (Gibco BRL) siguiendo las instrucciones del proveedor. La integridad y cantidad del ARN obtenido fue evaluada por medio de una electroforesis en geles de agarosa 1% con formaldehído (Sambrook et al., 1989) y visualización en transiluminador con luz UV.

Con el fin de generar cADN, 5 µg del ARN total fueron incubados a 65°C durante 5 min, seguido de una incubación en hielo. Por otro lado, una mezcla de reacción conteniendo 300 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega); 2,5 µM de un oligonucleótido de timidinas (oligo dT), utilizado como “primer”; 80 UI de un inhibidor de RNasas (Promega) y 0,3 mM de dNTPs, fue llevada a un volumen final de 15 µl con el buffer apropiado. La mezcla de reacción, junto con el ARN, fue incubada durante 10 min a temperatura ambiente, seguido por 1 h a 37°C y 5 min a 94°C. Dos µl del producto de la transcripción reversa fueron sometidos a PCR utilizando “primers” específicos (detallados a continuación), y el resultado de cada reacción fue evaluado por medio de una electroforesis en geles de agarosa 1% y visualización en transiluminador con luz UV.

Las condiciones en generales de PCR fueron: 1 min a 94°C; 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C por 35 ciclos; 5 min a 72°C. En el caso específico de las RT-PCR semicuantitativas, se restringió el número de ciclos a 20, y visualizado como recién se mencionó. Posteriormente, se cuantificó el producto de PCR obtenido con la ayuda del programa Image J contra un gen constitutivo amplificado mediante el mismo número de ciclos y partiendo de la misma muestra.

Primers utilizados: de 5´ a 3´

GLIPR1L1 para subclonar. Fwd (BamHI): AGGCCGGTCCAAAATGGCCCTGAAGAAG; Rvs (HindIII): GGCCGCAAGCTTTTAACTAGGCTCTG.

GLIPR1L2 para subclonar. Fwd (BamHI): GGGCCGGATCCAAATGAAGGCCTCTCTG; Rvs: GGCCGCAAGCTTCTATTGTTTCATCTTCTTC

CRISP1 rata Fwd: TGTTCTGGCTGCTGTATTG;

Rvs: AAGACCACGATGCAGGGTAA

CRISP2 rata Fwd: CCACCCACAGAAGGAAAGG;

Rvs: CATACCAGCTTTGAATTACGG

CRISP4 rata Fwd: CAGACATCTCAAAGTGG; Rvs: GGCCAATTCTCCGTATTTG

CRISP1 ratón Fwd: AAGCCATCAGAATTCCAAGATAGCTCTCAG;

Rvs: CTGGAATTATTTCAATGTCC

GLIPR1L1 para tejidos y semicuantitativa. Fwd: TTCGCCAGCAGGAACTTTATAGG; Rvs: CGCTTTGTGGTGAGGTGTCTTC

GLIPR1L2 para tejidos y semicuantitativa. Fwd: TTGGCATGAGGAGAGGAAGAGC; Rvs: GCACACGAAGTAACAGCACAACC

Deglicosilación enzimática

Con el fin de evaluar la posibilidad de deglicosilar a GLIPR1L1 y GLIPR1L2, 2 millones de espermatozoides frescos fueron resuspendidos en buffer 50 mM Na₃PO₄ (pH 7,5) y luego incubados a 37°C durante 2 h con PNGasaF (NEB) (50 unidades/mg d proteína). Luego de este período, la eficiencia del tratamiento analizada mediante western blot.

Hibridación *in situ*

Preparación de la sonda:

A partir de 10.5 µl de cada sonda simple cadena (secuencias detalladas al final) solubilizadas en dH₂O, se le agregaron: 4 µl Promega 5X buffer de transcripción, 2 µl BMB 10X DIG RNA labeling mix (BMB Cat. #1 277 073), 1 µl 0.1M DTT, 0.5 µl Promega rRNAsin, 2 µl RNA polimerasa (SP6, T3, or T7), llevando las soluciones a un volumen final de 20 ul. Posteriormente, las soluciones a volumen fueron mezcladas cuidadosamente, fueron centrifugadas a baja velocidad, e incubadas a 37°C por 2 horas. Las sondas fueron pasadas por columnas G50 ProbeQuan (que permiten separar aquellas que incorporaron DIG de aquellas que no), llevandolas a un volumen final de 100 µl con buffer de hibridización.

El tejido obtenido del animal fue congelado a -80°C y posteriormente, fue cortado en criostato con un grosor de 15 µm. Luego los cortes se dejaron secar, se fijaron en PFA 4% por 10 minutos, y se lavaron tres veces por 3 min en PBS. Estos cortes fueron prehibridizados poniéndolos con la solución de hibridización a 65°C durante una hora. Para cada corte se prepararon 100 µl de buffer de hibridización conteniendo 1-2 µl de cada sonda marcada con DIG, las cuales fueron desnaturalizadas por calor a 80°C durante 5 minutos, y rápidamente fueron

pasadas a hielo. Las sondas fueron pipeteadas cuidadosamente sobre los cortes, poniendo los mismos en cámara húmeda a 65°C por 16-24 horas cubiertos con parafilm. Pasado ese lapso de tiempo, el parafilm fue removido, y los cortes incubados en 5X SSC (0,15 M de citrato de sodio, 15 mM de citrato de trisodio, pH 7) precalentado a 65°C, y lavados con 3 pasaje de 20 min en 0.2X SSC también a 65°C. Finalmente, los cortes fueron lavados 10 min en PBS, Tritón X-100 0.1%, incubados 1 hora en solución de bloqueo B2 y expuestos al anticuerpo anti-DIG-fosfatasa alcalina (BMB Cat. #1 093 274) (diluido 1:1000 en la solución B2), a 4° C 24 hs.

Luego de la incubación del anticuerpo, se realizaron 3 lavados de 30 min en PBS, 0.1% Triton X-100, y luego se equilibró a los cortes en la solución B3 durante 10 min. Pasado el período de equilibración, los cortes fueron cubiertos con la solución B4 a temperatura ambiente por 24 hs o hasta la aparición de reacción positiva. La reacción fue frenada mediante el lavado por 5 minutos con PBS-Triton X-100 0.1%. Finalmente, los cortes fueron lavados con agua destilada, secados con aire, montados en 160 ul Glycergel (DAKO) y examinados en microscopio óptico (Nikon).

Solucion de Hibridization: 50% formamida; 5X SSC, 5X Denhardtts, 250 µg/ml tRNA de levadura, 500 µg/ml DNA de espermatozoos de salmon, 50 µg/ml Heparina, 2.5 mM EDTA, 0.1% Tween-20, 0.25% CHAPS

Solución B2: 1XPBS, 0.1% Triton X-100, 10% Suero de cabra normal inactivado por calor.

Solución B3: 0.1M Tris pH 9.5, 0.1M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween-20

Solución B4: 45 µl NBT, 35 µl BCIP, 100 µl 100mM Levamisole, 10 ml B3

Sonda GLIPR1L1 de 5´a 3´: GCCGCTTTGTGGTGAGGTGTCTTCCGATTC

Sonda GLIPR1L2 de 5´a 3´: CCTCTCCCTCTCCCTCCTCCATCACTATTTCTACC

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± el error estándar para cada serie de experimentos. Aquellos resultados expresados en porcentajes (ej: embriones en 2 células, ovocitos penetrados, ovocitos con espermatozoides unidos a ZP, motilidad y

reacción acrosomal de los espermatozoides) fueron analizados con el test de Chi cuadrado (χ^2). Los números de espermatozoides penetrando los complejos cumulus-ovocitos y unidos a la zona fueron analizados mediante el test de Student. Los estudios de quimiotaxis y dispersión del cumulus fueron analizados mediante ANOVA de una vía. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes a un valor de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa “GraphPad Prism” (versión 3,02, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Resultados

Capítulo I

Identificación de proteínas CRISP en el tracto reproductor femenino y su participación en el proceso de fertilización

1- Presencia de CRISP1 en el tracto reproductor femenino de la rata

Como se mencionara en la Introducción, existen muchas evidencias de la expresión de la proteína CRISP1 en el epidídimo y en el espermatozoide, como así también sobre su participación en el proceso de interacción de gametas. Si bien esta proteína había sido descrita sólo en el tracto masculino, estudios realizados en *Xenopus leavis* indicando la presencia de una proteína CRISP denominada Allurina en el tracto reproductor femenino (Olson et al., 2001) abrieron la posibilidad de que CRISP1 estuviera presente en el tracto femenino. Allurina, es secretada de manera hormono-dependiente por el oviducto, adhiriéndose a la gelatina que rodea a los ovocitos durante el tránsito de los mismos por el oviducto (Xiang et al., 2004) y participa en el proceso de fertilización ejerciendo un efecto quimioattractante sobre los espermatozoides, hacia los ovocitos (Xiang et al., 2005).

Teniendo en cuenta las observaciones descriptas, y que la proteína CRISP1 de rata posee una homología del 40% con la proteína Allurina, se investigó la posible presencia de CRISP1 en el tracto reproductor femenino de la rata. Para ello, se comenzó evaluando la presencia del ARNm del gen *Crisp1* en ovario, oviducto y útero, a través de la técnica de RT-PCR utilizando primers específicos para CRISP1. Como control positivo, utilizamos ADNc de epidídimo. Los resultados revelaron la presencia de una banda del tamaño esperado en los tres tejidos estudiados que no se observó en los controles negativos (**Figura 1**).

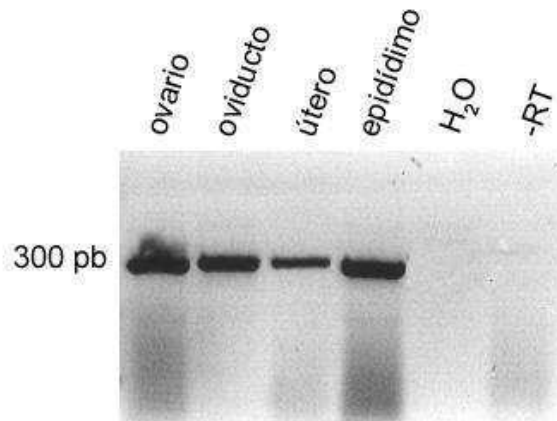


Figura 1. Análisis de la presencia de ARNm de *Crisp1* en tracto reproductor femenino. Productos de RT-PCR de los diferentes tejidos reproductivos femeninos fueron separados en un gel de agarosa al 2% y luego teñidos con bromuro de etidio para su visualización. Se utilizó el producto de PCR de epidídimo como control positivo, y los productos de PCR sin molde (H_2O) y de PCR sin la realización previa de RT (-RT), como controles negativos.

La presencia del mensajero de CRISP1 en el ovario abría la posibilidad de que estuviera presente en los ovocitos o en las células del cúmulus que rodean al ovocito. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron los ensayos de RT-PCR antes mencionados utilizando como molde ARNm proveniente de ovocitos y de las células del cúmulus aisladas de COCs por tratamiento con hialuronidasa. Los resultados indicaron la presencia de una banda del tamaño esperado en el cúmulus que no fue detectado en el ovocito (**Figura 2**).

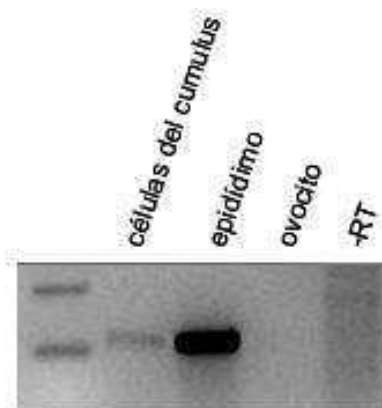


Figura 2. Análisis de la presencia de ARNm de *Crisp1* en ovocito y células del cúmulus. Productos de RT-PCR de células del cúmulus y ovocito fueron separados en un gel de agarosa al 2% y luego teñidos con bromuro de etidio para su visualización. Se utilizó el producto de PCR de epidídimo como control positivo, y el producto de PCR sin la realización previa de RT (-RT), como control negativo.

La identidad de las bandas detectadas por RT-PCR en las distintas muestras fue analizada por secuenciación de los fragmentos amplificados correspondientes. Tal como se muestra en la **Tabla1**, los resultados indicaron que, en todos los casos, los ARNm amplificados presentaban una identidad mayor al 95% con CRISP1.

Tejido	Identidad
Ovario	97
Oviducto	95
Útero	99
Células del cúmulus	96

Tabla 1. Identidad de los productos secuenciados. Los productos de secuenciación fueron comparados contra todo el genoma de rata utilizando el programa nucleotide Blast ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)), calculándose los porcentajes de identidad con respecto a *Crisp1* para cada muestra.

Con el fin de evaluar la expresión de la proteína CRISP1 en todas las muestras analizadas realizamos ensayos de Western blot (Wb) utilizando el anticuerpo anti-CRISP1 generado en nuestro laboratorio. Para este fin, extractos proteicos de los tejidos y de las células mencionadas fueron sometidos a separación electroforética y Western blot utilizando el extracto epididimario como control. Los resultados se muestran en la **Figura 3 (A y B)** e indican la presencia de una banda del tamaño esperado para la proteína CRISP1 tanto en los tejidos como en las células del cúmulus, confirmando la expresión de la proteína. De la observación de los geles resulta evidente la menor expresión de CRISP1 en los tejidos reproductores femeninos y en las células del cúmulus con respecto al epidídimo.

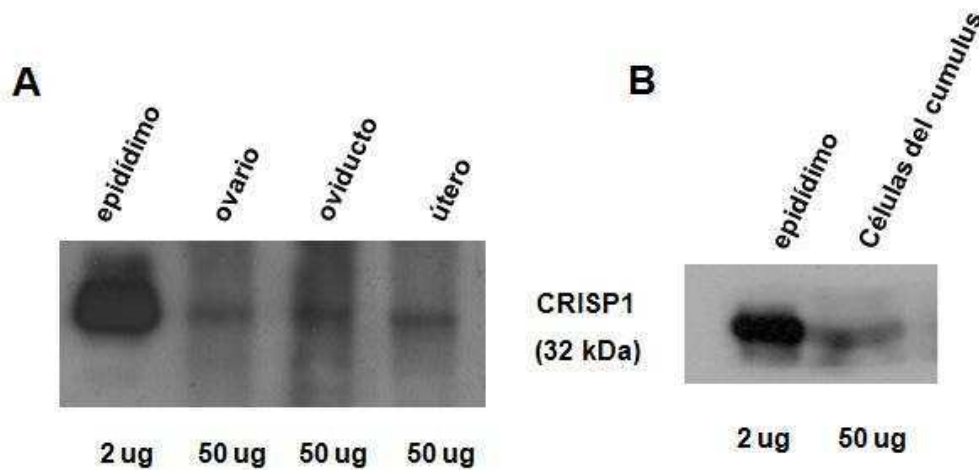


Figura 3. Presencia de la proteína CRISP1. Extractos proteicos de ovario, oviducto, útero (A) y células del cúmulus (B) fueron separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 12%, analizándose la presencia de CRISP1 mediante Western blot. Como control se utilizó epidídimo.

A continuación, y como otra alternativa para evaluar la presencia y localización de CRISP1 en el tracto reproductor femenino, se realizaron estudios de inmunohistoquímica. Para ello, cortes histológicos de los distintos órganos fueron incubados con anti-CRISP1, seguido de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Tal como se muestra en la **Figura 4**, los tres tejidos incubados con el anticuerpo presentaron marcación positiva mientras que los tejidos incubados en condiciones control carecían de marca. La marcación para CRISP1 se localizó principalmente en el epitelio luminal del oviducto y el útero, consistente con su naturaleza secretoria. Asimismo se observó una marca mayoritaria en las células de la granulosa y minoritaria en las células estromales del ovario.

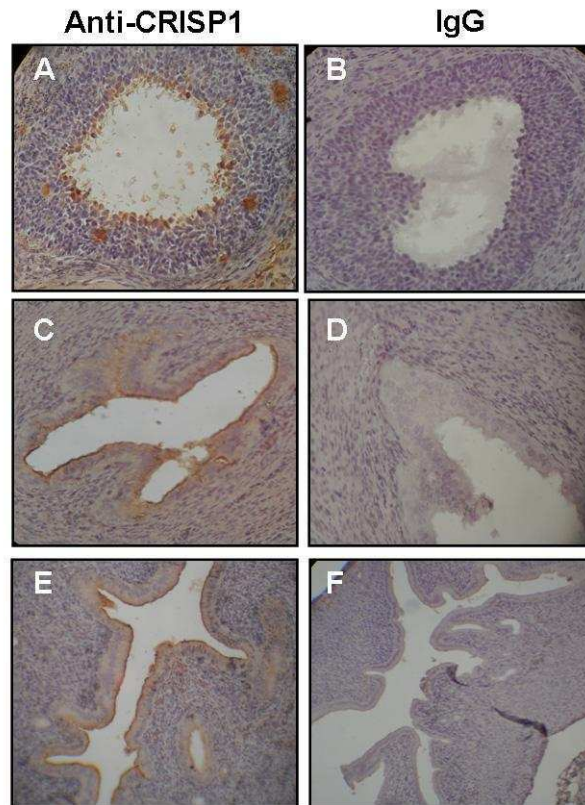


Figura 4. Localización de CRISP1 en tejidos reproductivos femeninos. Ovario (**A y B**), oviductos (**C y D**) y útero (**E y F**) fueron sometidos a inmunohistoquímica utilizando anti-CRISP1 (**A, C y E**) o IgG de conejo normal como primeros anticuerpos (**B, D y F**).

Habiendo determinado la localización de la proteína CRISP1 en los tejidos reproductores femeninos, el siguiente paso consistió en evaluar la localización sobre las células del cúmulo, para lo cual las mismas fueron aisladas de COCs (mediante exposición a hialuronidasa), incubadas con anti-CRISP1 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC y, finalmente, observadas en un microscopio de epifluorescencia. Como control, se utilizó IgG purificada de sueros normales. Los resultados indicaron que, mientras las células del cúmulo incubadas en condiciones control no presentaban marca, aquellas incubadas con anti-CRISP1 mostraban una marca fluorescente en su superficie (**Figura 5**).

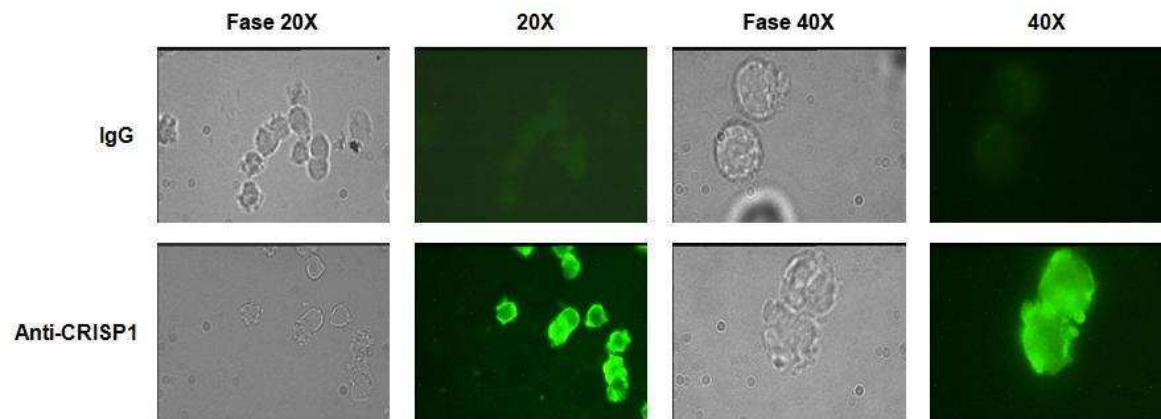


Figura 5. Localización de CRISP1 en las células del cúmulus. Células del cúmulus aisladas fueron fijadas y sometidas a IFI utilizando anti-CRISP1 o IgG de conejo normal como primeros anticuerpos.

Como se mencionara anteriormente, la capacitación de espermatozoides involucra, entre otras cosas, la modificación, incorporación y liberación de proteínas del espermatozoide, no sólo de superficie sino también integrales. En ese sentido, existen recientes evidencias en la bibliografía que indican la existencia de vesículas presentes en el fluido uterino de ratón, denominadas “uterosomas”, las cuales mediarían la transferencia de proteínas integrales al espermatozoide durante su tránsito por el útero (Griffiths et al., 2008a). Considerando que una población de CRISP1 se encuentra presente en unas vesículas epididimarias muy similares a los uterosomas denominadas “epididimosomas” (Tesis Doctoral Dra. Julieta Maldera) y la existencia de esta proteína en el útero, cabía la posibilidad de que CRISP1 se encontrara presente en uterosomas en la rata.

Con el fin de evaluar esta posibilidad, fluidos uterinos obtenidos mediante perfusión retrógrada fueron sometidos a centrifugación para descartar el debris celular y, posteriormente, a ultracentrifugación para el aislamiento de las vesículas membranosas. Las vesículas así obtenidas fueron luego preparadas para su análisis por microscopía electrónica. Las fotomicrografías electrónicas mostraron la presencia de vesículas membranosas de doble capa lipídica, de tamaño heterogéneo (**Figura 6**), consistente con lo descrito en la literatura (Griffiths et al., 2008a), confirmando así la presencia de uterosomas en las muestras obtenidas.

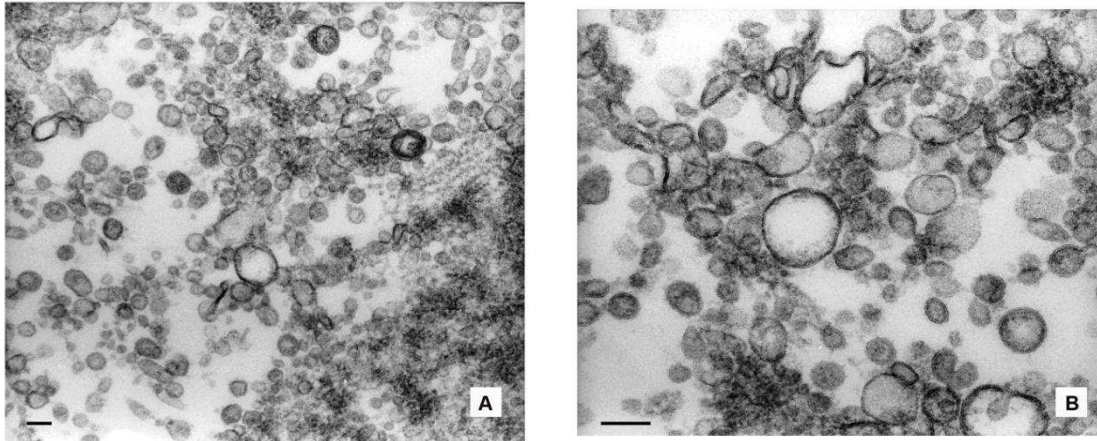


Figura 6. Microscopía electrónica de uterosomas. Imágenes de microscopía electrónica de preparaciones de uterosomas aislados del fluido uterino. **A.** 15000x **B.** 102000x Barra= 50 nm.

Una vez corroborada la existencia de uterosomas en la rata y su correcto aislamiento, el siguiente paso consistió en investigar la posible presencia de CRISP1 en dichas vesículas. Para ello, extractos proteicos de uterosomas fueron separados por electroforesis y, revelados mediante tinción con plata y Wb utilizando anti-CRISP1 como primer anticuerpo. Los resultados mostrados en la **Figura 7A** indican que CRISP1 se encontraría presente en los uterosomas, a juzgar por el hecho de que el anticuerpo fue capaz de detectar una única banda del tamaño molecular esperado para esta proteína en el extracto proteico de vesículas.

Con el fin de descartar que la proteína CRISP1 detectada en el extracto de uterosomas se debiera a proteína que pudiera estar en forma soluble en el fluido uterino, analizamos el fluido uterino libre de vesículas y los sobrenadantes de los lavados de vesículas. Para estudiar dicha posibilidad, el sobrenadante de lavado de las vesículas y los extractos proteicos de uterosomas fueron analizados por Wb. Tal como se observa en la **Figura 7B**, los resultados mostraron la ausencia de reacción positiva para CRISP1 en la solución de lavado y en el fluido uterino, confirmando que la proteína CRISP1 detectada en uterosomas no correspondía a una contaminación.

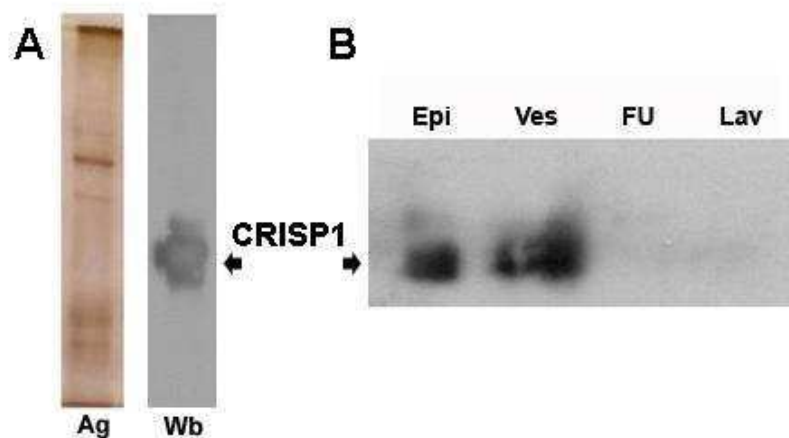


Figura 7. Presencia de CRISP1 en los uterosomas. (A) Extractos proteicos de vesículas fueron sometidos a electroforesis, y revelados mediante tinción con plata (Ag) o Western blot (Wb) utilizando anti-CRISP1 como primer anticuerpo. (B) Extractos proteicos tanto de epidídimo (Epi), como de vesículas (Ves), y fluido uterino (FU), sobrenadante del lavado de las vesículas (Lav), fueron separados electroforéticamente y analizados por Wb usando anti-CRISP1.

En resumen, los estudios presentados en esta sección indican que la proteína CRISP1 se encuentra presente en el tracto reproductor femenino, más precisamente en el ovario, oviducto, útero y células del cúmulo, observándose además, que la proteína presente en el útero estaría asociada a uterosomas.

2- Identificación de otras proteínas CRISP en el tracto femenino de la rata

Como se mencionara en la introducción, en la rata, además de CRISP1, se encuentran presentes CRISP2 (de origen testicular) y CRISP4 (de origen epididimario), las cuales poseen una alta homología de secuencia con CRISP1 (Gibbs y O'Bryan, 2007).

Teniendo en cuenta estos datos, y habiendo mostrado la presencia de la proteína CRISP1 en tejidos reproductivos femeninos, cabía la posibilidad de que CRISP2 y CRISP4 también se expresaran en el tracto reproductor femenino de la rata. Con el fin de evaluar esta posibilidad, analizamos en primer lugar la presencia del ARNm de ambas proteínas en ovario, oviducto, útero, células del cúmulo, y ovocito. Para ello, se realizó al igual que para *Crisp1* una RT-PCR pero con una combinación de "primers" que corresponden a los mensajeros de *Crisp2* y *Crisp4*, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 8A, los resultados indican la presencia de una banda a la misma altura que su control, correspondiente a CRISP2 en ovario, mientras que para el caso de CRISP4 no se detectó banda en ninguno de los tejidos evaluados (Figura 8B). La secuenciación de la banda detectada en ovario reveló un 97% de identidad con CRISP2. Si bien la presencia de CRISP2 en el ovario abría la posibilidad de que se encontrara presente en las células del cúmulus u ovocitos, la ausencia de producto de PCR indicó que no es el caso (Figura 8C).

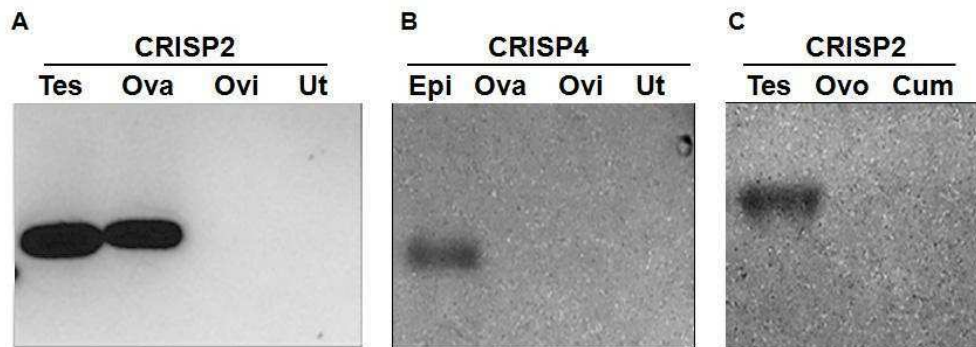


Figura 8. Análisis de la presencia de ARNm de CRISP2 y CRISP4 en tracto reproductor femenino. (A y B) Productos de RT-PCR de ovario (Ova), oviducto (Ovi) y útero (Ut) con primers para CRISP2 y CRISP4 respectivamente, y (C) ovocito (Ovo) y células del cúmulus (Cum), fueron separados en un gel de agarosa al 2% y luego teñidos con bromuro de etidio para permitir su visualización. Se utilizó el producto de PCR de testículo (Test) y epidídimo (Epi) como control positivo, y producto de PCR sin la realización previa de RT (-RT) como control negativo.

Posteriormente, analizamos la expresión de la proteína CRISP2 en ovario mediante ensayos de Wb utilizando un anticuerpo contra la proteína CRISP2 recombinante de ratón generado en nuestro laboratorio. Para este fin, se realizaron extractos proteicos de testículo de ratón (como control positivo) y testículo y ovario de rata, los cuales fueron luego sometidos a Wb con el anticuerpo anti-CRISP2 antes mencionado. El resultado de este ensayo indicó la presencia de banda del tamaño esperado para la proteína CRISP2 (**Figura 9**) en ovario, confirmando la expresión del mensajero detectado en el ovario. Cabe mencionar que en el ovario de rata, se puede observar la presencia de una banda minoritaria con un peso molecular diferente al de CRISP2. De la observación del gel, resulta evidente la menor expresión de CRISP2 en el ovario respecto al testículo en la rata y la mayor especificidad del anticuerpo contra la proteína testicular de ratón.

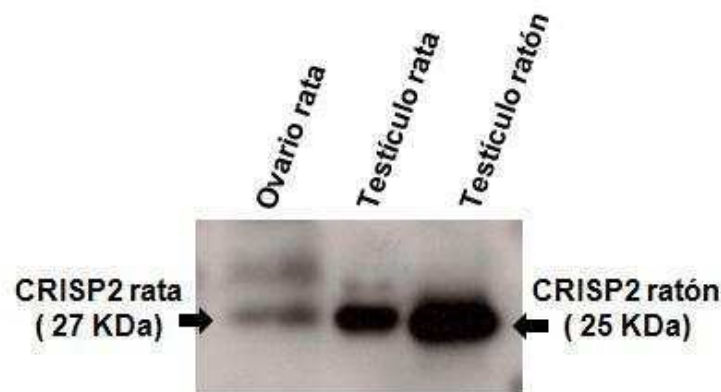


Figura 9. Presencia de la proteína CRISP2 en ovario. Extracto proteico de ovario de rata (30 μ g), fue sometido a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%, analizándose la presencia de CRISP2 mediante Western blot utilizando un suero anti-CRISP2 generado contra la proteína de ratón. Como control se utilizaron extractos de testículo de ratón y de rata (2 μ g en ambos casos).

A continuación, para evaluar la localización de CRISP2 en el ovario, se realizaron estudios de inmunohistoquímica. Para ello, los cortes de ovario fueron incubados con anti-CRISP2, y con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Las muestras se incubaron luego con el colorante hematoxilina para marcar los núcleos de las células y se prepararon para su posterior observación bajo microscopio. Tal como se muestra en la **Figura 10**, los ovarios presentaron una marcación intensa en la médula y de menor intensidad en el tejido intersticial del cortex. A diferencia de lo que ocurre con CRISP1, no se observa marcación sobre las células de la granulosa.

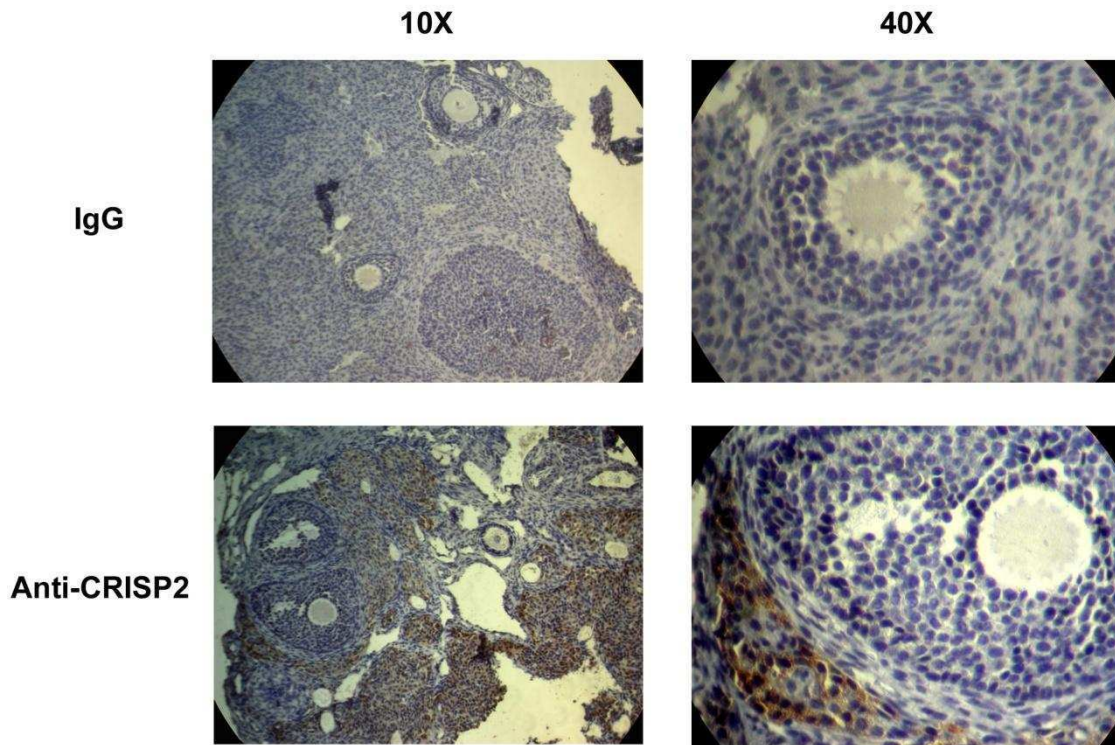


Figura 10. Localización de CRISP2 en ovario. Cortes histológicos de ovario fueron sometidos a inmunohistoquímica utilizando suero anti-CRISP2 o IgG de conejo normal como primeros anticuerpos.

En resumen, los resultados presentados sugieren la presencia de CRISP2 en el ovario de la rata y la ausencia de CRISP4 en el tracto femenino.

3- Identificación de CRISP1 en el tracto reproductor femenino del ratón y su participación en el proceso de fertilización

Tal como se describiera en la introducción, los ensayos de fertilización *in vitro*, junto a los experimentos de inmunización activa de ratas realizados en nuestro laboratorio, sugieren que la proteína epididimaria CRISP1 no sólo participaría en el proceso de interacción de gametas sino que también sería relevante para la fertilidad de un individuo (Rochwerger y Cuasnicu, 1992; Pérez Martínez et al., 1995; Ellerman et al., 2008). En base a estas observaciones, en el laboratorio se realizaron diversos ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando ratones *Crisp1*^{-/-} generados por nuestro grupo. Los resultados obtenidos indicaron que, si bien los machos KO eran fértiles, los espermatozoides carentes de CRISP1 presentaban una capacidad fertilizante

significativamente disminuida (Da Ros et al., 2008). Teniendo en cuenta nuestros resultados indicando la presencia de CRISP1 en el tracto reproductor femenino, resultaba de interés investigar si, al igual que la proteína CRISP1 epididimaria, la proteína presente en el tracto femenino también participaba en el proceso de fertilización. En ese sentido, los ratones carentes de CRISP1 constituyen un excelente modelo para estudiar esta posibilidad.

Para tal fin, se evaluó primeramente si CRISP1 estaba presente en el tracto reproductor femenino del ratón analizando la presencia de ARNm de CRISP1, la expresión de la proteína y el tipo de localización, en ovario, oviducto, útero, células del cúmulus y ovocito provenientes de ratones HT y KO (**Figura 11**). Los resultados de los ensayos de RT-PCR mostraron la presencia de bandas del tamaño esperado en todas las muestras de animales HT analizadas, a excepción de las muestras de ovocito, y su ausencia en animales KO confirmando que en ratón, al igual que en rata, este mensajero se encuentra presente en el tracto reproductor femenino. Si bien la ausencia de banda en los tejidos KO sugería que el mensajero correspondería a CRISP1, las bandas positivas fueron secuenciadas, confirmándose la identidad de CRISP1 en todos los casos.

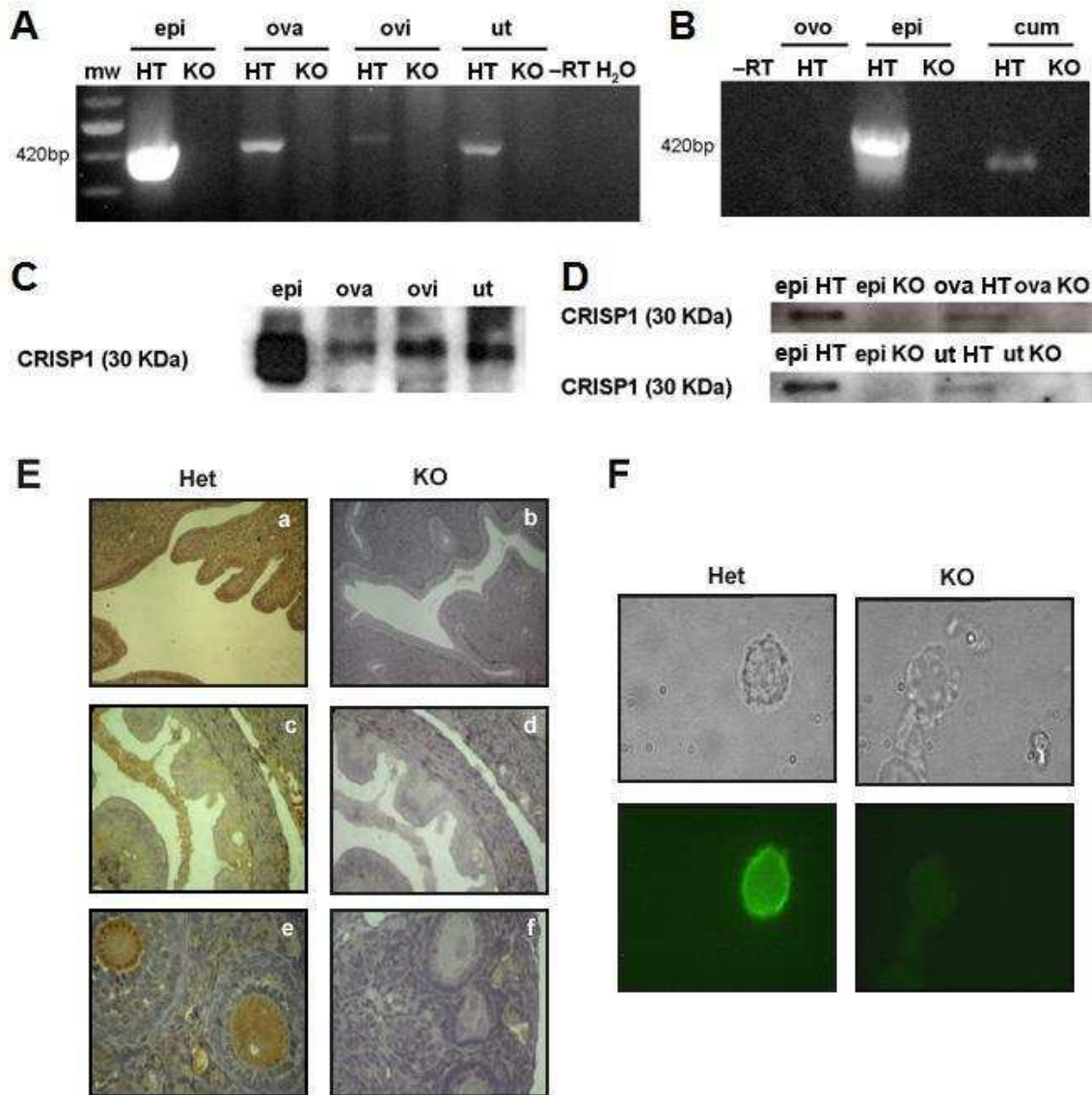


Figura 11. Presencia y localización de CRISP1 en ratón. Productos de RT-PCR de ovario (ova), oviducto (ovi), útero (ut) (A), y de células del cúmulus (cum) y ovocito (ovo) (B) provenientes de animales HT y KO para CRISP1 fueron separados en un gel de agarosa al 2% y luego teñidos con bromuro de etidio para permitir su visualización. Extractos proteicos de ovario, oviducto y útero de animales HT (C), y de ovario y útero tanto HT como KO (D) fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12%, analizándose la presencia de CRISP1 mediante Western blot. En C y D extracto proteico de epidídimo HT y KO fueron utilizados como control. E. Oviducto (a y b), útero (c y d) y ovario (e y f) provenientes de animales HT y KO fueron sometidos a inmunohistoquímica utilizando anti-CRISP1 como primer anticuerpo. F. Células del cúmulus HT y KO fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia indirecta utilizando anti-CRISP1 y un anticuerpo secundario acoplado a FITC.

Los resultados de Wb revelaron bandas del tamaño esperado para la proteína CRISP1 en oviducto, ovario y útero, cuya identidad quedó confirmada en los dos últimos por la

ausencia de dicha banda en las muestras provenientes de animales KO (**Figura 11D**). En cuanto a su localización, los resultados de inmunohistoquímica indicaron la presencia de marcación positiva en el epitelio luminal del oviducto y del útero, como así también en las células de la granulosa y, minoritariamente, en las células estromales del ovario en los animales HT y no así en los KO (**Figura 11E**). En las células del cúmulus, observamos que, mientras que las células de animales KO no presentaban marca, aquellas de animales HT mostraban una marca fluorescente en la superficie (**Figura 11F**). En conjunto los resultados indican que al igual que en la rata, CRISP1 se expresa en el tracto reproductor femenino del ratón.

El siguiente paso consistió en estudiar los posibles roles o funciones que podría cumplir la proteína en dicho tracto. Dado que uno de los objetivos de nuestro laboratorio es el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en fertilización, decidimos investigar el posible rol de CRISP1 del cúmulus en este proceso, utilizando el modelo de ratón KO: Para ello, se realizaron una serie de experimentos en los cuales COCs HT y KO fueron inseminados con espermatozoides HT o KO durante 3 horas. Finalizada la incubación, los ovocitos fueron recuperados, teñidos con el colorante Hoechst y observados al microscopio, determinándose el porcentaje de fertilización en los cuatro grupos. Los resultados indicaron que los porcentajes de fertilización de ovocitos provenientes de COCs KO fueron significativamente menores que los correspondientes a COCs HT, revelando que la presencia de CRISP1 en el cúmulus sería importante para la fertilización. Al igual que había sido descrito anteriormente (Da Ros et al., 2008), los espermatozoides provenientes de animales KO no tuvieron un comportamiento distinto respecto a los espermatozoides de animales HT cuando los COCs eran provenientes de animales HT. Sin embargo, cuando los ensayos fueron realizados con COCs KO, los porcentajes de fertilización fueron significativamente menores al utilizar espermatozoides KO, sugiriendo que, además del efecto producido por la ausencia de CRISP1 en el cúmulus sobre la fertilización, habría un efecto debido a la ausencia de CRISP1 sobre los espermatozoides (**Figura 12**). Estos resultados indicaban que la ausencia de CRISP1 permitía evidenciar defectos funcionales del espermatozoide KO no detectados al utilizar COCs de animales HT sugiriendo que, más allá de las ya descritas funciones de CRISP1 del espermatozoide en las etapas de interacción con la ZP y con el oolema (fusión) (Da Ros et al., 2008) CRISP1 del espermatozoide podría estar participando en la etapa de penetración del cúmulus.

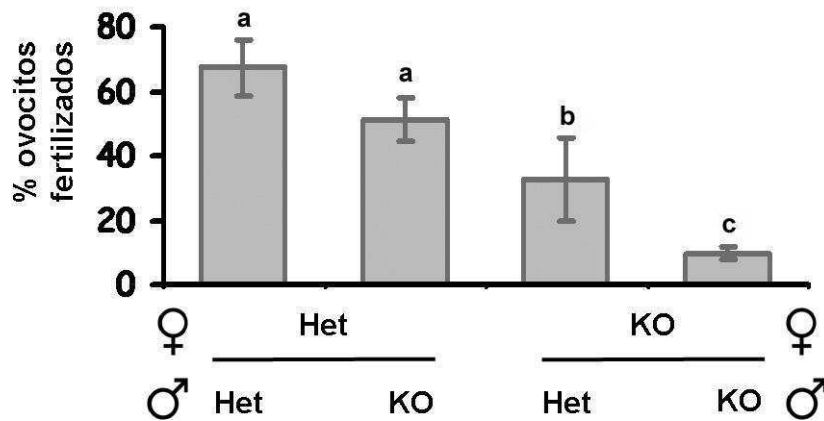


Figura 12. Participación de CRISP1 del cúmulus en el proceso de fertilización. Complejos cúmulus-ovocito (COCs) de hembras HT y KO fueron co-incubados con espermatozoides *Crisp1*^{+/-} o *Crisp1*^{-/-} capacitados por 90 min, luego de lo cual, los ovocitos fueron teñidos con Hoescht determinándose el porcentaje de fertilización. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. b $p < 0,05$ vs a. c $p < 0,05$ vs a y vs b.

4- Participación de CRISP1 del espermatozoide en la apertura del cúmulus

Con el fin de completar la caracterización de las funciones de CRISP1 del espermatozoide el próximo paso consistió en investigar la posible participación de CRISP1 en la apertura del cúmulus que tiene lugar mientras el espermatozoide atraviesa esta matriz que rodea al ovocito. Esta posibilidad estaba apoyada por observaciones previas de nuestro laboratorio (Tesis Doctoral Dra. Dolores Busso), mostrando que la proteína CRISP1 purificada provocaba la dispersión de las células del cúmulus. Tal como se muestra en la **Figura 13** (Tesis Doctoral Dra. Dolores Busso) puede observarse el aspecto compacto de COCs incubados en medio control respecto al correspondiente a COCs incubados en medio conteniendo CRISP1, en los que se observa un claro efecto de la proteína sobre la integridad del cúmulus.

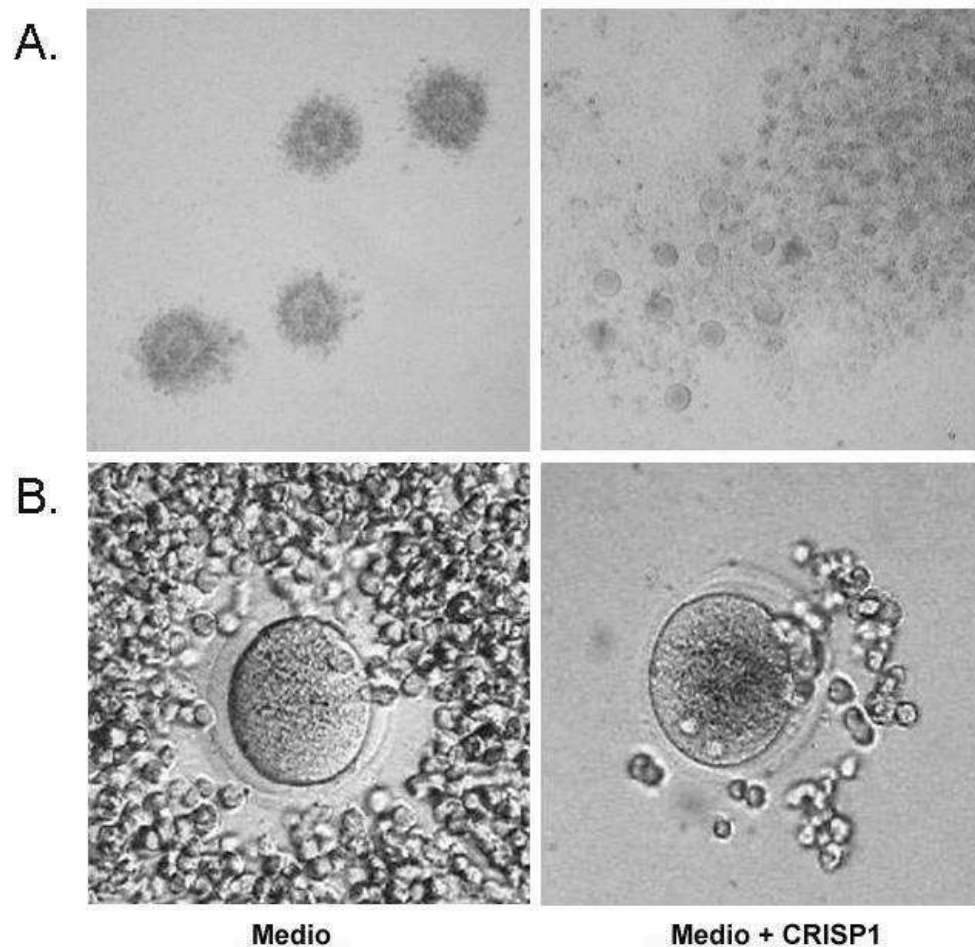


Figura 13. Efecto de la proteína CRISP1 sobre la integridad de COCs de ratón. COCs de ratón fueron incubados durante 30 min en medio control o medio conteniendo 6 μ M CRISP1. **A.** COCs observados en las gotas de incubación mediante un microscopio invertido (6X). **B.** COCs lavados, montados, y observados al microscopio óptico (40X).

Con el fin de investigar más profundamente la posibilidad de que CRISP1 fuera capaz de dispersar el cúmulus, empleamos la clasificación previamente descrita por nuestro laboratorio, por la cual se otorga un valor de 4 a los COCs intactos, un valor de 0 a aquellos COCs completamente denudados, y valores entre 4 y 0 a los estadios intermedios en los COCs parcialmente denudados (**Figura 14**).

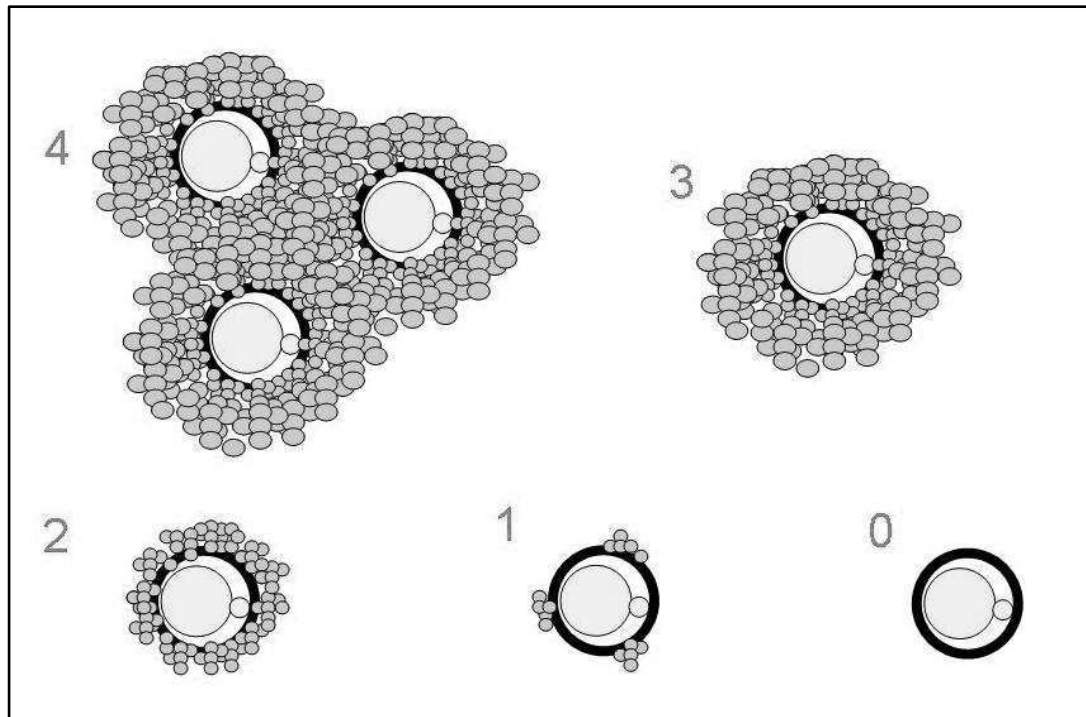


Figura 14. Clasificación de la integridad del cúmulus. Esquema en el que se representa el sistema de evaluación subjetiva utilizado para evaluar el efecto de proteínas sobre los COCs. Se asignó a cada COC individualmente un valor de entre 4 y 0, según el grado de disgregación del cúmulus.

A continuación, los COCs fueron incubados en presencia de CRISP1 (6 μ M) durante 30 o 60 min, utilizando CRISP3 y hialuronidasa como controles. Los resultados mostraron que el efecto de CRISP1 sobre la disgregación del cúmulus fue dependiente del tiempo de incubación ($p < 0,05$), observándose una disgregación total de los COCs por exposición a 6 μ M CRISP1 durante 60 minutos, y ningún efecto al emplear CRISP3 a ninguno de los tiempos evaluados (**Figura 15**). La hialuronidasa, como era previsible, produjo la disgregación total de los COCs a los 60 minutos.

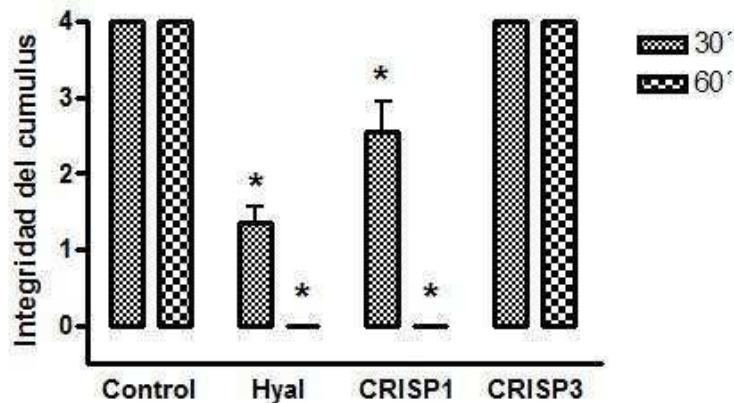


Figura 15. Actividad de CRISP1 sobre la integridad del cúmulus de ratón. COCs de ratón fueron incubados en ausencia de proteína (control), o en presencia de CRISP1 (6 μ M), o CRISP3 (6 μ M), o hialuronidasa de testículo bovino (Hyal) (0,3mg/ml), durante 30 o 60 min, determinándose, posteriormente, la integridad de los cúmulus de acuerdo al sistema de evaluación descripto (n=3). *p<0,05 vs control

Con el fin de investigar la especificidad del efecto de CRISP1 sobre la apertura del cúmulus, se evaluó si los anticuerpos contra CRISP1 eran capaces de inhibir su actividad por bloqueo del sitio activo. Para ello, los COCs fueron expuestos a la proteína CRISP1 que había sido previamente preincubada por 30 minutos con sueros generados contra recCRISP1 provenientes de tres animales distintos, observándose el efecto de cada suero sobre la apertura del cúmulus por CRISP1. Mientras que la incubación de COCs en presencia de CRISP1 provocó la dispersión del cúmulus previamente descrita, la preincubación de la proteína con una concentración tres veces superior de cualquiera de los tres anticuerpos no modificó el nivel de dispersión (**Figura 16**), indicando que la actividad de CRISP1 no era inhibible mediante el bloqueo de la proteína por los anticuerpos.

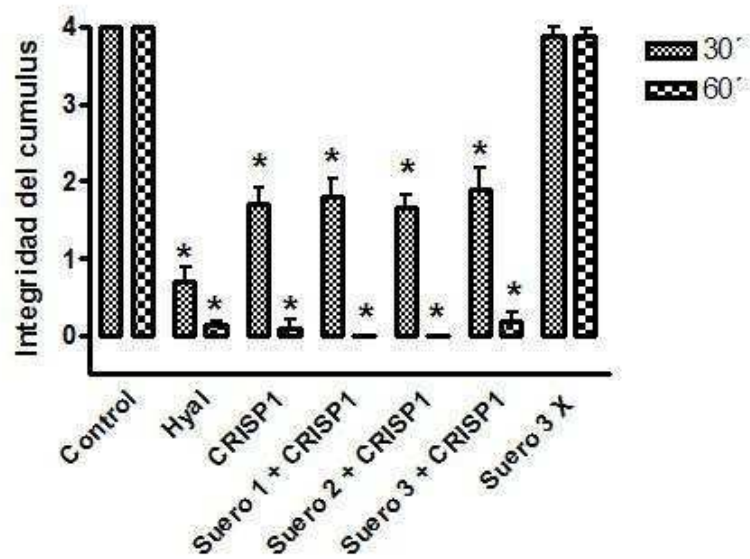


Figura 16. Especificidad del efecto de CRISP1 sobre la integridad del cúmulus. COCs de ratón fueron incubados durante 30 o 60 min en presencia de CRISP1 6 μ M, la cual había sido expuesta previamente por 30 min a sueros anti recCRISP1 (18 μ M), determinándose, posteriormente, la integridad de los cúmulus de acuerdo al sistema de evaluación descrito. La incubación de COCs en ausencia de proteína, o bien en presencia de hialuronidasa (0,3mg/ml), fue realizada como control. * $p < 0,05$ vs control. (n=3).

Evidencias previas del laboratorio indican que, si bien la proteína CRISP1 es capaz de asociarse a ácido hialurónico *in vitro*, no tendría una actividad hialuronidásica detectable (Tesis Doctoral Dra Dolores Busso). Esos resultados han llevado a re-evaluar la posibilidad de que existan otros mecanismos por los cuales CRISP1 podría estar dispersando al cúmulus. Con el fin de evaluar la posible dispersión del cúmulus a través de un mecanismo independiente de la acción hialuronidásica, los COCs fueron incubados en presencia de CRISP1 previamente preincubada por 15 minutos con Apigenina, un inhibidor específico de hialuronidasa. Los resultados mostraron que la apertura del cúmulus, ya sea por hialuronidasa o por CRISP1, podía ser parcialmente inhibida por el tratamiento con Apigenina, principalmente a los 60 minutos de incubación (**Figura 17**).

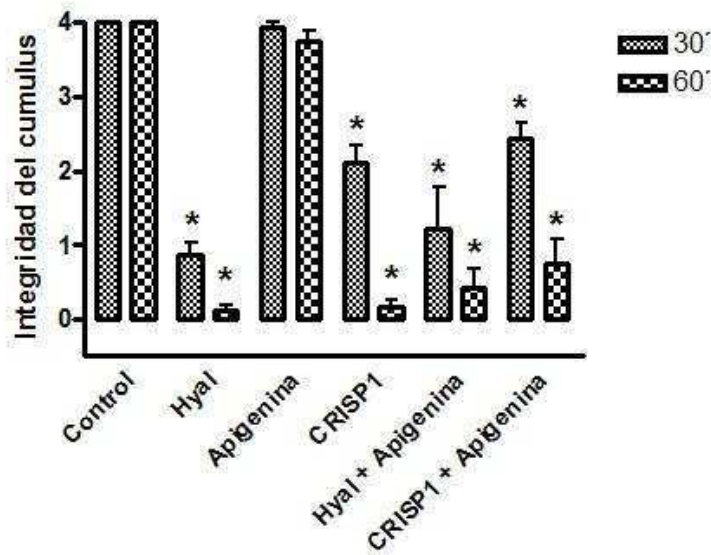


Figura 17. Actividad de CRISP1 en presencia de Apigenina sobre la integridad del cúmulus. COCs de ratón fueron incubados 30 o 60 min en presencia de 6 μ M CRISP1 preincubada con Apigenina (100 μ M), analizándose, posteriormente, el efecto del tratamiento sobre la dispersión del cúmulus. Como controles, se realizaron ensayos en los cuales la incubación de COCs se realizó en ausencia de proteína (control), en presencia de hialuronidasa, en presencia de Apigenina, o en presencia de hialuronidasa preincubada con Apigenina. * $p < 0,05$ vs control. (n=3).

Este resultado sugirió que la preparación de CRISP1 nativa podría estar contaminada con alguna de las hialuronidasas conocidas. Para evaluar esta posibilidad, se procedió a repurificar la proteína nativa por separación electroforética y elución de la banda correspondiente a CRISP1. Como control, se eluyó el resto de la calle sembrada donde podrían quedar los contaminantes, como así también la calle correspondiente a la hialuronidasa comercial. Los resultados (**Figura 18**) mostraron que la preparación de CRISP1 utilizada en los ensayos contenía contaminantes (**Figura 18A**), que fueron detectables como consecuencia de la concentración de las muestras durante el proceso de repurificación.

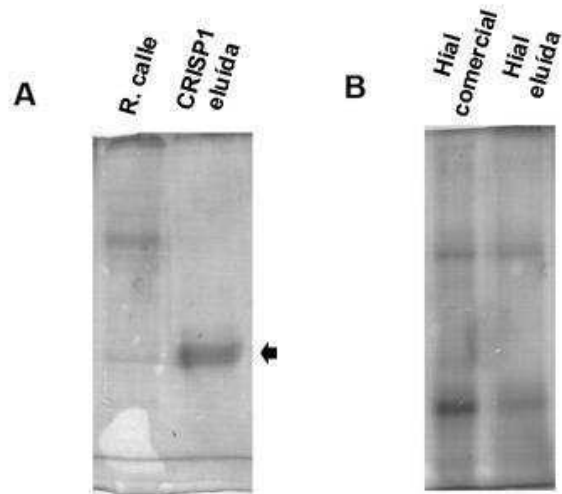


Figura 18. Re-purificación de las proteínas nativas. **A.** CRISP1 (2 μ g) y el resto de la calle (R. calle) sembrada repurificados y separados electroforéticamente en un gel de acrilamida nativo al 12% y revelados mediante tinción con plata. **B.** hialuronidasa comercial (2 μ g) y hialuronidasa previamente eluída del gel, fueron separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida al 8% e identificados mediante tinción con plata.

La proteína CRISP1 (6 μ M) eluída del gel fue utilizada en un ensayo de apertura de cúmulus utilizando, como control, COCs expuestos a la fracción conteniendo los contaminantes (6 μ M) o a hialuronidasa eluída del gel (**Figura 18B**). Los resultados indicaron que, mientras la fracción conteniendo los contaminantes mostró capacidad de dispersar al cúmulus, CRISP1 eluída no fue capaz de disgregarlos (**Figura 19**). El hecho de que la hialuronidasa y los contaminantes purificados no perdieran su actividad, indicaría que el método de purificación no estaría alterando la capacidad de dispersión de las proteínas.

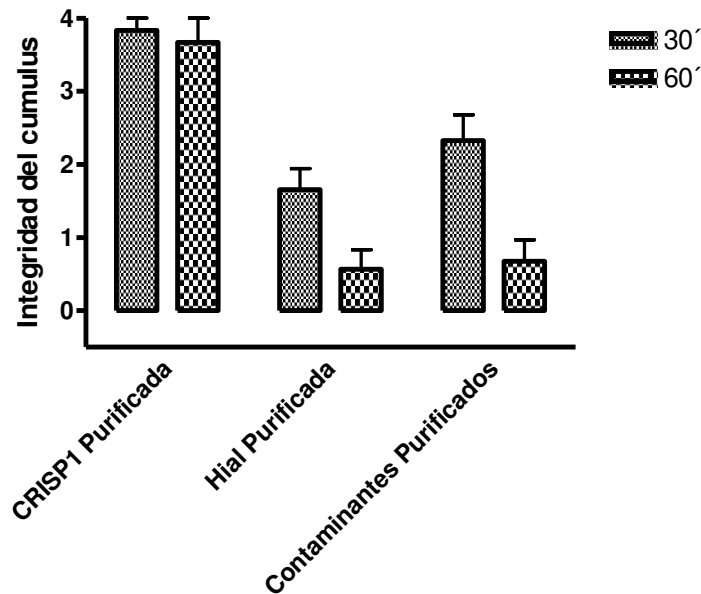


Figura 19. Actividad de CRISP1 re-purificada sobre la integridad del cúmulus de ratón. COCs de ratón fueron incubados durante 30 o 60 min en presencia de CRISP1 (6 μ M), de la fracción conteniendo los contaminantes (6 μ M), o de hialuronidasa (0,3mg/ml) eluidos del gel, determinándose, posteriormente, la integridad de los cúmulus por el sistema de evaluación descripto. * $p < 0,05$ vs control. (n=3).

En resumen, estos resultados indicando que la apertura observada al exponer los cúmulus a CRISP1 se debería a contaminantes muy minoritarios que acompañaban la preparación original, no apoyarían una actividad disgregante de CRISP1 del espermatozoide durante la etapa de penetración del cúmulus.

5- Efecto de la ausencia de CRISP1 del cúmulus en la interacción de gametas

Dado que los estudios descriptos no apoyaban una actividad disgregante del cúmulus por parte de la proteína CRISP1 del espermatozoide, el paso siguiente consistió en investigar de qué manera la ausencia de CRISP1 del COC podría estar afectando la fertilización. Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos en la FIV con COCs de hembras KO revelaron que la presencia de CRISP1 en las células del cúmulus era relevante para la fertilización. Por otra parte, la disminución de la capacidad fertilizante de los espermatozoides KO para CRISP1 se observaba sólo al

utilizar COCs KO. Una posible causa para explicar estos resultados, sería que la ausencia de CRISP1 de las células del cúmulus estuviera de alguna manera afectando el ingreso de los espermatozoides a los COCs. Para evaluar dicha posibilidad, se diseñó un ensayo en el cual COCs HT y KO fueron co-incubados durante 15 min con espermatozoides HT capacitados, previamente teñidos con el colorante Hoechst, con el fin de poder detectar, por observación al microscopio óptico, los espermatozoides que estaban penetrando el cúmulus (**Figura 20A**).

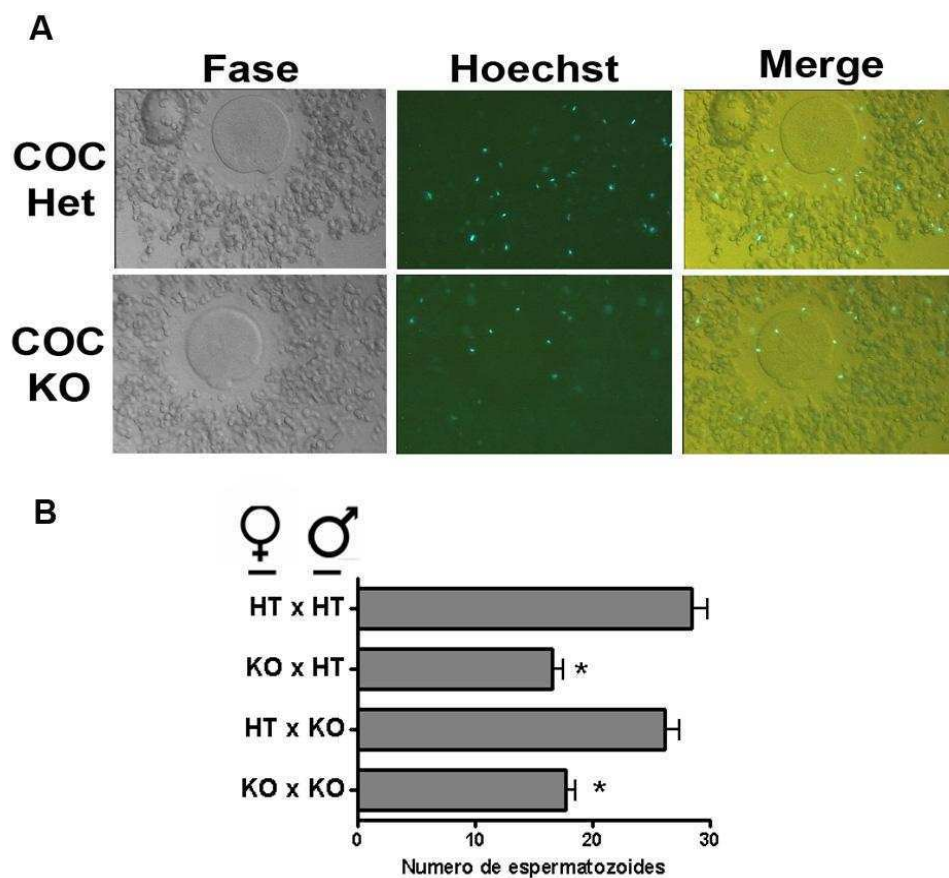


Figura 20. Efecto de la ausencia de CRISP1 en los COCs sobre la penetración de los espermatozoides. COCs de animales heterocigotas (HT) o Knock out (KO) fueron incubados con espermatozoides HT o KO, los cuales fueron previamente capacitados y marcados con Hoechst. La co-incubación fue realizada por 15 min, y fijada con para formaldehído. Posteriormente los COCs fueron montados entre cubre y porta, y los espermatozoides observados (**A**) y contados (**B**) bajo un microscopio de epifluorescencia. * $p < 0,05$ vs hembra HT. (n=5).

Los resultados mostraron que los COCs KO presentaban un número de espermatozoides en su interior significativamente menor que el correspondiente a COCs HT (**Figura 20B**). En paralelo, se realizaron ensayos de penetración en los

cuales se utilizaron espermatozoides KO en lugar de HT. En estos ensayos, los resultados mostraron nuevamente que aquellos COCs que carecían de CRISP1 eran menos penetrados por los espermatozoides que los COCs HT. Por otro lado, el mismo grado de penetración logrado por los espermatozoides, independientemente de su genotipo, tanto para COCs HT como KO, estaba de acuerdo con los resultados previos indicando que la proteína CRISP1 presente en los espermatozoides no participaría en la apertura del cúmulus.

En conjunto, estos resultados indicaban que la ausencia de CRISP1 en el cúmulus estaría afectando la penetración de los espermatozoides durante el proceso de fertilización. En base a estas observaciones, nos planteamos diferentes roles posibles para la proteína CRISP1 del cúmulus en el proceso de fertilización. Como primera posibilidad se evaluó si CRISP1 presente en el COC podría estar teniendo una función en la organización de la estructura del cúmulus que la hiciera más penetrable por los espermatozoides. Para ello, se analizó la apertura de los COCs provenientes de hembras HT o KO ya sea espontánea o bajo efecto de la hialuronidasa, cada 30 minutos durante un período de 3 horas. Los resultados mostraron que si bien se observaba una mayor apertura tanto espontánea como por hialuronidasa en función del tiempo, no había diferencias de comportamiento entre COCs HT y COCs KO para ninguno de los dos tratamientos ensayados (**Figura 21A y B**). Estos estudios indicarían que la ausencia de CRISP1 en las células del cúmulus no tendría un efecto en la estructura del cúmulus al menos detectable mediante los métodos empleados.

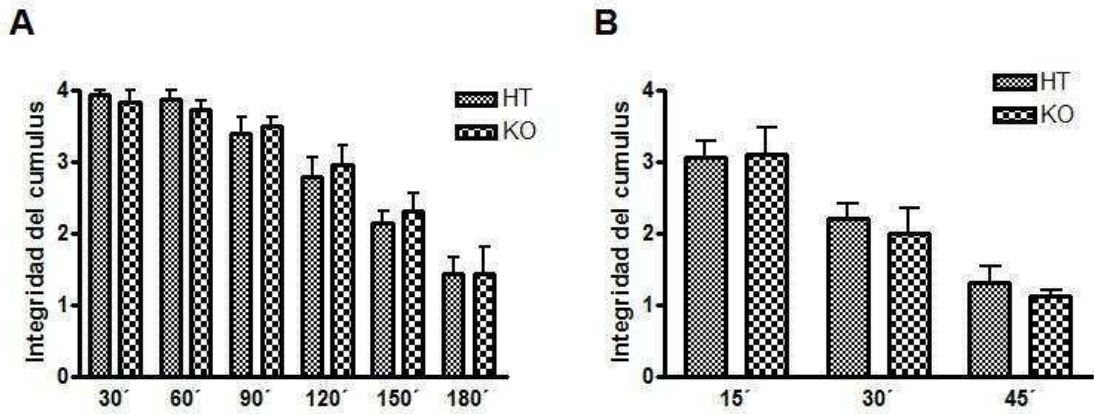


Figura 21. Evaluación de la importancia de CRISP1 para la organización del cúmulus. A. COCs de animales HT y KO fueron incubados a 37°C por 3 horas, y luego analizados bajo microscopio óptico siguiendo el sistema de evaluación previamente descrito (n=3). **B.** COCs HT y KO fueron incubados en presencia de hialuronidasa (0,1mg/ml), durante 15, 30 o 45 min, determinándose la integridad de los cúmulus de acuerdo al sistema de evaluación descrito anteriormente (n=3).

Dado que la estructura de los COCs no se encontraría alterada, y teniendo en cuenta la alta homología de CRISP1 con la proteína CRISP de anfibios “Allurina”, la cual presenta propiedades quimioattractantes de espermatozoides no sólo de anfibios sino también de ratón, decidimos evaluar si la bajada en el número de espermatozoides que penetran los COCs KO podría deberse a que CRISP1 del COC actuara como quimioattractante.

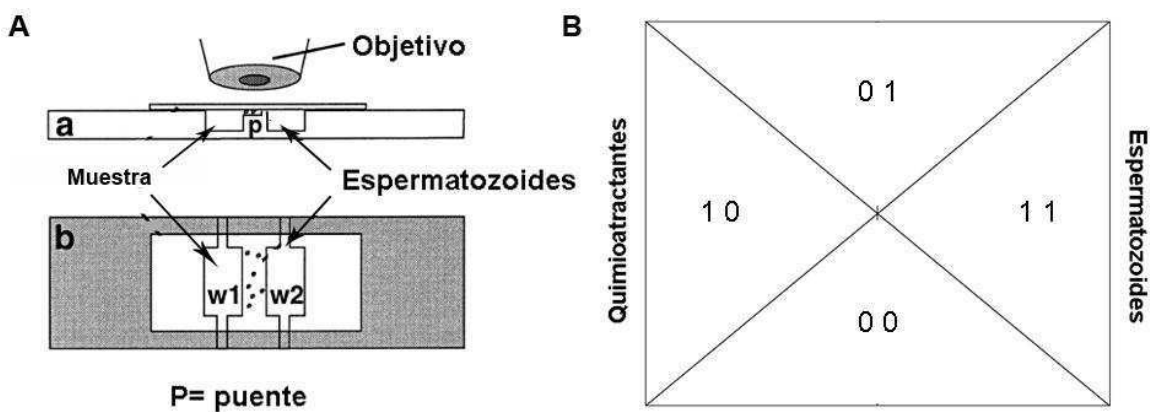


Figura 21. A. Esquema de cámara Zigmond. B. Cuadrantes de distribución de los espermatozoides, sobre el puente.

Para ello, se utilizó el método de medición de quimiotaxis descrito por la Dra. Laura Giojalas (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), investigadora con amplia experiencia en el estudio de quimiotaxis espermática, en el cual uno de los receptáculos (W1) de una cámara Zigmond es cargado con el agente quimioattractante a evaluar mientras que el otro es cargado con espermatozoides capacitados (W2) (**Figura 21A**). De esta manera, se forma un gradiente monodimensional del quimioattractante cargado en W1 sobre el puente (p) formado entre ambos compartimientos (W1 y W2), y es ahí donde los espermatozoides son filmados con una cámara acoplada al microscopio. Los videos son luego analizados mediante el seguimiento de la trayectoria de los espermatozoides individualmente, evaluando su orientación en los cuadrantes de manera tal que si los mismos estuvieran orientados al azar, estarían distribuidos equitativamente en cada cuadrante (25% en cada uno), mientras que la detección de un desvío indicaría la existencia de quimiotaxis (**Figura 21B**).

Para evaluar a CRISP1 como quimioattractante, se realizó una curva de concentraciones progresivas de CRISP1 nativa purificada (0,1 pM hasta 10 μ M), evaluándose, en cada uno de los ensayos, la orientación de los espermatozoides incubados en medio de capacitación solo o conteniendo 10 pM de progesterona, como controles negativo y positivo, respectivamente. Los resultados mostraron que a 1 μ M de CRISP1 se observa un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides orientados hacia el gradiente, alcanzándose el valor correspondiente a progesterona al utilizar una concentración 10 μ M de CRISP1 (**Figura 22**). Estos resultados nos indicaban que, al igual que la proteína de anfibios "Allurina", CRISP1 sería capaz de quimioatraer espermatozoides.

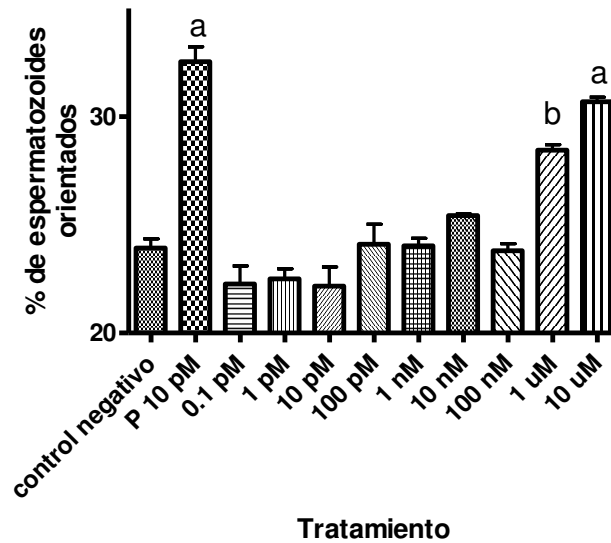


Figura 22. Capacidad quimioattractante de CRISP1 hacia los espermatozoides. Espermatozoides capacitados (1×10^4) fueron cargados en la cámara Zigmond al mismo tiempo que una de las concentraciones de CRISP1 a evaluar, dejados 15 minutos en estufa a 37°C para que se equilibre y luego filmados. Por último los espermatozoides son contados y su orientación evaluada. Medio de capacitación de espermatozoides y progesterona 10 pM fueron usados como controles negativos y positivos respectivamente. Esto fue realizado en 3 experimentos contando por lo menos 450 espermatozoides para cada tratamiento. Los datos son expresados como la media \pm SEM. a $p < 0,005$ vs control ; b $p < 0,05$ vs control y b $p < 0,05$ vs a

Con el fin de caracterizar esta nueva actividad de la proteína, el paso siguiente consistió en la realización de una serie de estudios estructura-función, en los que se evaluó la relevancia de la glicosilación y la conformación de la proteína para la actividad quimioattractante observada. Para ello, se utilizó la proteína recombinante CRISP1 (recCRISP1 10 μM) la cual, por ser producida en un sistema procariota, carece de glicosilación y posee un deficiente nivel de formación de puentes disulfuros (Ellerman et al, 1998b). Los resultados mostraron que esta proteína no tenía actividad quimioattractante a juzgar por el hecho de que la misma fue incapaz de atraer a los espermatozoides (**Figura 23**). Posteriormente, se evaluó la actividad de la proteína nativa desnaturalizada por calentamiento (10 min a 75°C), y de la proteína nativa reducida por tratamiento con DTT, y alquilada para evitar la reformación de los puentes disulfuro y posterior desnaturalización por calor. Estos resultados indicaron que la actividad de la proteína desnaturalizada era menor respecto de la proteína no tratada, exhibiendo así una actividad similar a la obtenida al utilizar la proteína nativa en concentración 1 μM . Por su parte, la proteína reducida y calentada resultó totalmente inactiva (**Figura 23**).

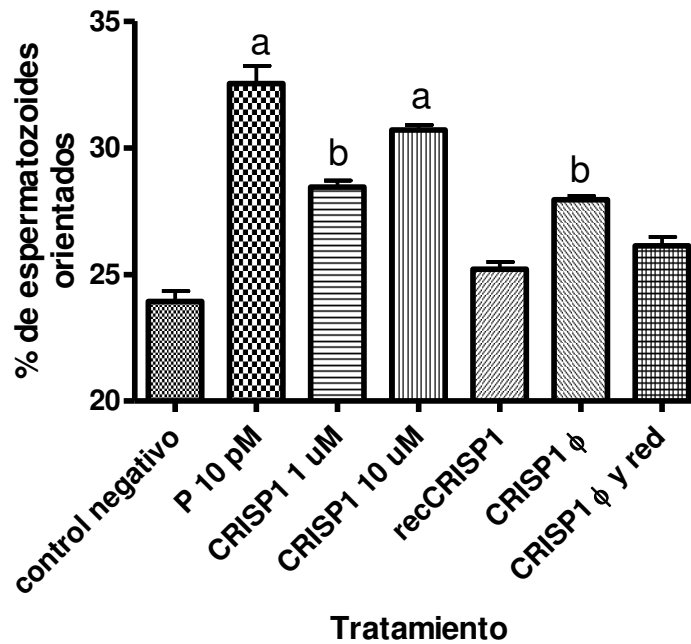


Figura 23. Caracterización de la actividad quimioattractante de CRISP1 por estudios estructura/función. Espermatozoides capacitados (1×10^4) fueron colocados en la cámara Zigmond, evaluándose el porcentaje de los mismos que mostraban orientación al ser expuestos en medio solo o conteniendo progesterona 10 pM (P 10 pM), CRISP1 nativa (1 y 10 μ M), CRISP1 recombinante (10 μ M) (recCRISP1), CRISP1 nativa calentada (10 μ M) (CRISP1 Φ) y CRISP1 nativa calentada y reducida (10 μ M) (CRISP1 Φ y red). Los datos provienen de 3 experimentos contando por lo menos 450 espermatozoides para cada tratamiento. Los datos son expresados como la media \pm SEM. a $p < 0,005$ vs control ; b $p < 0,05$ vs control y b $p < 0,05$ vs a

La falta de actividad de la proteína recombinante como así también la disminución de la actividad en la proteína nativa desnaturalizada y reducida indican que la conformación y los puentes disulfuro serían relevantes para la actividad quimiotáctica de CRISP1.

En resumen, los estudios presentados a lo largo del capítulo indican que CRISP1 está presente en el tracto reproductor femenino, y que aquella presente en el cúmulus participaría en el proceso de fertilización facilitando la penetración de los espermatozoides por el cúmulus a través de una acción quimioattractante sobre los mismos.

Capítulo II

Presencia de proteínas GLIPR1 en el tracto reproductor y su participación en el proceso de fertilización

1- Identificación de GLIPR1L1 y GLIPR1L2

Como se mencionara en la introducción, la secuenciación de péptidos pertenecientes a proteínas localizadas en “raft” de membranas de espermatozoides reveló la presencia de dos proteínas de la superfamilia CAP que no habían sido previamente descritas en espermatozoides, denominadas SCP/TPX-1/CRISP-LIKE # 2 (1700011E04RIK) BAB 24280 y SCP/TPX-1/CRISP-LIKE # 1 (4921508011RIK) NP_080499 (Sleight et al., 2005). La inclusión de estas secuencias en la base de datos del NCBI, y posterior búsqueda utilizando la plataforma “nucleotide blast”, indicó que correspondían a las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2.

Teniendo en cuenta la similitud de las proteínas GLIPRs con las CRISPs, y su presencia en el espermatozoide, el primer paso consistió en investigar el sitio de expresión de dichas proteínas. Para ello, se realizó la extracción del ARN total de diferentes tejidos reproductivos y no reproductivos (control), y la retrotranscripción correspondiente sometiendo las muestras a PCR utilizando primers específicos para dichos genes. Como control de carga, utilizamos primers del gen *Gadph*, que posee expresión constitutiva en todos los tejidos evaluados. Los resultados revelaron la presencia del mensajero para *Glipr111* sólo en testículo, y de *Glipr112* en el testículo y en el epidídimo (**Figura 1A**). Dado que *Glipr112* se encontraba presente en epidídimo, se evaluó su expresión en las tres regiones principales del órgano: caput, corpus y cauda, detectándose el mensajero sólo en el caput epididimario (**Figura 1B**). La identidad de las bandas detectadas por PCR fue confirmada mediante secuenciación de los fragmentos amplificados correspondientes. Los resultados indicaron que los ARNm amplificados presentaban una identidad de 98% con *Glipr111* y de 100% con *Glipr112* en testículo y de un 98% con *Glipr112* en epidídimo.

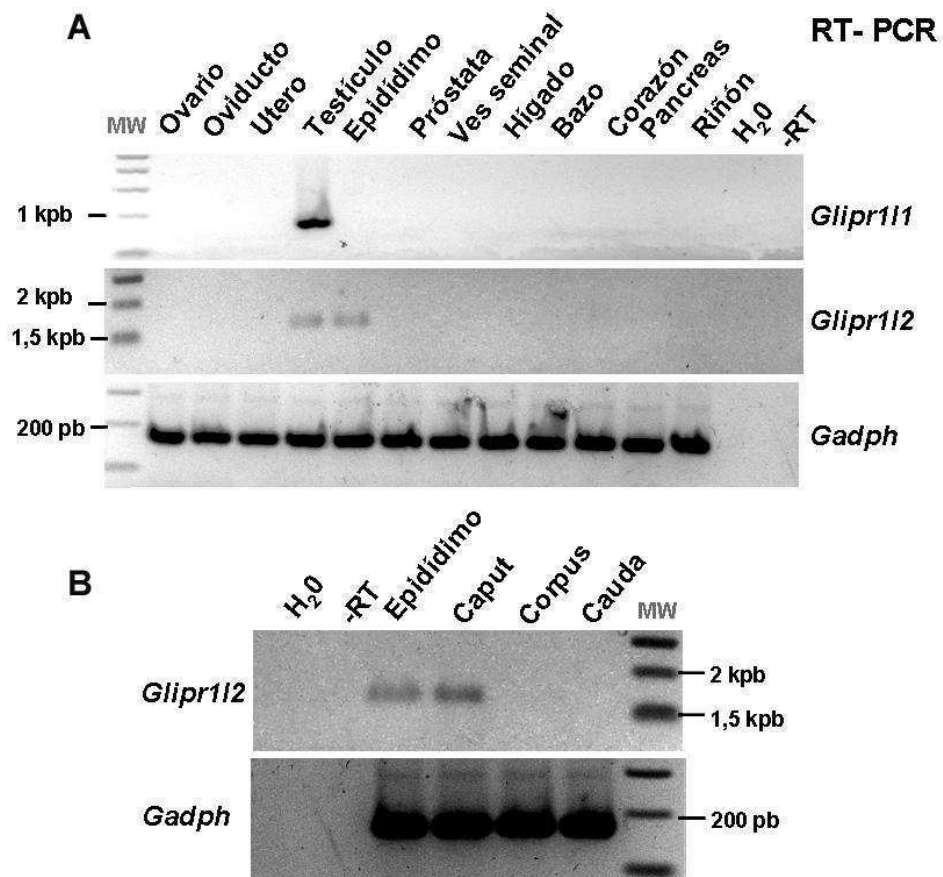


Figura1: Estudio de la presencia de ARNm de Glipr111 y Glipr112. Los ADNc de diferentes tejidos (A) y de las diferentes regiones del epidídimo (B) fueron sometidos a RT-PCR, utilizando los primers correspondientes, y luego analizados por electroforesis en un gel de agarosa. Los productos de PCR fueron observados por tinción con bromuro de etidio.

Con el fin de caracterizar la expresión de ambos mensajeros durante la ontogenia, se realizaron RT-PCRs semi-cuantitativas a partir de los mensajeros totales de epidídimo y testículo recuperados a distintos tiempos desde el nacimiento hasta los 70 días de edad. Una vez obtenidos los productos de PCR, los mismos fueron comparados con los productos de PCR obtenidos para *Gadph* a partir de las mismas muestras, y la relación fue calculada utilizando el programa Image J. Los resultados (**Figura 2A y B**) mostraron expresión del ARNm de *Glipr111* al nacimiento, una disminución a los 7 días, y un aumento a partir de ese momento hasta alcanzar el máximo a los 70 días. Para el caso de GLIPR1L2, el mensajero también se encontró presente al nacimiento. Sin embargo, mientras el mensajero testicular bajó a los 7 días sustancialmente, el mensajero para la proteína epididimaria descendió a los 7 días de manera menos

pronunciada y mantuvo los mismos niveles hasta los 28 días. En ambos casos, los niveles luego subieron hasta llegar a valores máximos a los 60 días.

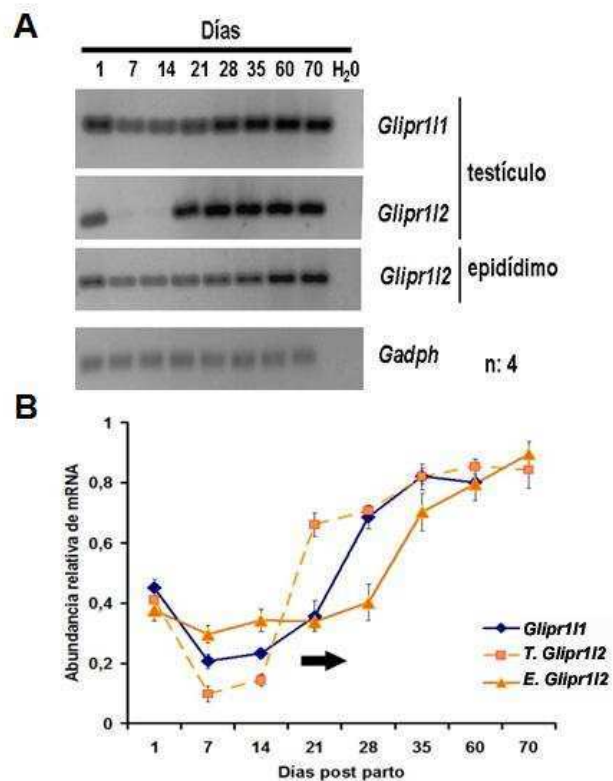


Figura 2. Estudio de la expresión de las GLIPRs durante el desarrollo. **A.** Los ADNc de testículo y epidídimo fueron sometidos a RT-PCR semicuantitativas, utilizando los primers correspondientes a *Glipr111* y *Glipr112*, y luego analizadas por electroforesis en un gel de agarosa. En el control H₂O, no se incluyó ADNc, el control -RT se incluye ARNm sin convertir a ADNc, para chequear la presencia de ADN genómico. Como control de carga se realiza una RT-PCR con primers de un gen que se expresa de manera constitutiva en los distintos tejidos (*Gadph*). Los productos de PCR fueron observados por tinción con bromuro de etidio. **B.** Los productos de PCR fueron cuantificados utilizando el programa Image J. Este gráfico es el promedio de 4 ensayos.

Con el fin de estudiar la localización celular de la expresión de estos mensajeros, cortes histológicos de testículo y epidídimo fueron sometidos a la técnica de hibridación *in situ*, utilizando sondas nucleotídicas antisentido específicas de los mensajeros de *Glipr111* y *Glipr112*. Debido a la existencia de una región de alta homología entre ambos mensajeros, y con el fin de evitar reacciones cruzadas, las sondas fueron diseñadas en zonas de baja o nula homología (**Figura 3**). A ambas sondas se les acopló el glucósido digitoxina, de forma tal de ser detectadas mediante el uso de un anticuerpo anti-digitonina acoplado a fosfatasa alcalina.

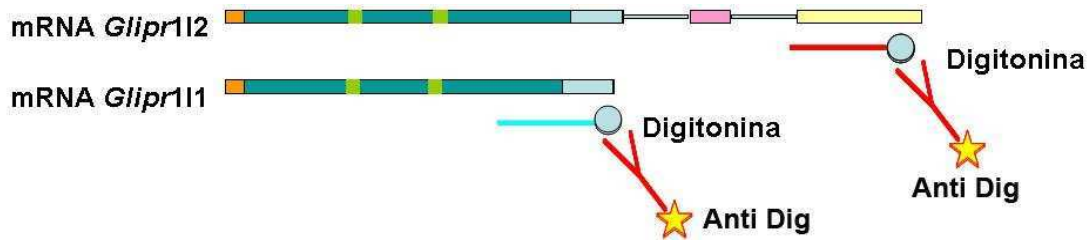


Figura 3: Esquema de las sondas anti-Glipr111 y anti-Glipr112 utilizadas en ensayos de hibridación *in situ*. Las sondas anti-sentido diseñadas fueron acopladas a digitoxina mediante un tratamiento químico. La detección de las sondas se llevó a cabo mediante el empleo del anticuerpo comercial anti-digitonina acoplado a peroxidada (Sigma) en una concentración 0,1mg/ml.

Para el caso de *Glipr111*, los resultados mostraron la presencia de una marca positiva en las espermátidas redondas y elongadas del testículo, mientras que para *Glipr112* se observó marca positiva en los espermatoцитos primarios del testículo (**Figura 4A**). Como control, los cortes de testículo fueron incubados con la sonda correspondiente y un exceso de la sonda “fría” (no acoplada a digitonina), no observándose marca en ninguno de los casos. La evaluación de *Glipr112* en el epidídimo mostró una marca intensa en las células principales del caput, no observada en el corpus ni cauda (**Figura 4B**).

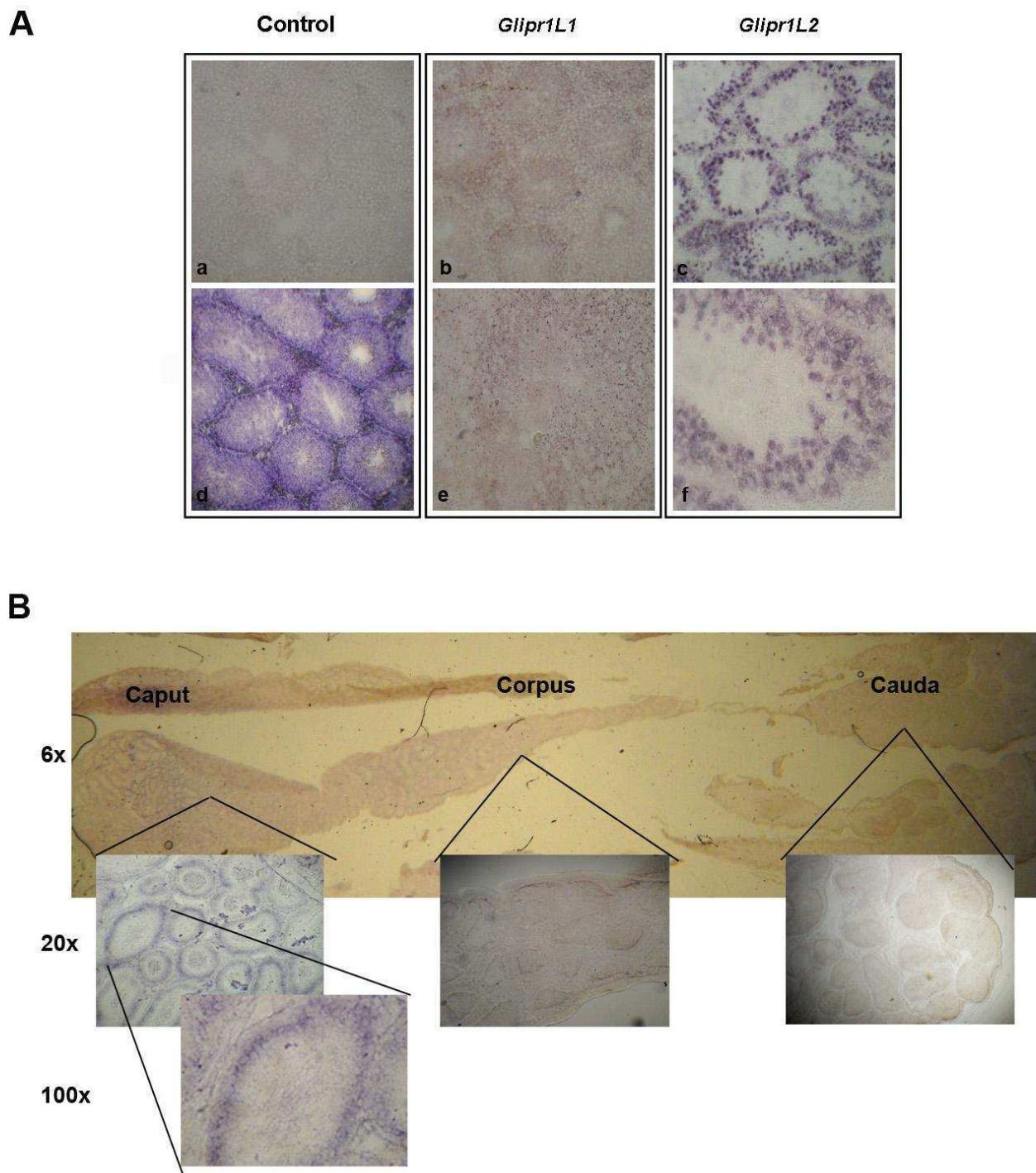


Figura 4: Localización de los ARNm de *Glipr1L1* y *Glipr1L2*. **A.** Cortes de testículo fueron incubados con la sonda marcada específica para *Glipr1L1* (**b** 40x y **e** 100x) y *Glipr1L2* (**c** 40x y **f** 100x) y, posteriormente con un anticuerpo anti-digitonina acoplado a fosfatasa alcalina. En el cuadro (**d**) se muestra una tinción con hematoxilina. El control (**a**) fue realizado co-incubando la sonda no acoplada a digitonina (fría) con la sonda marcada (caliente) en una relación 100 a 1. **B.** Localización de ARNm de *Glipr1L2* en las distintas regiones del epidídimo. Los cortes fueron tratados de la misma manera que en 4A. Se observa un epidídimo entero y luego magnificaciones de cada una de las regiones. Nótese la ausencia de marca en corpus y cauda.

2- Clonado y expresión de las proteínas recombinantes GLIPR1L1 y GLIPR1L2

De acuerdo a las evidencias halladas (Sleight et al., 2005), los péptidos secuenciados, que correspondieron a GLIPR1L1 y GLIPR1L2 se encontrarían presentes en los raft lipídicos de los espermatozoides. Sin embargo, se desconoce la localización de ambas proteínas en el espermatozoide y tejidos, como así también la función de las mismas. Con el fin de llevar a cabo estos estudios, el paso siguiente consistió en generar los anticuerpos específicos contra ambas proteínas. Para ello, se diseñó, en primer lugar, una estrategia para la obtención de las proteínas recombinantes partiendo de los ARNm de testículo, obteniendo, finalmente, ambas proteínas recombinantes acopladas a un tag (Histag) (**Figura 5**).

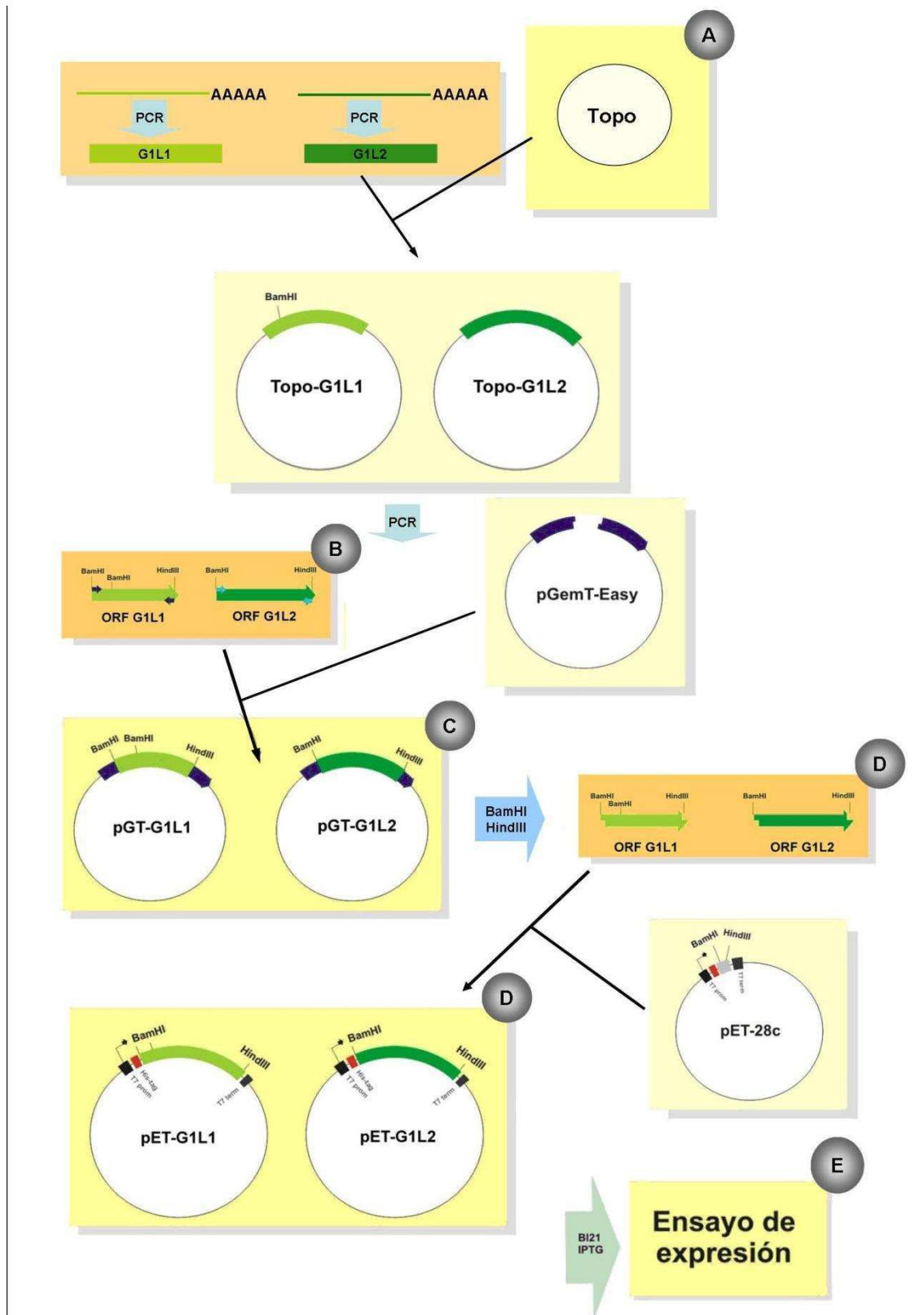


Figura 5. Diseño experimental para obtención de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 recombinantes. El esquema muestra las etapas llevadas a cabo para obtener la expresión de los ORFs de Glipr1l1 y Glipr1l2 en *Escherichia coli*. Cada etapa se encuentra indicada por letras (A, B, C, D y E).

Los marcos de lectura abiertos (ORF) de *Glipr111* y *Glipr112* fueron amplificados mediante RT-PCR utilizando testículo como molde (**Figura 5A**). Ambas secuencias fueron clonadas en el vector pTOPO, chequeándose la incorporación de los mismos en un gel de agarosa. Los resultados mostraron el tamaño esperado correspondiente a la suma del vector más cada uno de los insertos correspondientes (**Figura 6A**). Cabe destacar que las 3 bandas detectadas corresponden a las 3 conformaciones que pueden adquirir los vectores cerrados. La identidad de los insertos en el vector pTOPO fue analizada mediante la secuenciación de los mismos, confirmando que las secuencias presentaban identidad con los mensajeros de *Glipr111* y *Glipr112*.

El paso siguiente consistió en introducir sitios de corte de enzimas de restricción en los fragmentos presentes en el vector pTOPO (**Figura 5B**). Para ello, los fragmentos se subclonaron al vector pGemT que contaba en su secuencia con los sitios de corte para las enzimas disponibles en nuestro laboratorio. Para ello, los insertos presentes en el vector pTOPO fueron amplificados por PCR utilizando primers específicos que, además de amplificar la totalidad de ambos mensajeros, adicionaban en los extremos un sitio de corte específico para las enzimas de restricción BamH1 y HindIII. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa, y teñidos con bromuro de etidio. Los resultados mostraron bandas del tamaño esperado para cada uno de los mensajeros (**Figura 6B**), indicando que la amplificación había sido correcta.

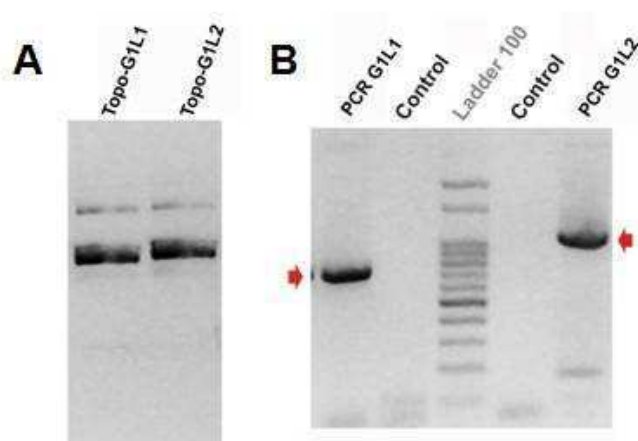


Figura 6. Obtención de los ORFs de *Glipr111* y *Glipr112* con los sitios de restricción BamHI y HINDIII. **A.** Plásmidos TOPO-*Glipr111* (TOPO-G1L1) y TOPO-*Glipr112* (TOPOG1L2) fueron extraídos de las bacterias transformadas y sometidos a electroforesis en un gel de agarosa. **B.** Productos de PCRs incorporando los sitios de restricción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Las flechas indican los fragmentos esperados con los nuevos sitios de restricción incorporados, 736 pb para *Glipr111* (PCR G1L1) y 1024 pb para *Glipr112* (PCR G1L2). El control consistió en una PCR llevada a cabo en ausencia de molde.

Estos fragmentos fueron recuperados del gel, clonados en el vector pGemT-Easy (**Figura 5B**) e introducidos en bacterias *E.coli* DH5 α . La elección de las posibles colonias que incorporaron el vector con los fragmentos deseados fue realizada seleccionando las colonias blancas, de acuerdo al sistema colorimétrico del vector pGemT en presencia del sustrato X-gal. Para comprobar la transformación de las bacterias con los vectores que poseían los insertos, cada colonia seleccionada fue sometida a “colony PCR” utilizando los primers específicos. La electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados de 10 colonias seleccionadas tanto para *Glipr111* como para *Glipr112*, permitió determinar que habían incorporado el inserto de manera correcta (**Figura 7**).

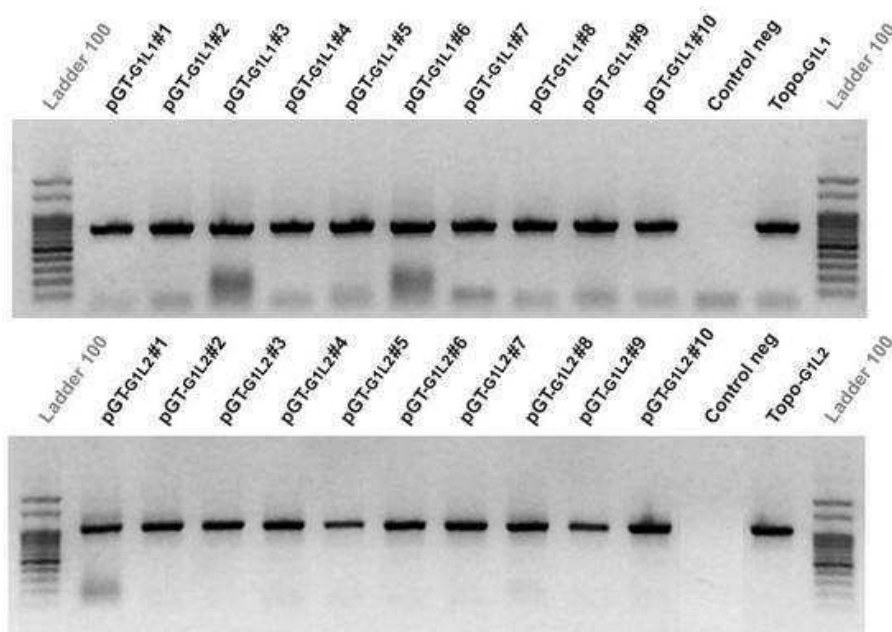


Figura 7. Subclonado en pGemT-Easy. Se seleccionaron 10 colonias (blancas) para *Glipr111* y *Glipr112* (pGT-G1L1 y pGT-G1L2 respectivamente) las cuales fueron crecidas en medio LB sólido suplementado con ampicilina y X-gal, luego analizadas mediante colony PCR. Los productos de amplificación fueron visualizados sometiendo los mismos a electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Como control negativo (control neg), se muestra el producto de PCR de colonias azules (negativas para la transformación), y, como control positivo, se utilizan colonias transformadas con el vector TOPO-G1L1 y TOPO-G1L2 respectivamente.

Habiendo observado la presencia de 10 colonias para *Glipr111* y 10 para *Glipr112* dentro del vector pGemT, a continuación se procedió a aislar los marcos abiertos de lectura (ORF) (**Figura 5C**). Para ello, cada una de las colonias fue crecida en medio LB suplementado con ampicilina, procediéndose al aislamiento de los plásmidos,

material del cual fueron obtenidos los ORFs por el tratamiento secuencial con las enzimas BamHI y HindIII. Para el caso del vector pGT-*Glipr111*, fue necesario realizar una digestión total con HindIII y otra parcial con BamHI, dado que el ORF *Glipr111* contiene un sitio de restricción interno (además del incorporado en el paso anterior junto al *primer*). Mientras que para pGT-*Glipr112*, se realizó una doble digestión total con las mismas endonucleasas. El producto de la digestión fue luego sometido a separación electroforética en un gel de agarosa, y teñido con bromuro de etidio para permitir su visualización. Los resultados mostrados en la **Figura 8** revelaron la obtención de ambos ORFs con los extremos adecuados para su posterior clonado en el vector pET-28c, dado que los mismos son capaces de ser digeridos por las enzimas y liberar los fragmentos del tamaño esperado. Vale aclarar que en el caso de pGT-*Glipr111*, dos bandas (601 pb y 719 pb) fueron visualizadas debido a que el inserto posee un sitio adicional al incorporado en el *primer*.

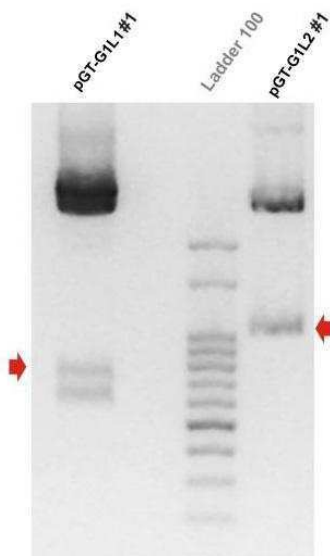


Figura 8. Obtención de los ORFs *Glipr111* y *Glipr112*. Digestiones enzimáticas de los plásmidos pGT-*glipr111* y pGT-*glipr112* con las enzimas BamHI y HindIII fueron analizadas mediante una electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Se indican con flechas los fragmentos esperados (719 pb para *glipr111*, 1007 pb para *glipr112*). Las bandas intensas corresponden a los vectores vacíos.

Los ORFs fueron luego recuperados del gel, ligados al vector de expresión pET-28c y dicho vector introducido en bacterias de *E. coli* DH5 α (**Figura 5D**). La elección de las colonias que incorporaron el vector fue realizada seleccionando aquellas resistentes a kanamicina y, determinándose la correcta inserción de los ORFs al vector en las colonias seleccionadas a través de una “*colony* PCR” con primers específicos. La

posterior electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos amplificados de 10 colonias seleccionadas, tanto para *Glipr111* como *Glipr112*, permitió determinar aquellas que habían incorporado el inserto de manera correcta (**Figura 9**).

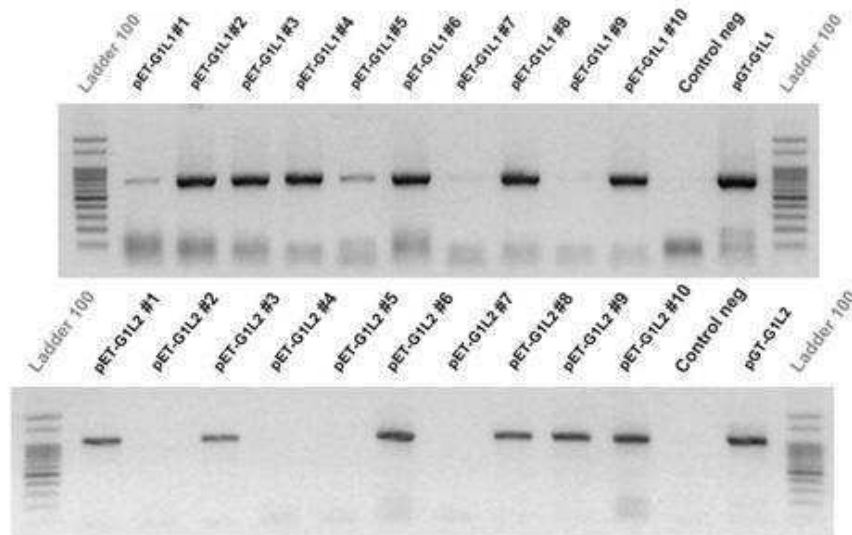


Figura 9. Clonado en el vector de expresión pET-28c. Se seleccionaron 10 colonias (resistentes a Kanamicina) para *Glipr111* y *Glipr112* (pET-G1L1 y pET-G1L2, respectivamente) las cuales fueron crecidas en medio LB sólido suplementado con kanamicina y luego analizadas mediante colony PCR. Los productos de amplificación fueron visualizados sometiendo los mismos a electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Como control negativo (control neg), se muestra el producto de PCR de colonias azules (negativas para la transformación), y, como control positivo, se utilizan colonias transformadas con el vector pGT-G1L1 y pGT-G1L2, respectivamente.

Dado que las DH5 α son bacterias de amplificación de vectores, los plásmidos pET-GLIPR1L1 (#2) y pET-GLIPR1L2 (#3) fueron transferidos a la cepa de expresión *E. coli* BL21, evaluándose la correcta expresión de ambas proteínas recombinantes (**Figura 5E**). Para ello, las bacterias transformadas fueron crecidas y expuestas a distintas concentraciones de IPTG, analizándose tanto la cinética de crecimiento de las bacterias transformadas como la proteómica de cada cultivo (entre 30 min y 150 min luego de la inducción). Como control, se utilizaron bacterias transformadas que crecieron en ausencia de IPTG. Tal como se observa en la **Figura 10A**, las bacterias no inducidas con IPTG crecieron de manera exponencial mientras que aquellas que habían sido inducidas no experimentaron un crecimiento significativo, indicando que la inducción bacteriana estaba siendo funcional. Los resultados obtenidos por tinción de los geles con Coomassie blue (CBB) mostraron que, en las bacterias transformadas con el vector pET-GLIPR1L1 e inducidas con IPTG, se observaba claramente la

inducción de una banda a los distintos tiempos evaluados (**Figura 10B**), mientras que, en las bacterias que contenían a pET-GLIPR1L2 no se detectaba ninguna banda diferencial al agregar IPTG, abriendo la posibilidad de que la proteína recombinante no se estuviera generando (**Figura 10C**).

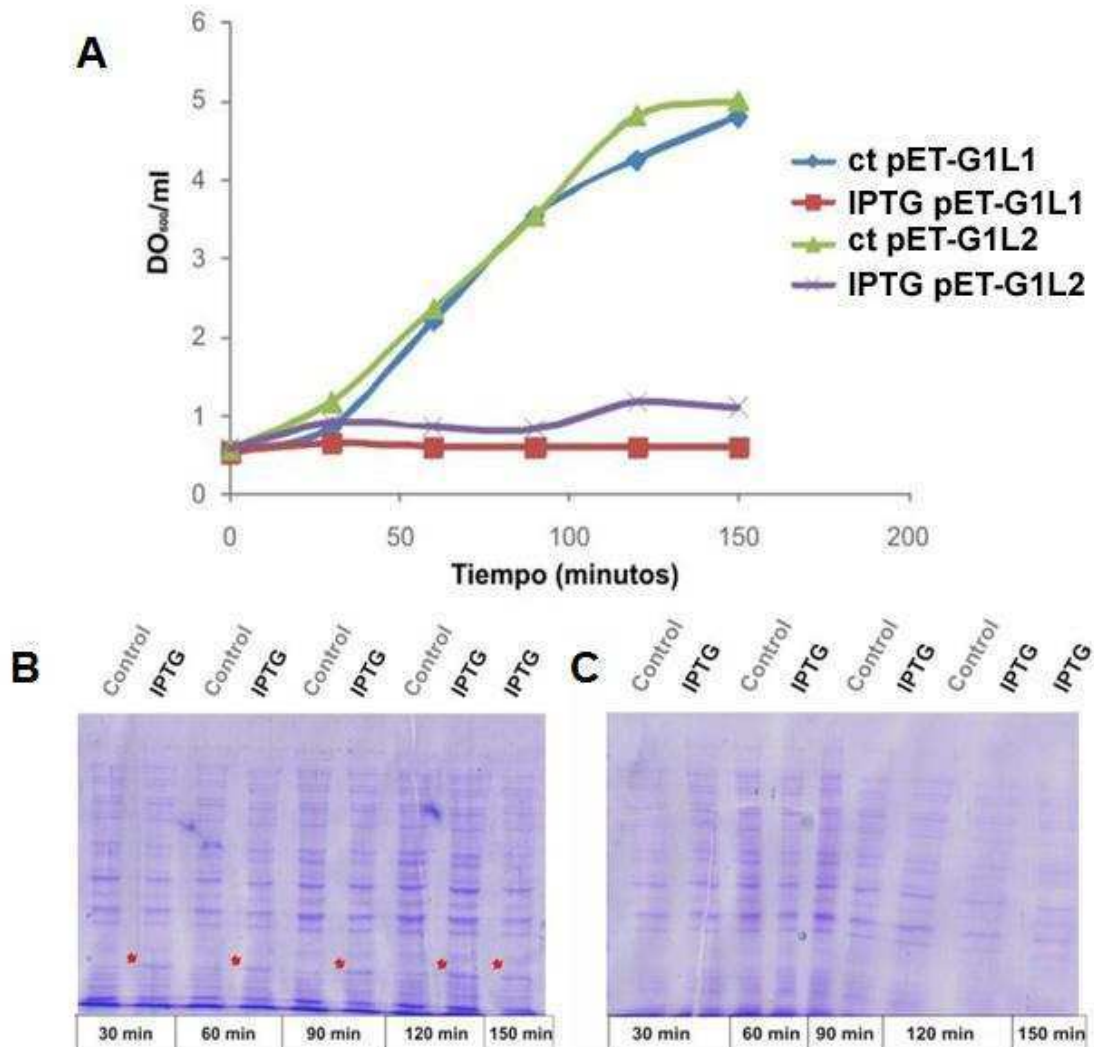


Figura 10. Crecimiento y proteoma de las bacterias transformadas con pET-GLIPR1L1 o pET-GLIPR1L2. Los clones BL21/pET-GLIPR1L1 y BL21/pET-GLIPR1L2 fueron inducidos con IPTG 1mM para evaluar la producción de las proteínas recombinantes. **A.** Cinética de crecimiento de los cultivos. Las bacterias transformadas fueron inducidas con IPTG, y el crecimiento bacteriano fue medido tomando la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (OD 600). Como control, se muestran las mismas bacterias sin inducir. **B, C.** El contenido del proteoma de bacterias inducidas y control (sin IPTG) para BL21/pET-GLIPR1L1 (**B**) y para BL21/pET-GLIPR1L2 (**C**) fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida. Las flechas indican las bandas diferenciales.

El análisis por Wb utilizando el anticuerpo anti-His tag mostró la presencia de dos bandas a los 150 minutos de inducción para recGLIPR1L2 y de una banda a los tres tiempos evaluados para recGLIPR1L1 (**Figura 11**). Para recGLIPR1L1, la banda tuvo el tamaño esperado (29 kDa), mientras que para recGLIPR1L2, se detectaron dos bandas, una mayoritaria del tamaño esperado (37 kDa), y otra minoritaria de aproximadamente 33 kDa, que podría deberse a degradación proteica. De esta manera, los resultados confirmaron la expresión de las proteínas recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2.

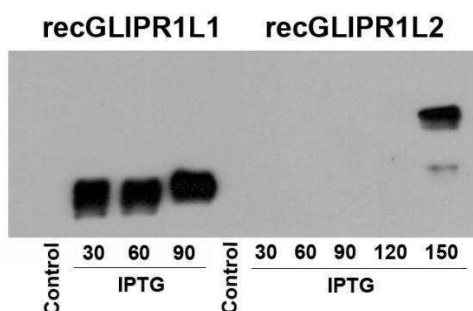


Figura 11. Evaluación de la expresión de las proteínas recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2. Proteomas derivados de los cultivos BL21/pET-GLIPR1L1 y BL21/pET-GLIPR1L2 fueron sometidos a electroforesis, y la presencia de las proteínas recombinantes fue analizada por Wb utilizando el anticuerpo monoclonal anti-His tag.

Para el caso de recGLIPR1L2, los resultados sugerían la especificidad de las bandas observadas. Sin embargo, su detección por Wb y no así por tinción con CBB, evidenciaba una pobre inducción. Con el fin de mejorar la expresión de recGLIPR1L2, se evaluó la inducción proteica a temperaturas menores, como así también la posibilidad de que las proteínas producidas se estuvieran acumulando en cuerpos de inclusión. Para ello, las bacterias recombinantes fueron crecidas a 37°C hasta una OD: 0,6, e inducidas con IPTG a 27°C. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, sometiéndolas a separación electroforética y analizados por Wb. Como control, las bacterias fueron inducidas a 37°C. Los resultados mostraron que His-Glpr112 fue expresada en mayor cantidad a menores temperaturas, generándose menor proporción de producto de degradación que aquel producido a 37°C (**Figura 12A**). Para evaluar la presencia de recGLIPR1L2 en los cuerpos de inclusión, la proteína expresada fue sometida a un fraccionamiento subcelular mediante centrifugaciones diferenciales, separando los cuerpos de inclusión del resto del proteoma bacteriano,

utilizando como control el proteoma total de las bacterias. Los resultados indicaron que la proteína recGLIPR1L2 se encontraba presente en los cuerpos de inclusión (**Figura 12B**). Habiendo detectado esta proteína en los cuerpos de inclusión se evaluó y encontró en los mismos a la proteína recGLIPR1L1 (**Figura 12B**).

Teniendo en cuenta el mejoramiento en la expresión de recGLIPR1L2 y que las dos proteínas recombinantes se encontraban en los cuerpos de inclusión, se evaluó su posible detección por CBB. Para ello, bacterias transformadas e inducidas a 27°C fueron sometidas a centrifugaciones para aislar los cuerpos de inclusión y las proteínas separadas electroforéticamente en un gel de acrilamida y teñidas con CBB. Como control positivo, se incluyó a recGLIPR1L1 aislada de los cuerpos de inclusión. Los resultados mostraron en ambos casos una banda diferencial con respecto al control no inducido (**Figura 12C**).

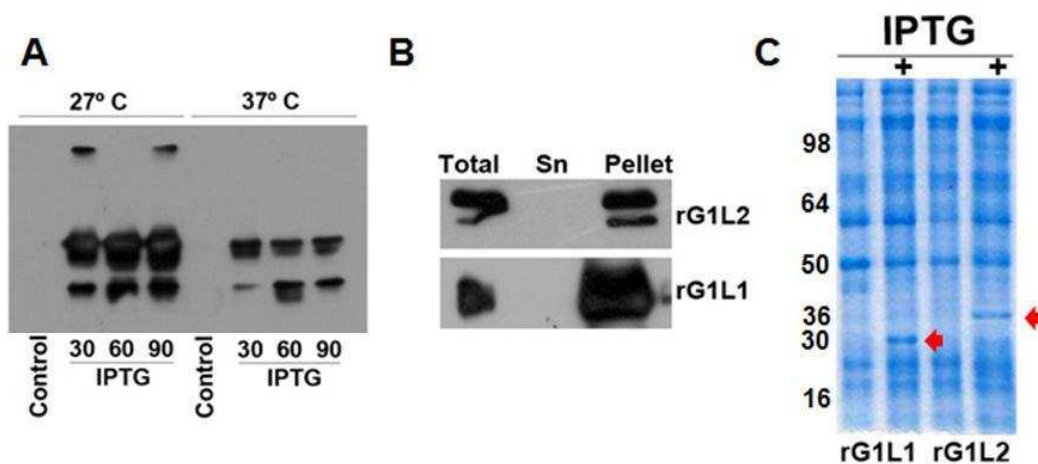


Figura 12. Evaluación de diferentes condiciones de expresión y análisis de la localización subcelular, de recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2. **A.** Proteomas derivados de los cultivos BL21/pET-GLIPR1L2, inducidos por diferentes tiempos a 27°C o a 37°C, fueron sometidos a electroforesis, y la presencia de las proteínas recombinantes analizada por Wb utilizando el anticuerpo monoclonal anti-His tag. Como control, fue utilizado el proteoma de bacterias no inducidas. **B.** Proteomas derivados de los cultivos inducidos BL21/pET-GLIPR1L1 (rG1L1) y BL21/pET-GLIPR1L2 (rG1L2) fueron evaluados mediante Wb de los sobrenadantes (sn, fracción soluble) o de los pellets (cuerpos de inclusión) resultantes de una centrifugación diferencial. Como control, fue utilizado el proteoma total de bacterias inducidas (Total). **C.** Extractos proteicos de cuerpos de inclusión de bacterias inducidas (+) y no inducidas (-) fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida y las proteínas visualizadas mediante tinción con CBB. Como control, se utilizaron cuerpos de inclusión de bacterias no inducidas. Las flechas indican las bandas diferenciales.

El sistema de expresión utilizado (His tag) permite la purificación de la proteína de fusión mediante una cromatografía de afinidad utilizando una columna de resina acoplada a níquel, para lo cual, es necesario que la proteína se encuentre en forma soluble. Por tal razón, los cuerpos de inclusión de ambas proteínas recombinantes fueron solubilizados en 8M de urea y pasados a través de una columna de níquel, recuperándose con una baja pureza las proteínas recombinantes por elución con un buffer ácido (**Figura 13A**). Por el punto isoeléctrico de ambas recombinantes, el manual del sistema de purificación estipulaba la salida de las proteínas en la fracción E, lo cual fue verificado mediante Wb (**Figura 13B**). Cabe aclarar que si bien no se muestra en la figura, la fracción F contiene muy poca cantidad de cada una de las proteínas y, dado que por tinción por CBB se observan contaminantes en mayor proporción a las proteínas de interés, esta fracción no fue incluida en el paso de purificación.

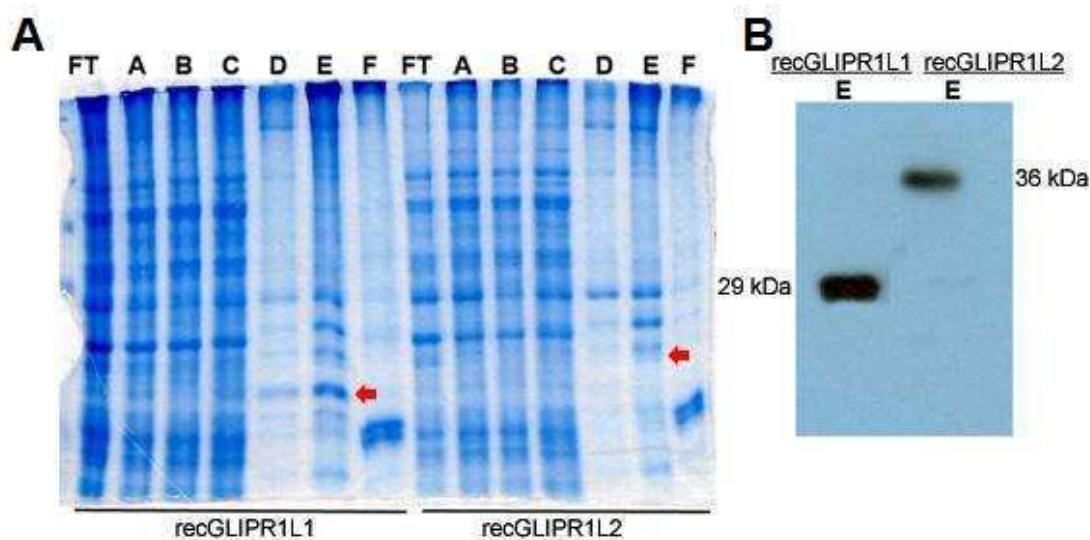


FIGURA 13. Purificación de las proteínas recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2. **A.** El pellet conteniendo las proteínas recGLIPR1L1 o recGLIPR1L2 fue disuelto en buffer con urea 8 M y pasado por una columna de níquel. Lo retenido en la columna, fue sometido a diferentes lavados (fracciones A, B y C) y, finalmente, a tres pasos de elución (fracciones D, E y F). Las diferentes fracciones fueron luego sometidas a electroforesis y reveladas por tinción con CBB. **B.** La fracción E que contiene a recGLIPR1L1 y a recGLIPR1L2 fueron separadas en un gel de poliacrilamida y las proteínas recombinantes detectadas mediante Wb utilizando el anticuerpo anti-His tagg. FT: Flow through

Dado que la purificación de ambas proteínas recombinantes mediante columna de afinidad carecía de la pureza deseada, se evaluó la posibilidad de mejorar la purificación. Para ello, se realizó el mismo procedimiento antes descrito, pero esta

vez sometiendo cada una de las fracciones E a electroforesis en gel de acrilamida al 10%, escindiendo la banda correspondiente (**Figura 14A**). Posteriormente, las proteínas fueron recuperadas del gel por elución pasiva, sometidas a una separación electroforética, y teñidas con CBB, detectándose ambas con una pureza superior al 85% (**Figura 14B**).

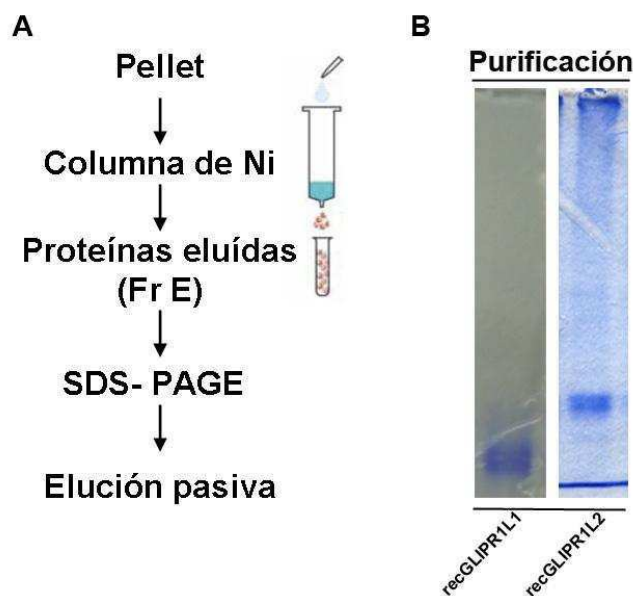


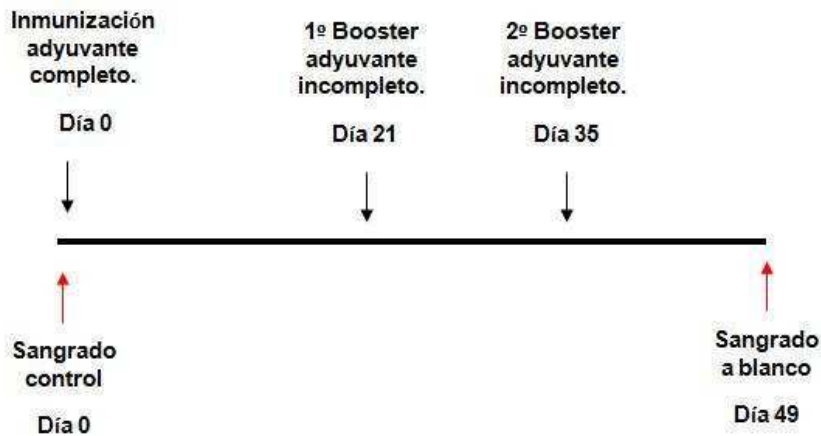
Figura 14. Purificación de recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2. **A.** Esquema de purificación realizado. **B.** Las fracciones obtenidas luego de la elución pasiva de recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2 fueron separadas electroforéticamente y visualizadas mediante tinción con CBB.

En conjunto, los resultados obtenidos mostraron que las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 pudieron ser expresadas en forma recombinante y purificadas exitosamente.

3- Generación y caracterización de los anticuerpos contra recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2

Los anticuerpos contra GLIPR1L1 y GLIPR1L2 se obtuvieron a través de la inmunización de ratas Wistar con cada una de las proteínas recombinantes generadas. Dado que ambas proteínas se encontraban fusionadas a His tag, la inmunización

podía realizarse tanto con las proteínas de fusión como con las proteínas previamente escindidas del tag. En este sentido, dada la baja inmunogenicidad del his tag debido a su pequeño tamaño (6 aminoácidos) (QIAGEN News 2003 e42), se procedió a la inmunización con las proteínas de fusión. Los animales fueron inmunizados tres veces a intervalos de tres semanas (**Esquema 1**) y cada animal fue sangrado antes de la primera inmunización (suero preinmune control) y catorce días después de la última inyección.



Esquema 1. Esquema de inmunización. Ratas de la cepa Wistar fueron inmunizadas según el esquema, obteniéndose los sueros por sangrado previo al comienzo y luego de finalizada la inmunización.

La especificidad de los sueros provenientes de los animales inmunizados con recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2 se evaluó mediante ensayos de Wb sobre extractos de bacterias recombinantes inducidas para expresar cada proteína. Los resultados mostraron que, a diferencia de los sueros preinmunes, los sueros de los animales inmunizados fueron capaces de detectar a recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2 específicamente (**Figura 15A**). Una vez evaluada la especificidad de los sueros, se procedió al aislamiento de las IgG presentes en los mismos. Para ello, los sueros fueron pasados por una columna de Proteína G, la cual posee alta afinidad por la fracción cristizable de las inmunoglobulinas. La especificidad de las IgG purificadas fue evaluada mediante ensayos de Wb sobre las proteínas recombinantes. Los resultados mostraron que los anticuerpos generados fueron capaces de detectar a recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2 con mayor especificidad que los sueros correspondientes, pudiéndose, además, descartar una posible reacción cruzada entre ambos anticuerpos (**Figura 15B**).

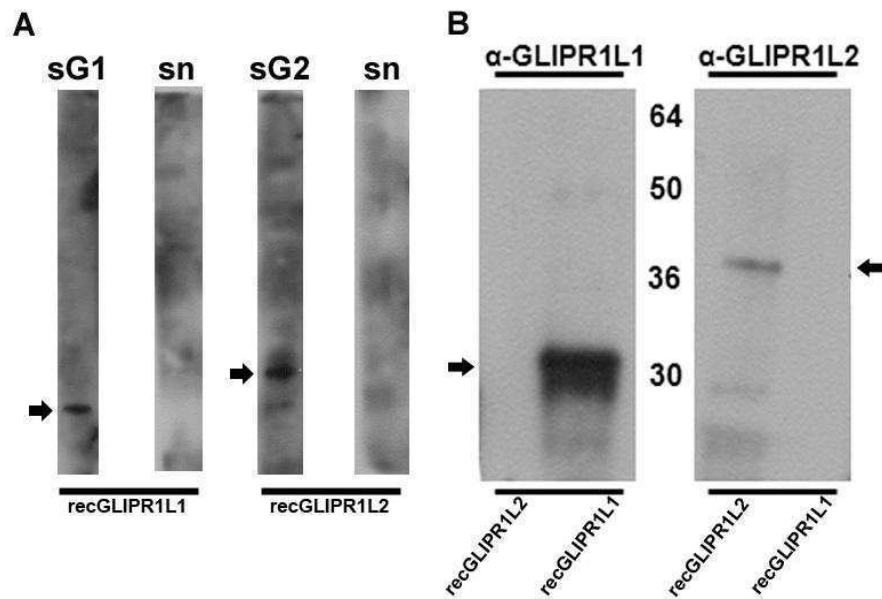


Figura 15. Especificidad de los sueros y los IgGs purificados. **A.** Extractos de bacterias recombinantes inducidas que expresan rG1L1 o rG1L2, fueron separados electroforéticamente y analizados por Wb utilizando el suero generado contra recGLIPR1L1 (sG1), y contra recGLIPR1L2 (sG2). Como control, se utilizó suero de ratas preinmune (sn). **B.** Los mismos extractos que en **A** fueron separados electroforéticamente y analizados por Wb utilizando las IgGs purificadas generadas contra recGLIPR1L1 (á-GLIPR1L1) y contra recGLIPR1L2 (á-GLIPR1L2).

4- Caracterización de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en tracto reproductor

Contando con los anticuerpos que reconocían específicamente a las proteínas recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2, el siguiente paso consistió en evaluar si los mismos eran capaces de reconocer a las proteínas nativas en testículo y epidídimo por Wb. Los resultados de estos ensayos se muestran en la **Figura 16** e indicaron la presencia de bandas del tamaño esperado para la proteína GLIPR1L1 (29 kDa) en testículo y GLIPR1L2 (37 kDa) tanto en testículo como en epidídimo de ratón, confirmando no sólo la especificidad de los anticuerpos generados, sino también la presencia de ambas proteínas en los tejidos en los cuales habían sido detectados previamente los ARNm correspondientes.

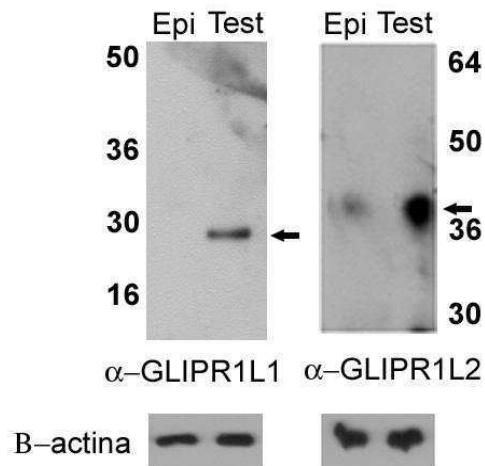


Figura 16. Presencia de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en testículo y epidídimo. Extractos de testículo (Test) y epidídimo (Epi) fueron separados electroforéticamente y analizados por Wb utilizando α -GLIPR1L1 y α -GLIPR1L2. En el panel inferior se muestra β -actina como control de carga. Las flechas indican las bandas diferenciales.

A continuación, se investigó la presencia de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en los espermatozoides, para lo cual extractos proteicos totales de espermatozoides frescos del cauda epididimario fueron sometidos a electroforesis y analizados por Wb utilizando los anticuerpos correspondientes. Los resultados confirmaron la presencia de las proteínas del tamaño esperado (**Figura 17**). Cabe aclarar que en el caso de GLIPR1L1 se detectó no sólo la banda de 29 kDa, sino una de menor intensidad y menor peso molecular. De esta manera, confirmamos la presencia de ambas proteínas en el espermatozoide.

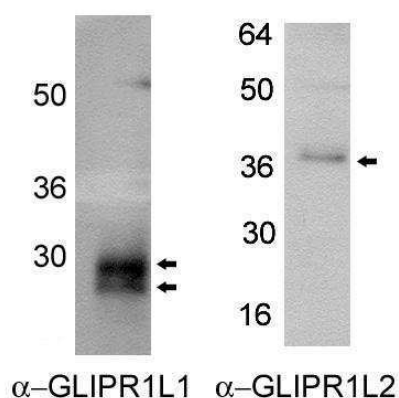


Figura 17. Presencia de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en espermatozoides. Extractos de espermatozoides frescos de ratón fueron separados electroforéticamente y analizados por Wb utilizando α -GLIPR1L1, y contra α -GLIPR1L2. Las flechas indican las bandas detectadas.

Una vez determinada la especificidad de los anticuerpos y la presencia de ambas proteínas en los espermatozoides, dichos anticuerpos fueron utilizados en ensayos de IIF con el fin estudiar la localización de las proteínas en los espermatozoides. Los resultados indicaron que mientras en espermatozoides vivos la marca se encontraba en la región dorsal de la cabeza del espermatozoide para ambas proteínas (**Figura 18A y C**) en espermatozoides fijados y permeabilizados la marca fluorescente se detectaba principalmente en la región dorsal de la cabeza y, adicionalmente, en la totalidad de la cola para ambas proteínas (**Figura 18B y D**).

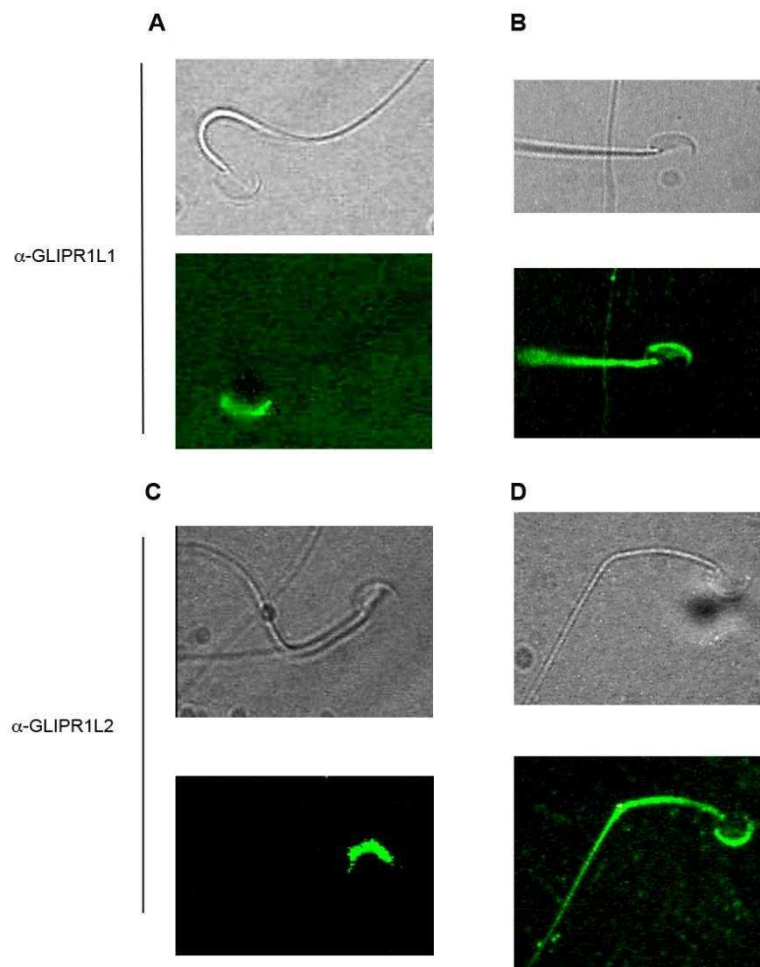


Figura 18. Localización de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en espermatozoides maduros. Espermatozoides vivos (A y C) y, fijados y permeabilizados (B y D) fueron sometidos a IFI utilizando α -GLIPR1L1 (A y B) y α -GLIPR1L2 (C y D) como primeros anticuerpos. En todos los casos, los paneles superiores corresponden a las imágenes de contraste de fase.

Sin embargo, en aquellos espermatozoides fijados y permeabilizados, además de la localización dorsal se detectaron otros tipos de marcación, los cuales fueron estudiados por IFI, identificando tres patrones fluorescentes en espermatozoides para ambas proteínas (**Figura 19**): la ya descrita marca en la región dorsal de la cabeza (Patrón a), marca en toda la región acrosomal (Patrón b) y, finalmente, marca en toda la cabeza o bien en la región dorsal y post acrosomal (Patrón c). En los tres tipos de patrones, la cola se encuentra marcada. La cuantificación de las células marcadas para ambas proteínas, evidenció una localización mayoritaria tipo patrón a, y minoritaria para los otros dos patrones (**Figura 19**). En conjunto, los resultados de IFI sugerían que GLIPR1L1 y GLIPR1L2 estarían localizadas principalmente en la región dorsal de manera superficial y en la región dorsal de la cabeza y en la cola de manera intracelular en los espermatozoides frescos.

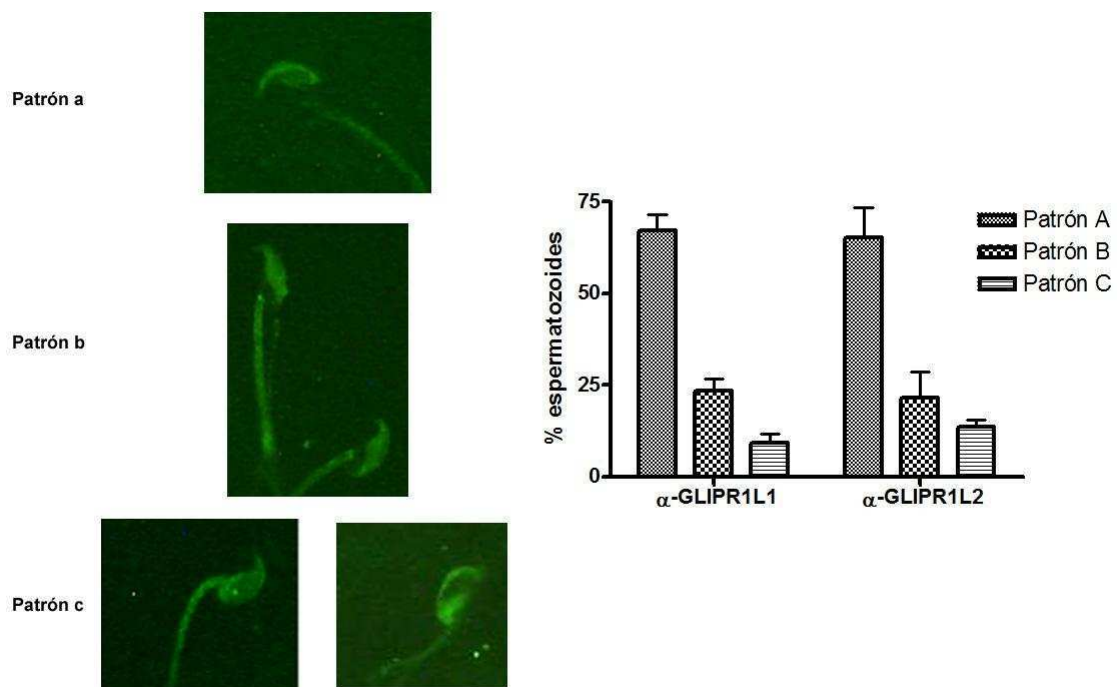


Figura 19. Localización de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en espermatozoides maduros. Espermatozoides frescos fijados y permeabilizados fueron sometidos a IFI utilizando α -GLIPR1L1 y α -GLIPR1L2 como primeros anticuerpos observándose 3 patrones de marcación (izquierda) los cuales fueron cuantificados (derecha).

Con el fin de evaluar el tipo de asociación de estas proteínas a los espermatozoides, los mismos fueron sometidos a diferentes procedimientos de extracción de proteínas, analizándose la presencia de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en el sobrenadante o en el

precipitado mediante Wb. Los resultados indicaron que, mientras que el NaCl fue incapaz de remover tanto a GLIPR1L1 como a GLIPR1L2 de los espermatozoides a las distintas concentraciones empleadas, las proteínas fueron completamente liberadas por exposición de los espermatozoides a Tritón X-100 (**Figura 20A, C y D**).

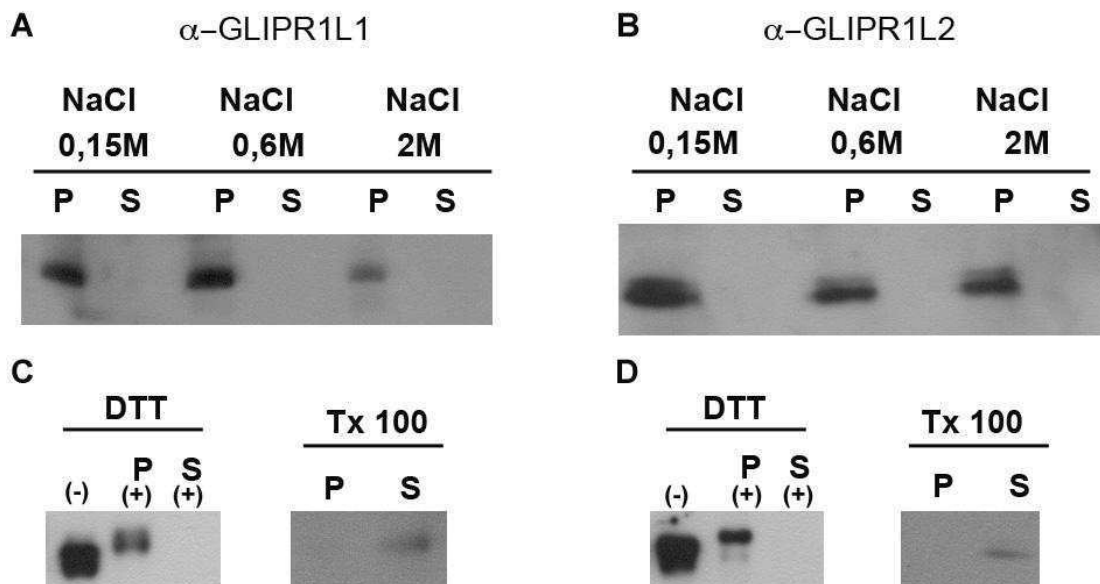


Figura 20. Extracción de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 de espermatozoides. Espermatozoides frescos de ratón fueron expuestos a 0,15 – 2,0M de NaCl, 250mM de Ditiotritol (DTT) y 1% Tritón-X100 (Tx 100), y los extractos proteicos centrifugados para obtener los sobrenadantes (S) y pellets (P), los cuales fueron sometidos a electroforesis y analizados por Wb utilizando α -GLIPR1L1 y α -GLIPR1L2.

Considerando los ensayos de localización que reflejaron la presencia superficial e intracelular de ambas proteínas, los resultados de las extracciones descartaron la presencia de una población de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 asociada a la superficie del espermatozoide por fuerza iónica, apoyando la posibilidad de que ambas proteínas estuvieran asociadas fuertemente a la superficie del mismo. El análisis de la secuencia indicó que GLIPR1L2, pero no así GLIPR1L1, posee dominios hidrofóbicos que permitirían su inserción en la membrana plasmática, en ese sentido ambas proteínas tanto de manera superficial como intracelular sólo fueron removidas por Tritón X-100. Por otro lado, si bien la abundancia de residuos cisteína en las moléculas podía dar lugar a enlaces covalentes de ambas proteínas con otras proteínas de la superficie del espermatozoide, el hecho de que la proteína superficial fuera removida en forma aislada y no formando parte de un complejo, no apoyaba dicha posibilidad. De todos modos, se realizaron experimentos en los cuales los espermatozoides de ratón fueron

sometidos a tratamientos con 250mM DTT, analizándose, posteriormente, la presencia de GLIPR1L1 y GLPR1L2 en el sobrenadante o pellet mediante Wb. Los resultados mostraron un cambio de peso molecular para ambas proteínas, indicando la presencia de puentes disulfuro intermoleculares en las mismas (**Figura 20C y D**).

El análisis de secuencia tanto de GLIPR1L1 como de GLIPR1L2 reveló que ambas proteínas poseían posibles sitios de N-glicosilación y de unión a GPI. Por este motivo, se realizaron experimentos en los cuales los espermatozoides frescos fueron sometidos a tratamientos con las enzimas PNGasa y Fosfolipasa C (PLC), analizándose por Wb la movilidad electroforética de ambas proteínas para el caso del tratamiento con PNGasa (**Figura 21A**), y la presencia de las mismas en el sobrenadante o precipitado para el tratamiento con PLC (**Figura 21B**).

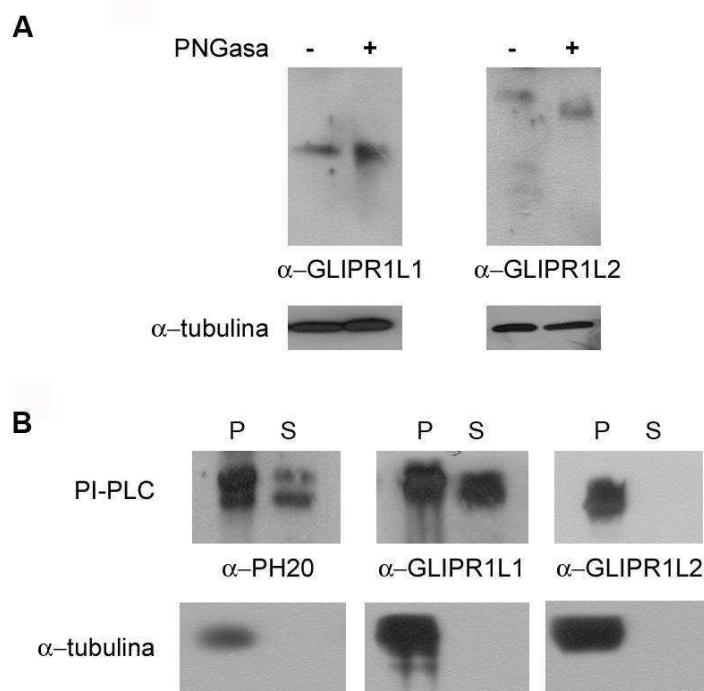


Figura 21. Efecto del tratamiento con PNGasa F y PLC sobre las proteínas GLIPRs.

A. Extractos de espermatozoides fueron incubados en presencia (+) o ausencia (-) de 2500 U de PNGasa F por 3 hs y sometidos a electroforesis y Wb, utilizando α -GLIPR1L1 y α -GLIPR1L2 como primer anticuerpo. **B.** Los espermatozoides fueron incubados en presencia de 5 U/ml PLC, y sometidos a centrifugación para obtener los sobrenadantes (S) y los pellets (P), los cuales fueron analizados mediante ensayos de Wb utilizando α -GLIPR1L1, α -GLIPR1L2, anti-SPAM1 (α -PH20) como primer anticuerpo. En A y B se utilizó α -tubulina como control de carga y marcador celular, respectivamente.

Los resultados indicaron que GLIPR1L2 presentaba una movilidad electroforética mayor en los extractos tratados con PNGasa con respecto a los no tratados. Para el caso de GLIPR1L1 se detectó un leve cambio en movilidad electroforética y un ensanchamiento de la banda, sugerente de un efecto de la enzima sobre esta proteína (**Figura 21A**). Los resultados de tratamientos con PLC mostraron que, al igual que lo observado para el anticuerpo control PH20, GLIPR1L1 se liberaba al sobrenadante, abriendo la posibilidad de que esta proteína tuviera una unión vía GPI a la membrana del espermatozoide. Por el contrario, en el caso de GLIPR1L2, los resultados mostraron su ausencia en el sobrenadante, indicando que la misma no poseería uniones GPI (**Figura 21B**).

Teniendo en cuenta que GLIPR1L1 y GLIPR1L2 fueron detectadas en la cabeza de los espermatozoides frescos, el paso siguiente consistió en investigar si las mismas permanecían o se liberaban durante la capacitación y si sufrían o no modificaciones post-traduccionales luego de la capacitación y RA. Para ello, extractos proteicos totales de un mismo número de espermatozoides frescos, capacitados y tratados con ionóforo de calcio fueron separados electroforéticamente y examinados por Wb utilizando los anticuerpos específicos generados. Los resultados revelaron la permanencia de ambas proteínas en espermatozoides capacitados y reaccionados, y la ausencia de diferencias en la movilidad electroforética de las proteínas entre las tres poblaciones de espermatozoides (**Figura 22A**).

A continuación, con el fin de evaluar si la localización de ambas proteínas se modificaba durante la capacitación y la RA, espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados fueron fijados, permeabilizados, y sometidos a IFI tal como fuera descrito anteriormente. El análisis de los resultados mostró los tres patrones fluorescentes antes mencionados. La cuantificación del número de células mostrando cada uno de estos patrones indicó que no había diferencias significativas entre las tres poblaciones analizadas, revelando que tanto GLIPR1L1 como GLIPR1L2 no modificarían su localización como consecuencia de los eventos de capacitación y RA (**Figura 22B y C**).

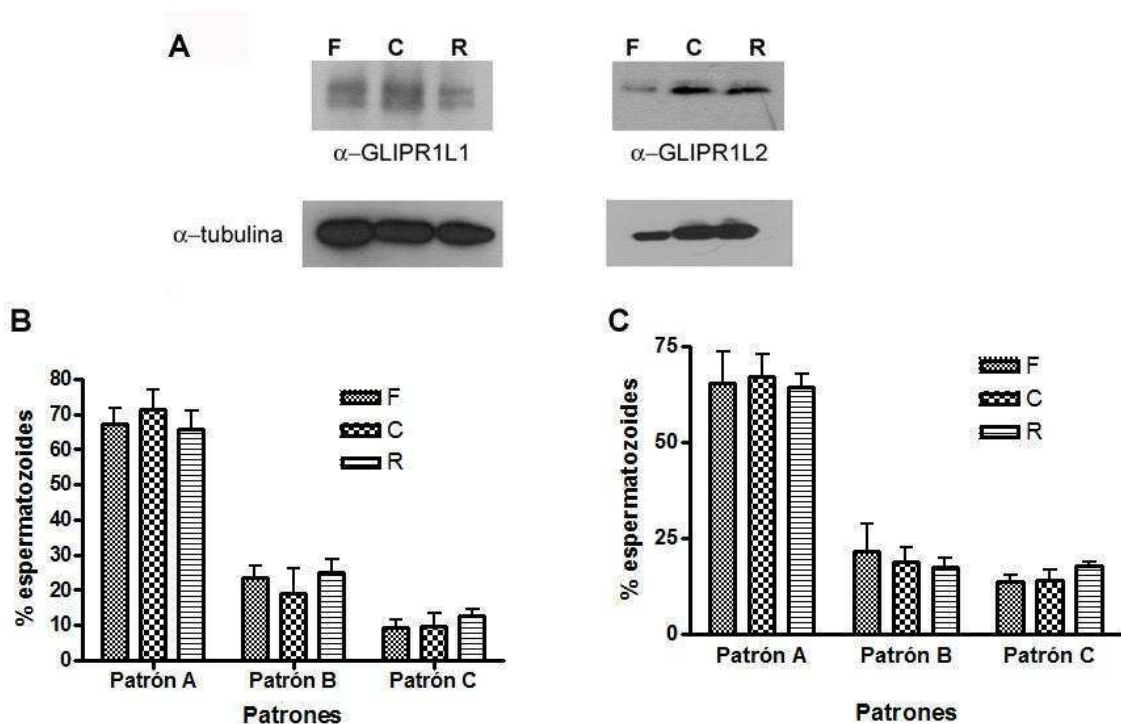


Figura 22. Comportamiento de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 durante la capacitación y RA. Extractos de espermatozoides frescos (F), capacitados (C) y reaccionados (R) fueron separados electroforéticamente y analizados por Wb utilizando α -GLIPR1L1, y α -GLIPR1L2 de ratón (A). Porcentaje de espermatozoides mostrando los diferentes patrones para GLIPR1L1 (B), o para GLIPR1L2 (C).

Por otro lado, mientras realizábamos estos experimentos una empresa generó los anticuerpos comerciales contra las dos proteínas humanas. A partir de esos anticuerpos evaluamos la presencia de hGLIPR1L1 y hGLIPR1L2 en espermatozoides humanos, y observamos que ambas proteínas se encontraban en los espermatozoides con un tamaño de 26 kDa para hGLIPR1L1 y de 28 y 32 kDa para hGLIPR1L2. El paso siguiente consistió en investigar, si las mismas permanecían durante la capacitación y si sufrían post-traduccionales luego de la capacitación y RA. Cabe aclarar que ambas proteínas humanas al igual que las de ratón permanecieron en los espermatozoides capacitados y reaccionados sin presentar cambio alguno en la movilidad electroforética (Figura 23). Es importante mencionar que, la realización de ensayos de IFI sobre espermatozoides humanos utilizando cualquiera de los dos anticuerpos no generó ningún resultado debido a la incapacidad de ambos anticuerpos de reconocer a estas proteínas espermáticas en este tipo de ensayo.

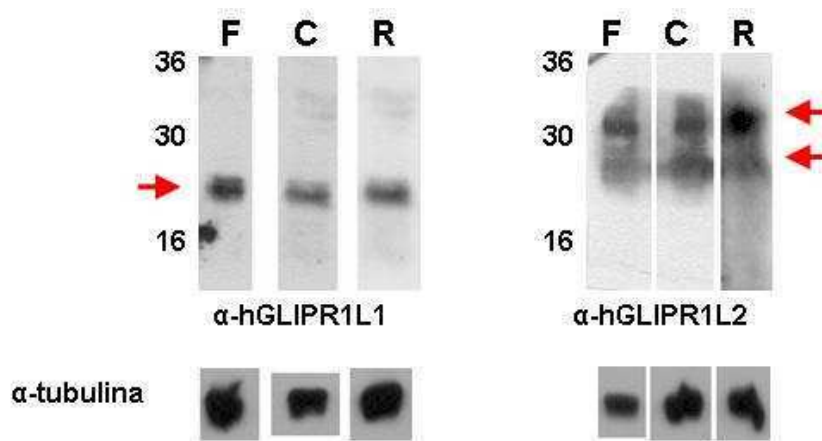
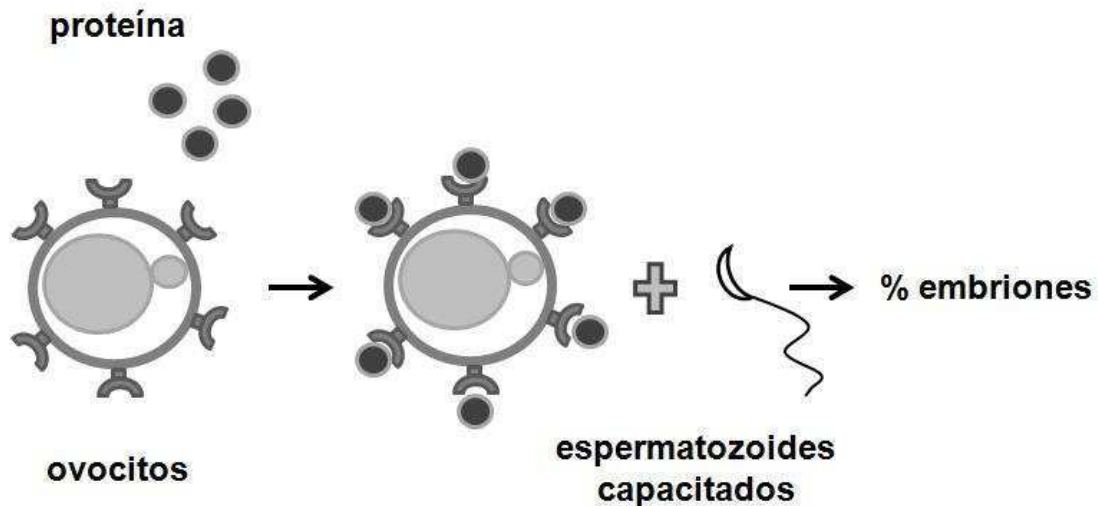


Figura 23. Comportamiento de las proteínas hGLIPR1L1 y hGLIPR1L2 durante la capacitación y RA. Extractos de espermatozoides (6×10^6) frescos (F), capacitados (C) y reaccionados (R) fueron separados electroforéticamente y analizados por Wb utilizando á-GLIPR1L1, y á-GLIPR1L2.de humano.

5- Participación de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en la interacción de gametas

El hecho de que GLIPR1L1 y GLIPR1L2 permanecieran en el espermatozoide luego de la capacitación y la RA abría la posibilidad de que las proteínas participaran en la interacción de gametas. Más aún, la presencia de ambas proteínas en la región dorsal, región por la cual los espermatozoides se unen a la ZP, nos hablaba de una posible interacción de estas proteínas con la zona.

Con el fin de analizar la participación de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en la interacción espermatozoide-ZP, se decidió utilizar dos esquemas experimentales. En el primer caso, los ovocitos intactos fueron preincubados con la proteína a ser estudiada, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. La idea de estos experimentos radica en que, si existieran sitios de unión para la proteína del espermatozoide en los ovocitos, la pre-incubación de los mismos con la proteína soluble resultaría en una inhibición en el porcentaje de fertilización (**Esquema 1**).



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

Para ello, los ovocitos de ratón desnudos del cúmulo fueron preincubados en medio solo, o medio conteniendo 0,5, 1 o 5 μM de recGLIPR1L1 o recGLIPR1L2, utilizando 6 μM de CRISP1 o recCRISP1 como control, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 18 hs, los ovocitos fueron lavados, montados y observados al microscopio óptico evaluándose la presencia de embriones en 2 células. Los resultados indicaron que ninguna de las dos proteínas recombinantes produjo una inhibición significativa a las concentraciones utilizadas, (tampoco se observó acumulación de espermatozoides perivitelinos), mientras que las proteínas controles redujeron de manera significativa el porcentaje de embriones en 2 células respecto del control (**Figura 24**).

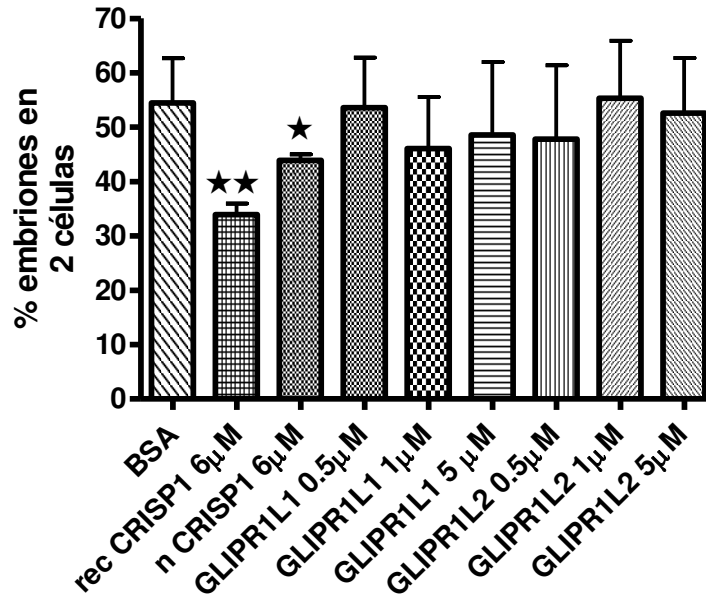
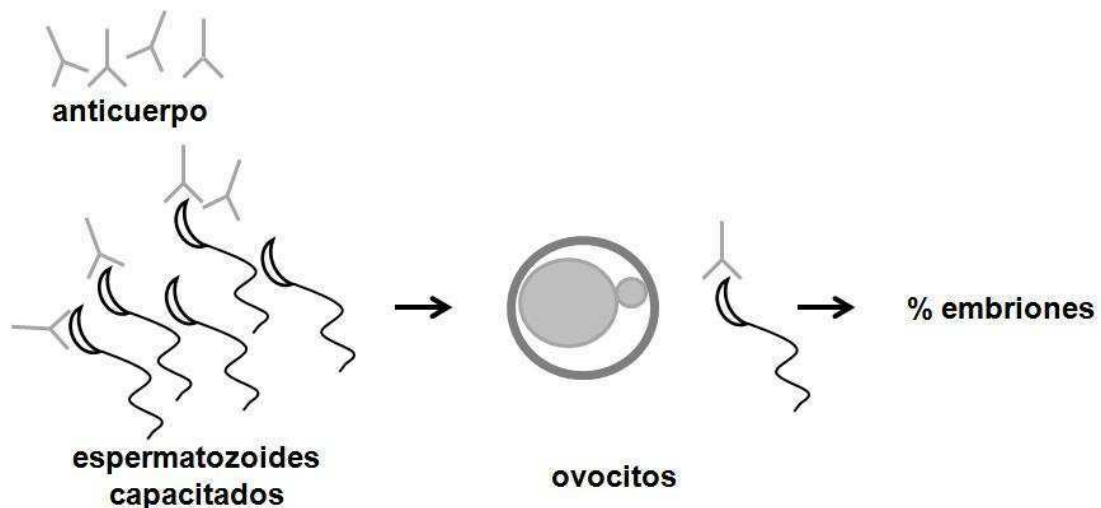


Figura 24. Efecto de la presencia de proteínas GLIPR1s durante la coincubación sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides. Ovocitos con ZP fueron pre-incubados en ausencia de proteína (control) o en presencia de diferentes concentraciones de recGLIPR1L1 o recGLIPR1L2, o proteínas CRISP como control, y luego inseminados con espermatozoides capacitados. Al cabo de 18 h de co-incubación, se determinó el porcentaje. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0,02$ vs control, ** $p < 0,001$ vs control.



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

El segundo esquema tiene como objetivo bloquear la proteína espermática a través del empleo de anticuerpos específicos y evaluar el efecto de dicho bloqueo sobre los

eventos de la fertilización (**Esquema 2**). En este caso, los espermatozoides capacitados de ratón fueron preincubados con anti-GLIPR1L1 ó anti-GLIPR1L2 durante los 15 minutos finales de la capacitación para permitir la interacción anticuerpo-proteína, y luego utilizados para inseminar ovocitos con ZP, evaluándose el efecto de los anticuerpos sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Espermatozoides incubados en presencia de IgG de rata normal fueron incluidos en todos los experimentos como controles negativos. Los resultados indicaron que la exposición de las gametas tanto al anticuerpo anti-GLIPR1L1 como anti-GLIPR1L2 fue capaz de producir una inhibición significativa en el porcentaje de embriones en 2 células respecto al control, sin observarse en ninguno de los casos acumulación de espermatozoides perivitelinos (**Figura 25A**).

Con el fin de analizar los mecanismos por los cuales los anticuerpos inhibieron la capacidad fertilizante, evaluamos su efecto sobre diferentes parámetros espermáticos. Los resultados indicaron que la presencia de los anticuerpos durante la co-incubación no afectó la viabilidad (**Figura 25B**) ni la motilidad de los espermatozoides (tanto vibratoria, como progresiva) (**Figura 25C**), como así tampoco la capacidad de los mismos de sufrir la RA espontánea (**Figura 25D**), indicando la especificidad del efecto de los anticuerpos sobre la capacidad de interactuar con el ovocito.

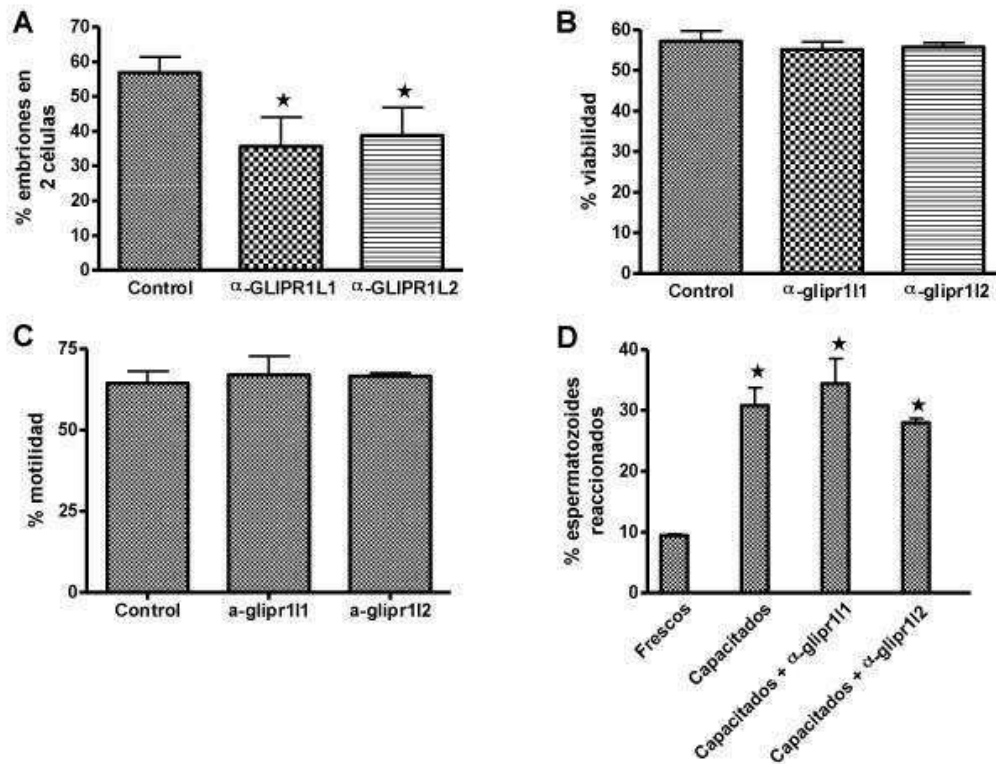


Figura 25. Efecto de los anticuerpos contra proteínas GLIPR1s sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Espermatozoides capacitados fueron preincubados por 15 min en medio conteniendo 10 $\mu\text{g/ml}$ anti-GLIPR1L1, anti-GLIPR1L2, o IgG de rata purificada de sueros preinmunes, y luego utilizados para inseminar ovocitos con ZP, evaluándose, el porcentaje de embriones en 2 células (**A**). En esos mismos espermatozoides se evaluó la viabilidad por tinción vital con eosina (**B**), la motilidad total subjetiva (**C**) y reacción acrosomal espontánea por la técnica de Coomassie Blue (**D**). * $p < 0.05$. $n = 4$.

Con el fin de evaluar la participación de las proteínas en la etapa específica de unión a la ZP, los espermatozoides capacitados fueron incubados con los anticuerpos tal como se describiera anteriormente, y las gametas fueron co-incubadas sólo por treinta minutos. Los ovocitos fueron luego lavados para remover los espermatozoides asociados débilmente a la ZP y, finalmente, observados al microscopio óptico. Los resultados mostraron una disminución significativa en el número de espermatozoides unidos por ovocito tanto al emplear anti-GLIPR1L1 como anti-GLIPR1L2, sin observarse en ninguno de los casos espermatozoides perivitelinos (**Figura 26**).

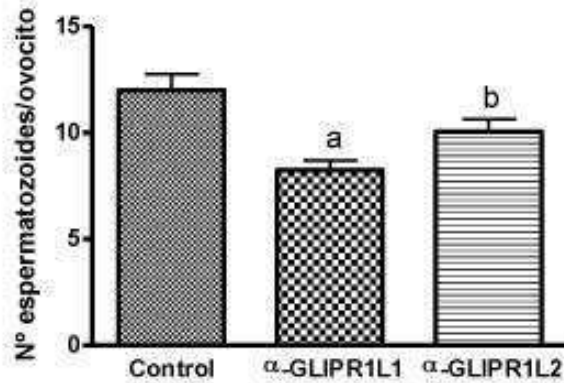


Figura 26. Efecto de anticuerpos contra proteínas GLIPR1s sobre la unión de espermatozoides a la ZP. Espermatozoides capacitados fueron preincubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anti-GLIPR1L1, anti-GLIPR1L2 o IgG de rata como control, y luego utilizados para inseminación de ovocitos con ZP ($n=4$). Al cabo de 30 minutos de coincubación, los ovocitos fueron lavados, fijados y montados, determinándose el número de espermatozoides unidos por ovocito. a $p < 0,002$; b $p < 0,05$.

Si bien los ensayos hasta aquí realizados indicaban la participación de estas proteínas en la interacción espermatozoide-ZP, existía la posibilidad de que las proteínas también participaran en la etapa posterior de fusión. Con el fin de evaluar dicha posibilidad, espermatozoides capacitados fueron pre-incubados con anti-GLIPR1L1 o anti-GLIPR1L2, y co-incubados con ovocitos sin ZP durante 90 min, luego de lo cual se evaluó el porcentaje de fusión utilizando la técnica de Hoescht que permite discriminar entre espermatozoides unidos o fusionados. Los resultados indicaron que ninguno de los anticuerpos produjo una inhibición del porcentaje de ovocitos penetrados (**Figura 27**) sugiriendo que las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 no participarían en la etapa de fusión. Cabe mencionar que no se evaluó la participación de las proteínas siguiendo el esquema 1 (co-incubación en presencia de proteínas), dado que, a diferencia de lo observado con los anticuerpos, ninguna de las proteínas había producido una disminución en el porcentaje de fertilización cuando los ovocitos empleados presentaban ZP (ver **Figura 24**).

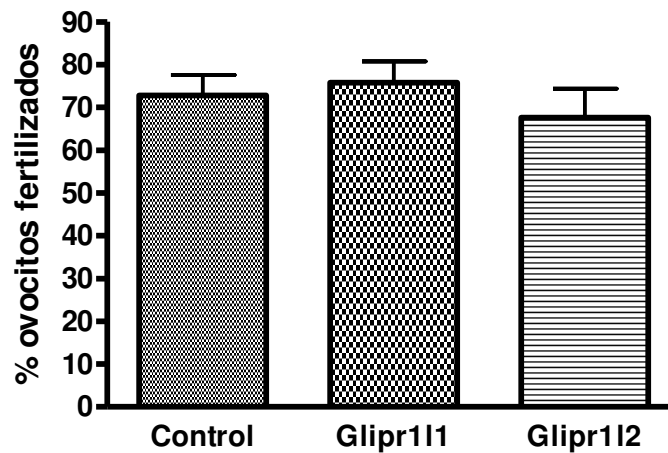


Figura 27. Efecto de anticuerpos contra GLIPR1s sobre la fusión de gametas. Ovocitos de ratón sin ZP fueron inseminados con espermatozoides preincubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anti-GLIPR1L1, anti-GLIPR1L2, o IgG de rata purificada y, al cabo de 90 min de co-incubación, los ovocitos fueron teñidos con Hoescht, determinándose el porcentaje de fertilización. Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes.

En conjunto, los resultados presentados a lo largo de este capítulo describen la identificación de dos nuevas proteínas CAP, GLIPR1L1 de origen testicular y GLIPR1L2 de origen testicular y epididimario, las cuales se encuentran presentes en el espermatozoide y participarían en el proceso de fertilización, más específicamente en la etapa de interacción con la ZP.

Discusión

Con el fin de esclarecer los mecanismos moleculares involucrados en la fertilización, la presente Tesis se ha centrado en las dos familias mejor caracterizadas de la superfamilia de proteínas CAP, las familias CRISP y GLIPR1. Para ello, en el primer capítulo se investigó la presencia de proteínas CRISP en el tracto reproductor femenino como así también su participación durante la interacción de gametas, mientras que el segundo capítulo estuvo enfocado en la caracterización de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 y estudio de su posible rol durante el proceso de fertilización.

Capítulo 1

CRISP en el tracto femenino

Como se mencionara en la introducción, la alta homología entre las proteínas CRISP y Allurina nos llevó a investigar la posible presencia de alguna CRISP en el tracto reproductor femenino, como así también, su posible rol en el proceso de fertilización, siendo éstos los objetivos de este primer capítulo.

Los estudios de RT-PCR en los diferentes tejidos del tracto reproductor femenino de la rata indicaron la presencia de una banda correspondiente al mensajero de CRISP1 en todos los tejidos analizados, como también en las células del cúmulus que rodean al ovocito, pero no así en el ovocito mismo. Estos resultados fueron confirmados por ensayos de Wb indicando la presencia de la proteína CRISP1 en los mismos tejidos en los que se habían detectado los mensajeros correspondientes. Estos estudios indicaban, claramente, que CRISP1 no sólo está presente en el tracto reproductor masculino sino también a lo largo de todo el tracto reproductor femenino, aunque en una cantidad significativamente menor como surge de la comparación con las bandas correspondientes a epidídimo tanto a nivel de mensajero como de proteína. Estudios complementarios en los que se analizó la localización de CRISP1 en los diferentes tejidos, mostraron su presencia en el epitelio luminal del oviducto y útero como así también en la superficie de las células de la granulosa del ovario y de las células del cúmulus, consistente con la naturaleza secretoria de las proteínas CRISPs, las cuales poseen en su secuencia el característico péptido señal (Krätzschar J et al, 1996). Durante el transcurso de esta Tesis, el grupo de la Dra. O'Bryan realizó un análisis de la expresión de las proteínas CRISP en diversos tejidos del ratón identificando a CRISP1 en útero pero no así en ovario por RT-PCR detectando, al igual que en

nuestro trabajo, una marcación positiva en el epitelio luminal por inmuno-histoquímica (Reddy et al., 2008). Sin embargo, el trabajo mencionado carece de correctos controles de Wb que confirmen la especificidad de los anticuerpos utilizados y no evalúa la presencia de CRISP1 en oviducto ni en las células del cúmulus. En ese sentido, cabe mencionar un reciente trabajo que describe la presencia del mensajero de CRISP1 en las células del cúmulus por RT-PCR (Burnett et al., 2012), apoyando nuestras observaciones en esas células.

Teniendo en cuenta que CRISP1 se encuentra presente en unas vesículas membranosas llamadas “epididimosomas” que mediarían la transferencia de proteínas integrales al espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo (Griffiths et al., 2008a), decidimos investigar si existía la posibilidad de que CRISP1 se encontraría también presente en unas vesículas membranosas muy similares presentes en el fluido uterino denominadas “uterosomas”. Dado que dichas vesículas habían sido descritas en ratón, evaluamos la presencia de uterosomas en la rata y la posible asociación de CRISP1 a los mismos. La correcta obtención de los uterosomas de rata se confirmó mediante su observación al microscopio electrónico. En concordancia con lo descrito en la bibliografía (Griffiths et al., 2008b), se observó la presencia de numerosas vesículas formadas por doble membrana, con heterogeneidad de tamaño. A continuación, se investigó la presencia de CRISP1 en estas vesículas uterinas mediante la preparación de extractos proteicos y su posterior análisis por Wb. Los resultados obtenidos indicando la presencia de CRISP1 en las vesículas y su ausencia en fluido uterino constituyen la primera evidencia de la existencia de una proteína CRISP en los uterosomas. Hasta el momento, se sabe muy poco respecto a las funciones biológicas de estas vesículas. Considerando evidencias previas de nuestro laboratorio indicando la transferencia in vitro de CRISP1 desde los epididimosomas a los espermatozoides (Tesis Doctoral Julieta Maldera), existía la posibilidad de que CRISP1 sea transferida a los espermatozoides no sólo durante la maduración epididimaria a través de epididimosomas, sino también durante su paso por el útero a través de los uterosomas. En este sentido, resultados de nuestro laboratorio indican la existencia de dos poblaciones de CRISP1 asociadas a la superficie del espermatozoide con afinidades diferentes: una población mayoritaria que se asocia en forma débil, la cual podría actuar como factor decapacitante, y una fracción minoritaria que se asocia con mayor afinidad y que sólo puede ser removida de los espermatozoides por tratamientos que extraen proteínas integrales de membrana (Cohen et al., 2000b), la cual participaría en el proceso de fertilización. Mientras que la

población débilmente unida se asociaría a los espermatozoides por un mecanismo que involucraría la formación de complejos entre la proteína y el zinc (Maldera et al., 2011), la población fuertemente unida lo haría a través de los epididimosomas presentes en el fluido (Tesis Doctoral Dra. Julieta Maldera). Estos resultados abren la posibilidad de que los uterosomas estén involucrados en la transferencia de una población de CRISP1 que se una fuertemente a la superficie de los espermatozoides durante su tránsito por el útero con el fin de reforzar y asegurar la presencia de esta proteína involucrada en el proceso de fertilización. Esta posibilidad no pudo ser evaluada dadas las importantes dificultades encontradas al realizar los experimentos de transferencia desde los epididimosomas (Tesis Doctoral Dra. Julieta Maldera), los cuales incluso presentan cantidades significativamente mayores de CRISP1 que las detectadas en las vesículas uterinas. Sin embargo, existen evidencias que apoyan la modificación post-testicular de las proteínas de superficie de los espermatozoides no sólo durante la maduración epididimaria sino también durante su capacitación en el tracto femenino (Kirchhoff et al., 1998). Un claro ejemplo es la proteína testicular SPAM1 de ratón, la única proteína caracterizada en los uterosomas hasta el momento, la cual participa en el proceso de fertilización y es transferida a los espermatozoides por un mecanismo mediado por las vesículas uterinas (Griffiths et al., 2008a). De esta manera, si bien SPAM1 se encuentra presente en el espermatozoide desde el testículo, continúa incorporándose a la gameta tanto durante su tránsito por el epidídimo a través de epididimosomas como durante su tránsito por el útero mediado por uterosomas (Griffiths et al., 2008a). Por otra parte, es posible que CRISP1 presente en el oviducto también se asocie a los espermatozoides mientras los mismos permanecen en el isthmus aguardando la ovulación, con el fin de reforzar la presencia de esta proteína en la gameta masculina. Tal es el caso de la proteína de hámster Oviductina, la cual es sintetizada tanto en el útero como en el oviducto, y se asocia a los espermatozoides durante el tránsito por ambos órganos, participando luego en la interacción de gametas (Kimura et al., 1994), e incluso la ya mencionada SPAM1, la cual también se encuentra presente en el oviducto (Griffiths et al., 2008b). Además, es posible que CRISP1 en el oviducto participe en la estrecha asociación de los espermatozoides al isthmus oviductal, como ocurre con la proteína SBG la cual facilita la unión de los espermatozoides al epitelio oviductal, actuando también en la capacitación de los mismos (Teijeiro et al., 2011). Finalmente, la proteína CRISP1 detectada en las células de la granulosa del ovario corresponde a aquella que forma parte de las células del cúmulus, siendo posible que la misma cumpla un rol durante la penetración de los espermatozoides a través del cúmulus que rodea al ovocito. Esta posibilidad será discutida en profundidad más adelante.

La presencia de CRISP1 en el tracto femenino de la rata nos llevó a investigar la presencia de las otras proteínas CRISP en este tracto tales como CRISP2 y CRISP4, dado que el gen de CRISP3 no está presente en la rata. A diferencia de CRISP1, el mensajero de CRISP2 se detectó sólo en ovario, mientras que el correspondiente a CRISP4 no se encontró en ninguno de los órganos reproductores femeninos evaluados. Dada la existencia del mensajero de CRISP2 en ovario, se exploró su presencia tanto en los ovocitos como en las células del cúmulus, obteniéndose resultados negativos en ambos casos. Los estudios de Wb en tejido ovárico revelaron la presencia de una banda a la misma altura que la correspondiente a CRISP2 testicular confirmando la expresión de la proteína en este tejido. La presencia de otra banda de menor intensidad y mayor peso molecular que CRISP2 podría corresponder a una inespecificidad detectable en ovario debido a la mayor concentración de extractos proteicos utilizados para detectar CRISP2 en este tejido comparado a la utilizada en testículo. Alternativamente, la banda podría corresponder a una modificación post-traducciona, específica de ovario ya que es sabido que CRISP2 no posee ninguna modificación post-traducciona a nivel testicular (Reddy et al., 2008). Los estudios de localización mostraron a CRISP2 en la región de la médula ovárica y en el tejido intersticial del cortex. Considerando el carácter secretorio de CRISP2 y su rol como regulador de canales iónicos (Gibbs et al., 2006), es posible que esta proteína cumpla una función parácrina en el ovario regulando el flujo de iones, crítico para numerosos eventos foliculares (Díaz-Muñoz et al., 2008). Si bien la Dra O´Bryan y colaboradores (Reddy et al., 2008) detectaron a CRISP2 en el ovario por inmunohistoquímica, la misma fue localizada, a diferencia de nuestras observaciones, en las células de la granulosa, en las células intersticiales del cortex ovárico y en el citoplasma de ovocitos preovulatorios. Sin embargo, estos estudios carecen de controles negativos y no fueron complementados con ensayos de Wb que evidencien la especificidad de los anticuerpos empleados. Además, a diferencia de nuestro grupo, el trabajo mencionado no evalúa la presencia de CRISP2 ni en oviducto ni en células del cúmulus.

Tal como se indicara anteriormente, la presencia de CRISP1 en las células del cúmulus sugería su posible participación en el proceso de interacción de gametas. En ese sentido, los ratones carentes de CRISP1 disponibles en nuestro laboratorio representaban un modelo ideal para estudiar esta posibilidad. Estos ratones fueron generados con el fin de dilucidar el papel funcional de la proteína epididimaria CRISP1 en el proceso de fertilización, y constituyeron el primer KO para una proteína de la

familia CRISP. En principio, evaluamos si, al igual que en la rata, CRISP1 estaba presente en el tracto reproductor femenino del ratón. Los resultados indicaron la presencia del mensajero de CRISP1 en el ovario, oviducto, útero y células del cúmulus provenientes de animales HT y su ausencia en los animales KO. Cabe destacar que si bien las bandas observadas no se encontraban a la misma altura que el control (epidídimo), el hecho de que no estuvieran presentes en los animales KO apoyaba que las mismas correspondieran al mensajero de CRISP1 y no a un posible contaminante. De todos modos, la secuenciación de las bandas detectadas en los animales HT confirmó la identidad de las mismas como CRISP1. La presencia de la proteína CRISP1 en ovario, oviducto y útero fue confirmada por Wb, evidenciándose, al igual que en la rata, una menor expresión en todos estos tejidos respecto a la correspondiente en epidídimo. El empleo de los animales KO confirmó que la ausencia del mensajero se traducía en la ausencia de la proteína en ovario y en útero. Los estudios de IIF revelaron la misma localización de CRISP1 en los tejidos y en las células del cúmulus que la observada en la rata, a excepción del ovario donde se detectó una marcación minoritaria en las células intersticiales no detectada en la rata. Cabe destacar que en ninguno de los casos se encontró marcación en los animales KO. Estos resultados nos indicaban la presencia de CRISP1 a lo largo de todo el tracto femenino del ratón, confirmando, además, la utilidad de los animales KO para evaluar la posible participación de CRISP1 en la interacción de gametas en esta especie.

En base a nuestros resultados revelando la presencia de CRISP1 en las células del cúmulus, evaluamos su posible participación en el proceso de interacción de gametas. Para ello, se realizaron experimentos de fertilización *in vitro* en los cuales los COCs *Crisp1*^{-/-} se co-incubaron tanto con espermatozoides control como mutantes. Bajo estas condiciones, los porcentajes de fertilización correspondientes a los COCs deficientes en CRISP1 fueron significativamente menores que aquellos obtenidos con COCs control. Más aún, cuando se co-incubaron los COCs KO con espermatozoides KO, los porcentajes de fertilización fueron significativamente menores que aquellos observados cuando los COCs KO eran incubados con espermatozoides control. En relación a estas observaciones surgen dos consideraciones: que CRISP1 presente en las células del cúmulus cumpliría un rol en la interacción de gametas, y que los espermatozoides carentes de CRISP1 exhiben un defecto en la fertilización de COCs KO, no detectado al emplear COCs control (Da Ros et al., 2008). Al respecto, cabe aclarar que los espermatozoides KO para CRISP1 presentan una reacción acrosomal (tanto espontánea como inducida), y una motilidad, no diferentes de los animales HT

(Da Ros et al., 2008) excluyendo la idea de que la menor capacidad de los espermatozoides KO de penetrar los COCs KO se deba a defectos en estos dos parámetros funcionales involucrados en la penetración del cúmulus. Por otro lado, observaciones de nuestro grupo indicaban que la proteína CRISP1 purificada era capaz de unirse a ácido hialurónico (AH), uno de los componentes mayoritarios de la matriz de los COCs, como así también de provocar la dispersión de las células del cúmulus (Tesis Doctoral Dra. Dolores Busso), sugiriendo que CRISP1 del espermatozoide podría cumplir un rol durante la etapa de penetración del cúmulus. En ese sentido, se ha planteado que la penetración del cúmulus estaría mediada tanto por la fuerza generada por la hiperactividad del espermatozoide (teoría mecánica) como también por la acción de enzimas capaces de degradar la matriz extracelular (teoría enzimática) (Kim et al., 2008). En base a ello, y teniendo en cuenta la capacidad degradativa de CRISP1, el siguiente paso consistió en investigar la posible participación de CRISP1 del espermatozoide en la apertura del cúmulus que rodea al ovocito durante la fertilización. Nuestros resultados mostraron que, al igual que había sido observado para la rata y ratón (Tesis Doctoral Dra. Dolores Busso), la proteína CRISP1 purificada era capaz de dispersar en forma tiempo-dependiente a las células de cúmulus maduros, sugiriendo que el blanco de la acción de CRISP1 sería la matriz en la cual están embebidas las células del cúmulus. El hecho de que CRISP3 purificada no afectara la integridad del cúmulus indicó que el efecto no era propio de cualquier CRISP. Con el fin de analizar la especificidad de la acción de CRISP1 sobre la integridad del cúmulus, los ensayos fueron realizados en presencia de CRISP1 purificada expuesta previamente a diferentes sueros específicos contra la proteína. Los resultados mostrando que el efecto de dispersión no era bloqueable por la acción de ninguno de los anticuerpos sugirieron que la actividad dispersante de CRISP1 podía deberse a la presencia de contaminantes en la preparación. Dicha posibilidad se evaluó a través de ensayos con apigenina, un flavonoide inhibidor específico de hialuronidasas que había sido utilizado para demostrar la acción hialuronidásica de PH20 y Hyal5 (Lin et al., 1994; Kim et al., 2005). La disminución de la actividad dispersante de CRISP1 en presencia de este inhibidor fue un hallazgo importante ya que apoyó la idea de que el efecto de la preparación de CRISP1 dependía de una actividad hialuronidasa. Sin embargo, nuestras evidencias previas indicaban que si bien la preparación de CRISP1 purificada tenía la capacidad de disgregar el cúmulus y de unirse a AH, no poseía actividad hialuronidásica según surgía de la comparación de las secuencias aminoacídicas de CRISP1 con las de dos proteínas con actividad hialuronidasa: la hialuronidasa del veneno de la abeja *Apis mellifera* (Gmachl & Kreil, 1993) y la proteína PH-20 de rata (Hou et al, 1996). Más aún, la capacidad de CRISP1

para degradar AH también había sido analizada mediante un ensayo bioquímico, sin obtener resultados positivos (Tesis Doctoral Dra, Dolores Busso). Estas observaciones y nuestros resultados con apigenina apoyaban la idea de la existencia de posibles contaminaciones con actividad hialuronidásica en los preparados de CRISP1. La repurificación de la proteína confirmó la presencia de contaminantes en la preparación los cuales serían responsables de la actividad dispersante a juzgar por el hecho de que CRISP1 repurificada no tuvo acción alguna sobre la dispersión de las células del cúmulus. En conjunto, los estudios realizados indicaban que CRISP1 presente en la superficie del espermatozoide no podría ejercer un efecto sobre la apertura o dispersión de la matriz del cúmulus, descartando que los menores porcentajes de fertilización observados en la co-incubación de COCs KO con espermatozoides KO se debieran a una menor capacidad de los espermatozoides KO de dispersar al cúmulus. Por su parte, al igual que lo observado anteriormente (Da Ros et al., 2008), los espermatozoides KO incubados con COCs control no exhibieron ningún defecto significativo en su capacidad fertilizante. En ese sentido, es sabido que el *cúmulus oophorus* tiene efectos beneficiosos sobre la fertilización tales como estimular la motilidad de los espermatozoides y la ocurrencia de la RA, y controlar el acceso de los espermatozoides a la ZP del ovocito (Florman y Ducibella, 2006) que podrían, en conjunto, enmascarar los defectos propios de los espermatozoides KO. En vista de ello, los menores porcentajes de fertilización obtenidos con espermatozoides y COCs KO podrían deberse a los defectos ya conocidos en la fosforilación de proteínas en tirosina, en la capacidad del espermatozoide de interactuar con la ZP o con el oolema (fusión) (Da Ros et al., 2008), o bien a defectos aún no descriptos, los cuales se harían evidentes en una condición más restrictiva como la correspondiente al empleo de cúmulus KO.

La segunda observación importante de los ensayos de fertilización *in vitro* fue el hecho de que, en aquellos casos en los que se utilizaron COCs KO, observáramos menores porcentajes de fertilización. Estos resultados, nos llevaron a pensar que los efectos beneficiosos que atribuíamos al *cúmulus oophorus*, podían también deberse a la presencia de CRISP1 en dichas células. En base a ello, el próximo paso consistió en evaluar si CRISP1 del cúmulus ejercía un efecto positivo sobre la penetración de los espermatozoides. Los ensayos de penetración realizados mostraron que, en aquellos COCs que carecían de la proteína, ingresaban menos espermatozoides que en los COCs controles, confirmando que CRISP1 presente en las células del cúmulus favorecía la penetración de los espermatozoides a través del cúmulus. Una

observación interesante fue que la penetración de los cúmulos tanto KO como HT no difirió al utilizar espermatozoides KO o HT, diferentemente del caso de los ratones carentes de las hialuronidasas PH-20 (Baba et al., 2002) o Hyal5 (Kim et al., 2005), o de las serinproteasas PRSS21 y ACR (Kawano et al., 2010) los cuales presentan una menor capacidad de penetrar el cúmulo respecto a los espermatozoides control. Estas observaciones apoyan nuestros resultados previos indicando que CRISP1 no tendría una actividad dispersante de las células del cúmulo.

Una posible explicación para la disminución en la penetración de COCs carentes de CRISP1 podría ser que la estructura de la matriz extracelular se encontrara alterada generando así una mayor dificultad a los espermatozoides para penetrarla. Tal es el caso de COCs resistentes a la degradación por hialuronidasa debido a la sobreexpresión de fibronectina, que los hace menos aptos para la fertilización (Tamba et al., 2008). Teniendo en cuenta estas observaciones, evaluamos la estructura de la matriz extracelular del cúmulo carente de CRISP1 mediante el estudio de la apertura de COC tanto espontánea como inducida por hialuronidasa. En ambos casos, la evaluación se hizo en función del tiempo y comparando COCs KO y HT. Los resultados mostraron que la dispersión de las células del cúmulo tanto espontánea como inducida por hialuronidasa fue la misma para ambos grupos, apoyando la idea de que la estructura de la matriz del COC no estaría afectada por la ausencia de CRISP1 en la misma. Otra posible explicación para la menor penetración observada para COCs KO sería que CRISP1 ejerciera una actividad quimioattractante hacia los espermatozoides tal como fuera descrito para la proteína CRISP Allurina de anfibios. Allurina fue identificada a partir de medios condicionados de huevos de *Xenopus laevis*, los cuales tenían la capacidad de atraer espermatozoides (Al-Anzi and Chandler, 1998), encontrándose luego que dicha proteína era la responsable del efecto observado (Olson et al., 2001). Esta proteína es secretada por las células ciliadas del epitelio oviductal, y se incorpora a la cubierta gelatinosa de los huevos durante su tránsito por el oviducto (Xiang et al., 2004). Una vez que los huevos son liberados por la hembra al medio, Allurina es rápidamente liberada por difusión y convección, atrayendo a los espermatozoides (Xiang et al., 2005). Otra de las evidencias de la probable actividad quimioattractante de CRISP1 la constituye el modelo del ratón KO para la proteína receptora de prostanglandina E subtipo EP2 (PTGER2) presente en las células del cúmulo, el cual exhibe una severa reducción en la tasa de fertilización y de penetración del cúmulo (Hizaki et al., 1999). Dicha reducción se debe, principalmente, a que la ausencia del receptor genera un

desbalance en la síntesis de quemoquinas, las cuales atraen los espermatozoides mediante quimiotaxis. Considerando estos resultados, y que la penetración de los espermatozoides era menor en los COCs KO, el próximo paso consistió en evaluar si CRISP1 tenía la capacidad de quimioatraer a los espermatozoides.

El análisis de la actividad quimiotáctica de CRISP1 se realizó utilizando el método de medición de quimiotaxis descrito por la Dra. Giojalas (Universidad de Córdoba), en el cual uno de los receptáculos de una cámara Zigmond es cargado con el agente a testear como quimioattractante mientras que el otro es cargado con espermatozoides capacitados, formándose un gradiente monodimensional del quimioattractante. Los espermatozoides son filmados por una cámara acoplada al microscopio y los videos analizados, posteriormente, mediante el seguimiento individual de la trayectoria (orientación) de los espermatozoides. En todos los ensayos se empleó progesterona como control positivo ya que la actividad quimiotáctica de esta hormona está bien descrita en mamíferos (Teves et al., 2006). Cabe destacar que la actividad quimiotáctica se define como el control direccional del nado de los espermatozoides generado por el agente quimiotáctico mediante un gradiente de concentración creciente originado desde la fuente de dicho agente. Estos ensayos revelaron que CRISP1 exhibía actividad quimioattractante a partir de una concentración de 1 μM , alcanzando los niveles correspondientes a la progesterona (control positivo) a 10 μM . Si bien esta concentración es varios órdenes de magnitud mayor a la necesaria para progesterona, la misma es similar a la concentración de CRISP1 utilizada para inhibir la unión de los espermatozoides a ZP y la fusión de gametas en ensayos *in vitro* (6 μM) (Cohen et al., 2000b; Cohen et al., 2000a; Busso et al., 2007a).

La actividad quimioattractante de CRISP1 parecería depender de su conformación a juzgar por el hecho que la proteína recombinante recCRISP1 expresada en bacterias, carente de glicosilación, y con un deficiente nivel de formación de puentes disulfuro (Ellerman et al., 1998), no fue capaz de quimioatraer a los espermatozoides a la máxima concentración utilizada (10 μM). La necesidad de una correcta conformación para la actividad quimiotáctica de CRISP1 también quedó evidenciada por los resultados mostrando que la desnaturalización parcial de la proteína por calor o la acción conjunta de la desnaturalización por calor y reducción de los puentes disulfuro por DTT, disminuyeron dicha capacidad. Cabe mencionar que la proteína Allurina generada en un sistema procariótico también mostró atraer a los espermatozoides de

sapo de un modo menos eficiente que la proteína nativa debido a la incorrecta formación de los puentes disulfuro (Sugiyama et al., 2009). De todos modos, es importante recordar que tanto Allurina nativa como recombinante mostraron tener la capacidad de atraer los espermatozoides no sólo de anfibios sino también de ratón. Teniendo en cuenta la homología de Allurina con CRISP1, en el mismo trabajo los autores evaluaron la capacidad de la proteína recombinante CRISP1 de ratón de atraer a los espermatozoides, encontrando que la misma no poseía dicha capacidad (Burnett et al., 2011). La proteína recombinante utilizada en estos estudios fue generada en fibroblastos de ratón por lo cual, a diferencia de nuestra proteína recombinante, no tendría afectada las modificaciones post-traduccionales ni la conformación. En base a ello, una posible explicación para la falta de actividad quimiotáctica observada para esta proteína podría radicar en el hecho de que los autores utilizaron medios condicionados conteniendo la proteína recombinante a una concentración única (Burnett et al., 2011), no suficiente para ejercer el efecto quimiotáctico, o que algún factor presente en el medio inactiva su potencial actividad.

Nuestros resultados describen por primera vez, en mamíferos, la capacidad quimiotáctica de una proteína ya que, hasta el momento, sólo se encontraban descritos como agentes quimiotácticos de espermatozoides a la ya mencionada hormona esteroidea progesterona (Teves et al., 2006), el aldehído aromático bourgeonal que activa los receptores olfatorios OR1D2 en el espermatozoide (Spehr et al. 2003; Spehr et al. 2004; Gakamsky et al. 2009), y péptidos pequeños de hasta 8 kDa denominados quemoquinas, tales como RANTES, CCL7, etc. (Isobe et al., 2002; Tamba et al., 2008). Nuestras observaciones mostrando la actividad quimiotáctica de CRISP1 están apoyadas por los resultados encontrados para la proteína CRISP Allurina (Al-Anzi et al., 1998), que fue la primera proteína CRISP detectada en el tracto femenino y en mostrar capacidad quimiotáctica de espermatozoides de sapo (Olson et al., 2001).

Si bien el mecanismo de acción que llevaría a CRISP1 a generar quimiotaxis sobre los espermatozoides de ratón aún se desconoce, recientes trabajos aportarían cierta evidencia al respecto. De acuerdo a estos estudios, Allurina no alteraría la velocidad de los espermatozoides sino su orientación, uniéndose principalmente a la pieza media del flagelo espermático (Burnett et al., 2011). Por otro lado, el movimiento flagelar está asociado a las señales de calcio provenientes tanto de la entrada de

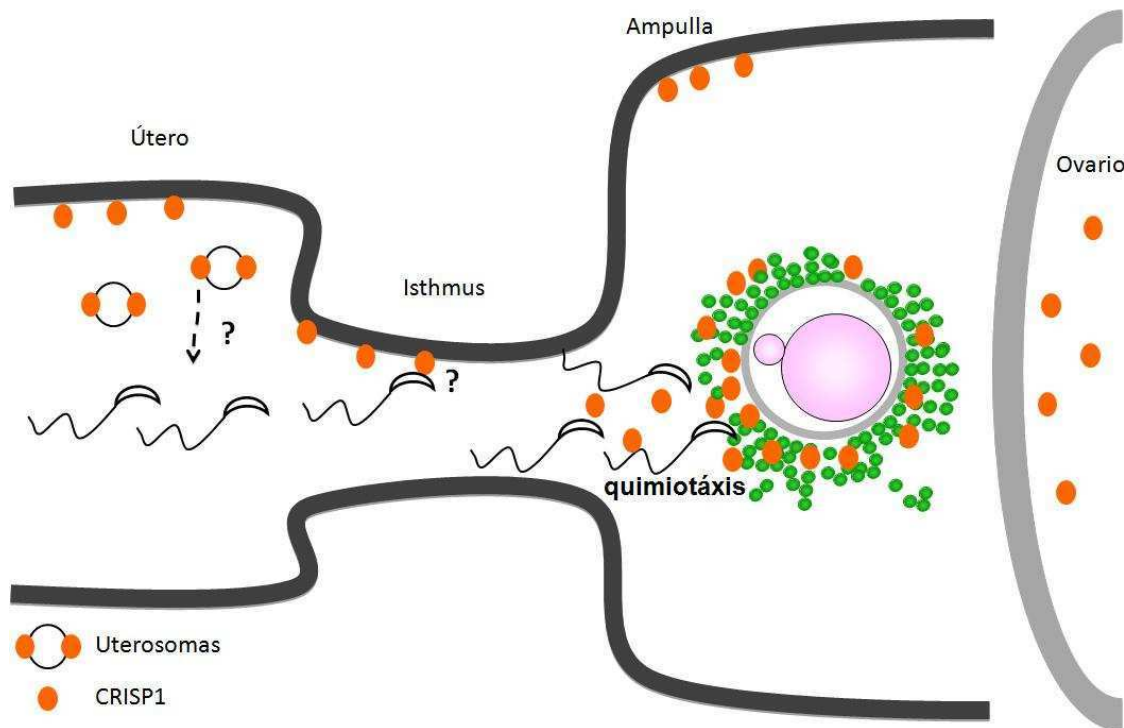
calcio extracelular como de la liberación de este ión de los reservorios intracelulares (Burnett et al., 2012). En ese sentido, es sabido que la progesterona, principal quimioattractante de espermatozoides en mamíferos, regula los canales de calcio “CatSper” presentes en el flagelo de los espermatozoides humanos, abriendo la posibilidad de que dichos canales también estén involucrados en la regulación de las señales de calcio del flagelo durante la quimiotaxis (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011). Además de los canales “CatSper”, la familia de canales receptores de potencial transciente (TRP) participa en una variedad de procesos en el espermatozoide dependientes de calcio tales como motilidad, capacitación y reacción acrosomal (De Blas et al., 2009). Recientemente, se han identificado algunos miembros de esa familia en espermatozoides humanos (De Blas et al., 2009) y de ratón (Martinez-Lopez et al., 2011), y se ha mostrado que estos canales podrían estar involucrados en termotaxis, quimiotaxis y transducción mecanosensitiva (De Blas et al., 2009; Martinez-Lopez et al., 2011). Uno de estos canales, el TRPM8, mostró ser inhibido por la región CRD de CRISP4 (Gibbs et al., 2011). La alta homología entre el CRD de CRISP4 y CRISP1 sugeriría que CRISP1 también podría regular canales TRP y, a través de los mismos, ejercer su acción quimiotáctica. Esta posibilidad está siendo evaluada en estos momentos en colaboración con el Dr Alberto Darszon (UNAM, Méjico), como así también la posibilidad de que CRISP1 pudiera estar modulando directa o indirectamente a “CatSper”. Un aspecto a considerar en cuanto a la participación de CRISP1 en quimiotaxis a través del CRD, es que Allurina, también involucrada en este proceso, carece de CRD, estando conformada sólo por el dominio PR1 y una porción del Hinge. Por tal razón, resultará de sumo interés evaluar cuál de los dominios de CRISP1 se encuentra involucrado en quimiotaxis o bien la posibilidad de que ambos dominios ejerzan el efecto attractante.

Por último, si bien los anticuerpos desarrollados en nuestro laboratorio detectan a CRISP1 sólo en la cabeza de los espermatozoides, la misma también se encontraría presente en la cola según lo observado al emplear otros anticuerpos (Roberts et al 2007). En ese sentido, resulta curioso el hecho de que el espermatozoide que ya contiene la proteína CRISP1 en cabeza y cola, sea capaz de detectar un gradiente formado por CRISP1 proveniente de las células del cúmulus. Una posibilidad es que existan receptores libres para CRISP1 en el espermatozoide, lo cual estaría apoyado por la capacidad de CRISP1 nativa de unirse a la cola de espermatozoides inmaduros (Maldera et al., 2011). Más aún, tanto los canales CatSper (Xia et al., 2007), como los TRP, incluyendo los TRPM8, se encuentran principalmente en la cola del

espermatozoide (Martinez-Lopez et al., 2011). Otra posibilidad podría ser que la proteína proveniente del cúmulus contacte a aquella que se encuentra presente en el espermatozoide formando un dímero que actúe como efector de la señal quimiotáctica. Apoyando esta opción, existen evidencias de dimerización de proteínas CRISP presentes en venenos de víboras (Suzuki et al., 2008). Una última opción sería que CRISP1 del cúmulus presente diferencias post-traduccionales con respecto a la proteína espermática siendo estas diferencias las que el espermatozoide lograra detectar. Sin embargo, esta hipótesis es poco probable dado que los ensayos de quimiotaxis fueron realizados con la proteína CRISP1 nativa purificada de epidídimo.

Es interesante mencionar que nuestros hallazgos no sólo proporcionan información sobre los mecanismos por los cuales la proteína CRISP1 presente en las células del cúmulus participa en la interacción de gametas, sino que permitirían mimetizar *in vitro* la capacidad quimiotáctica de una proteína clave en el proceso de fertilización. En ese sentido, sería interesante investigar la presencia de CRISP1 en las células del cúmulus humanas, lo cual abriría la posibilidad de una futura aplicación en la clínica tal como la evaluación de la falta o mutación de CRISP1 en los cúmulus de mujeres infértiles o subfértiles. En caso de encontrarse algún tipo de asociación entre la infertilidad de las pacientes y la presencia de CRISP1 en sus COCs, se podría plantear la posibilidad del agregado de esta proteína en los ensayos de fertilización *in vitro* (FIV) con el fin de aumentar los porcentajes de fertilización. Por otro lado, con el advenimiento de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), se han ofrecido nuevas esperanzas a pacientes con subfertilidad severa. Previo a la inyección de los espermatozoides, el paso clave es la selección de los espermatozoides a inyectar, siendo el actual criterio de selección la observación cualitativa de las gametas por parte del operador. De este modo, el análisis de la capacidad de los espermatozoides de responder a la actividad quimioattractante de CRISP1 podría constituir un nuevo parámetro para la selección espermática. En ese sentido, recientemente, se ha diseñado un chip de quimiotaxis para la selección de espermatozoides a ser utilizados en ICSI, por el cual se elijen aquellas gametas capaces de responder a la quemoquina acetilcolina (Ko et al., 2012). Considerando este tipo de ensayo, se abre la posibilidad de mejorar los métodos de evaluación utilizando a CRISP1 como agente quimioattractante tanto para el uso en humanos como en especies animales de interés comercial.

En resumen, en este capítulo, se observó la presencia de CRISP1 a lo largo de todo el tracto reproductor femenino (útero, oviducto, ovario y células del cúmulus) evaluándose su posible función en el mismo. En ese sentido, se observó que la ausencia de CRISP1 en las células del cúmulus disminuye el porcentaje de fertilización *in vitro* y la penetración de los espermatozoides al cúmulus debido, muy probablemente, a la capacidad de esta proteína de quimioatraer a los espermatozoides. Sumado a los resultados previos, concluimos que CRISP1 sería una proteína crítica en el proceso de fertilización ya que acompaña o escolta al espermatozoide a lo largo del tracto reproductor tanto masculino como femenino. De este modo, CRISP1 se asociaría a los espermatozoides durante el tránsito de los mismos por el epidídimo. Posteriormente, durante su tránsito por el tracto femenino, la proteína CRISP1 presente en el útero se asociaría a los espermatozoides a través de un proceso de transferencia mediado por uterosomas. Ya en el oviducto, mientras la proteína CRISP1 presente en el isthmus podría jugar algún rol en la interacción entre el espermatozoide y el epitelio, la proteína presente en la ampulla y en el cúmulus ejercería un efecto quimioattractante conduciendo a los espermatozoides hiperactivados hacia el ovocito (**Esquema 1**).



Esquema 1: Representación esquemática de la participación de la proteína CRISP1 femenina.

Capítulo 2

GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en el tracto reproductor masculino

Como fuera mencionado en la introducción de esta Tesis, las familias mejor caracterizadas dentro de la superfamilia CAP son la familia CRISP y la familia GLIPR1. Sin embargo, al comienzo de nuestros estudios, la información existente sobre la presencia y función de familia GLIPR1 en el tracto reproductor era escasa y controvertida. En ese sentido, la alta homología que presentan las proteínas CRISP y las proteínas GLIPR1 sugería posibles funciones comunes. De acuerdo a los estudios realizados por Visconti y colaboradores (2005), la secuenciación de pequeños péptidos provenientes de proteínas presentes en “rafts” de membrana de espermatozoides de ratón reveló la posible presencia de dos proteínas denominadas SCP/TPX-1/CRISP-LIKE # 2 (1700011E04RIK) BAB24280 y SCP/TPX-1/CRISP-LIKE #1 (4921508011RIK) NP_080499. Posteriormente, nuestra búsqueda de las secuencias de los genes que podían contener esos péptidos en la base de datos del NCBI, indicaron que los mismos pertenecían al ADNm de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2. En base a ello, nos planteamos estudiar la expresión, presencia y localización de estas dos proteínas en el tracto reproductor, y su posible participación en la interacción de gametas.

Los estudios de RT-PCR y secuenciación destinados a evaluar la presencia de los mensajeros de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en diferentes tejidos indicaron la expresión de GLIPR1L1 en testículo y de GLIPR1L2 tanto en testículo como en el cauda epididimario, confirmando a ambas proteínas como componentes del tracto reproductor masculino del ratón. Considerando la presencia de CRISP1 en el tracto reproductor femenino, se estudió la presencia de los mensajeros de ambas GLIPR1s en dicho tracto. Contrariamente a lo observado para CRISP1, ninguno de los mensajeros de las GLIPR1s fue encontrado en el tracto femenino. Estudios complementarios en los que se analizó la expresión de estas proteínas durante el desarrollo postnatal mediante RT-PCR semi-cuantitativa sugirieron una expresión andrógeno-dependiente de ambas proteínas, a juzgar por los niveles significativos de expresión alrededor de los 20 días, coincidente con el momento en el cual se

comienzan a detectar los niveles androgénicos de plasma y los receptores de andrógenos en testículo y epidídimo (Gallon et al., 1989; McKinney y Desjardins, 1973) como así también por el hecho de que los niveles de expresión de las GLIPR1s alcanzan un máximo a los 40 días, momento en el cual los ratones alcanzan la madurez sexual. La andrógeno-dependencia de la expresión de las proteínas sugerida por los ensayos de RT-PCR semi-cuantitativa, está apoyada por la presencia de elementos AREs (Androgen Response Elements) en la región promotora de ambos genes. Asimismo, es importante mencionar que los genes de las GLIPRs son regulados por p53, factor de transcripción involucrado en el daño del ADN, apoptosis y control del ciclo celular, y cuya inhibición disminuye la señalización mediada por el receptor de andrógenos (Yu *et al*, 1997a., 1997b; Sengupta y Wasylyk, 2001; Shenk *et al*, 2001; Tam et al., 2010). En conjunto, nuestros resultados de RT-PCR y las evidencias mencionadas apoyan la existencia de una regulación androgénica de GLIPR1L1 y GLIPR1L2. Por otro lado, el estudio de la localización de ambos mensajeros mediante la técnica de hibridación *in situ* evidenció la presencia de GLIPR1L1 en las espermátidas redondas y elongadas del testículo, y de GLIPR1L2 en los espermatoцитos primarios del testículo y en las células principales del epitelio del caput epididimario. Cabe destacar que la localización testicular de las dos proteínas es similar a la observada para CRISP2 (Foster y Gerton, 1996), mientras que la localización de GLIPR1L2 en el epidídimo es similar a la de la proteína epididimaria andrógeno-dependiente CRISP1 (Eberspaecher et al., 1995). Estas observaciones, junto a la presencia de los mensajeros de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en las células testiculares post-mitóticas, son consistentes con la posible presencia de ambas proteínas en los espermatozoides (Sleight et al., 2005).

Con el fin de estudiar la localización, y función de GLIPR1L1 y GLIPR1L2, el paso siguiente consistió en clonar y expresar las proteínas recombinantes para la posterior generación de los anticuerpos específicos. Para ello, se subclonaron las secuencias codificantes de ambas proteínas del vector Topo al vector pGemT, incluyéndoles los sitios de digestión de las enzimas de restricción BamHI y HindIII en los extremos 5' y 3', respectivamente, con el fin de poder direccionar el subclonado. Una vez dentro del vector pGemT, ambas secuencias fueron extraídas del mismo mediante digestión enzimática y transferidas al vector de expresión pET-28c. Dicho vector produce proteínas de fusión con poli-histidina lo cual permite la purificación de las mismas a través de una columna de afinidad de níquel (Mierendorf et al., 1998). La expresión a partir de este vector resultó en la detección de una banda única del tamaño esperado

para GLIPR1L1 tanto por Wb como por tinción del gel con CBB, y de una banda para GLIPR1L2 detectada sólo por Wb, sugiriendo una menor expresión de esta proteína. La coincidencia entre el peso molecular observado y el esperado para las proteínas de fusión indicó que las bandas detectadas corresponderían a recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2.

Con la finalidad de optimizar la expresión de ambas proteínas, se estudió el crecimiento, en medio líquido, de bacterias transformadas, evaluándose su capacidad de responder a la inducción con IPTG. Si bien los resultados mostraron la ausencia de crecimiento bajo condiciones de inducción, los ensayos de Wb indicaron que la inducción a 37°C generaba productos de proteólisis en ambas proteínas recombinantes. Para evitar dicho efecto, se evaluó la expresión de las dos proteínas a 27 °C, observándose la reducción de los productos de degradación y una mayor expresión de las proteínas recombinantes completas. Estos resultados confirmaron que la sobreexpresión de ambas proteínas era tóxica para las bacterias, tal como es el caso de 135 proteínas del arroz (Tsunoda et al., 2005) y de la proteína bacteriana Flagellina (Goudarzi et al., 2009), cuyas inducciones en un sistema pET-28C a 37°C en *Escherichia coli*, resulta tóxica para la célula y conduce a la degradación. A pesar de que la expresión a temperaturas menores que 37°C previene la formación de cuerpos de inclusión (Rudolph y Lilie, 1996), la expresión a 27°C de recGLIPR1L1 y recGLIPR1L2 resultó en la obtención de las proteínas mayoritariamente en forma insoluble. Si bien la aparición de las proteínas en los cuerpos de inclusión no era un efecto buscado, permitió que la purificación fuera más sencilla ya que los cuerpos de inclusión se encuentran enriquecidos en las proteínas recombinantes y son fáciles de separar del resto de la célula (Rudolph y Lilie, 1996).

Sin embargo, teniendo en cuenta que un aspecto importante para la purificación de una proteína por cromatografía de afinidad es que la misma se obtenga en forma soluble, las dos GLIPR1s fueron purificadas por solubilización de los cuerpos de inclusión con urea, y pasaje por columna de afinidad de níquel. A pesar de ello, la purificación de las GLIPR1s fue ineficiente. Si bien los motivos de dicha ineficiencia se desconocen, se puede descartar que se debiera a que el péptido de fusión (His tag) no se mantuviera unido a ambas proteínas o que hubiera sido clivado ya que la detección de las proteínas recombinantes con el anticuerpo contra His tag confirmó que las mismas tenían el péptido unido. También se puede descartar que el His-tag se encontrara mal plegado dado que el mismo se une a la columna con una afinidad del 80% (comparado con el tag lineal), independientemente del grado de plegado (Novagen pET expression System manual). En vista de estas observaciones, se

procedió a la purificación de ambas proteínas por elución pasiva de las mismas desde el gel, el cual resultó un proceso rápido que permitió obtener grandes cantidades de proteína purificada con una pureza superior al 90%. En conjunto, estos resultados indicaron que las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 pueden ser expresadas en un sistema bacteriano, y purificadas con un rendimiento aceptable.

Habiendo expresado y purificado las dos proteínas recombinantes, el paso siguiente consistió en la inmunización de ratas con dichas proteínas con el fin de generar los correspondientes anticuerpos. Los sueros obtenidos fueron capaces de reconocer a las proteínas recombinantes en forma específica, a juzgar por la falta de detección de las mismas al utilizar los sueros preinmunes control. Posteriormente, los sueros fueron pasados por una columna de sefarosa-proteína G, la cual posee alta afinidad por la fracción cristalizante de las inmunoglobulinas G (IgGs) permitiendo su purificación (Björck y Kronvall, 1984). La posibilidad de que cada uno de los anticuerpos obtenidos reconociera a ambas proteínas era alta considerando que los mismos contienen anticuerpos tanto conformacionales como de secuencia (Frandsen et al., 2011), y que, por otro lado, existe un 45% de identidad entre GLIPR1L1 y GLIPR1L2. Sin embargo, las IgGs purificadas no presentaron reacción cruzada entre sí. En ese sentido, cabe mencionar que la ausencia de actividad cruzada entre dos anticuerpos contra proteínas homólogas fue también observada para las proteínas CRISP1 y CRISP2, las cuales exhiben un 70% de identidad (Eberspaecher et al., 1995; Kasahara et al., 1989), como así también CRISP1 y CRISP4 que poseen un 44% de identidad (Nolan, et al., 2006).

Contando con los anticuerpos generados, se procedió a investigar la existencia de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en aquellos órganos en los cuales se habían detectado los mensajeros correspondientes. Ensayos de Wb detectaron la presencia de una banda de 29 kDa en testículo, al emplear anti-GLIPR1L1, y de una banda de 37 kDa tanto en testículo como en epidídimo, al utilizar anti-GLIPR1L2. Cabe destacar que el anticuerpo generado contra GLIPR1L1 fue incapaz de detectar a GLIPR1L2, mientras que el anticuerpo contra GLIPR1L2 fue incapaz de detectar a GLIPR1L1 tanto en testículo como en epidídimo, consistente con la ausencia de actividad cruzada observada al utilizar las proteínas recombinantes aisladas. Estos resultados confirmaron la capacidad de los anticuerpos de reconocer las proteínas nativas con

una alta especificidad, y mostraron la presencia de ambas proteínas en el tracto reproductor masculino.

Posteriores estudios de Wb confirmaron la presencia de ambas proteínas en la gameta masculina con un peso molecular igual al predicho. Estudios complementarios de inmunolocalización mostraron la presencia de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en la región dorsal de la cabeza de células sin tratar, revelando la existencia de tres diferentes patrones de marcación en la cabeza de células permeabilizadas (marca dorsal, marca dorsal y ecuatorial, y marca parcial o total de la cabeza) que incluían en todos los casos marcación en la cola. El hecho de que la marca en la cabeza se observaba tanto en las células sin tratar como permeabilizadas mientras que la marcación en la cola se detectaba solo en células sometidas a permeabilización, indicó que ambas proteínas tendrían una localización superficial en la cabeza e intracelular en la cola. No se descarta, sin embargo, que las mismas sean también intracelulares a nivel de la cabeza. Los otros patrones minoritarios observados para ambas proteínas sólo en espermatozoides permeabilizados podrían deberse a localizaciones internas alternativas presentes en algunas subpoblaciones de espermatozoides. Otra explicación para la existencia de los tres patrones de marcación observados en nuestros estudios podría ser que, previo a la fijación, un porcentaje de los espermatozoides estuviera muerto y, consecuentemente, las proteínas de membrana se relocalizaran como consecuencia de la muerte celular. Tal es el caso del marcador de raft GM1, un glicosfingolípido que muestra un patrón de localización dorsal en espermatozoides frescos y capacitados sin fijar ni permeabilizar (Selvaraj et al., 2007), y que exhibe otros patrones de marcación minoritarios, similares a los observados para las GLIPRs, cuando los ensayos de localización se realizan sobre espermatozoides fijados y permeabilizados entre los cuales se encontraban espermatozoides muertos por el proceso de fijación (Selvaraj et al., 2009).

Con el fin de evaluar qué tipo de unión mantenían estas proteínas con la superficie de los espermatozoides, se analizó el comportamiento de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en ensayos de extracción de proteínas. El tratamiento de los espermatozoides con fuerza iónica fue incapaz de liberar tanto a GLIPR1L1 como a GLIPR1L2 de la superficie de los espermatozoides, aún luego del empleo de 2M NaCl, indicando que la asociación a la membrana del espermatozoide no estaría mediada por interacciones iónicas. Estos resultados son consistentes con la presencia de las dos proteínas en “rafts” lipídicos

del espermatozoide (Sleight et al., 2005), dado que las proteínas presentes en dichos dominios se encuentran fuertemente unidas a las membranas ya sea a través de puentes disulfuro, uniones transmembrana, o anclaje a GPI. La abundancia de cisteínas en GLIPR1L1 y en GLIPR1L2 nos llevó a investigar, primeramente, la posibilidad de que las proteínas estuvieran asociadas covalentemente a un componente de la membrana del espermatozoide mediante puentes disulfuro. Si bien el tratamiento de los espermatozoides con DTT, agente que produce la ruptura de puentes disulfuro, produjo un corrimiento en la movilidad electroforética de ambas proteínas, el mismo fue incapaz de removerlas de los espermatozoides. De acuerdo a estas observaciones, el desplazamiento observado en el patrón electroforético de las proteínas tratadas con DTT podría atribuirse a la ruptura de puentes disulfuro intramoleculares y, por ende, a un cambio conformacional en ambas proteínas. Posteriores observaciones mostrando de que tanto GLIPR1L1 como GLIPR1L2 pueden ser completamente removidas por tratamiento con Tritón X-100, indicaron que las mismas se comportarían como proteínas integrales o fuertemente unidas a la membrana. Este resultado es consistente con la presencia de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en los “rafts” de membranas ya que el Tritón X-100 tiene la capacidad de extraer proteínas de estos dominios lipídicos (Asano et al., 2009). Considerando que varias de las proteínas presentes en “rafts” de espermatozoides se encuentran unidas a través de GPI (Yin et al., 2009; Netzel-Arnett et al., 2009; Sullivan et al., 2007), existía la posibilidad de que GLIPR1L1 y GLIPR1L2 se asociaran a la membrana mediante este tipo de unión. Las proteínas que se unen a la membrana a través de GPI se identifican mediante el uso de la enzima PI-PLC que escinde específicamente este tipo de unión. Los resultados indicaron que la enzima fue capaz de remover a GLIPR1L1 pero no así a GLIPR1L2 de los espermatozoides. Por otro lado, el análisis de las secuencias aminoacídicas correspondientes a GLIPR1L1 y GLIPR1L2 a través del software big-PI Predictor, indicó que GLIPR1L1 tendría un sitio altamente probable de modificación con GPI mientras que GLIPR1L2 presentaría dos sitios de unión a GPI de probabilidad media. De acuerdo a estas observaciones, GLIPR1L1 podría unirse a la membrana mediante uniones GPI, tal como es el caso de la proteína epididimaria denominada MAK248 que se asocia a espermatozoides de mono por un anclaje GPI (Yudin et al., 2002) y que fuera descrita como un homólogo de la proteína testicular GLIPR1L1 previamente identificada en el humano (GLIPR1-like 1, Nro. de Acceso NCBI: AAH14603). Por su parte, GLIPR1L2 y la proteína de glioma GLIPR1 son las únicas dos proteínas de toda la superfamilia CAP que poseen un dominio transmembrana (Gibbs et al., 2010) en su estructura terciaria que permitiría su anclaje a la membrana. Esta posibilidad está apoyada por los resultados obtenidos con los diferentes

tratamientos de extracción (NaCl, DTT y Tritón X-100). Si bien los estudios de asociación permiten sacar conclusiones sobre GLIPR1L1 y GLIPR1L2 localizadas en la superficie de la cabeza del espermatozoide (detectadas por IFI en células sin permeabilizar), existe la posibilidad de que ambas proteínas localizadas de manera intracelular estén asociadas a membrana. Esta posibilidad es también consistente con la presencia de las proteínas en los “rafts”, ya que estos dominios lipídicos se encuentran presentes tanto en la membrana plasmática como en las membranas internas de la cabeza y la cola del espermatozoide (Gadella et al., 2008).

El análisis de las secuencias aminoacídicas utilizando el software NetNGlyc 1.0 Server, reveló la presencia de posibles sitios de glicosidación en ambas proteínas. Por ese motivo, y con el fin de completar su caracterización, los espermatozoides fueron tratados con PNGasa F, enzima que deglicosila las proteínas cortando la unión entre la asparagina y la N-acetilglucosamina. Mientras que la banda correspondiente a GLIPR1L1 sufrió un corrimiento no muy pronunciado hacia pesos moleculares menores, la banda correspondiente a GLIPR1L2 presentó un peso molecular claramente inferior al observado en los controles sin tratar, consistente, en ambos casos, con la ocurrencia de un proceso de deglicosilación. La diferencia observada entre GLIPR1L1 y GLIPR1L2 podría deberse a que GLIPR1L2 presenta más residuos glicosídicos que GLIPR1L1, haciendo más evidente su deglicosidación.

Cabe destacar que durante el transcurso de esta Tesis, el grupo de la Dra. O'Bryan publicó un trabajo acerca de la presencia de GLIPR1L1 en el tracto reproductor masculino del ratón (Gibbs et al., 2010). En el mismo, los estudios realizados utilizando un anti-péptido contra GLIPR1L1 reflejaron la presencia de esta proteína en testículo y espermatozoides. Los autores hacen referencia a que la proteína tendría 4 isoformas (42, 37, 32 y 24 kDa), mientras que nosotros sólo detectamos una banda a la altura de 29 kDa. En ese sentido, es importante mencionar que el tamaño predicho bio-informáticamente para la proteína GLIPR1L1 es de 27 kDa, que no habría *splicing* alternativo en esta especie, y que la misma poseería un solo sitio de N-glicosilación. Teniendo en cuenta estas observaciones, creemos que la gran variedad de isoformas detectadas por el laboratorio de la Dra. O'Bryan podría deberse a que el anti-péptido utilizado tuviera una reacción cruzada con GLIPR1L2 u otras proteínas de la superfamilia. Al igual que en nuestro caso, en dicho trabajo demostraron la existencia de N-glicanos en GLIPR1L1 presente en el espermatozoide si bien, a diferencia de

nuestras observaciones, no detectaron la asociación de la proteína a la superficie del espermatozoide por uniones GPI. Apoyando nuestros resultados, muy recientemente fue descrita la presencia de GLIPR1L1 en el testículo y epidídimo del bovino (Caballero et al., 2012). En esta especie, la proteína se encontraría asociada al espermatozoide y a los epididimosomas y poseería tanto N-glicosilaciones como uniones GPI comprobadas por tratamientos con PNGasa F y PI-PLC, respectivamente. En ninguno de los dos trabajos mencionados se hace referencia alguna a GLIPR1L2 siendo, esta Tesis, hasta el momento, la única que identifica y describe las características de esta proteína.

Considerando que sólo aquellas proteínas que permanecen en el espermatozoide luego de la capacitación son capaces de interactuar con el ovocito durante la fertilización, estudiamos el destino de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en los espermatozoides luego de la capacitación y ocurrencia de la RA. Los resultados de Wb mostraron la permanencia de ambas proteínas en espermatozoides tanto capacitados como reaccionados, sugiriendo que las mismas podrían participar en el proceso de interacción de gametas. Si bien varias proteínas del espermatozoide sufren modificaciones post-traduccionales luego de la capacitación o RA (Wen et al., 1999; Chandrasekhar et al., 2011), la ausencia de diferencias en la movilidad electroforética de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 al comparar las poblaciones de espermatozoides capacitados y reaccionados con la población control (frescos), permitiría descartar la existencia de un procesamiento de estas proteínas como consecuencia de la ocurrencia de capacitación y/o RA.

Por otra parte, la permanencia de las proteínas luego de los procesos de capacitación y/o RA se vió apoyada por los estudios de IFI indicando la presencia de las mismas en la casi totalidad de los espermatozoides capacitados y reaccionados. Si bien existía la posibilidad de que alguna de las proteínas GLIPR1 se relocalizará como consecuencia de estos eventos biológicos, tal como fuera descrito para la proteína CRISP1 (Rochwerger et al., 1992; Cohen et al., 2000), los estudios de inmunolocalización en espermatozoides capacitados y reaccionados revelaron los mismos patrones antes descritos para espermatozoides frescos, sin observarse diferencias cuantitativas entre las tres poblaciones para ninguna de las dos proteínas y descartando una redistribución de las proteínas en función del grado de capacitación de los espermatozoides. En ese sentido, cabe mencionar que el grupo de la Dra O'Bryan

observó una relocalización de GLIPR1L1 desde la región posterior de la cabeza del espermatozoide al tip apical. Dado que estos estudios se hicieron utilizando el anti-péptido capaz de reconocer las 4 isoformas (Gibbs et al., 2010), es probable que dicha relocalización se deba, a la detección cruzada de otras isoformas. Por otra parte, si bien se ha reportado que GLIPR1L1 bovina se localiza en la región ecuatorial de la cabeza y en el cuello del espermatozoide (Caballero et al., 2012), al igual que fuera descrito para la proteína de mono MAK 248 (Yudin et al., 2002), ninguno de esos trabajos evalúa la existencia de una probable redistribución de las proteínas como consecuencia de la capacitación y/o RA.

Como se mencionara recientemente, si bien ninguna de estas proteínas fue descrita en el humano, la presencia de la secuencia nucleotídica de un homólogo a GLIPR1L1 registrada en el banco de datos del NCBI (GLIPR1-like 1, Nro. de Acceso NCBI: AAH14603) sugería la posible existencia de GLIPR1L1 y/o GLIPR1L2 en espermatozoides humanos. Esta posibilidad se evaluó por Wb utilizando anticuerpos comerciales contra cada una de las proteínas, detectándose la presencia de una banda de 26 kDa al utilizar anti-GLIPR1L1 y bandas de 28 kDa y 32 kDa con anti-GLIPR1L2 en espermatozoides frescos. Estas observaciones mostraron, por primera vez, la presencia de ambas proteínas en los espermatozoides humanos, sin mostrar reacción cruzada durante la utilización de ambos anticuerpos. La presencia de dos isoformas para GLIPR1L2 podría deberse a un procesamiento post-traducciona diferencial o a la generación de dos proteínas por splicing alternativo tal como se observa para la proteína GLIPR1 en las células de glioma humanos, la cual tiene, al menos, dos isoformas generadas por splicing alternativo (Xiang et al., 2007). Por otra parte, se observó la presencia de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en espermatozoide capacitados y reaccionados como así también la ausencia de diferencias en la movilidad electroforética de las mismas entre dichas poblaciones, lo cual permitiría descartar un procesamiento de estas proteínas durante los procesos de capacitación y RA. Por último, la permanencia de ambas proteínas en espermatozoides humanos capacitados y reaccionados sugeriría una posible participación de las GLIPR1s en la interacción de gametas humanas. Al respecto, cabe mencionar que estos estudios no pudieron ser realizados debido a las dificultades técnicas y bioéticas inherentes a la obtención del material humano necesario para tal fin.

La posible participación de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en el proceso de fertilización, fue evaluada en el sistema de ratón. Para ello, se empleó un esquema experimental en el cual las gametas se co-incubaron en presencia de las proteínas con la idea de que, en caso de existir sitios de unión para las proteínas en el ovocito, las mismas se unirían a dichos sitios inhibiendo competitivamente la interacción con el espermatozoide. Bajo estas condiciones, ninguna de las dos proteínas recombinantes logró reducir los niveles de fertilización. Ante estos resultados, se empleó un esquema experimental complementario en el cual se evaluó la capacidad de los anticuerpos contra ambas proteínas de afectar la interacción espermatozoide-ovocito. Los resultados revelaron que ambos anticuerpos fueron capaces de producir una disminución significativa del porcentaje de fertilización. La ausencia de efectos de los anticuerpos sobre otros parámetros espermáticos tales como motilidad, viabilidad y ocurrencia de la RA apoyó la idea de que tanto GLIPR1L1 como GLIPR1L2 se encontrarían involucradas, específicamente, en el proceso de interacción de gametas. Las diferencias observadas entre los ensayos utilizando proteínas o anticuerpos podrían deberse a que las proteínas participen en la interacción espermatozoide-ovocito mediante un mecanismo que no sea el de ligando-receptor. Sin embargo, la proteína Ciurabin de *Ciona intestinalis*, la cual tiene homología con las GLIPR1s, principalmente con GLIPR1L1, está unida a la cabeza del espermatozoide mediante un enlace GPI, y participa en la unión a la cubierta vitelina a través de un receptor específico CiVC57 (Yamaguchi et al., 2011). Otra posible explicación para la incapacidad de las proteínas recombinantes de inhibir el proceso de fertilización es que la incorrecta conformación de las mismas debido a la falta de glicosidación e inadecuada formación de puentes disulfuro, no permitiera su interacción con los sitios complementarios en el ovocito. Esta última posibilidad está apoyada por estudios previos de nuestro laboratorio mostrando que, a diferencia de CRISP1 nativa, recCRISP1 no se asocia a la ZP ni afecta la etapa de interacción de los espermatozoides con la misma cuando está presente durante la co-incubación (Busso et al., 2007). Si este fuera el caso para las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2, se podría considerar que la participación de las proteínas en el proceso de fertilización estaría mediado por un mecanismo en el cual la conformación de la proteína jugaría un importante rol.

Si bien se observó un menor número de ovocitos fertilizados en presencia de los anticuerpos, en ningún caso se detectaron espermatozoides en el espacio perivitelino, sugiriendo que los anticuerpos no estarían afectando la etapa de fusión de membranas. Dado que el estudio de la etapa de fusión de gametas debe realizarse

utilizando ovocitos sin ZP para poder evaluar la etapa específica de interacción de membranas, el siguiente paso consistió en estudiar el efecto de los anticuerpos sobre la fusión utilizando ovocitos sin ZP. Los resultados mostrando que ninguno de los anticuerpos logró disminuir el porcentaje de ovocitos fertilizados confirmaron que las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 no estarían participando en la etapa de fusión de gametas. Es importante mencionar que estudios de nuestro laboratorio indican que el sitio de unión de CRISP1 al oolema estaría circunscripto a una región de 12 aminoácidos en el dominio PR1, correspondiente a uno de las dos motivos consenso que caracterizan a la familia de proteínas CRISP, denominado “Signature 2” (S2) (Ellerman et al., 2006). Mientras CRISP2 tiene solo dos aminoácidos distintos respecto a CRISP1 y también participa en fusión, CRISP4 tiene cuatro aminoácidos diferentes y no participa en esta etapa. Consistente con los resultados de fusión, los S2 de GLIPR1L1 y GLIPR1L2 son diferentes a los de CRISP1 y CRISP2 en al menos cuatro aminoácidos.

Con el fin de identificar en qué paso de la interacción espermatozoide-ovocito participan ambas proteínas, se realizaron ensayos de unión a ZP en presencia de cada uno de los anticuerpos. Los resultados indicando que, bajo estas condiciones, se producía una reducción significativa del número de espermatozoides unidos al ovocito, apoyaron la participación de ambas proteínas en la primer etapa de unión de los espermatozoides a la ZP. Mientras los resultados observados para GLIPR1L1 se encuentran apoyados por observaciones publicadas durante el transcurso de esta Tesis tanto en ratón (Gibbs et al., 2010) como en bovino (Caballero et al., 2012), los resultados presentados sobre la participación de GLIPR1L2 en la interacción con la ZP son los únicos reportados hasta el momento. La participación de estas proteínas en la etapa de interacción con la ZP es consistente también con su localización en los “rafts” (Sleight et al., 2005) ya que se ha postulado que estos dominios lipídicos funcionarían como plataformas estables de proteínas importantes en la unión espermatozoide-ZP (Gadella y Evans, 2011).

Según se describiera en la introducción de esta tesis, existen varias moléculas del espermatozoide a las que se les ha otorgado una función en la etapa de interacción del espermatozoide con la ZP, por lo que se ha postulado que podría existir una redundancia funcional en las proteínas del espermatozoide, y que las mismas podrían actuar en forma conjunta para mantener al espermatozoide hiperactivado asociado a

la ZP (Reid et al., 2011). Más aún, recientes estudios sugieren que las distintas proteínas involucradas en la unión a ZP podrían ser parte de un complejo multimérico de reconocimiento a la zona (MZRC), el cual se formaría después de la capacitación mediante la reorganización de los “rafts” de membrana, favoreciendo la interacción entre el espermatozoide y la ZP (Reid et al., 2011). Asimismo, se ha sugerido que mientras las proteínas localizadas en la superficie del espermatozoide, tales como galactosyltransferasa (Shur & Hall, 1982), SED1 (Ensslin & Shur, 2003), CRISP1 (Busso et al., 2007) y CRISP4 (Turunen et al., 20012) participarían en la unión primaria a la ZP, las proteínas intra-acrosomales expuestas luego de la RA, tales como acrosina (Richardson et al., 1994; Crosby et al, 1998; Furlong et al, 2000; Howes et al, 2001b), SP56 (Cohen & Wassarman, 2001; Kim et al, 2001a) y zonadhesina (Lea et al, 2001), estarían involucradas en la unión secundaria del espermatozoide a la ZP. De acuerdo a este modelo, la presencia tanto de GLIPR1L1 como GLIPR1L2 en la superficie del espermatozoide indicada por la detección de la mismas por IFI en espermatozoides sin permeabilizar, sugiere que ambas podrían formar parte del conjunto de moléculas involucradas en la unión primaria a la ZP. No se descarta, sin embargo, como se sugiriera anteriormente, la posibilidad de que ambas proteínas se encuentren asociadas a membranas internas de la región dorsal y también participen en la unión secundaria a la ZP. Más allá de la posible participación de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en la unión primaria y/o secundaria a la ZP, quedaría por evaluar la función de la proteína localizada intracelularmente en la cola espermática.

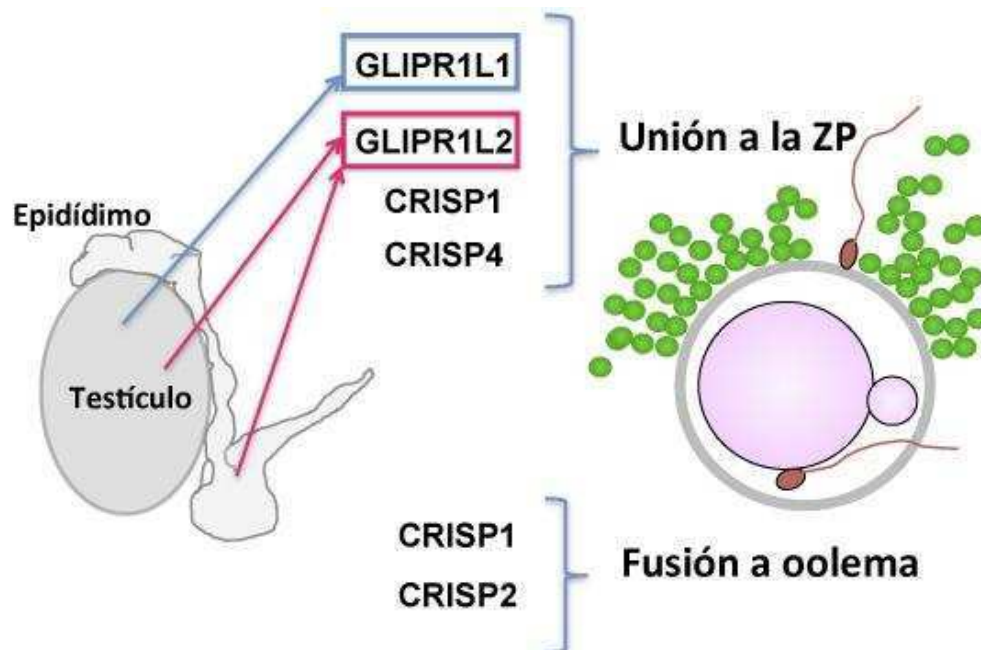
Como fuera mencionado en la introducción, las CRISP, al igual que las GLIPR1, forman parte de la superfamilia CAP, compartiendo un dominio en común denominado PR1. Este hecho apoya la idea de que la actividad de unión a ZP en proteínas de ambas familias reside el PR1, dominio en el cual también se ubica la región S2 involucrada en fusión. Sin embargo, mientras una porción discreta y lineal de las proteínas CRISP (S2) sería suficiente para su actividad en la etapa de fusión, la conformación de las proteínas CRISP parecería ser esencial para su participación en la interacción con la ZP (Busso et al., 2007b). En base a estas observaciones, es posible que la intervención de las GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en la unión de los espermatozoides a ZP también dependa de la conformación del dominio PR1.

El hecho de que proteínas de la misma familia como GLIPR1s y CRISP s posean la misma función parecería *a priori* llamativo. Sin embargo, tal como se mencionara

anteriormente, la redundancia funcional es un mecanismo descrito en el espermatozoide que involucra a familias de proteínas cuyos miembros, estructuralmente similares, pueden compensarse funcionalmente entre sí haciendo que el fenotipo producido por la falta de una proteína no se haga evidente. Apoyando esta posibilidad, estudios previos de nuestro grupo indican que los machos KO para CRISP1 presentan una fertilidad normal a pesar de que los espermatozoides exhiben una capacidad de unión a ZP y de fusión significativamente menor a los controles (Da Ros., et al 2008). Estos resultados sugieren que otra proteína CRISP, con alta homología con CRISP1 y con capacidad de unirse al ovocito, estaría cooperando con CRISP1 en las diferentes etapas de la fertilización. Mientras que la proteína testicular CRISP2 sería la candidata más probable a compensar funcionalmente la falta de CRISP1 en el animal KO durante la etapa de fusión, recientes resultados indicando que los espermatozoides KO para CRISP4 presentan una menor capacidad de unirse a la ZP (Turunen et al., 2012), sugieren que CRISP4 podría estar compensando la falta de CRISP1 durante la interacción del espermatozoide con la ZP. En ese sentido, nuestras observaciones indicando que GLIPR1L1 y GLIPR1L2 participan en la etapa de unión a ZP, abriría la posibilidad de que las proteínas CRISP y GLIPR1 cooperen entre sí como un mecanismo destinado a garantizar el éxito de la fertilización (**Esquema 2**). En base a ello, consideramos que la generación de animales KO para GLIPR1L1 y GLIPR1L2 brindará importante información acerca de la existencia de una posible redundancia entre las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 como así también entre las GLIPR1 y los miembros de la familia CRISP.

El hecho de que las GLIPR1 participen en la interacción con la ZP en el ratón y el bovino como así también en la interacción de espermatozoides con la cubierta vitelina en ascidias, indica que esta función estaría muy conservada a lo largo de la evolución, reforzando la posible participación de estas proteínas en el proceso de fertilización en el humano tal como fuera descrito para las proteínas CRISP1 (Cohen et al., 2001) y CRISP2 (Busso et al., 2005). En caso de confirmarse el rol de las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2 en el proceso de fertilización, sería de sumo interés evaluar si la falta de estas proteínas en el espermatozoide humano, su incorrecta localización, o la presencia de mutaciones en las mismas, se correlacionan con aquellos casos de infertilidad por causas desconocidas.

Finalmente, resulta importante mencionar que el desarrollo de un anticonceptivo basado en el bloqueo de la capacidad fertilizante de las gametas ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años, siendo una opción útil tanto para la anticoncepción en el hombre como en la mujer. Al respecto, evidencias de nuestro laboratorio indican que la inmunización de ratas con CRISP1 nativa o recombinante es capaz de producir anticuerpos específicos contra la proteína y de inhibir significativamente la fertilidad tanto en machos como en hembras (Cuasnicú et al, 1990; Perez Martinez et al, 1995; Ellerman et al., 2008). Se ha sugerido que la utilización de “cocktails” de moléculas espermáticas relevantes para la fertilización podría brindar resultados superiores a los de la inmunización con un solo antígeno (Frayne & Hall, 1999). En este sentido, la utilización de un cocktail conteniendo tanto a las proteínas CRISP como GLIPR1 podría ser una buena alternativa para aumentar la eficiencia del método inmuncontraceptivo ya que se generarían diferentes anticuerpos capaces de inhibir distintos eventos y etapas durante el proceso de fertilización (quimiotáxis, unión a ZP, fusión).



Esquema 2. Representación esquemática de la posible redundancia entre las proteínas CAP en las diferentes etapas de la fertilización.

Conclusiones

El presente trabajo se ha enfocado al estudio de la participación de las proteínas de las familias CRISP y GLIPR1 en el proceso de fertilización con el fin de ampliar los conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en este proceso. Para ello, se llevaron a cabo distintos ensayos utilizando los modelos de rata, ratón y humano, como así también de animales KO para CRISP1 desarrollados en nuestro laboratorio que, en conjunto generaron los resultados incluidos en el **esquema 3**.

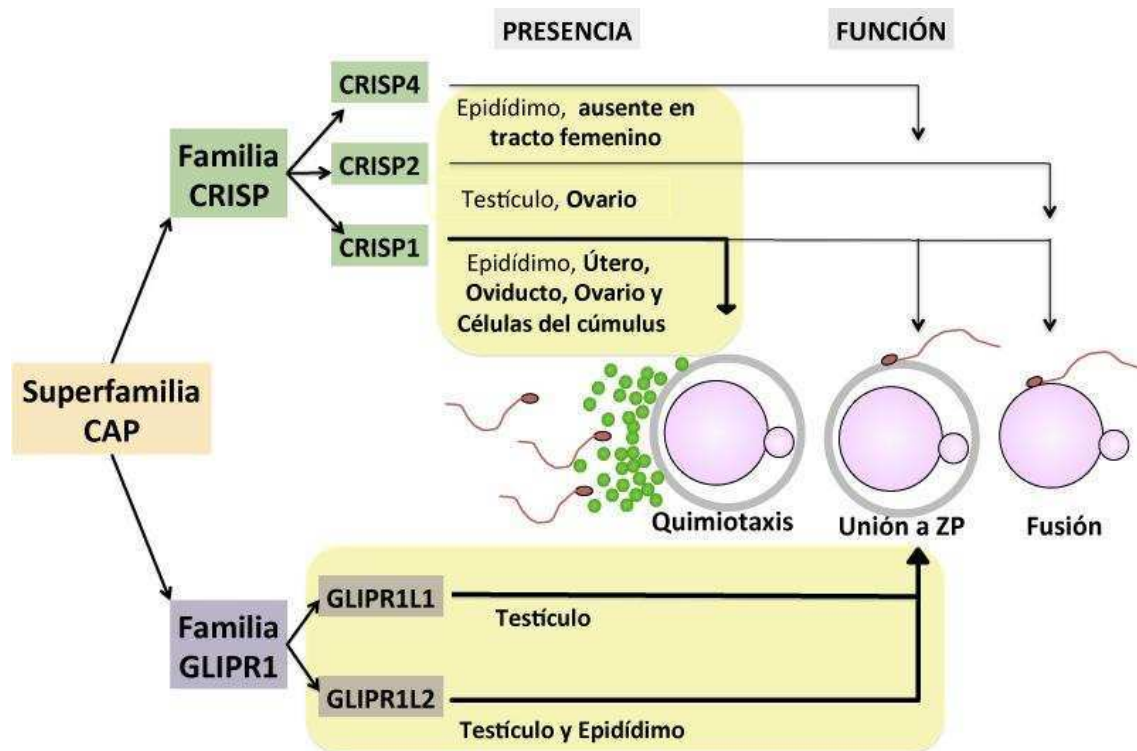
En el primer capítulo de esta Tesis se describe la presencia de la proteína CRISP1 en el útero, oviducto, ovario y células del cúmulus. Mientras la presencia de CRISP1 en los uterosomas y oviducto sugiere que la misma podría asociarse a los espermatozoides mientras transitan por el tracto femenino, la presencia de CRISP1 en las células del cúmulus apoya su posible participación en el proceso de fertilización. Esta última posibilidad fue confirmada por resultados indicando que la ausencia de la proteína en células del cúmulus KO para CRISP1, resulta en una significativa inhibición en el porcentaje de fertilización. Estudios posteriores revelaron que, además de su ya conocida participación en las etapas de unión a ZP y fusión, CRISP1 tendría una capacidad quimioattractante de espermatozoides, siendo ésta la primera descripción de una proteína de mamífero con dicha actividad.

El segundo capítulo de esta Tesis describe la identificación y caracterización de dos miembros de la familia GLIPR1: las proteínas GLIPR1L1 y GLIPR1L2. Nuestros resultados indican que mientras GLIPR1L1 es de origen testicular, GLIPR1L2 es de origen tanto testicular como epididimario. Además, ambas proteínas se encuentran presentes en los espermatozoides, asociadas fuertemente a la superficie de los mismos y participan en el proceso de fertilización, más específicamente en la etapa de unión de los espermatozoides a la ZP. Dada la homología entre las proteínas GLIPR1 y las proteínas CRISP, tanto a nivel de secuencia como de función, es posible que exista una redundancia funcional entre los miembros de estos dos grupos de proteínas CAP.

En conjunto, los resultados obtenidos en ambos capítulos indican que una misma proteína CAP podría participar en más de una etapa del proceso de fertilización tal como CRISP1 la cual participa en quimiotaxis, interacción con ZP y fusión, y que más de una proteína CAP participaría en la misma etapa de la interacción de gametas tal como ocurre con CRISP1, CRISP4, GLIPR1L1 y GLIPR1L2 que participan en la

interacción con la ZP, y con CRISP1 y CRISP2 involucradas en la etapa de fusión, con el fin de garantizar el éxito reproductivo.

Los resultados de esta Tesis contribuirían no sólo a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de gametas sino también al futuro desarrollo de nuevos métodos tanto de regulación de la fertilidad como de diagnóstico y tratamiento de la infertilidad humana.



Esquema 3. Representación esquemática de los resultados de esta Tesis. El esquema muestra la participación de proteínas de CAP en el proceso de fertilización. El conjunto de las evidencias experimentales aportadas por esta Tesis se encuentran resaltados en amarillo.

Bibliografía

Referencias

- Abbott,A.L., Fissore,R.A., and Ducibella,T. (1999). Incompetence of preovulatory mouse oocytes to undergo cortical granule exocytosis following induced calcium oscillations. *Dev. Biol.* *207*, 38-48.
- Adham,I.M., Nayernia,K., and Engel,W. (1997). Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* *46*, 370-376.
- Al Anzi,B. and Chandler,D.E. (1998). A sperm chemoattractant is released from *Xenopus* egg jelly during spawning. *Dev. Biol.* *198*, 366-375.
- Alfieri,J.A., Martin,A.D., Takeda,J., Kondoh,G., Myles,D.G., and Primakoff,P. (2003). Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout of GPI-anchored proteins. *J. Cell Sci.* *116*, 2149-2155.
- 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., and White,J.M. (1995). Mouse egg integrin $\alpha 6\beta 1$ functions as a sperm receptor. *Cell* *81*, 1095-1104.
- Amann,R.P., Hammerstedt,R.H., and Veeramachaneni,D.N.R. (1993). The epididymis and sperm maturation: A perspective. *Reprod. Fertil. Dev.* *5*, 361-381.
- Arcelay,E., Salicioni,A.M., Wertheimer,E., and Visconti,P.E. (2008). Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* *52*, 463-472.
- Arts,E.G.J.M., Kuiken,J., Jager,S., and Hoekstra,D. (1993). Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa- Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* *217*, 1001-1009.
- Asano,A., Selvaraj,V., Buttke,D.E., Nelson,J.L., Green,K.M., Evans,J.E., and Travis,A.J. (2009). Biochemical characterization of membrane fractions in murine sperm: identification of three distinct sub-types of membrane rafts. *J Cell Physiol* *218*, 537-548.
- Austin,C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res [B]* *4*, 581-596.
- Austin,C.R. (1952). The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* *170*, 326.
- Austin,C.R. (1961). The mammalian egg. C.C.Thomas, ed. Springfield III).
- Austin,C.R. (1985). Sperm maturation in the male and female genital tracts. In *Biology of Fertilization*, Vol.2, C.B.Metz and A.Monroy, eds. (New York: Academic Press), pp. 121-155.
- Austin,C.R. and Short F.R.S. (1972). *Germ Cells and Fertilization*. University Press, Cambridge).
- Baba,D., Kashiwabara,S., Honda,A., Yamagata,K., Wu,Q., Ikawa,M., Okabe,M., and 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*, 30310-30314.
- Baba,T., Azuma,S., Kashiwabara,S., and 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*, 31845-31849.
- Baibakov,B., Gauthier,L., Talbot,P., Rankin,T.L., and Dean,J. (2007). Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* *134*, 933-943.

- Baumber, J. and Meyers, S.A. (2006). Changes in membrane lipid order with capacitation in rhesus macaque (*Macaca mulatta*) spermatozoa. *J Androl* *27*, 578-587.
- Bedford, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* *2*, 128-158.
- Bedford, J.M. (1990). Sperm dynamics in the epididymis. In *Gamete physiology.*, R.H. Asch, J.P. Balmaceda, and I. Johnson, eds. (Serono Symposia, Norwell, MA, USA: pp. 53-68.
- Bedford, J.M. (2004). Enigmas of mammalian gamete form and function. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *79*, 429-460.
- Bedford, J.M. and Cooper, G.W. (1978). Membrane fusion events in fertilization of vertebrate eggs. In *Membrane surface reviews (Membrane fusion).*, G. Poste and G.L. Nicolson, eds. (Amsterdam: North-Holland), pp. 65-125.
- Bedford, J.M. and Kim, H.H. (1993). Cumulus oophorus as a sperm sequestering device, in vivo. *J. Exp. Zool.* *265*, 321-328.
- Berger, T., Turner, K.O., Meizel, S., and Hedrick, J.L. (1988). Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol. Reprod.* *40*, 525-530.
- Bigler, D., Takahashi, Y., Chen, M.S., Almeida, E.A., Osbourne, L., and White, J.M. (2000). Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. *J. Biol. Chem.* *2000*, Apr. *275*(16):11576-84. *275*, 11576-11584.
- Bjartell, A., Johansson, R., Bjork, T., Gadaleanu, V., Lundwall, A., Lilja, H., Kjeldsen, L., and Udby, L. (2006). Immunohistochemical detection of cysteine-rich secretory protein 3 in tissue and in serum from men with cancer or benign enlargement of the prostate gland. *Prostate* *66*, 591-603.
- Bjork, L. and Kronvall, G. (1984). Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol.* *133*, 969-974.
- Blackmore, P.F. (1993). Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca^{2+} influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell. Signal.* *5*, 531-538.
- Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1983). Sperm-egg interaction in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev. Biol.* *95*, 317-324.
- Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. (1990). Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *87*, 5563-5567.
- Bloom, S.E. (1984). Sister chromatid exchange studies in the chick embryo and neonate: actions of mutagens in a developing system. *Basic Life Sci.* *29 Pt B*, 509-533.
- Boatman, D.E. and Robbins, R.S. (1991). Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol. Reprod.* *44*, 806-813.
- Boerke, A., Brouwers, J.F., Olkkonen, V.M., van de Lest, C.H., Sostaric, E., Schoevers, E.J., Helms, J.B., and Gadella, B.M. (2012). Involvement of Bicarbonate-Induced Radical Signaling in Oxysterol Formation and Sterol Depletion of Capacitating Mammalian Sperm During In Vitro Fertilization. *Biol. Reprod.*
- Bork, P. and Sander, C. (1992). A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF- β . *FEBS. Lett.* *300*, 237-240.
- Buhi, W.C., Alvarez, I.M., and Kouba, A.J. (2000). Secreted proteins of the oviduct. *Cells Tissues. Organs* *166*, 165-179.

- Burnett,L.A., Anderson,D.M., Rawls,A., Bieber,A.L., and Chandler,D.E. (2011). Mouse sperm exhibit chemotaxis to allurin, a truncated member of the cysteine-rich secretory protein family. *Dev. Biol.* **360**, 318-328.
- Burnett,L.A., Washburn,C.A., Sugiyama,H., Xiang,X., Olson,J.H., Al Anzi,B., Bieber,A.L., and Chandler,D.E. (2012). Allurin, an amphibian sperm chemoattractant having implications for Mammalian sperm physiology. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **295**, 1-61.
- Busso,D., Cohen,D.J., Hayashi,M., Kasahara,M., and 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., Cohen,D.J., Maldera,J.A., Dematteis,A., and Cuasnicu,P.S. (2007a). A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: Involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol. Reprod.* **77**, 848-854.
- Busso,D., Goldweic,N.M., Hayashi,M., Kasahara,M., and Cuasnicu,P.S. (2007b). Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* **76**, 701-708.
- Bustos,M.A., Lucchesi,O., Ruete,M.C., Mayorga,L.S., and Tomes,C.N. (2012). Rab27 and Rab3 sequentially regulate human sperm dense-core granule exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**, E2057-E2066.
- Caballero,J., Frenette,G., D'Amours,O., Belleannee,C., Lacroix-Pepin,N., Robert,C., and Sullivan,R. (2012). Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. *J Cell Physiol* **227**, 3876-3886.
- Cameo,M.S. and Blaquier,J.A. (1976). Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. *J. Endocr.* **69**, 317-324.
- Chandrasekhar,A., Laloraya,M., and Kumar,P.G. (2011). Modulation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity through sequential posttranslational modifications of p22 phagocytic oxidase during capacitation and acrosome reaction in goat spermatozoa. *J Anim Sci.* **89**, 2995-3007.
- Chang,H. and Suarez,S.S. (2010). Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol. Reprod.* **83**, 507-513.
- Chang,M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. *Nature* **168**, 697-698.
- Chau,K.M. and Cornwall,G.A. (2011). Reduced fertility in vitro in mice lacking the cystatin CRES (cystatin-related epididymal spermatogenic): rescue by exposure of spermatozoa to dibutyryl cAMP and isobutylmethylxanthine. *Biol. Reprod.* **84**, 140-152.
- Chen,L., Russell,P.T., and Larsen,W.J. (1993). Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Mol. Reprod. Dev.* **34**, 87-93.
- Chen,M.S., Tung,K.S., Coonrod,S.A., Takahashi,Y., Bigler,D., Chang,A., Yamashita,Y., Kincade,P.W., Herr,J.C., and White,J.M. (1999). Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 11830-11835.
- Cherr,G.N., Lambert,H., Meizel,S., and 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**, 119-131.

- Cohen,D.J., Ellerman,D.A., Busso,D., Morgenfeld,M., Piazza,A., Hayashi,M., Young,E.T., Kasahara,M., and 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*, 1000-1005.
- Cohen,D.J., Ellerman,D.A., and Cuasnicú,P.S. (2000a). Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biol. Reprod.* *63*, 462-468.
- Cohen,D.J., Munuce,M.J., and 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*, 200-206.
- Cohen,D.J., Rochwerger,L., Ellerman,D.A., Morgenfeld,M., Busso,D., and 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*, 180-188.
- Cohen,N. and Wassarman,P.M. (2001). Association of egg zona pellucida glycoprotein mZP3 with sperm protein sp56 during fertilization in mice. *Int. J. Dev. Biol.* *45*, 569-576.
- Cohen DJ, Maldera JA, Vasen G, Ernesto JI, Muñoz MW, Battistone MA, Cuasnicú PS. (2011). Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process. *J Androl.* 2011 Nov-Dec;32(6):672-8. Epub 2011 Mar 25. Review.
- Cooper,T.G. (1986). *The epididymis, sperm maturation and fertilization.* (Berlin: Springer Verlag).
- Cooper,T.G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *J Reprod. Fertil. Suppl* *53*, 119-136.
- Cowan,A.E., Koppel,D.E., Vargas,L.A., and Hunnicutt,G.R. (2001). Guinea pig fertilin exhibits restricted lateral mobility in epididymal sperm and becomes freely diffusing during capacitation. *Dev. Biol.* *236*, 502-509.
- Crosby,J.A., Jones,R., Barros,C., and Carvallo,P. (1998). Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. *Mol. Reprod. Dev.* *49*, 426-434.
- Cross,N.L. (1998). Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* *59*, 7-11.
- Cross,N.L., Morales,P., Overstreet,J.W., and Hanson,F.W. (1988). Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida. *Biol. Reprod.* *38*, 235-244.
- Cross,N.L. and Razy-Faulkner,P. (1997). Control of human sperm intracellular pH by cholesterol and its relationship to the response of the acrosome to progesterone. *Biol. Reprod.* *56*, 1169-1174.
- Cuasnicú,P.S., Conesa,D., and Rochwerger,L. (1990). Potential contraceptive use of an epididymal protein that participates in fertilization. In *Gamete interaction. Prospects for immunocontraception.*, N.J.Alexander, D.Griffin, J.M.Spieler, and G.M.H.Waites, eds. (New York: Wiley-Liss), pp. 143-153.
- Cuasnicu,P.S., Ellerman,D.A., Cohen,D.J., Busso,D., Morgenfeld,M.M., and Da Ros,V.G. (2001). Molecular mechanisms involved in mammalian gamete fusion. *Arch. Med. Res.* *32*, 614-618.
- Cuasnicu,P.S., Gonzalez Echeverria,F., Piazza,A., and Blaquier,J.A. (1984). Antibody against epididymal glycoprotein blocks fertilizing ability in rats. *J. Reprod. Fertil.* *72*, 467-471.

- D'Amours,O., Frenette,G., Bordeleau,L.J., Allard,N., Leclerc,P., Blondin,P., and Sullivan,R. (2012). Epididymosomes Transfer Epididymal Sperm Binding Protein 1 (ELSPBP1) to Dead Spermatozoa During Epididymal Transit in Bovine. *Biol. Reprod.* 87, 94.
- Da Ros,V.G., Maldera,J.A., Willis,W.D., Cohen,D.J., Goulding,E.H., Gelman,D.M., Rubinstein,M., Eddy,E.M., and Cuasnicu,P.S. (2008). Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-Rich Secretory Protein 1 (CRISP1). *Dev. Biol.* 320, 12-18.
- Da Ros,V.G., Munuce,M.J., Cohen,D.J., Marin-Briggiler,C.I., Busso,D., Visconti,P.E., and Cuasnicu,P.S. (2004). Bicarbonate is required for migration of sperm epididymal protein DE (CRISP-1) to the equatorial segment and expression of rat sperm fusion ability. *Biol. Reprod.* 70, 1325-1332.
- Daleke,D.L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J. Lipid Res.* 44, 233-242.
- De Blas,G.A., Darszon,A., Ocampo,A.Y., Serrano,C.J., Castellano,L.E., Hernandez-Gonzalez,E.O., Chirinos,M., Larrea,F., Beltran,C., and Trevino,C.L. (2009). TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS. One.* 4, e6095.
- De Blas,G.A., Roggero,C.M., Tomes,C.N., and Mayorga,L.S. (2005). Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS. Biol.* 3, e323.
- de Mouzon,J., Lefevre,B., Frydman,R., Belaisch-Allart,J.C., Guillet-Rosso,F., and Testart,J. (1985). Factors affecting human in vitro fertilization: a multifactorial study. *Fertil. Steril.* 43, 892-896.
- Diaz-Munoz,M., de la Rosa,S.P., Juarez-Espinosa,A.B., Arellano,R.O., and Morales-Tlalpan,V. (2008). Granulosa cells express three inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms: cytoplasmic and nuclear Ca²⁺ mobilization. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 60.
- Ducibella,T. (1991). Mammalian egg cortical granules and cortical reaction. In *Elements of mammalian fertilization. Volume 1. Basic concepts.*, P.M.Wassarman, ed. (Boca Raton, Florida.: CRC Press), pp. 205-231.
- Ducibella,T. (1996). The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum. Reprod. Update.* 2, 29-42.
- Ducibella,T., Kurasawa,S., Duffy,P., Kopf,G.S., and 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, 1251-1257.
- Dun,M.D., Aitken,R.J., and Nixon,B. (2012). The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. *Hum. Reprod. Update.* 18, 420-435.
- Ebensperger,C. and Barros,C. (1984). Changes at the hamster oocyte surface from germinal vesicle stage to ovulation. *Gam. Res.* 9, 387-397.
- Eberspaecher,U., Roosterman,D., Krätzschmar,J., Haendler,B., Habenicht,U.F., Becker,A., Quensel,C., Petri,T., Schleuning,W.D., Donner,P., and Krätzschmar,J. (1995). Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): Isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form . *Mol. Reprod. Dev.* 42, 157-172.
- Eisenbach,M. (1999). Sperm chemotaxis. *Rev. Reprod.* 4, 56-66.
- Eisenbach,M. (2004). Towards understanding the molecular mechanism of sperm chemotaxis. *J Gen. Physiol* 124, 105-108.

- Ellerman,D.A., Brantua,V.S., Martinez,S.P., Cohen,D.J., Conesa,D., and Cuasnicu,P.S. (1998a). Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. *Biol. Reprod.* *59*, 1029-1036.
- Ellerman,D.A., Busso,D., Maldera,J.A., and Cuasnicu,P.S. (2008). Immunocontraceptive properties of recombinant sperm protein DE: implications for the development of novel contraceptives. *Fertil. Steril.* *89*, 199-205.
- Ellerman,D.A., Cohen,D.J., Da Ros,V.G., Morgenfeld,M.M., Busso,D., and Cuasnicu,P.S. (2006). Sperm protein "DE" mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. *Dev. Biol.* *297*, 228-237.
- Ellerman, D. A., Cohen, D. J., Werbahj, S., Dematteis, A., and Cuasnicu, P. S. Cloning and expression of epididymal protein DE, and biological activity of the recombinant protein. *Proc. of the 8th International Symposium on Spermatology* , 87. 1998b.
Ref Type: Abstract
- Ensslin,M., Vogel,T., Calvete,J.J., Thole,H.H., Schmidtke,J., Matsuda,T., and 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*, 1057-1064.
- Ensslin,M.A. and Shur,B.D. (2003). Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell* *114*, 405-417.
- Eppig,J.J. (1979). FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* *281*, 483-484.
- Evans,J.P. (1999). Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. *Front. Biosci.* *4*, D114-31.
- Fabro,G., Rovasio,R.A., Civalero,S., Frenkel,A., Caplan,S.R., Eisenbach,M., and Giojalas,L.C. (2002). Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. *Biol. Reprod.* *67*, 1565-1571.
- Fetterolf,P.M., Jurisicova,A., Tyson,J.E., and Casper,R.F. (1994). Conditioned medium from human cumulus oophorus cells stimulates human sperm velocity. *Biol. Reprod.* *51*, 184-192.
- Flesch,F.M., Brouwers,J.F., Nievelstein,P.F., Verkleij,A.J., van Golde,L.M., Colenbrander,B., and Gadella,B.M. (2001). Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. *J Cell Sci.* *114*, 3543-3555.
- Florman,H.M. and Ducibella,T. (2006). Fertilization in Mammals. In *Physiology of Reproduction*, J.D.Neill, ed. (New York: Academic Press), pp. 55-111.
- Florman,H.M. and First,N.L. (1988). The regulation of acrosomal exocytosis.I. Sperm capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona pellucida *in vitro*. *Dev. Biol.* *128*, 453-463.
- Florman,H.M. and Storey,B.T. (1982). Mouse gamete interactions. The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. *Dev. Biol.* *91*, 121-130.
- Fornes,M.W., Barbieri,A., Sosa,M.A., and Bertini,F. (1991). First observations on enzymatic activity and protein content of vesicles separated from rat epididymal fluid. *Andrologia* *23*, 347-351.
- Foster,J.A., Friday,B.B., Maulit,M.T., Blobel,C., Winfrey,V.P., Olson,G.E., Kim,K.S., and 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*, 12714-12722.

Foster, J.A. and Gerton, G.L. (1996). Autoantigen 1 of the guinea pig sperm acrosome is the homologue of mouse Tpx-1 and human TPX1 and is a member of the cysteine- rich secretory protein (CRISP) family. *Mol. Reprod. Dev.* *44*, 221-229.

Frandsen, T.P., Naested, H., Rasmussen, S.K., Hauptig, P., Wiberg, F.C., Rasmussen, L.K., Jensen, A.M., Persson, P., Wiken, M., Engstrom, A., Jiang, Y., Thorpe, S.J., Forberg, C., and Tolstrup, A.B. (2011). Consistent manufacturing and quality control of a highly complex recombinant polyclonal antibody product for human therapeutic use. *Biotechnol. Bioeng.* *108*, 2171-2181.

Fraser, L.R. (1998). Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.* *13 Suppl 1*, 9-19.

Fraser, L.R. and Drury, L.M. (1975). The relationship between sperm concentration and fertilization *in vitro* of mouse eggs. *Biol. Reprod.* *13*, 513-518.

Fraser, L.R., Harrison, R.A.P., and Herod, J.E. (1990). Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* *89*, 135-148.

Frayne, J. and Hall, L. (1999). The potential use of sperm antigens as targets for immunocontraception; past, present and future. *J. Reprod. Immunol.* *43*, 1-33.

Frenette, G., Legare, C., Saez, F., and Sullivan, R. (2005). Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol. Hum. Reprod.* *11*, 575-582.

Frenette, G., Lessard, C., and Sullivan, R. (2002). Selected proteins of "prostasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol. Reprod.* *67*, 308-313.

Frenette, G. and Sullivan, R. (2001). Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol. Reprod. Dev.* *59*, 115-121.

Furlong, L.I., Hellman, U., Krimer, A., Tezon, J.G., Charreau, E.H., and Vazquez-Levin, M.H. (2000). Expression of human proacrosin in *Escherichia coli* and binding to zona pellucida. *Biol. Reprod.* *62*, 606-615.

Gaddum-Rosse, P. (1985). Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs? *Am. J. Anat.* *174*, 347-356.

Gadella, B.M. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod. Sci.* *107*, 229-236.

Gadella, B.M. and Evans, J.P. (2011). Membrane fusions during mammalian fertilization. *Adv. Exp. Med. Biol.* *713*, 65-80.

Gadella, B.M. and 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*, 2407-2420.

Gadella, B.M. and 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*, 340-350.

Gadella, B.M., Miller, N.G., Colenbrander, B., van Golde, L.M., and 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*, 108-125.

- Gahlay,G., Gauthier,L., Baibakov,B., Epifano,O., and Dean,J. (2010). Gamete recognition in mice depends on the cleavage status of an egg's zona pellucida protein. *Science* *329*, 216-219.
- Gakamsky,A., Armon,L., and Eisenbach,M. (2009). Behavioral response of human spermatozoa to a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides. *Hum. Reprod.* *24*, 1152-1163.
- Gallon,C., Veyssiere,G., Berger,M., Jean-Faucher,C., De Turckheim,M., and Jean,C. (1989). Age-related changes in the concentration of cytosolic androgen receptors in the epididymis, vas deferens and seminal vesicle of maturing male mice. *J Androl* *10*, 188-194.
- Garberi,J.C., Fontana,J.D., and Blaquier,J.A. (1982). Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. *Int. J. Androl.* *5*, 619-626.
- Garberi,J.C., Kohane,A.C., Cameo,M.S., and Blaquier,J.A. (1979). Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* *13*, 73-82.
- Gibbs,G.M., Lo,J.C., Nixon,B., Jamsai,D., O'Connor,A.E., Rijal,S., Sanchez-Partida,L.G., Hearn,M.T., Bianco,D.M., and O'Bryan,M.K. (2010). Glioma pathogenesis-related 1-like 1 is testis enriched, dynamically modified, and redistributed during male germ cell maturation and has a potential role in sperm-oocyte binding. *Endocrinology* *151*, 2331-2342.
- Gibbs,G.M. and O'Bryan,M.K. (2007). Cysteine rich secretory proteins in reproduction and venom. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl* *65*, 261-267.
- Gibbs,G.M., Orta,G., Reddy,T., Koppers,A.J., Martinez-Lopez,P., Luis de la Vega-Beltran, Lo,J.C., Veldhuis,N., Jamsai,D., McIntyre,P., Darszon,A., and O'Bryan,M.K. (2011). Cysteine-rich secretory protein 4 is an inhibitor of transient receptor potential M8 with a role in establishing sperm function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 7034-7039.
- Gibbs,G.M., Roelants,K., and O'Bryan,M.K. (2008). The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. *Endocr. Rev.* *29*, 865-897.
- Gibbs,G.M., Scanlon,M.J., Swarbrick,J., Curtis,S., Gallant,E., Dulhunty,A.F., and 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*, 4156-4163.
- Giojalas,L.C. and Rovasio,R.A. (1998). Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. *Int. J Androl* *21*, 201-206.
- Gmachl,M. and Kreil,G. (1993). Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 3569-3573.
- Gmachl,M., Sagan,S., Ketter,S., and Kreil,G. (1993). The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett.* *336*, 545-548.
- Go,K.J. and Wolf,D.P. (1985). Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol. Reprod.* *32*, 145-153.
- Goudarzi,G., Sattari,M., Roudkenar,M.H., Montajabi-Niyat,M., Zavarán-Hosseini,A., and Mosavi-Hosseini,K. (2009). Cloning, expression, purification, and characterization of recombinant flagellin isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. Lett.* *31*, 1353-1360.
- Griffiths,G.S., Galileo,D.S., Reese,K., and Martin-Deleon,P.A. (2008a). Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol. Reprod. Dev.* *75*, 1627-1636.

- Griffiths,G.S., Miller,K.A., Galileo,D.S., and Martin-Deleon,P.A. (2008b). Murine SPAM1 is secreted by the estrous uterus and oviduct in a form that can bind to sperm during capacitation: acquisition enhances hyaluronic acid-binding ability and cumulus dispersal efficiency. *Reproduction*. *135*, 293-301.
- Guo,M., Teng,M., Niu,L., Liu,Q., Huang,Q., and Hao,Q. (2005). Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. *J. Biol. Chem.* *280*, 12405-12412.
- Haddad,A. and Nagai,E. (1977). Radioautographic study of glycoprotein biosynthesis and renewal in the ovarian follicles of mice and the origin of the zona pellucida. *Cell Tissue Res.* *177*, 347-369.
- Haendler,B., Kratzschmar,J., Theuring,F., and 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*, 192-198.
- Ham,K.N., Hurley,J.V., Lopata,A., and Ryan,G.B. (1970). A combined isotopic and electron microscopic study of the response of the rat uterus to exogenous oestradiol. *J Endocrinol.* *46*, 71-81.
- Hamann,H., Jude,R., Sieme,H., Mertens,U., Topfer-Petersen,E., Distl,O., and Leeb,T. (2007). A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Anim Genet.* *38*, 259-264.
- Hardy,D.M. and 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*, 26025-26028.
- Hardy,D.M., Huang,T.T.F., Driscoll,W.J., Tung,K.S.K., and Wild,G.C. (1988). Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* *38*, 423-437.
- Hatanaka,Y., Nagai,T., Tobita,T., and Nakano,M. (1992). Changes in the properties and composition of zona pellucida of pigs during fertilization *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* *95*, 431-440.
- Hayashi,M., Fujimoto,S., Takano,H., Ushiki,T., Abe,K., Ishikura,H., Yoshida,M., Kirchhoff,C., Ishibashi,T., and 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*, 367-374.
- He,Z.Y., Brakebusch,C., Fassler,R., Kreidberg,J.A., Primakoff,P., and 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*, 226-237.
- Hizaki,H., Segi,E., Sugimoto,Y., Hirose,M., Saji,T., Ushikubi,F., Matsuoka,T., Noda,Y., Tanaka,T., Yoshida,N., Narumiya,S., and Ichikawa,A. (1999). Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 10501-10506.
- Ho,K., Wolff,C.A., and Suarez,S.S. (2009). CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. *Reprod. Fertil. Dev.* *21*, 345-350.
- Honda,A., Siruntawineti,J., and Baba,T. (2002). Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum. Reprod. Update.* *8*, 405-412.
- Hoodbhoy,T. and Dean,J. (2004). Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* *127*, 417-422.

- Hoodbhoy,T. and Talbot,P. (1994). Mammalian cortical granules: Contents, fate, and function. *Mol. Reprod. Dev.* *39*, 439-448.
- Horvath,P.M., Kellom,T., Caulfield,J., and Boldt,J. (1993). Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Mol. Reprod. Dev.* *34*, 65-72.
- Hou,S.T., Mal,A., Jones,R., and Hall,L. (1996). Molecular cloning and characterization of rat sperm surface antigen 2B1, a glycoprotein implicated in sperm-zona binding. *Mol. Reprod. Dev.* *45*, 193-203.
- Howes,E., Pascall,J.C., Engel,W., and Jones,R. (2001b). Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J. Cell Sci.* *114*, 4127-4136.
- Howes,E., Pascall,J.C., Engel,W., and Jones,R. (2001a). Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. *J. Cell Sci.* *114*, 4127-4136.
- Huang,T.T.F. and Yanagimachi,R. (1985). Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. *Am. J. Anat.* *174*, 249-268.
- Hunter,R.H., Barwise,L., and King,R. (1982). Sperm transport, storage and release in the sheep oviduct in relation to the time of ovulation. *Br. Vet. J.* *138*, 225-232.
- Inoue,N., Ikawa,M., Isotani,A., and Okabe,M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* *434*, 234-238.
- Inoue,N., Satouh,Y., Ikawa,M., Okabe,M., and Yanagimachi,R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 20008-20011.
- Isobe,T., Minoura,H., Tanaka,K., Shibahara,T., Hayashi,N., and Toyoda,N. (2002). The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum. Reprod.* *17*, 1441-1446.
- Iwamatsu,T. and Chang,M.C. (1972). Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during maturation. *J. Reprod. Fertil.* *31*, 237-247.
- Jalkanen,J., Huhtaniemi,I., and 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*, 1268-1274.
- Jamsai,D., Bianco,D.M., Smith,S.J., Merriner,D.J., Ly-Huynh,J.D., Herlihy,A., Niranjana,B., Gibbs,G.M., and O'Bryan,M.K. (2008). Characterization of gametogenetin 1 (GGN1) and its potential role in male fertility through the interaction with the ion channel regulator, cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) in the sperm tail. *Reproduction.* *135*, 751-759.
- Jamsai,D., Rijal,S., Bianco,D.M., O'Connor,A.E., Merriner,D.J., Smith,S.J., Gibbs,G.M., and O'Bryan,M.K. (2010). A novel protein, sperm head and tail associated protein (SHTAP), interacts with cysteine-rich secretory protein 2 (CRISP2) during spermatogenesis in the mouse. *Biol. Cell* *102*, 93-106.
- Jegou,A., Ziyat,A., Barraud-Lange,V., Perez,E., Wolf,J.P., Pincet,F., and Gourier,C. (2011). CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 10946-10951.
- Jin,M., Fujiwara,E., Kakiuchi,Y., Okabe,M., Satouh,Y., Baba,S.A., Chiba,K., and Hirohashi,N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *108*, 4892-4896.

- Johnson,M.H., Eager,D., Muggleton-Harris,A., and Grave,H.M. (1975). Mosaicism in organisation of concanavalin A receptors on surface membranes of mouse eggs. *Nature* 257, 321-322.
- Jovine,L., Darie,C.C., Litscher,E.S., and Wassarman,P.M. (2005). Zona pellucida domain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 83-114.
- Jovine,L., Qi,H., Williams,Z., Litscher,E., and Wassarman,P.M. (2002). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat. Cell Biol.* 4, 457-461.
- Kaji,K., Oda,S., Shikano,T., Ohnuki,T., Uematsu,Y., Sakagami,J., Tada,N., Miyazaki,S., and Kudo,A. (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.* 24, 279-282.
- Kaplan,R. and Kraicer,P.F. (1978). Effect of elevated calcium concentration on fertilization of rat oocytes in vitro. *Gam. Res.* 1, 281-285.
- Kasahara,M., Gutknecht,J., Brew,K., Spurr,N., and Goodfellow,P.N. (1989). Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. *Genomics* 5, 527-534.
- Kaupp,U.B., Kashikar,N.D., and Weyand,I. (2008). Mechanisms of sperm chemotaxis. *Annu. Rev. Physiol* 70, 93-117.
- Kawano,N., Kang,W., Yamashita,M., Koga,Y., Yamazaki,T., Hata,T., Miyado,K., and Baba,T. (2010). Mice lacking two sperm serine proteases, ACR and PRSS21, are subfertile, but the mutant sperm are infertile in vitro. *Biol. Reprod.* 83, 359-369.
- Kim,E., Baba,D., Kimura,M., Yamashita,M., Kashiwabara,S., and 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, 18028-18033.
- Kim,E., Yamashita,M., Kimura,M., Honda,A., Kashiwabara,S., and Baba,T. (2008). Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int. J Dev. Biol.* 52, 677-682.
- Kim,E., Yamashita,M., Nakanishi,T., Park,K.E., Kimura,M., Kashiwabara,S., and Baba,T. (2006). Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* 281, 5634-5639.
- Kim,K.S., Cha,M.C., and Gerton,G.L. (2001a). Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol. Reprod.* 64, 36-43.
- Kim,K.S., Foster,J.A., and Gerton,G.L. (2001b). Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biol. Reprod.* 64, 148-156.
- Kim,K.S. and 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, 141-152.
- Kimura,H., Matsuda,J., Ogura,A., Asano,T., and Naiki,M. (1994). Affinity binding of hamster oviductin to spermatozoa and its influence on in vitro fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 39, 322-327.
- King,T.P. and Spangfort,M.D. (2000). Structure and biology of stinging insect venom allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123, 99-106.
- Kirchhoff,C. (1998). Molecular characterization of epidymal proteins. *Rev. Reprod.* 3, 86-95.
- Kirchhoff,C. and Hale,G. (1996). Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 2, 177-184.

- Ko, Y.J., Maeng, J.H., Lee, B.C., Lee, S., Hwang, S.Y., and Ahn, Y. (2012). Separation of progressive motile sperm from mouse semen using on-chip chemotaxis. *Anal. Sci.* **28**, 27-32.
- Kohane, A.C., Cameo, M.S., Piñeiro, L., Garberi, J.C., and Blaquier, J.A. (1980a). Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. *Biol. Reprod.* **23**, 181-187.
- Kohane, A.C., Gonzalez Echeverria, F., Piñeiro, L., and Blaquier, J.A. (1980b). Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. *Biol. Reprod.* **23**, 737-742.
- Kohane, A.C., Piñeiro, L., and Blaquier, J.A. (1983). Androgen-controlled synthesis of specific protein in the rat epididymis. *Endocrinology* **112**, 1590-1596.
- Kopf, G.S., Ning, X.P., Visconti, P., Purdon, M.A., Galantino-Homer, H.L., and Fornes, M. (2002). Signaling Mechanisms Controlling Mammalian Sperm Fertilization Competence and Activation. In *The Male Gamete: From Basic Science to Clinical Applications.*, C.Gagnon, ed. (Vienna, USA.: Cache River Press.), pp. 105-118.
- Kota, V., Rai, P., Weitzel, J.M., Middendorff, R., Bhande, S.S., and Shivaji, S. (2010). Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 773-783.
- Krapf, D., Ruan, Y.C., Wertheimer, E.V., Battistone, M.A., Pawlak, J.B., Sanjay, A., Pilder, S.H., Cuasnicu, P., Breton, S., and Visconti, P.E. (2012). cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Dev. Biol.* **369**, 43-53.
- Kratzschmar, J., Haendler, B., Eberspaecher, U., Roosterman, D., Donner, P., and 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**, 827-836.
- Krutsikh, A., Poliandri, A., Cabrera-Sharp, V., Dacheux, J.L., Poutanen, M., and Huhtaniemi, I. (2012). Epididymal protein Rnase10 is required for post-testicular sperm maturation and male fertility. *FASEB J* **26**, 4198-4209.
- Kurokawa, M., Sato, K., and Fissore, R.A. (2004). Mammalian fertilization: from sperm factor to phospholipase C ζ . *Biol. Cell* **96**, 37-45.
- Larsen, W.J., Wert, S., and Brunner, G. (1986). A dramatic loss of cumulus cells gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev. Biol.* **113**, 517-521.
- Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* **287**, 319-321.
- Lea, I.A., Sivashanmugam, P., and O'Rand, M.G. (2001). Zonadhesin: characterization, localization, and zona pellucida binding. *Biol. Reprod.* **65**, 1691-1700.
- Lefievre, L., Conner, S.J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I.A., Monk, M., Hughes, D.C., and Barratt, C.L. (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.* **19**, 1580-1586.
- Legare, C., Berube, B., Boue, F., Lefievre, L., Morales, C.R., El-Alfy, M., and Sullivan, R. (1999). Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol. Reprod. Dev.* **52**, 225-233.
- Leyton, L. and Saling, P. (1989). Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* **108**, 2163-2168.
- Li, M.W., Cherr, G.N., Yudin, A.I., and Overstreet, J.W. (1997). Biochemical characterization of the PH-20 protein on the plasma membrane and inner acrosomal membrane of cynomolgus macaque spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **48**, 356-366.

- Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W.F., Myles, D.G., and 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*, 1157-1163.
- Lishko, P.V., Botchkina, I.L., and Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* *471*, 387-391.
- Liu, D.Y. and Baker, H.W. (2000). Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* *15*, 702-708.
- Liu, D.Y. and Baker, H.W. (2003). Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertil. Steril.* *79*, 74-80.
- Lopez, L.C. and Shur, B.D. (1987). Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. *J. Cell Biol.* *105*, 1663-1670.
- Lu, Q.X. and Shur, B.D. (1997). Sperm from β 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. *Development* *124*, 4121-4131.
- Maeda, T., Sakashita, M., Ohba, Y., and Nakanishi, Y. (1998). Molecular cloning of the rat Tpx-1 responsible for the interaction between spermatogenic and Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *248*, 140-146.
- Maekawa, A. (1990). Pathology of tumours in laboratory animals. Tumours of the rat. Tumours of the ovary. *IARC Sci. Publ.* 473-497.
- Maldera, J.A., Vasen, G., Ernesto, J.I., Weigel-Munoz, M., Cohen, D.J., and Cuasnicu, P.S. (2011). Evidence for the Involvement of Zinc in the Association of CRISP1 with Sperm During Epididymal Maturation in Rats. *Biol. Reprod.*
- Martinez-Lopez, P., Trevino, C.L., De La Vega-Beltran JL, De Blas, G., Monroy, E., Beltran, C., Orta, G., Gibbs, G.M., O'Bryan, M.K., and Darszon, A. (2011). TRPM8 in mouse sperm detects temperature changes and may influence the acrosome reaction. *J Cell Physiol* *226*, 1620-1631.
- Mashiach, R., Tadir, Y., Fisch, B., Ovadia, J., Eltes, F., and Bartoov, B. (1992). The relationship between sperm ultrastructural features and fertilizing capacity in vitro. *Fertil. Steril.* *57*, 1052-1057.
- McGee, E.A. and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* *21*, 200-214.
- Mckinney, T.D. and Desjardins, C. (1973). Postnatal development of the testis, fighting behavior, and fertility in house mice. *Biol. Reprod.* *9*, 279-294.
- McLay, D.W. and Clarke, H.J. (1997). The ability to organize sperm DNA into functional chromatin is acquired during meiotic maturation in murine oocytes. *Dev. Biol.* *186*, 73-84.
- Mehlmann, L.M. and Kline, D. (1994). Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: Calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biol. Reprod.* *51*, 1088-1098.
- Mendez, J. and Stillman, B. (2000). Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol. Cell Biol.* *20*, 8602-8612.
- Mierendorf, R.C., Morris, B.B., Hammer, B., and Novy, R.E. (1998). Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System. *Methods Mol. Med.* *13*, 257-292.

- Miller,B.J., Georges-Labouesse,E., Primakoff,P., and Myles,D.G. (2000). Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin alpha6beta1 and is CD9-dependent. *J. Cell Biol.* *149*, 1289-1296.
- Milne,T.J., Abbenante,G., Tyndall,J.D., Halliday,J., and 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*, 31105-31110.
- Miyado,K., Yamada,G., Yamada,S., Hasuwa,H., Nakamura,Y., Ryu,F., Suzuki,K., Kosai,K., Inoue,K., Ogura,A., Okabe,M., and Mekada,E. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* *287*, 321-324.
- Miyado,K., Yoshida,K., Yamagata,K., Sakakibara,K., Okabe,M., Wang,X., Miyamoto,K., Akutsu,H., Kondo,T., Takahashi,Y., Ban,T., Ito,C., Toshimori,K., Nakamura,A., Ito,M., Miyado,M., Mekada,E., and Umezawa,A. (2008). The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 12921-12926.
- Mizuki,N. and Kasahara,M. (1992). Mouse submandibular glands express an androgen-regulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. *Mol. Cell. Endocrinol.* *89*, 25-32.
- Morrisette,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., and Possani,L.D. (1995). Primary structure and properties of helothermine, a peptide that blocks ryanodine receptors. *Biophys. J.* *68*, 2280-2288.
- Muller,K., Labbe,C., and Zachowski,A. (1994). Phospholipid transverse asymmetry in trout spermatozoa plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* *1192*, 21-26.
- Murphy,E.V., Zhang,Y., Zhu,W., and Biggs,J. (1995). The human glioma pathogenesis-related protein is structurally related to plant pathogenesis-related proteins and its gene is expressed specifically in brain tumors. *Gene* *159*, 131-135.
- Myles,D.G. and 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*, 320-327.
- Nass,S.J. and Strauss,J.F., III (2004). Research on contraceptives. *Science* *303*, 1769-1771.
- Netzel-Arnett,S., Bugge,T.H., Hess,R.A., Carnes,K., Stringer,B.W., Scarman,A.L., Hooper,J.D., Tonks,I.D., Kay,G.F., and Antalis,T.M. (2009). The glycosylphosphatidylinositol-anchored serine protease PRSS21 (testisin) imparts murine epididymal sperm cell maturation and fertilizing ability. *Biol. Reprod.* *81*, 921-932.
- Niwa,K. and Chang,M.C. (1975). Fertilization of rat eggs in vitro at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fertil.* *43*, 435-451.
- Nixon,B., Aitken,R.J., and McLaughlin,E.A. (2007). New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cell Mol. Life Sci.* *64*, 1805-1823.
- Nolan,M.A., Wu,L., Bang,H.J., Jelinsky,S.A., Roberts,K.P., Turner,T.T., Kopf,G.S., and 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*, 984-991.
- O'Bryan,M.K., Sebire,K., Meinhardt,A., Edgar,K., Keah,H., Hearn,M.T., and De Kretser,D.M. (2001). Tpx-1 is a component of the outer dense fibers and acosome of rat spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* *58*, 116-125.

- O'Rand, M.G. and Fisher, S.J. (1987). Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zona. *Dev. Biol.* *119*, 551-559.
- O'Rand, M.G., Welch, J.E., and Fisher, S.J. (1986). Sperm membrane and zona pellucida interactions during fertilization. In *Molecular and cellular aspects of reproduction.*, D.S. Dhinsa and O.P. Bahl, eds. (New York: Plenum Press), pp. 131-144.
- Oehninger, S., Blackmore, P., Morshedi, M., Sueldo, C., Acosta, A.A., and Alexander, N.J. (1994). Defective calcium influx and acrosome reaction (spontaneous and progesterone-induced) in spermatozoa of infertile men with severe teratozoospermia. *Fertil. Steril.* *61*, 349-354.
- Oliphant, G., Reynolds, A.B., and Thomas, T.S. (1985). Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.* *174*, 269-283.
- Oliveira, R.G., Tomasi, L., Rovasio, R.A., and Giojalas, L.C. (1999). Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. *J. Reprod. Fertil.* *115*, 23-27.
- Olson, J.H., Xiang, X., Ziegert, T., Kittelson, A., Rawls, A., Bieber, A.L., and 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*, 11205-11210.
- Orgebin-Crist, M.C. and Fournier-Delpech, S. (1982). Sperm-egg interaction. Evidence for maturational changes during epididymal transit. *J. Androl.* *3*, 429-433.
- Osheroff, J.E., Visconti, P.E., Valenzuela, J.P., Travis, A.J., Alvarez, J., and 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*, 1017-1026.
- Overstreet, J.W., Lin, Y., Yudin, A.I., Meyers, S.A., Primakoff, P., Myles, D.G., Katz, D.F., and Vandevort, C.A. (1995). Location of the PH-20 protein on acrosome-intact and acrosome-reacted spermatozoa of cynomolgus macaques. *Biol. Reprod.* *52*, 105-114.
- Parinaud, J., Labal, B., and Vieitez, G. (1992). High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. *Fertil. Steril.* *58*, 599-602.
- Perez Martinez, S., Conesa, D., and 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.
- Perreault, S.D., Naish, S.J., and Zirkin, B.R. (1987). The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biol. Reprod.* *36*, 239-244.
- Primakoff, P., Hyatt, H., and 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*, 2239-2244.
- Rankin, T., Familiar, M., Lee, E., Ginsberg, A., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Drago, J., Westphal, H., and Dean, J. (1996). Mice homozygous for an insertional mutation in the *Zp3* gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* *122*, 2903-2910.
- Rankin, T., Talbot, P., Lee, E., and Dean, J. (1999). Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. *Development* *126*, 3847-3855.
- Rankin, T.L., Coleman, J.S., Epifano, O., Hoodbhoy, T., Turner, S.G., Castle, P.E., Lee, E., Gore-Langton, R., and Dean, J. (2003). Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. *Dev. Cell* *5*, 33-43.

- Rankin,T.L., O'Brien,M., Lee,E., Wigglesworth,K., Eppig,J., and Dean,J. (2001). Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* *128*, 1119-1126.
- Reddy,T., Gibbs,G.M., Merriner,D.J., Kerr,J.B., and O'Bryan,M.K. (2008). Cysteine-rich secretory proteins are not exclusively expressed in the male reproductive tract. *Dev. Dyn.* *237*, 3313-3323.
- Reid,A.T., Lord,T., Stanger,S.J., Roman,S.D., McCluskey,A., Robinson,P.J., Aitken,R.J., and Nixon,B. (2012). Dynamin regulates specific membrane fusion events necessary for acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *J Biol. Chem.* *287*, 37659-37672.
- Reid,A.T., Redgrove,K., Aitken,R.J., and Nixon,B. (2011). Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J Androl* *13*, 88-96.
- Ren,C., Li,L., Goltsov,A.A., Timme,T.L., Tahir,S.A., Wang,J., Garza,L., Chinault,A.C., and Thompson,T.C. (2002). mRTVP-1, a novel p53 target gene with proapoptotic activities. *Mol. Cell Biol.* *22*, 3345-3357.
- Ren,C., Li,L., Yang,G., Timme,T.L., Goltsov,A., Ren,C., Ji,X., Addai,J., Luo,H., Ittmann,M.M., and Thompson,T.C. (2004). RTVP-1, a tumor suppressor inactivated by methylation in prostate cancer. *Cancer Res.* *64*, 969-976.
- Ren,C., Ren,C.H., Li,L., Goltsov,A.A., and Thompson,T.C. (2006). Identification and characterization of RTVP1/GLIPR1-like genes, a novel p53 target gene cluster. *Genomics* *88*, 163-172.
- Rich,T., Chen,P., Furman,F., Huynh,N., and Israel,M.A. (1996). RTVP-1, a novel human gene with sequence similarity to genes of diverse species, is expressed in tumor cell lines of glial but not neuronal origin. *Gene* *180*, 125-130.
- Richardson,R.T., Yamasaki,N., and O'Rand,M.G. (1994). Sequence of a rabbit sperm zona pellucida binding protein and localization during the acrosome reaction. *Dev. Biol.* *165*, 688-701.
- Roberts,K.P., Johnston,D.S., Nolan,M.A., Wooters,J.L., Waxmonsky,N.C., Piehl,L.B., Ensrud-Bowlin,K.M., and Hamilton,D.W. (2007). Structure and function of epididymal protein cysteine-rich secretory protein-1. *Asian J. Androl* *9*, 508-514.
- Roblero,L.S., Guadarrama,A., Ortiz,M.E., Fernandez,E., and Zegers-Hochschild,F. (1990). High potassium concentration and the cumulus corona oocyte complex stimulate the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* *54*, 328-332.
- Rochwerger,L., Cohen,D.J., and 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.
- Rochwerger,L. and Cuasnicu,P.S. (1992). Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vivo and in vitro capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* *31*, 34-41.
- Roldan,E.R.S., Murase,T., and Shi,Q.X. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science.* *266*, 1578-1581.
- Rosenzweig,T., Ziv-Av,A., Xiang,C., Lu,W., Cazacu,S., Taler,D., Miller,C.G., Reich,R., Shoshan,Y., Anikster,Y., Kazimirsky,G., Sarid,R., and Brodie,C. (2006). Related to testes-specific, vespid, and pathogenesis protein-1 (RTVP-1) is overexpressed in gliomas and regulates the growth, survival, and invasion of glioma cells. *Cancer Res.* *66*, 4139-4148.
- Rudolph,R. and Lilie,H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* *10*, 49-56.

- Schambony,A., Gentzel,M., Wolfes,H., Raida,M., Neumann,U., and Topfer-Petersen,E. (1998a). Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim. Biophys. Acta* 1387, 206-216.
- Schambony,A., Hefele,J.A., Gentzel,M., Wilm,M., and 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, 937-948.
- Schambony,A., Hess,O., Gentzel,M., and Topfer-Petersen,E. (1998b). Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 53, 67-72.
- Schroer,S.C., Yudin,A.I., Myles,D.G., and Overstreet,J.W. (2000). Acrosomal status and motility of guinea pig spermatozoa during in vitro penetration of the cumulus oophorus. *Zygote*. 8, 107-117.
- Selvaraj,V., Asano,A., Buttke,D.E., Sengupta,P., Weiss,R.S., and Travis,A.J. (2009). Mechanisms underlying the micron-scale segregation of sterols and GM1 in live mammalian sperm. *J Cell Physiol* 218, 522-536.
- Selvaraj,V., Buttke,D.E., Asano,A., McElwee,J.L., Wolff,C.A., Nelson,J.L., Klaus,A.V., Hunnicutt,G.R., and Travis,A.J. (2007). GM1 dynamics as a marker for membrane changes associated with the process of capacitation in murine and bovine spermatozoa. *J Androl* 28, 588-599.
- Sengupta,S. and Wasyluk,B. (2001). Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev.* 15, 2367-2380.
- Setchell,B. (1982). Spermatogenesis and spermatozoa. In *Reproduction in mammals.*, C.R.Austin and R.V.Short, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 63-101.
- Shabanowitz,R.B. and O'Rand,M.G. (1988). Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. *J. Reprod. Fertil.* 82, 151-161.
- Shalgi,R. and Phillips,D.M. (1980). Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. *J. Ultrastruct. Res.* 71, 154-161.
- Shur,B.D. and Hall,N.G. (1982). A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. *J. Cell Biol.* 95, 574-579.
- Simons,K. and Toomre,D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31-39.
- Sleight,S.B., Miranda,P.V., Plaskett,N.W., Maier,B., Lysiak,J., Scoble,H., Herr,J.C., and Visconti,P.E. (2005). Isolation and Proteomic Analysis of Mouse Sperm Detergent-Resistant Membrane Fractions. Evidence for Dissociation of Lipid Rafts During Capacitation. *Biol. Reprod.*
- 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., and 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, 223-226.
- Sosnik,J., Miranda,P.V., Spiridonov,N.A., Yoon,S.Y., Fissore,R.A., Johnson,G.R., and Visconti,P.E. (2009). Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci.* 122, 2741-2749.
- Spehr,M., Gisselmann,G., Poplawski,A., Riffell,J.A., Wetzel,C.H., Zimmer,R.K., and Hatt,H. (2003). Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 299, 2054-2058.

- Spehr,M., Schwane,K., Riffell,J.A., Barbour,J., Zimmer,R.K., Neuhaus,E.M., and Hatt,H. (2004). Particulate adenylate cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis. *J Biol. Chem.* *279*, 40194-40203.
- Stephoe,P.C. and Edwards,R.G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* *2*, 366.
- Stewart-Savage,J. and Bavister,B.D. (1988). A cell surface block to polyspermy occurs in the golden hamster eggs. *Dev. Biol.* *128*, 150-157.
- Storey,B.T. (1991). Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Ann. NY. Acad. Sci.* *637*, 459-473.
- Strunker,T., Goodwin,N., Brenker,C., Kashikar,N.D., Weyand,I., Seifert,R., and Kaupp,U.B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* *471*, 382-386.
- Suarez,S.S. (1996). Hyperactivated motility in sperm. *J. Androl.* *17*, 331-335.
- Sugiyama,H., Burnett,L., Xiang,X., Olson,J., Willis,S., Miao,A., Akema,T., Bieber,A.L., and Chandler,D.E. (2009). Purification and multimer formation of allurin, a sperm chemoattractant from *Xenopus laevis* egg jelly. *Mol. Reprod. Dev.* *76*, 527-536.
- Sullivan,R., Frenette,G., and Girouard,J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* *9*, 483-491.
- Suzuki,N., Yamazaki,Y., Brown,R.L., Fujimoto,Z., Morita,T., and Mizuno,H. (2008). Structures of pseudochetoxin and pseudecin, two snake-venom cysteine-rich secretory proteins that target cyclic nucleotide-gated ion channels: implications for movement of the C-terminal cysteine-rich domain. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* *64*, 1034-1042.
- Tachibana,I. and 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.
- Talbot,P., Shur,B.D., and Myles,D.G. (2003). Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interactions, and sperm-egg fusion. *Biol. Reprod.* *68*, 1-9.
- Tam,M., Lin,P., Hu,P., and Lennon,P.A. (2010). Examining Hedgehog pathway genes GLI3, SHH, and PTCH1 and the p53 target GLIPR1/GLIPR1L1/GLIPR1L2 gene cluster using fluorescence in situ hybridization uncovers GLIPR1/GLIPR1L1/GLIPR1L2 deletion in 9% of patients with multiple myeloma. *J Assoc. Genet. Technol.* *36*, 111-114.
- Tamba,S., Yodoi,R., Segi-Nishida,E., Ichikawa,A., Narumiya,S., and Sugimoto,Y. (2008). Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 14539-14544.
- Tanaka,K., Fujimura-Kamada,K., and Yamamoto,T. (2011). Functions of phospholipid flippases. *J Biochem.* *149*, 131-143.
- Tanghe,S., Van Soom,A., Nauwynck,H., Coryn,M., and de Kruif,A. (2002). Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* *61*, 414-424.
- Tardif,S. and Cormier,N. (2011). Role of zonadhesin during sperm-egg interaction: a species-specific acrosomal molecule with multiple functions. *Mol. Hum. Reprod.* *17*, 661-668.
- Teijeiro,J.M., Dapino,D.G., and Marini,P.E. (2011). Porcine oviduct sperm binding glycoprotein and its deleterious effect on sperm: a mechanism for negative selection of sperm? *Biol. Res.* *44*, 329-337.

- Teves,M.E., Barbano,F., Guidobaldi,H.A., Sanchez,R., Miska,W., and Giojalas,L.C. (2006). Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. *Fertil. Steril.* *86*, 745-749.
- Thibault,C. (1991). Production of fertilizable oocytes. Introduction. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy.)* *75*, 105-108.
- Thimon,V., Frenette,G., Saez,F., Thabet,M., and Sullivan,R. (2008). Protein composition of human epididymosomes collected during surgical vasectomy reversal: a proteomic and genomic approach. *Hum. Reprod.* *23*, 1698-1707.
- Topfer-Petersen,E., Ekhlasi-Hundrieser,M., Tsoлова,M., Leeb,T., Kirchhoff,C., and Muller,P. (2005). Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia* *37*, 202-204.
- Travis,A.J. and Kopf,G.S. (2002). The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J Clin. Invest* *110*, 731-736.
- Travis,A.J., Merdiushev,T., Vargas,L.A., Jones,B.H., Purdon,M.A., Nipper,R.W., Galatioto,J., Moss,S.B., Hunnicutt,G.R., and Kopf,G.S. (2001). Expression and localization of caveolin-1, and the presence of membrane rafts, in mouse and Guinea pig spermatozoa. *Dev. Biol.* *240*, 599-610.
- Tsunoda,S., Kawano,N., Miyado,K., Kimura,N., and Fujii,J. (2012). Impaired Fertilizing Ability of Sod1-Deficient Mouse Sperm During In Vitro Fertilization. *Biol. Reprod.*
- Tsunoda,Y., Sakai,N., Kikuchi,K., Katoh,S., Akagi,K., Miura-Ohnuma,J., Tashiro,Y., Murata,K., Shibuya,N., and Katoh,E. (2005). Improving expression and solubility of rice proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* *42*, 268-277.
- Turunen,H.T., Sipila,P., Krutskikh,A., Toivanen,J., Mankonen,H., Hamalainen,V., Bjorkgren,I., Huhtaniemi,I., and Poutanen,M. (2012). Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. *Biol. Reprod.* *86*, 1-8.
- Udby,L., Bjartell,A., Malm,J., Egesten,A., Lundwall,A., Cowland,J.B., Borregaard,N., and Kjeldsen,L. (2005). Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. *J. Androl* *26*, 333-342.
- Udby,L., Calafat,J., Sorensen,O.E., Borregaard,N., and Kjeldsen,L. (2002a). Identification of human cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) as a matrix protein in a subset of peroxidase-negative granules of neutrophils and in the granules of eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* *72*, 462-469.
- Udby,L., Cowland,J.B., Johnsen,A.H., Sorensen,O.E., Borregaard,N., and Kjeldsen,L. (2002b). An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. *J. Immunol. Methods* *263*, 43-55.
- Udby,L., Johnsen,A.H., and Borregaard,N. (2010). Human CRISP-3 binds serum alpha(1)B-glycoprotein across species. *Biochim. Biophys. Acta* *1800*, 481-485.
- Uto,N., Yoshimatsu,N., Lopata,A., and Yanagimachi,R. (1988). Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. *J. Exp. Zool.* *248*, 113-120.
- Vacquier,V.D. (1998). Evolution of gamete recognition proteins. *Science* *281*, 1995-1998.
- van Gestel,R.A., Brewis,I.A., Ashton,P.R., Helms,J.B., Brouwers,J.F., and Gadella,B.M. (2005). Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. *Mol. Hum. Reprod.* *11*, 583-590.

- van Loon,L.C., Rep,M., and Pieterse,C.M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 135-162.
- Visconti,P.E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *106*, 667-668.
- Visconti,P.E., Bailey,J.L., Moore,G.D., Pan,D., Olds-Clarke,P., and Kopf,G.S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* *121*, 1129-1137.
- Visconti,P.E., Stewart-Savage,J., Blasco,A., Battaglia,L., Miranda,P., Kopf,G.S., and Tezon,J.G. (1999). Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. *Biol. Reprod.* *61*, 76-84.
- Wang,H.X., Kolesnikova,T.V., Denison,C., Gygi,S.P., and Hemler,M.E. (2011). The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization. *J Cell Sci.* *124*, 2702-2710.
- Ward,C.R. and Kopf,G.S. (1993). Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.* *158*, 9-34.
- Wassarman,P. (1988a). The mammalian ovum. In *The Physiology of Reproduction.*, E.Knobil, J.Neill, and et al., eds. (New York: Raven Press, Ltd.), pp. 69-101.
- Wassarman,P.M. (1988b). Zona pellucida glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* *57*, 415-442.
- Wassarman,P.M., Jovine,L., Qi,H., Williams,Z., Darie,C., and Litscher,E.S. (2005). Recent aspects of mammalian fertilization research. *Mol. Cell Endocrinol.* *234*, 95-103.
- Wassarman,P.M. and Litscher,E.S. (2001). Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. *Cells Tissues. Organs* *168*, 36-45.
- Weigel,M.M., Ernesto,J.I., Bluguermann,C., Busso,D., Battistone,M.A., Cohen,D.J., and Cuasnicu,P.S. (2012). Evaluation of Testicular Sperm CRISP2 as a Potential Target for Contraception. *J Androl.*
- Wen,Y., Richardson,R.T., and O'Rand,M.G. (1999). Processing of the sperm protein Sp17 during the acrosome reaction and characterization as a calmodulin binding protein. *Dev. Biol.* *206*, 113-122.
- Xia,J., Reigada,D., Mitchell,C.H., and Ren,D. (2007). CATSPER channel-mediated Ca²⁺ entry into mouse sperm triggers a tail-to-head propagation. *Biol. Reprod.* *77*, 551-559.
- Xiang,C., Sarid,R., Cazacu,S., Finniss,S., Lee,H.K., Ziv-Av,A., Mikkelsen,T., and Brodie,C. (2007). Cloning and characterization of human RTVP-1b, a novel splice variant of RTVP-1 in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *362*, 612-618.
- Xiang,X., Burnett,L., Rawls,A., Bieber,A., and Chandler,D. (2004). The sperm chemoattractant "allurin" is expressed and secreted from the Xenopus oviduct in a hormone-regulated manner. *Dev. Biol.* *275*, 343-355.
- Xiang,X., Kittelson,A., Olson,J., Bieber,A., and Chandler,D. (2005). Allurin, a 21 kD sperm chemoattractant, is rapidly released from the outermost jelly layer of the Xenopus egg by diffusion and medium convection. *Mol. Reprod. Dev.* *70*, 344-360.
- Xu,Z., Williams,C.J., Kopf,G.S., and Schultz,R.M. (2003). Maturation-associated increase in IP₃ receptor type 1: role in conferring increased IP₃ sensitivity and Ca²⁺ oscillatory behavior in mouse eggs. *Dev. Biol.* *254*, 163-171.

- Yamaguchi,A., Saito,T., Yamada,L., Taniguchi,H., Harada,Y., and Sawada,H. (2011). Identification and localization of the sperm CRISP family protein CiUraBin involved in gamete interaction in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mol. Reprod. Dev.* **78**, 488-497.
- Yamashita,M., Honda,A., Ogura,A., Kashiwabara,S., Fukami,K., and Baba,T. (2008). Reduced fertility of mouse epididymal sperm lacking Prss21/Tesp5 is rescued by sperm exposure to uterine microenvironment. *Genes Cells* **13**, 1001-1013.
- Yamazaki,Y. and Morita,T. (2004). Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* **44**, 227-231.
- Yanagimachi,R. (1972). Fertilization of guinea pig eggs *in vitro*. *Anat. Rec.* **174**, 9-20.
- Yanagimachi,R. (1994). Mammalian Fertilization. In *The Physiology of Reproduction.*, E.Knobil and J.D.Neill, eds. (New York: Raven Press), pp. 189-317.
- Yin,L., Chung,C.M., Huo,R., Liu,H., Zhou,C., Xu,W., Zhu,H., Zhang,J., Shi,Q., Wong,H.Y., Chen,J., Lu,Y., Bi,Y., Zhao,C., Du,Y., Ma,M., Cai,Y., Chen,W.Y., Fok,K.L., Tsang,L.L., Li,K., Ni,Y., Chung,Y.W., Zhou,Z., Sha,J., and Chan,H.C. (2009). A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cell Mol. Life Sci.* **66**, 900-908.
- Yoshida,M. and Yoshida,K. (2011). Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca²⁺. *Mol. Hum. Reprod.* **17**, 457-465.
- Yu,C., Yap,N., Chen,D., and Cheng,S. (1997a). Modulation of hormone-dependent transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by the tumor suppressor p53. *Cancer Lett.* **116**, 191-196.
- Yu,C.L., Driggers,P., Barrera-Hernandez,G., Nunez,S.B., Segars,J.H., and Cheng,S. (1997b). The tumor suppressor p53 is a negative regulator of estrogen receptor signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**, 617-620.
- Yudin,A.I., Cherr,G.N., and 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**, 555-564.
- Yudin,A.I., Li,M.W., Robertson,K.R., Tollner,T., Cherr,G.N., and Overstreet,J.W. (2002). Identification of a novel GPI-anchored CRISP glycoprotein, MAK248, located on the posterior head and equatorial segment of cynomolgus macaque sperm. *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 488-499.
- Yudin,A.I., Vandervoort,C.A., Li,M.W., and Overstreet,J.W. (1999b). PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* **53**, 350-362.
- Yudin,A.I., Vandervoort,C.A., Li,M.W., and Overstreet,J.W. (1999a). PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* **53**, 350-362.
- Zhang,H. and Martin-Deleon,P.A. (2003). Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. *J Androl* **24**, 51-58.
- Zhang,L., Jiang,S., Wozniak,P.J., Yang,X., and Godke,R.A. (1995). Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **40**, 338-344.
- Zhou,C., Kang,W., and Baba,T. (2012). Functional characterization of double-knockout mouse sperm lacking SPAM1 and ACR or SPAM1 and PRSS21 in fertilization. *J Reprod. Dev.* **58**, 330-337.

Zhu,G.Z., Miller,B.J., Boucheix,C., Rubinstein,E., Liu,C.C., Hynes,R.O., Myles,D.G., and Primakoff,P. (2002). Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development* 129, 1995-2002.

Zhuo,L. and Kimata,K. (2001). Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell Struct. Funct.* 26, 189-196.