Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral



Las proteínas CRISP: desde la fertilización al sistema inmune

Weigel Muñoz, Mariana

2013-04-22

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:

Weigel Muñoz, Mariana. (2013-04-22). Las proteínas CRISP: desde la fertilización al sistema inmune. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Weigel Muñoz, Mariana. "Las proteínas CRISP: desde la fertilización al sistema inmune". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-04-22.

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 **Contacto:** digital@bl.fcen.uba.ar



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Las proteínas CRISP: desde la fertilización al sistema inmune.

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

Mariana Weigel Muñoz

Director de tesis: Dra Patricia S. Cuasnicu

Consejero de estudios: Dr Jorge Muschietti

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas

Buenos Aires, 2012

Las proteínas CRISP: desde la fertilización al sistema inmune.

Las proteínas CRISP (Proteínas Secretorias Ricas en Cisteínas) de mamíferos se encuentran presentes en el tracto reproductor masculino y han sido propuestas como mediadores del proceso de fertilización. En base a ello, y a su alta homología con las proteínas PR1 y Ag5 involucradas en el sistema de defensa, el objetivo de esta Tesis ha sido investigar la relevancia de las CRISP tanto para la fertilidad como para el sistema inmune. Previos resultados de nuestro grupo indican que los ratones knockout para la proteína epididimaria CRISP1 (*Crisp1^{-/-}*) son fértiles pese a presentar espermatozoides con una menor capacidad fertilizante. Dado que una mutación puede producir fenotipos diferentes según su fondo genético, evaluamos el fenotipo de los animales Crisp1^{-/-} generados en un fondo genético homogéneo. Los resultados revelaron que los machos presentaron no sólo una desventaja en la fertilidad sino también nuevos defectos en parámetros funcionales de los espermatozoides, confirmando la importancia de realizar estudios en animales con diversos fondos genéticos. La proteína testicular CRISP2 participa en el proceso de fertilización y ha sido propuesta como un auto-antígeno capaz de generar orquitis. Con el fin de investigar su relevancia para la fertilidad, ratas macho y hembra fueron inmunizadas con CRISP2, observando que esta proteína es capaz de generar una respuesta inmune específica en animales de ambos sexos, que no genera orquitis ni compromete la fertilidad. Estos resultados sugieren que, a diferencia de CRISP1, CRISP2 no seria un blanco anticonceptivo ni un antigeno responsable de la inmunoifertilidad. En cuanto a CRISP3, observamos que si bien existen dos isoformas en el espermatozoide humano, una de las cuales se libera durante la capacitación y otra que permanece en el espermatozoide capacitado, esta proteína no actuaría como factor decapacitante ni sería relevante para la fertilización. Finalmente, en lo que respecta al posible rol de las CRISP en el sistema inmune, observamos que tanto CRISP3 como su homólogo CRISP1 se expresan en células dendríticas inmaduras y maduras. Más aún, el empleo de animales knockout para CRISP1 reveló que esta proteína modularía el perfil secretorio de citoquinas de las células dendrítricas. En conjunto, los resultados obtenidos indican la relevancia de las CRISP para la regulación tanto de la fertilidad como del sistema inmune.

Palabras claves: Fertilidad, fertilización, espermatozoide, CRISP, células dendríticas

The CRISP proteins: from fertilization to the immune system.

The CRISP proteins (Cysteine Rich Secretory Proteins), in mammals, are primarily expressed in the male reproductive tract and have been proposed to participate in the fertilization process. Based on this, and considering the high homology between the CRISP proteins and the PR1 y Ag5 proteins involved in the immune system, the objective of the present thesis was to investigate the relevance of CRISP in fertility and in the immune system. Previous results from our group indicated that in spite of been fertile, the CRISP1 knockout mice contain sperm that exhibit a reduced ability to fertilized eggs. Considering that it has been reported that different phenotypes can arise from the same mutation depending on the genetic background, we investigated the phenotype of *Crisp1^{-/-}* animals of a homogenous background. Results showed that males exhibited not only a disadvantage in fertility but also new defects on sperm parameters, confirming the importance of performing studies in animals with different genetic background. Testicular protein CRISP2 is involved in the fertilization process and has been proposed as an auto-antigen capable of generate autoimmune orchitis. With the aim of investigate its relevance for fertility, male and female rats were immunized with CRISP2. Results showed that this protein is capable of generating a specific immune response in male and female rats that neither generates autoimmune orchitis nor compromises fertility. These results suggest that, differently from CRISP1, CRISP2 would not be a target for immunocontraception or a molecule responsible for immunoinfertility. About CRISP3, we observed that even though two forms of the protein exist in human sperm, one of which is released from the sperm during capacitation and the other one that remains associated with the sperm after the acrosome reaction, this protein would not behave as a decapacitating factor and would not be relevant for fertility. Finally, regarding the role of CRISP in the immune system, we observed that CRISP3 and CRISP1 are expressed in immature and mature dendritic cells. Moreover, the use of CRISP1 knockout animals revealed that this protein would modulate cytokine secretion by dendritic cells. Altogether, the results obtained in the present thesis indicate not only the relevance of the CRISP protein in the regulation of fertility but also of the immune system.

Keywords: Fertility, fertilization, sperm, CRISP, dendritic cells.

Agradecimientos

- A Paty, mi directora de tesis, por confiar en mí desde el primer momento, por haberme brindado numerosas oportunidades, entre ellas, desarrollar la Tesis en su laboratorio

- A todo el lab: Deb: por transmitirme tranquilidad, Vani: por tu sobriedad, Juli: y Petu: por su buena onda, Gus: por saber todo: Juan: por estar en TODAS; Agus: por tu energía de siempre Augusto: por darme una mano cuando la necesite, Gaby: por tu frescura, Caro: por tu gran compañía en los primeros momentos. A todos los que pasaron, ayudaron y dejaron su huella (Diego E, Loli, Mauro, Diego C, Nacho, Mayel, Víctor, Ana, Fer, Agus S Mariana). A Nico: éxitos.

- A Gabriel por su incondicional apoyo y gran ayuda.

- Al .Lab de inmunopatología unos ídolos todos, sin palabras

 Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología (AGENCIA), a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y a la fundación SALES por haberme otorgado el apoyo económico necesario para realizar la Tesis.

- AL IBYME (becarios, investigadores, administración, biblioteca, bioterio, estudiantes, limpieza, recepción, seguridad) por darme "el lugar", por su ayuda y amabilidad.

- A los que pusieron su granito de arena: Pao, Claudia, Anabel.

 A mis papás y mis hermanas por enseñarme a vivir y estar conmigo en cada momento

- A mis amigas, primos, tíos, cuñados/a y suegra/o por acompañarme

- A todos mis sobrinos por sacarme siempre una sonrisa

- A Juan por ser "EL COMPAÑERO" y bancarme siempre....

Abreviaturas

AC	adenilato ciclasa
BSA	albúmina sérica bovina
AMPc	AMP cíclico
dbcAMP	dibutiril AMP cíclico
ссо	complejos cúmulos-ovocitos
DC	célula dendrítica, optamos por la sigla en inglés a los fines de evitar confusiones con los marcadores CD (<i>cluster of diferentiation</i>), muy utilizados en inmunología
DCi	célula dendrítica inmadura
DCm	células dendríticas maduras
DMSO	dimetilsulfóxido
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPI	glicosilfosfatidilinositol
нт	Crisp1 ^{+/-}
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IL	interleuquina
IPTG	isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
КО	Crisp1 ^{-/-}
P4	progesterona
PFA	paraformaldehído
РКА	proteína quinasa A
RA	reacción acrosomal
sAC	adenilato ciclasa soluble
ZP	zona pelúcida

Índice

Introducción		
El tracto reproductor femenino	9	
La gameta femenina1	0	
El tracto reproductor masculino1	6	
La gameta masculina1	9	
Maduración epididimarial2	23	
Capacitación2	26	
Reacción acrosomal2	<u>29</u>	
Quimiotaxis	33	
Hiperactivación	34	
Transporte de gametas 3	5	
Tiempo de vida fértil de las gametas	35	
Sitio de deposición del semen	37	
Formación del tapón vaginal	37	
Mecanismos de defensa contra el ataque inmunológico del tracto	27	
	7	
Besquesta inmune en el cenvix	יי 72	
Respuesta inmune en el útero	38	
El proceso de fertilización	88	
Interacción espermatozoide-ovocito	38	
Penetración del <i>cúmulus oophorus</i> 4	40	
، Interacción espermatozoide-ZP4	41	
Fusión del espermatozoide con el ovocito4	14	
Activación del ovocito4	19	
Familia de proteínas CRISP5	50	
Proteína CRISP15	52	
Proteína CRISP26	30	
Proteína CRISP36	64	
Objetivos6	7	

Índice

Metodología69
Resultados86
CAPÍTULO 1 : Influencia del origen genético sobre el fenotipo de los animales KO para CRISP187
CAPÍTULO 2 : Estudio de la relevancia de la proteína testicular CRISP2 para la fertilidad
CAPÍTULO 3: Estudio de CRISP3 en el proceso de fertilización y de su posible rol inmunoregulatorio 110
Discusión
CAPÍTULO 1 : Influencia del origen genético sobre el fenotipo de los animales KO para CRISP1125
CAPÍTULO 2 : Estudio de la relevancia de la proteína testicular CRISP2 para la fertilidad135
CAPÍTULO 3: Estudio de CRISP3 en el proceso de fertilización y de su posible rol inmunoregulatorio 141
Conclusión152
Bibliografía156

La fertilización es el proceso por el cual dos gametos haploides, el espermatozoide (gameto masculino) y el ovocito (gameto femenino) se unen para producir un individuo diploide único. Los ovocitos y los espermatozoides presentan, durante el proceso de fertilización, una historia y un comportamiento sumamente diferente. Profundizar nuestro conocimiento sobre el "diálogo" entre las gametas nos permitirá mejorar el diagnóstico y el tratamiento de la infertilidad. Más aún, se sabe que la población mundial se encuentra en constante crecimiento, generando ésto la necesidad de desarrollar nuevos y mejores métodos anticonceptivos.

Por otra parte, las evidencias indican que la fertilización es el resultado de una secuencia precisa y ordenada de interacciones celulares, razón por la cual, caracterizar los mecanismos moleculares involucrados en este proceso podría aportar al conocimiento general de diferentes procesos celulares (Florman and Ducibella, 2006).

El tracto reproductor femenino

El tracto reproductor femenino está compuesto por los ovarios, los oviductos, el útero, el cervix y la vagina (**Figura 1**).



Figura 1: El tracto reproductor femenino.

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

Los ovarios, se encuentran en estrecho contacto con las estructuras de comunicación con el útero, los oviductos en roedores y las trompas de *Fallopio* en la mujer. La región del oviducto proximal al ovario, llamada *ampulla*, es en donde se crea el microambiente necesario para que ocurra la fertilización, en tanto la región distal, el *isthmus*, sirve de reservorio de espermatozoides previo a la fertilización (Susan S.Suarez, 2006).

El útero se extiende desde el oviducto y recorre la cavidad abdominal dorsal, conectándose a la vagina por el cérvix. A diferencia de los ovarios y oviductos que son estructuras pares, el útero es una estructura única en primates, y bicorne en la mayoría de los mamíferos. 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). Si bien su función principal es alojar y favorecer el desarrollo del embrión, se ha demostrado que, además, las suaves contracciones musculares de este órgano, causadas por la estimulación nerviosa del apareamiento, permiten que los espermatozoides sean impulsados hacia adelante, permitiendo alcanzar los segmentos superiores del oviducto dentro de los primeros minutos siguientes al apareamiento.

La gameta femenina

El ovocito se produce en el ovario a través de un proceso biológico altamente especializado y regulado denominado ovogénesis. Dicho proceso comienza con la formación de las células germinales en el embrión y culmina luego de la pubertad, con la liberación de los ovocitos durante la ovulación (Austin and Short F.R.S., 1972).

La ovogénesis, esquematizada en la **Figura 2**, comienza con la división activa de las células germinales por mitosis, las cuales pasan a denominarse ovogonias. Posteriormente, en el desarrollo embrionario, estas células comienzan a sintetizar DNA en preparación para la meiosis, perdiendo su totipotencialidad y denominándose ovocitos primarios. Al nacimiento, las hembras poseen un número finito de ovocitos, los cuales permanecen arrestados en Profase I de la meiosis hasta la pubertad. Al llegar a la pubertad, se produce el crecimiento de los ovocitos en forma coordinada con células de origen somático, en estructuras celulares llamadas folículos. Durante el período periovulatorio, un ovocito reanuda la meiosis estimulada por la acción de hormonas. Esta división desigual del citoplasma de la gameta femenina provoca que, mientras que una de las células hijas (el ovocito) recibe la mayor parte del citoplasma y es capaz de originar un embrión, la otra (el corpúsculo polar) recibe una cantidad mínima, y está destinada a la degeneración. En cada ciclo menstrual, cierto número de ovocitos (dependiente de la especie) es capaz de alcanzar el estadio en que son ovulados.



Figura 2: La ovogénesis. A la izquierda, se esquematiza un corte transversal de un ovario resaltando diferentes estadios foliculares presentes durante la ovogénesis y a la derecha se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis femenina.

En el momento de la ovulación, el ovocito secundario, que se encuentra en folículos preovulatorios o De Graaf (**Figura 3A**), junto con el primer cuerpo polar y algunas células de soporte, son expulsados del ovario al oviducto donde son retenidos. En la mayoría de los mamíferos, los ovocitos son ovulados en el estadio de Metafase II, con el primer corpúsculo polar emitido. Finalmente, la meiosis continúa solamente después de la entrada del espermatozoide al ovocito, resultando en la extrusión del segundo cuerpo polar. De esta manera, la meiosis femenina se inicia en la etapa fetal, se prolonga hasta la edad madura de la hembra y, sólo se completa durante el proceso de fertilización.

El ovocito ovulado en los mamíferos euterianos es una célula esférica, de diámetro variable según la especie (70-120 µM), contenida dentro de una matriz extracelular, la

zona pelúcida (ZP). Por fuera de la ZP del ovocito ovulado, se encuentran varias capas de células de la granulosa y una matriz extracelular que, en su conjunto, conforman el *cumulus oophorus*. Al conjunto del ovocito, la ZP, las células del cúmulus y la matriz extracelular se la denomina complejo cúmulos-ovocito (CCO) (**Figura 3 B y C**). Entre la ZP y la membrana plasmática del ovocito, se encuentra el espacio perivitelino conformado por una matriz extracelular sintetizada principalmente por el ovocito pero con el agregado de fluido y moléculas provenientes de las células que lo rodean (Talbot and Dandekar, 2003) (**Figura 3 D**).



Figura 3: La gameta femenina. A) Microfotografía de un folículo de Graaf donde puede verse el ovocito rodeado de varias capas de células de la granulosa desplazado del centro del folículo por el antro. B) Microfotografía de un CCO ya ovulado. O: ovocito. ZP: zona pelúcida. CR: corona radiata. CL: células del cúmulus C) Fotografía de un ovocito sin células del cúmulus en donde se distinguen la zona pelúcida, el espacio perivitelino y el primer cuerpo polar.

El ovocito se encuentra conformado por la membrana plasmática (oolema) rodeando al citoplasma (ooplasma), el cual contiene al núcleo y una variedad de organelas. 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 (Shalgi and Phillips, 1980);(O'Rand et al.,

1986);(Matsudaira, 1990);(Ducibella, 1991). 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).

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 (Wassarman, 1988);(Haddad and Nagai, 1977);(Bleil and Wassarman, 1980);(Wassarman, 1988). Dicha matriz se deposita alrededor del ovocito durante el crecimiento y aumenta su espesor a medida que la célula aumenta su diámetro (Mashiach et al., 1992). A pesar de la presencia de la ZP, las células foliculares continúan en contacto con el ovocito a través de uniones de tipo "gap", formadas entre el oolema y extensiones de las células del cúmulus (Austin and Short F.R.S., 1972). Estas uniones tendrían importancia 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 (ZP1, ZP2, ZP3, ZP4), según la especie (Wassarman, 1988; 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 (Hoodbhoy and Dean, 2004);(Wassarman and Litscher, 2001);(Wassarman, 1988). En esta especie, tres proteínas altamente glicosiladas conforman la ZP: ZP1, ZP2 y ZP3, siendo las dos últimas las más abundantes. La glicosilación diferencial de las tres proteínas produce una alta heterogeneidad de carga en las mismas. Mientras que tanto ZP3 (83 kDa) como ZP2 (120-140 kDa) son monómeros, la proteína minoritaria ZP1 (185-200 kDa) se encuentra formando parte de un dímero de cadenas polipeptídicas asociadas por puentes disulfuro. Hace ya casi dos décadas, Wassarman postuló un modelo para explicar la estructura de la ZP de ratón, basándose en resultados provenientes de

13

experimentos de microscopía electrónica, cross-linking químico, e immunolocalización de proteínas en la ZP (Wassarman, 1988). Dicho modelo, esquematizado en la **Figura 4A**, propuso 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 and Sander, 1992), sería el responsable del ensamblaje de estos filamentos (Jovine et al., 2005; Jovine et al., 2002). Considerando la relación evolutiva entre ZP1 y ZP4, se ha sugerido que los filamentos de ZP2/ZP3 formarían la estructura básica de la ZP pero que estos filamentos podrían estar unidos a través de ZP1 y/o a través de ZP4 (Florman and Ducibella, 2006) **(Figura 4B)**



Figura 4. Representación esquemática del modelo de la organización molecular de la ZP

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 (KO) para ZP3 fueron aquellos que presentaron efectos más drásticos sobre el fenotipo, los ovocitos carecieron de ZP y los animales fueron completamente infértiles (Rankin et al., 1996). En las hembras KO para ZP1, se formó una 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). Por último, el fenotipo de los animales KO 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). Según esos resultados, la ZP1 sería una proteína minoritaria de la matriz, con un rol

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

Como se mencionara anteriormente, rodeando la ZP, en la mayoría de los mamíferos, se encuentra el cumulus oophorus, conformado por un grupo de células de la granulosa, llamadas células del cúmulus, embebidas en una matriz extracelular. 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 CCOs 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 and Kimata, 2001). Originalmente, el ácido hialurónico era considerado el componente principal de la matriz del cúmulus (Eppig, 1979). Posteriormente, se han descripto otros componentes de dicha matriz, particularmente glicosaminoglicanos y proteínas, sintetizados por las células de la granulosa, que también serían parte importante del cúmulus (Zhuo and Kimata, 2001). Además de las moléculas antes mencionadas, existen factores extrafoliculares, 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). 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 (Yoshida and Yoshida, 2011); (Kaupp et al., 2008), 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).

El tracto reproductor masculino

En el tracto reproductor masculino, los testículos son órganos pares que consisten en una serie de lóbulos que contienen en su interior los túbulos seminíferos, dentro de los cuales se produce la espermatogénesis, separados por tejido intersticial (Austin and Short F.R.S., 1972). Los túbulos se unen entre sí en la *rete testis*, que se conecta mediante los ductos eferentes con el epidídimo. Este órgano consiste en un largo conducto que se continúa con el *vas deferens* el cual, durante la eyaculación, recoge las secreciones de las glándulas accesorias (próstata, vesícula seminal, glándulas bulbo-uretrales) y conduce a los espermatozoides hasta la uretra (**Figura 5**).

En los testículos se producen los espermatozoides, a través de un proceso conocido como espermatogénesis (Austin and Short F.R.S., 1972). Al igual que en la hembra, dicho proceso comienza con la formación de las células germinales (espermatogonias) durante la vida embrionaria y requiere de la división meiótica para la producción de gametas haploides (**Figura 5**). La gran diferencia con la hembra radica en que mientras que en la oogénesis todas las células germinales se diferencian en ovocitos durante el desarrollo embrionario, en el macho existe una población de células germinales capaces de multiplicarse por mitosis durante toda la vida adulta. De este modo, mientras que en la hembra existe un número fijo de gametas al principio de la vida fértil, en el macho, la producción de espermatozoides es constante. Además, en la espermatogénesis, cada espermatogonia que entra en meiosis origina cuatro espermatozoides. Sin embargo, en la oogénesis se produce un sólo ovocito por ovogonia. Mientras las gametas femeninas son grandes, poco numerosas, con una abundante reserva de nutrientes y prácticamente inmótiles; las gametas masculinas son muy pequeñas, numerosas, carentes de nutrientes y muy mótiles.

A diferencia de la hembra, en el macho, la espermatogénesis comienza recién luego de la pubertad y ocurre durante toda la vida adulta del individuo. A partir de ese momento, una población de células germinales continúa multiplicándose por mitosis, mientras que otras se diferencian en espermatocitos primarios, los cuales entran en meiosis generando espermatocitos secundarios. Los mismos entran a una interfase inter-meiótica de poca duración para pasar luego a la segunda división meiótica que da origen a las células llamadas espermátides. Estas últimas son células redondas

que se diferencian morfológicamente para dar origen a los espermatozoides a través de un proceso denominado espermiogénesis, caracterizado por la pérdida de citoplasma, la condensación nuclear y la aparición de estructuras particulares como la cola y el acrosoma, relevantes para la función de la gameta. Como consecuencia de la pérdida casi completa del citoplasma, el espermatozoide carece de la maquinaria necesaria para la expresión de proteínas, síntesis y degradación de lípidos, y transporte vesicular. Finalmente, se produce la liberación de los espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos por un proceso denominado espermiación. De este modo, los espermatozoides salen del epitelio seminífero por la *rete testis* que se conecta con el epidídimo mediante los ductos eferentes.



Figura 5: reproductor EI tracto masculino la V espermatogénesis. Arriba, a la izquierda, se muestra una representación simple del tracto reproductor masculino. Arriba, a la derecha, se muestra una representación de un corte transversal de un testículo y de un túbulo seminífero. Abajo, a la izquierda, se muestra un diagrama resumiendo las etapas de la meiosis masculina. Abajo, la derecha, se esquematiza los diferentes estadios celulares presentes durante la espermatogénesis en un corte transversal de un túbulo seminífero.

Además de la línea germinal, dentro del túbulo seminífero, se encuentran las células de Sertoli. La función de estas células es crear y mantener un microambiente apropiado para el correcto desarrollo de los espermatozoides. Su forma es única ya que se apoyan en la membrana basal y llegan hasta el lumen del epitelio seminífero, extendiéndose entre las células germinales. La presencia de uniones estrechas entre las células de Sertoli, permite la formación de una barrera que limita el pasaje de moléculas de gran tamaño, como los anticuerpos, entre las células adyacentes. Esta permeabilidad reducida es parte de lo que se conoce como barrera hemato-testicular, y determina que las células haploides se encuentren aisladas del sistema inmune.

La gameta masculina aparecen en el desarrollo mucho tiempo después de la maduración del sistema inmune y el establecimiento de la tolerancia inmunológica (**Figura 6**). Por esta razón, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los tejidos y órganos, dichas células son particularmente susceptibles al sistema inmune. La activación de una respuesta contra el espermatozoide o hacia otros elementos del aparato reproductor puede producir insuficiencia androgénica, inflamación crónica o infertilidad (M.P.Hedger and D.B.Hales, 2006).



Figura 6: Comparación de la maduración del sistema inmune y del espermatozoide a lo largo del desarrollo.

La explicación tradicional del privilegio inmunológico basado únicamente en la "barrera hemato-testicular" no es consistente con los conceptos actuales de tolerancia inmunológica ni con la organización histológica del tracto reproductor. Los conceptos actuales se focalizan en la actividad inmunoregulatoria de las células dendríticas, los

macrófagos y los linfocitos, así como también en una supresión activa de la respuesta inmune antígeno-específica mediada por células somáticas a través de la liberación citoquinas inmonuregulatorias, esteroides androgénicos, y otros factores antiinflamatorios. En este sentido, se ha demostrado que la función reproductiva normal se encuentra íntimamente ligada al correcto desarrollo de un microambiente inmunológico normal (M.P.Hedger and D.B.Hales, 2006).

El dimorfismo sexual en la salud, tal como la prevalecia de las enfermedades autoinmunes en las mujeres, junto con ciertas evidencias que indican que diversos procesos inmunológicos presentan diferencias sexo específicas, claramente establecen que los productos testiculares, y en particular los esteroides sexuales, son capaces de regular el sistema inmune directa o indirectamente (Kimura et al., 1995); (Araneo et al., 1991); (Weinstein and Berkovich, 1981). Numerosas evidencias apoyan la idea de que la regulación del sistema inmune en el tracto reproductor masculino posee características únicas que pueden proporcionar información importante para lograr entender la regulación del sistema inmune en los transplantes, así como también en diversas patologías tales como enfermedades autoinmunes y el cáncer. Más aún, los mecanismos fisiológicos que permiten al sistema inmune y al aparato reproductor masculino convivir en un mismo ambiente son, probablemente, muy similares, en muchos aspectos, a los mecanismos implicados en la interacción célula-célula de cualquier otro evento en el proceso de la reproducción (M.P.Hedger and D.B.Hales, 2006).

La gameta masculina

El espermatozoide es una célula altamente especializada con capacidad para transportarse hasta el sitio de fertilización en el tracto reproductor femenino y atravesar las cubiertas que rodean al ovocito para, finalmente, fertilizarlo.

Existe una alta variabilidad en el tamaño de los espermatozoides de las distintas especies de mamíferos, siendo los de los roedores los de mayor tamaño ya que alcanzan longitudes entre tres y cinco veces las de la mayor parte de los animales domésticos y el hombre (Austin and Short F.R.S., 1972). A pesar de que la forma y el tamaño de los espermatozoides de las distintas especies de los mamíferos son variables, los mismos comparten una estructura general similar. Básicamente, el espermatozoide posee dos componentes morfológicos distintivos: la cabeza y la cola o flagelo (**Figura 7A**) (Eddy, 2006).

La cabeza del espermatozoide contiene dos elementos fundamentales: un núcleo compacto, debido a la presencia de cromatina altamente condensada, y el acrosoma, una estructura cuyo contenido sería importante para la fertilización (Eddy, 2006). En la mayoría de los mamíferos, incluidos el hombre y gran parte de los animales domésticos, la cabeza del espermatozoide tiene una forma espatulada en la que el núcleo y el acrosoma son estructuras simétricas, de forma aplanada en el sentido longitudinal de la célula (Figura 7A). En otros animales, como el hamster y el cobayo, existe una protrusión del acrosoma, perpendicular al plano aplanado de la cabeza. En los roedores, la cabeza es falciforme, con el acrosoma ocupando la región convexa del núcleo (Figura 7 B y C).



Figura 7: La gameta masculina. (A) Esquema de un espermatozoide de mamífero en el que se muestran las diferentes estructuras internas de la cola. (B) Se muestran las estructuras generales de la cabeza de un espermatozoide falciforme (izquierda) y otro con forma espatulada (derecha). (C) se muestran las regiones y las membranas de un espermatozoide falciforme.

El núcleo del espermatozoide es de un tamaño significativamente menor al del resto de los tipos celulares. El motivo de esta diferencia se debe, particularmente, a que el ADN se encuentra asociado a pequeñas proteínas básicas y de bajo peso molecular, llamadas protaminas. Estas proteínas permiten un mayor empaquetamiento de la cromatina comparado con las histonas presentes en las células somáticas. El núcleo

se encuentra rodeado por una envoltura nuclear bastante inusual, caracterizada por la cercanía entre las dos membranas que la conforman y la escasez de poros nucleares.

El acrosoma es una estructura membranosa que rodea al núcleo en la parte anterior de la cabeza, originada en el aparato de Golgi, durante la espermatogénesis. La forma y el tamaño del acrosoma es variable en las diferentes especies relacionándose, generalmente, a la forma de la cabeza. Si bien la membrana que rodea al acrosoma es única y continua, se ha definido como "membrana acrosomal interna" a aquella que envuelve a la membrana nuclear externa, y como "membrana acrosomal externa" a la que se encuentra por debajo de la membrana plasmática, en la parte anterior de la cabeza. El acrosoma a su vez está constituido por dos regiones denominadas capuchón acrosomal y segmento ecuatorial (SE), definidas principalmente por diferencias funcionales entre ellas. En cuanto a su composición, el acrosoma contiene varias moléculas con actividad enzimática, las cuales se han relacionado a la capacidad del espermatozoide de penetrar las cubiertas que rodean al ovocito durante la fertilización. Estudios de microscopía y extracción diferencial de proteínas han sugerido que esta organela no sería simplemente un reservorio de enzimas solubles sino que existiría una organización funcional de moléculas dada por la presencia de una matriz intra-acrosomal (Yanagimachi, 1988a);(Kim and Gerton, 2003). Las dos enzimas mejor caracterizadas del acrosoma son acrosina, una proteína perteneciente a la familia de las serin-proteasas, y hialuronidasa, ambas con expresión especifica en las células espermatogénicas. Si bien por su estructura y contenidos, el acrosoma se ha descripto como un lisosoma especializado, esta organela del espermatozoide tendría, además, algunas características de una vesícula de secreción ya que, como se verá más adelante, libera sus contenidos mediante exocitosis en respuesta a señales específicas que se producen durante la interacción del espermatozoide con el ovocito.

En la cabeza del espermatozoide se encuentran también estructuras de citoesqueleto, que se distribuyen en dos regiones: el citoesqueleto subacrosomal o perforatorium, localizado entre el acrosoma y el núcleo, el cual está compuesto principalmente por material denso (Bellvé y O'Brien, 1983) y es más prominente en espermatozoides con forma falciforme, y el citoesqueleto postacrosomal, que se localiza entre el núcleo y la membrana plasmática de la región postacrosomal del espermatozoide, el cual está compuesto por filamentos ordenados (Koehler, 1970);(Courtens *et al.*, 1976);(Fouquet *et al.*, 1992).

La cola o flagelo del espermatozoide de los mamíferos está compuesto por cuatro segmentos diferentes: la pieza conectora o cuello, la pieza media, la pieza principal, y la pieza terminal (Figura 7A) (Eddy, 2006). El componente principal de la cola es el axonema, que consiste en un par de microtúbulos centrales rodeados por un cilindro de nueve pares de microtúbulos siguiendo la disposición característica de "9+2". Rodeando al axonema, desde la región de la pieza conectora hasta el final de la pieza principal, se encuentran nueve fibras densas conteniendo proteínas similares a la queratina. La estabilización de estas fibras por un gran número de puentes disulfuro entre sus componentes sugiere que dichas estructuras estarían involucradas en otorgar al espermatozoide la elasticidad y flexibilidad necesarias para el batido de la cola. Además de las fibras densas, en la pieza media se encuentra la vaina mitocondrial, estructura compuesta por mitocondrias organizadas extremo con extremo que envuelven a la cola en forma helicoidal y cumplirían un papel en la provisión de energía para el espermatozoide. En la pieza principal, reemplazando a la vaina mitocondrial, se encuentra la vaina fibrosa, conformada por dos columnas longitudinales asociadas entre sí por columnas transversales. El alto grado de compactación y la orientación de las fibras en la vaina fibrosa serían importantes para modular el plano de batido de la cola del espermatozoide. Por último, la pieza terminal está formada por el axonema como único componente estructural.

Al igual que en cualquier otro tipo celular, una membrana plasmática rodea a la totalidad del espermatozoide. A diferencia de otras células, la membrana del espermatozoide se encuentra subdividida en dominios o regiones independientes, coincidentes, en general, con estructuras internas diferentes entre sí no sólo en la composición sino también a nivel funcional. Estos dominios son estructuras dinámicas que sufren cambios en organización y composición durante la vida de la célula. Los dominios principales de la cabeza del espermatozoide son la región acrosomal y la región postacrosomal. La región acrosomal se subdivide a su vez en el segmento principal o capuchón acrosomal, y el segmento ecuatorial (**Figura 7B**). En la cola, los dominios de la membrana plasmática se denominan pieza media y cola posterior, abarcando la región de la pieza media estructural y las otras regiones más terminales, respectivamente.

Cuando son liberados del testículo, los espermatozoides son células altamente diferenciadas. Sin embargo, a diferencia de los invertebrados y vertebrados inferiores, en los mamíferos, los espermatozoides testiculares no tienen aún capacidad de moverse progresivamente o de interactuar con el ovocito. Para adquirir estas

capacidades y llegar al sitio de fertilización en un estado competente, los espermatozoides deben sufrir numerosas modificaciones post-testiculares durante su pasaje tanto por el tracto masculino como por el femenino (Yanagimachi, 1994). De esta manera, los espermatozoides no solamente tienen que trasportarse desde el testículo hacia el oviducto, sitio donde ocurre la fertilización, sino también deben sufrir, durante este trayecto, una serie de cambios que se describirán a continuación.

Maduración epididimaria

Como se mencionara anteriormente, en los mamíferos, los espermatozoides que salen del testículo aún no poseen motilidad progresiva ni la capacidad de reconocer y fertilizar al ovocito. Estas capacidades las adquieren durante su pasaje por el epidídimo, en un proceso conocido como maduración epididimaria (Austin, 1985; Bedford, 1979; Cooper, 1986; Hinrichsen and Blaquier, 1980). El epidídimo (**Figura 8A**) es un conducto único, largo y con muchas circunvoluciones, que cubre el borde posterior del testículo. Convencionalmente, si bien no existen límites anatómicos definidos, el epidídimo se divide en tres regiones según su proximidad con el testículo: *caput* o cabeza (región más próxima al testículo), *corpus* o cuerpo (región media) y *cauda* o cola (región distal al testículo). Aunque no todos los espermatozoides adquieren la capacidad fertilizante simultáneamente, y existe variación entre las distintas especies, la gran mayoría de los espermatozoides obtiene el potencial fertilizante al llegar al *cauda* epididimario (Yanagimachi, 1994).

El epidídimo tiene un rol fundamental no sólo en el proceso de maduración sino también en el transporte, la protección y el almacenamiento de los espermatozoides. Para ello, los espermatozoides se encuentran a medida que transitan por el epidídimo con un microambiente altamente especializado y específico de cada segmento epididimario, el cual es generado mediante la secreción y absorción activa de agua, iones, solutos orgánicos y proteínas, así como también por la barrera hemato-epididimaria.

El proceso de maduración es dependiente de andrógenos (Blaquier et al., 1973; Dyson and Orgebin-Crist, 1973) y consiste en una serie de cambios bioquímicos y funcionales entre los que se incluyen la capacidad de desarrollar la motilidad progresiva y direccional, cambios estructurales tales como la pérdida de la gota citoplasmática y la estabilización de la cromatina, y cambios metabólicos como el aumento de la tasa de glucólisis y del consumo de oxígeno. Pero sin lugar a dudas, la mayor parte de los cambios ocurren al nivel de la membrana plasmática. Esto resulta lógico teniendo en

cuenta que la maduración epididimaria trae como consecuencia la adquisición de capacidad del espermatozoide de interactuar con el ovocito, interacción que ocurre a través de la superficie de ambas gametas. Gran parte de los cambios moleculares y bioquímicos responsables de las alteraciones de las propiedades de la membrana plasmática de los espermatozoides han sido caracterizados, entre ellos se incluyen: alteraciones en la carga de superficie, en las propiedades de unión de lectinas, en el contenido lipídico, en los carbohidratos de superficie y en la composición proteica (Eddy y O'Brien, 1994). Estos cambios surgen como consecuencia de la adquisición de nuevos componentes por parte de la membrana del espermatozoide, y de la migración, liberación y/o modificación de componentes preexistentes en la superficie de la gameta. Generalmente, es aceptado que todos los cambios producidos durante esta etapa de maduración son tendientes a estabilizar la membrana del espermatozoide.

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., 2002). De este modo, se ha descripto 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 and 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 (Frenette and Sullivan, 2001; Legare et al., 1999; Zhang and Martin-Deleon, 2003). Sin embargo, según la vía clásica de secreción de proteínas, una proteína anclada por GPI a la membrana de una célula tiene que transitar por el retículo endoplasmático, luego por el aparato de Golgi y, finalmente, por las vesículas secretoras hasta alcanzar la superficie celular. De acuerdo con este mecanismo de secreción, el espermatozoide no podría adquirir proteínas unidas a GPI durante su pasaje por el epidídimo. Estas observaciones sugieren la existencia de un mecanismo alternativo por el cual estas proteínas epididimarias se secretarían y se unirían a los espermatozoides. En este sentido, Yanagimachi y colaboradores (1985) describieron, por primera vez, mediante microscopía electrónica de cortes de epidídimos de hámster, la existencia de vesículas membranosas que interactuaban con los espermatozoides (Figura 8B y C). Varios años luego de esta primera observación, el laboratorio del Dr. Robert Sullivan

describió la participación de dichas vesículas membranosas en la transferencia de proteínas epididimarias a la superficie de los espermatozoides durante la maduración (Frenette and Sullivan, 2001; Frenette et al., 2002; Legare et al., 1999). Estas vesículas han sido denominadas "epididimosomas", y han sido descriptas en el epidídimo de distintos mamíferos tales como la rata (Fornes et al., 1991), el toro (Frenette and Sullivan, 2001), el ratón (Griffiths et al., 2008), e inclusive el humano (Frenette et al., 2005). Algunas proteínas epididimarias se encuentran asociadas a estas pequeñas vesículas y, de este modo, son transferidas a los espermatozoides durante la maduración (Sullivan et al., 2007). En cuanto al origen de estas pequeñas vesículas membranosas, se ha sugerido un mecanismo de secreción apócrina que implicaría la formación de vesículas citoplasmáticas en el polo apical de las células epiteliales secretoras, que se desprenden de las células y, una vez en el lumen del órgano, se desintegran liberando así su contenido (Aumuller et al., 1997; Hermo and Jacks, 2002). Estas vesículas citoplasmáticas contendrían a los epididimosomas en su interior.





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) otras, que reciben el nombre de "factores

decapacitantes", estabilizarían la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia prematura del proceso de capacitación (Fraser et al., 1990; Oliphant et al., 1985).

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

Capacitación

Si bien el lugar exacto donde se inicia este proceso aún se desconoce, existiendo variaciones según la especie y el sitio de deposición del eyaculado, la capacitación *in vivo* se considera completa cuando los espermatozoides llegan al oviducto (Bedford, 2004; Yanagimachi, 1994). Después de la eyaculación, los espermatozoides de los mamíferos no son capaces de fertilizar al ovocito pues la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración epididimaria es tan sólo de carácter "potencial". De esta manera, los espermatozoides maduros, como así también los espermatozoides eyaculados, deben permanecer en el tracto femenino durante cierto período para poder expresar la capacidad fertilizante adquirida durante la maduración y, finalmente, penetrar al ovocito. Es durante este trayecto hacia el sitio de fertilización que los espermatozoides sufren una serie de cambios fisiológicos que, en su conjunto, se denominan capacitación (Austin, 1951; Austin, 1952; Chang, 1951). Mientras que alguno de estos cambios se inician ni bien el espermatozoide entra en contacto con el tracto o con un medio capacitante apropiado, otros ocurren luego de un largo periodo de incubación (Visconti, 2009).

A pesar de que fisiológicamente el espermatozoide debe atravesar el tracto reproductor femenino para capacitarse y adquirir la habilidad de fertilizar al ovocito, la capacitación puede llevarse a cabo en condiciones *in vitro* si se coloca a los espermatozoides en un medio definido. Este medio puede variar de una especie a otra pero, en general, debe contar con una composición similar a la del fluido oviductal e incluir fuentes de energía tales como los sustratos piruvato, lactato, y glucosa, un aceptor de colesterol como la albúmina, y los iones Ca²⁺, K⁺, Na⁺ y HCO₃⁻.

Uno de los mayores cambios que ocurren durante el proceso de capacitación implica la desestabilización de la membrana plasmática. En diversas especies, se ha demostrado que la membrana de los espermatozoides muestra una distribución

asimétrica de lípidos (Gadella et al., 1999), la cual sería distorsionada por acción del ion bicarbonato durante la capacitación (Gadella and Harrison, 2002; Baumber and Meyers, 2006). Se cree que el mayor efecto de la reorganización de los lípidos sería el de facilitar la remoción del colesterol de ciertas dominios de la membrana plasmática (Flesch et al., 2001). La albúmina, presente en el tracto femenino, fue propuesta como uno de los agentes removedores del colesterol (Go and Wolf, 1985); (Cross, 1998); (Osheroff et al., 1999), (Visconti et al., 1999). Sin embargo, posteriormente se demostró que la albúmina es activa sólo luego de la reorganización de los lípidos, evento inducido por el bicarbonato (Flesch et al., 2001). A su vez, el bajo contenido de colesterol tiene efectos importantes sobre los microdominios de la membrana denominados "rafts", complejos dinámicos compuestos por colesterol y esfingolípidos. Se postula que los rafts estarían involucrados en la transducción de señales intracelulares ya que en los mismos se agrupan ciertos tipos de proteínas intrínsecas de membrana (revisión de trabajos en Simons and 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 and Kopf, 2002), entre los que puede mencionarse a la proteína fertilina, de cobayo (Cowan et al., 2001), la galactosiltransferasa, de ratón (Lopez and Shur, 1987), y la proteína epididimaria de rata CRISP1 (Rochwerger and Cuasnicu, 1992). Asimismo, esta desestabilización de la membrana plasmática, probablemente, debilite la unión de los mencionados factores decapacitantes, proteínas de superficie que están débilmente asociadas al espermatozoide, las cuales inhiben la capacitación y son removidas durante el tránsito por el tracto femenino (Fraser et al., 1990);(Oliphant, 1976);(Oliphant and Brackett, 1973);(Oliphant et al., 1985);(Fraser et al., 1990);(Oliphant et al., 1985). Tanto el aumento de la fluidez de la membrana como la relocalización y la pérdida de proteínas de superficie estarían relacionadas a eventos intracelulares involucrados en la capacitación. En los últimos años, se ha demostrado que la asimetría de los fosfolípidos en la bicapa es mantenida activamente 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 and Harrison, 2000);(Flesch et al., 2001);(Boerke et al., 2012).

Como se mencionara recientemente, numerosos estudios en diferentes especies han mostrado que, además de un aceptor de colesterol como la albúmina, la capacitación sería altamente dependiente de los iones HCO₃ (Boatman and Robbins, 1991; Visconti et al., 1995; Da Ros et al., 2004). En este sentido, la activación de la motilidad comienza inmediatamente después de que el espermatozoide entra en contacto con altas concentraciones de HCO₃⁻ y Ca²⁺ (Visconti, 2009). Por otra parte, el movimiento del HCO3⁻ a través de transportadores específicos en la membrana estaría relacionado con la regulación del metabolismo del AMP cíclico (AMPc) a través de la modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) del espermatozoide (Kopf et al., 2002). En el ratón, se demostró que el HCO³ podría entrar al espermatozoide a través de un cotransportador Na⁺/HCO₃⁻ y una vez dentro de la célula, interactuaría con una isoforma testicular y soluble de la enzima adenilato ciclasa (sAC), la cual aumentaría los niveles intracelulares de AMPc activando 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). Con algunas excepciones (Arcelay et al., 2008), queda aún por estudiar la identidad y función de esta gran cantidad de proteínas que sufren esta modificación post-traduccional durante la capacitación

Las modificaciones que ocurren en el espermatozoide durante la capacitación traen como consecuencia cambios tanto en la cabeza como en la cola del espermatozoide. Debido a que la cola y la cabeza son estructuralmente distintas, existe una tendencia a desvincular sus funciones, es decir que los cambios que ocurren en la cabeza durante la capacitación permitirían al espermatozoide sufrir la denominada reacción acrosomal mientras que los cambios producidos en la membrana plasmática de la cola permitirían desarrollar el fenómeno de hiperactivación. Sin embargo, en los últimos años, las evidencias sugieren que debe considerarse al flagelo como un cilio sensorial capaz de captar alteraciones en el medio extracelular y transmitirlas a la cabeza a través de mensajeros secundarios, pudiendo influir sobre la ocurrencia de la reacción acrosomal (Buffone et al., 2012).

A continuación describiremos los procesos desencadenados como consecuencia de la capacitación: la reacción acrosomal, la quimiotaxis, y la hiperactivación.

Reacción acrosomal:

La reacción acrosomal (RA) es la liberación regulada del contenido acrosomal del espermatozoide (**Figura 9**). Esta liberación ocurre solamente en los espermatozoides capacitados y tiene dos consecuencias principales, que resultan fundamentales para la ocurrencia de la fertilización. Una de ellas, es la exposición de moléculas intraacrosomales que permiten al espermatozoide penetrar la ZP, mientras que la segunda y no menos importante, es la adquisición de la capacidad fusogénica del segmento ecuatorial.



Figura 9: Reacción acrosomal. Microfotografía de un espermatozoide de cobayo sin reaccionar (**A**) y reaccionado (**B**). ac: acrosoma. (**C**) Microfotografía de espermatozoides de hámster. Los dos espermatozoides indicados con una flecha ya han comenzado la RA.

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 (Berger et al., 1988; Bleil and Wassarman, 1983; Cherr et al., 1986; Cross et al., 1988; Florman and Storey, 1982; Florman and First, 1988; O'Rand and Fisher, 1987). 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 fluído folicular que acompaña a las células del cúmulus también tiene la capacidad de inducirla (Parinaud et al., 1992; Blackmore, 1993; Roldan et al., 1994). Se ha postulado un efecto sinérgico entre elementos presentes en el cumulus y la ZP sobre el espermatozoide para completar la reacción (Cherr et al., 1986). Por lo tanto, no existiría en el medio de fertilización un único componente crucial para el desencadenamiento de la RA. Resulta más probable que el espermatozoide capacitado se encontrara listo para sufrir la RA, y que su inducción se produjera a medida que avanza a través de concentraciones crecientes de factores estimulantes, durante su acercamiento al ovocito. Durante la inducción, la entrada de calcio extracelular sería un paso esencial (Yanagimachi, 1994). Al respecto, se demostró que el ionóforo A23187, que provoca la entrada masiva de calcio a la célula, es capaz de inducir este importante proceso. (Green, 1978).



Figura 10: Progresión de la reacción acrosomal. Se muestra un diagrama representando las etapas de la reacción acrosomal en la cabeza del espermatozoide de ratón. mp: membrana plasmática, ma int: membrana acrosomal interna, ma ext: membrana acrosomal externa.

La RA consiste en la vesiculización del capuchón acrosomal del espermatozoide, que ocurre mediante un mecanismo similar al proceso de exocitosis. El proceso comienza con la fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática en múltiples puntos de la región acrosomal, con excepción del segmento ecuatorial. Se denomina *intacto* a aquel acrosoma que no presenta ningún tipo de alteraciones en su morfología, *modificado* a aquel que presenta alteraciones morfológicas tales como hinchamiento o rugosidades, y *reaccionado* a aquel que presenta ya sea vesiculización del acrosoma o pérdida total del capuchón acrosomal (**Figura 10**).

A nivel molecular, la secuencia de eventos que desencadena la RA involucra a múltiples receptores presentes en la membrana plasmática del espermatozoide capacitado, los cuales reconocen a su ligando complementario (entre ellos, ZP3 y progesterona) desencadenando la traducción de señales que produce el aumento del Ca²⁺ intracelular y de otros mensajeros secundarios tales como el AMPc. Como consecuencia de ello se desencadena el aumento del pH intracelular y se dispara la depolimerización de la F-actina, la cual se dispersa y permite el contacto cercano de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios (Figura 11) (Abou-haila and Tulsiani, 2009). Al igual que la fusión de membranas en otros sistemas, como entre vesículas de transporte y la membrana plasmática, la fusión en la RA está mediada por la acción de unas proteínas pertenecientes a la familia SNARE, como Rab3A y NSF (De Blas et al., 2005). En los sitios de fusión, la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa forman vesículas mixtas, que se desprenden en un fenómeno conocido con el nombre de "pérdida del capuchón acrosomal". Entre las vesículas se crean poros por los que se libera el contenido del acrosoma. En este sentido, 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). Al final de la RA, la membrana acrosomal interna se encuentra expuesta al medio extracelular, y adquiere continuidad con la membrana plasmática del segmento ecuatorial (Yanagimachi, 1994).



Figura 11: Modelo ilustrativo de la posible secuencia de eventos que desencadenan la reacción acrosomal.

Tradicionalmente, se pensaba que las enzimas contenidas dentro del acrosoma eran las encargadas de digerir tanto a la matriz extracelular de las células del cúmulus como a la ZP durante la RA, y permitir al espermatozoide abrirse camino hasta el ovocito (Yanagimachi, 1994). Esta hipótesis se vio modificada por evidencias demostrando que, al menos en el ratón, la RA ocurría, principalmente, cuando el espermatozoide contactaba con la ZP (Saling and Storey, 1979; Wassarman et al., 1985), y que los espermatozoides reaccionados eran incapaces de penetrar el cúmulus (Talbot, 1985). En los últimos años, se afirmaba que sólo los espermatozoides intactos eran capaces de unirse a la ZP. De acuerdo a este modelo, una vez unidos a la ZP, los espermatozoides sufrirían la RA, produciéndose la liberación de los contenidos del acrosoma, los cuales serían importantes para la penetración de la ZP. Posteriormente, los Dres. Kim y Gerton (2003) propusieron un nuevo modelo, denominado "de exocitosis acrosomal", en el que replantearon el mecanismo de la RA y el papel de las moléculas acrosomales en la interacción con las cubiertas del ovocito (Kim and Gerton, 2003). Según estos autores, la RA sería un proceso gradual, espontáneo, que sería acelerado por la ZP pero no iniciado por la misma. Según este modelo, 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 en el cúmulus y no sobre la ZP (Jin et al., 2011). Esto fue apoyado con la demostración de que los espermatozoides perivitelinos, ya reaccionados y sin capuchón acrosomal, son capaces de fertilizar ovocitos *in vitro* (Inoue et al., 2011).

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

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 atractantes, producidas por el ovocito o el microambiente. La guimiotaxis espermática hacia factores del ovocito o del tracto reproductor femenino, se ha observado en especies marinas, en anfibios y en mamíferos (Eisenbach and Tur-Kaspa, 1994). Existen evidencias que indican 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. Aunque se desconoce la identidad del (los) atractante(s) presente(s) en el fluido folicular, se ha sugerido como posibles candidatos, al aldehído aromático bourgeonal que activa los receptores olfatorios OR1D2 en el espermatozoide (Spehr et al., 2003);(Gakamsky et al., 2009), a péptidos pequeños de hasta 8 kDa denominados quemoquinas, tales como RANTES, CCL7 (Isobe et al., 2002);(Tamba et al., 2008) y a la hormona esteroidea progesterona (Teves et al.,

2006). 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).

Hiperactivación:

Es un patrón de la motilidad descripto por primera vez en el hámster (Yanagimachi, 1969), que consiste en un movimiento flagelar típico, ampliamente caracterizado, íntimamente relacionado con la capacitación y observado tanto *in vivo*, en el lugar de la fertilización, como *in vitro*, en todas las especies estudiadas (Yanagimachi, 1994). El movimiento hiperactivado se caracteriza por un incremento en la velocidad, una disminución en la linealidad, y un aumento de la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza, sumados a movimientos del flagelo similares a latigazos (Suarez et al., 1991);(Suarez, 1996). El patrón de motilidad durante la hiperactivación es variable en las diferentes especies de mamíferos estudiadas; en algunas de ellas, se observa a la cabeza de los espermatozoides trazar una figura que se asemeja a un ocho durante el estado hiperactivado (Yanagimachi, 1994) **(Figura 12)**.

Se han sugerido varios roles potenciales para este tipo de motilidad. Por un lado, el espermatozoide hiperactivado penetra más eficientemente las sustancias visco elásticas (Suarez, 1996). En ese sentido, hay que considerar que los espermatozoides deben penetrar el medio ambiente viscoso del fluido oviductal y, posteriormente, durante la interacción con el ovocito, deben secuencialmente moverse a través de la matriz extracelular del cúmulus oophorus y la ZP. Por otro lado, la hiperactivación podría ayudar a los espermatozoides a ascender desde el oviducto al sitio de fertilización, permitiéndoles disociarse de la adhesión transitoria que establecen con el epitelio oviductal (Yanagimachi, 1994);(Suarez, 1996). Además, existen funciones tales como aumentar la probabilidad de encuentro entre los espermatozoides y el ovocito dentro de la ampulla (Yanagimachi, 1994), y estar involucrada en el fenómeno de quimiotáxis (Chang and Suarez, 2010) entre otras. La hiperactivación actúa, entonces, como un filtro ya que acceden al sitio de fertilización sólo aquellos espermatozoides que han completado el proceso de capacitación y están hiperactivados.

Si bien se supone que la híperactivación podría estar regulada por factores presentes en el tracto reproductor femenino al momento de la fertilización, aún hoy, no hay consenso respecto a la identidad de dichos factores. Asimismo, la cascada de señales que regulan la hiperactivación tampoco ha sido completamente descripta, aunque se sabe que la alcalinización de los espermatozoides y el Ca²⁺ serían fundamentales para desencadenar dicho proceso. Por otra parte, se han descripto varias enzimas y canales que podrían estar involucradas en este proceso debido a que los ratones mutantes para dichos factores son incapaces de desencadenar el movimiento de la hiperactivación (Ho et al., 2009); (Kota et al., 2010); (Buffone et al., 2012).



Figura 12: Hiperactivación. Se representan los patrones de movimiento de un espermatozoide activado y de uno hiperactivado.

Transporte de gametas

El encuentro entre el espermatozoide y el ovocito podría parecer una simple cuestión de azar, ya que el macho deposita millones de espermatozoides en el hembra. Sin embargo, numerosas evidencias indican la existencia de múltiples mecanismos capaces de regular el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductor femenino. Estos mecanismos aseguran no sólo que la fertilización sea exitosa, sino también que los espermatozoides con una morfología y motilidad normal sean los que, finalmente, logren fertilizar.

Tiempo de vida fértil de las gametas

El tiempo de vida fértil de los espermatozoides varia según las especies, pudiendo permanecer en el tracto reproductor femenino a la espera de la llegada del ovocito por varios días e incluso durante años (Susan S.Suarez, 2006). En el ratón, la fertilización ocurre dentro de las siete horas posteriores al apareo. Sin embargo, los murciélagos se aparean justo antes de que comience el invierno y la fertilización ocurre en la primavera (Krutzsch et al., 1982). Por otra parte, ciertas especies de felinos y
camélidos han logrado minimizar el tiempo de espera de los espermatozoides mediante la ovulación inducida por el coito.

A diferencia de ello, la vida fértil del ovocito es el período posterior a la ovulación, durante el cual el ovocito es capaz de ser fertilizado por un espermatozoide y dar origen a un embrión normal. En general, los ovocitos permanecen fértiles por un período de 24 hs luego de la ovulación (vaca, oveja, cerdo, hombre). Sin embargo, en algunos casos, este período no sobrepasa las 12 hs post-ovulatorias (conejo, rata, hámster, ratón) (Austin, 1970). Si el tiempo transcurrido entre la ovulación y la fertilización es mayor que la vida fértil del ovocito, el desarrollo embrionario puede iniciarse pero, generalmente, resulta anormal y de duración limitada (Austin, 1982). En base a ello, debido a que el tiempo transcurrido desde la ovulación hasta la fertilización es relativamente corto, la mayor consideración respecto a su transporte es la llegada con éxito al sitio de fertilización para evitar embarazos ectópicos (Susan S.Suarez, 2006)

Sitio de deposición del semen

En la mayoría de las especies (humanos, ratón, rata, conejo, entre otras) el sitio de deposición del semen es la vagina. En el momento de la deposición, los espermatozoides son inmótiles, o poseen una motilidad muy reducida, razón por la cual, se asume que los mismos son arrastrados hacia el cérvix como consecuencia de las contracciones musculares del tracto reproductor.

En algunas especies, la deposición ocurre directamente en el útero. Por ejemplo, en el cerdo, el pene tiene forma de sacacorchos y el cuello del útero contiene surcos complementarios. Durante la cópula, el pene encaja en el cuello del útero y pasa un gran volumen de semen (aproximadamente 250 ml) a la cavidad uterina (Hunter, 1981).

Numerosas evidencias indican que los movimientos peristálticos del útero favorecen al proceso de fertilización tanto en las especies con deposición vaginal como en las que tienen deposición uterina (Susan S.Suarez, 2006). Al respecto, en la rata, se ha observado que las contracciones uterinas en las hembras son significativamente menores cuando se colocan en apareo con machos vasectomizadas, sugiriendo que los espermatozoides y/o los componentes del plasma seminal serían capaces de estimular las contracciones (Peitz and Olds-Clarke, 1986). Por otra parte, en el ratón, se ha sugerido que las glándulas sexuales también podrían jugar algún rol en este

proceso ya que la remoción de las vesículas seminales disminuye significativamente la tasa de preñez (Crane and Martin, 1991).

Formación del tapón vaginal

En algunas especies, mientras que la mayoría del semen es transportado hacia el útero, una porción permanece en la vagina donde se coagula para formar el tapón vaginal. Se ha demostrado en la rata, que la ligación de las glándulas que promueven la coagulación no sólo impide la formación del tapón, sino también el trasporte de los espermatozoides al útero (Susan S.Suarez, 2006). Más aún, en los animales KO para una de las proteínas responsables de la formación del tapón (PN-1) no se observan espermatozoides en el útero a los quince minutos posteriores al apareo. Estos animales son sub-fértiles, indicando la importancia de la formación del tapón vaginal en el trasporte de los espermatozoides hacia el útero (Murer et al., 2001).

Mecanismos de defensa contra el ataque inmunológico del tracto reproductor femenino.

El tracto reproductor femenino se encuentra en contacto con el exterior, siendo vulnerable a sufrir infecciones, especialmente en el momento de apareamiento. Por dicha razón, se encuentra equipado con un sistema de defensa antimicrobiana que puede a su vez atacar a los espermatozoides. Para que la fertilización pueda ocurrir, tanto la hembra como el macho han desarrollado mecanismos de protección contra el ataque inmunológico, alguno de los cuales nombraremos a continuación.

pH vaginal:

En la mujer el pH vaginal (normalmente menor a 5) es microbicida para numerosas patógenos de transmisión sexual. En contraste, el pH del plasma seminal oscila entre 6,7 y 7,4 lo cual permite neutralizar el pH vaginal durante el coito y, de esta manera, evitar el daño sobre los espermatozoides.

Respuesta inmune en el cervix:

El cuello del útero es inmunológicamente competente. En conejos y en humanos, la inseminación vaginal estimula la migración de leucocitos, particularmente los neutrófilos y los macrófagos, en el cuello uterino y en la vagina (Pandya and Cohen, 1985). Ciertos estudios han demostrado que los neutrófilos que ingresan al cérvix pueden unirse y fagocitar a los espermatozoides humanos sólo si, por alguna razón anómala, hay anticuerpos anti-espermatozoides en el suero (D'Cruz et al., 1992).

Estas evidencias sugieren que la invasión leucocitaria en el cérvix, inmediatamente después del coito, parecería servir de protección contra los microorganismos que acompañan a los espermatozoides, no siendo una barrera normal para las espermatozoides motiles (Susan S.Suarez, 2006).

Respuesta inmune en el útero:

En la cavidad uterina, como ocurre en la vagina y en el cervix, el coito induce la infiltración leucocitaria (Susan S.Suarez, 2006). Los leucocitos son principalmente neutrófilos y, en diferentes especies (ratón, rata conejo, equinos, etc.) se los ha observado fagocitando espermatozoides. Dicha fagocitosis ocurre varias horas post copula, existiendo la posibilidad de que se encuentre dirigida principalmente hacia los espermatozoides dañados. Sin embargo, se ha observado que los espermatozoides normales también pueden ser atacados, especialmente, en las especies con deposición vaginal donde los espermatozoides, al llegar al útero, han perdido gran parte de la protección otorgada por el plasma seminal. En este sentido, las evidencias indican que el plasma seminal no sólo contiene componentes que cubren a los espermatozoides otorgándoles protección, sino que también es capaz de inhibir las respuestas inmunes (Dostal et al., 1997). Asimismo, la sobrevida de los espermatozoides se ve favorecida por las contracciones miometriales, las cuales permiten el transporte rápido de los espermatozoides a través del útero.

El proceso de fertilización

Interacción espermatozoide-ovocito

Una vez que el espermatozoide logra alcanzar al ovocito, se desencadena el proceso de fertilización, el cual, en mamíferos, ocurre generalmente en la ampulla del oviducto (Figura 13A). En dicho lugar, el ovocito se encuentra rodeado por la ZP y por las células del cumulus. El espermatozoide capacitado deberá atravesar las diferentes envolturas para contactarse y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Dicho proceso involucra interacciones célula-matriz (espermatozoide-*cumulus oophorus* y espermatozoide-ZP) y célula-célula (membranas plasmáticas del espermatozoide y del ovocito), mediadas por moléculas presentes en ambas gametas, y culminar con la fusión de las membranas y la formación de un nuevo individuo (Figura 13B).

En la mayoría de las especies, el espermatozoide, una vez que atraviesa la unión útero-tubaria, se almacena en el isthmus hasta el momento de la ovulación. El epitelio del isthmus genera un microambiente que estabiliza al espermatozoide por un período de tiempo hasta que se desencadena la ovulación. Cuando esta última ocurre, ciertos factores femeninos estimulan la liberación del espermatozoide del reservorio. Este proceso ayuda a reducir el número de espermatozoides disponibles en el sitio de fertilización (la ampulla). Por otra parte, como se mencionó anteriormente, evidencias recientes indican que los CCOs liberan sustancias quimioatractantes que ayudan al espermatozoide a movilizarse hacia la ampulla y localizar su blanco (Ikawa et al., 2010).

Tanto las distintas etapas del proceso de interacción de gametas como así también las moléculas del espermatozoide y del ovocito involucradas serán descriptas con detalle a continuación.



Figura 13: Interacción espermatozoide-ovocito. A. Se muestra un oviducto de ratón. Am: ampulla. Is: isthmus. UTJ: unión útero tubaria. B. Se muestra un esquema representativo de la interacción espermatozoide-ovocito. El espermatozoide sufre el proceso de capacitación a medida que atraviesa el tracto reproductor femenino, lo cual va a permitir que ocurra la RA. Cerca del ovocito, el espermatozoide libera el contenido acrosomal, probablemente estimulado por el cumulus y/o por la ZP, y penetra la ZP. Solamente los espermatozoides reaccionados son capaces de fusionarse con el ovocito. EP: espacio perivitelino.

Penetración del cumulus oophorus

Como se describiera anteriormente, los componentes predominantes de la matriz del cúmulus son el ácido hialurónico y los glicosaminoglicanos que le proveerían a dicha estructura celular las propiedades viscoelásticas que lo caracterízan. Por lo tanto, los espermatozoides que se aproximan al ovocito durante la fertilización deben avanzar a través de la matriz existente entre las células del cúmulus para alcanzar al ovocito (Figura 14).

Aún existe controversia respecto de los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar durante la penetración del cúmulus. Algunas evidencias han sugerido que los espermatozoides poseerían hialuronidasa asociada a la superficie de los mismos y que, esta enzima sería la que ayudaría en el pasaje a través de las células del cúmulus (Talbot, 1985). En este sentido, ha sido descripto 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 (Cherr et al., 1996; Gmachl et al., 1993; Lin et al., 1994). La relevancia de esta proteína para la penetración del cúmulus ha sido replanteada en vista de que los ratones KO 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). En ese trabajo, se reveló la presencia de otra proteína con actividad 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 cual HYAL5 estaría compensando la función de SPAM1 en los animales KO antes descriptos (Kim et al., 2005). Más aún, la reciente generación de ratones doble KO para SPAM1 y las serinproteasas TESP5 o ACR (acrosina) sugieren que ambas proteínas actuarían cooperativamente junto a SPAM1 en la penetración del al cúmulus (Zhou et al., 2012). Por otra parte, el modelo de "exocitosis acrosomal" descripto anteriormente (ver sección Reacción acrosomal) postula que durante el avance de los espermatozoides, se produciría una liberación parcial de enzimas acrosomales, previa a la vesiculización completa del acrosoma, responsable de degradar a la matriz y permitir al espermatozoide avanzar entre las células.

Interacción espermatozoide-ZP

Luego de haber penetrado el *cumulus oophorus*, el espermatozoide se encuentra con la ZP (Figura 14 y 15) a la cual se une por la interacción entre moléculas presentes tanto en la superficie del espermatozoide como en la ZP.





Figura 14: Unión espermatozoide-ovocito en el ratón. A) Microfotografía de espermatozoides unidos a la ZP de un ovocito. B) Fotografía de microscopio electrónico de transmisión de la cabeza de un espermatozoide unido a la ZP de un ovocito. pm: membrana plasmática, ZP: zona pellúcida, n: núcleo, a: acrosoma.

Basándose en evidencias provenientes de estudios en el ratón, se ha propuesto un modelo de adhesión entre el espermatozoide y la ZP que consta de dos etapas (Wassarman, 1988) 1) "unión primaria": interacción del espermatozoide intacto con la ZP, más específicamente con carbohidratos de ZP3, desencadenando así la RA y 2) la "unión secundaria" del espermatozoide reaccionado, a través de ZP2. Sin embargo, este modelo ha sido recientemente cuestionado por experimentos con ratones modificados genéticamente, los cuales poseen una ZP "humanizada", es decir en vez de ZP3 o ZP2 de ratón, estos animales sintetizan a las proteínas homólogas humanas (Rankin et al., 1998);(Rankin et al., 2003). En base a los resultados de estos trabajos, los autores proponen un nuevo modelo de interacción entre el espermatozoide y una estructura supramolecular de la ZP compuesta por ZP2 y ZP3, en vez de la interacción con una única glicoproteína en particular (Rankin et al., 2003); (Hoodbhoy and Dean, 2004). Sin embargo, esta hipótesis ha sido refutada (Nixon et al., 2005); (Wassarman et al., 2005), por lo que parecería ser el modelo original de "unión primaria y secundaria" hasta ahora el más aceptado. De todas maneras, actualmente, existe confusión en lo que respecta a la penetración de la ZP. Como ya se mencionó, mientras algunos trabajos sugieren una unión primaria y secundaria, otros trabajos muestran que sólo el estado de ZP2 sería importante para penetrar la ZP. De esta

manera, una ZP2 clivada impediría el paso de la ZP, mientras que una ZP2 intacta facilitaría el paso a través de la misma (Gahalay et al., 2010).

Por otra parte, existe controversia en cuanto a la identidad del ligando para ZP3 presente en el espermatozoide. Uno de los candidatos más extensamente estudiados ha sido la β1,4-galactosiltransferasa I (GaIT I) (Shur and Hall, 1982);(Lopez and Shur, 1987), aunque su relevancia para la fertilidad ha sido luego replanteada en vista de que los ratones KO para GaT I son fértiles, a pesar de presentar niveles muy bajos tanto de RA inducida por ZP3 como de fertilización de ovocitos in vitro (Lu and Shur, 1997). Otros candidatos alternativos propuestos son sp56 (Bleil and Wassarman, 1990) y zonadhesina (Hardy and Garbers, 1995), sin embargo, debido a su localización intracrosomal (Foster et al., 1997);(Kim et al., 2001);(Bi et al., 2003) existen controversias en cuento a su disponibilidad para interactuar con ZP3. Cabe aclarar que, recientemente, se mostró que zonadhesina si bien participa en la interacción con la ZP, su rol principal sería en la regulación de la especie/especificidad (Tardiff et al., 2010). Según el modelo clásico, no podría actuar en la "unión primaria" ya que el espermatozoide se encontraría intacto al momento de unirse a ZP3, aunque en el modelo de "exocitosis acrosomal" (Kim and Gerton, 2003), las moléculas de la matriz acrosomal podrían asociarse a la ZP. Por otra parte, se ha descripto un cuarto candidato (Ensslin et al., 1998) con su homólogo en ratón, denominado SED1. Estudios con animales KO han demostrado la relevancia de esta proteína para la etapa de unión del espermatozoide a la ZP ya que los ratones machos son subfértiles in vivo e incapaces de unirse a la ZP de ovocitos in vitro (Ensslin and Shur, 2003).

En cuanto a las moléculas del espermatozoide responsables de la "unión secundaria", se han sugerido algunas proteínas tales como SPAM1 (Myles and Primakoff, 1997);(Yudin et al., 1999) y proacrosina/acrosina (Richardson and O'Rand, 1996);(Crosby et al., 1998);(Furlong et al., 2000); (Howes et al., 2001). En lo que respecta 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 Hyal 5 (Kim et al., 2005). Asimismo, se postula que esta proteína, que es liberada durante la RA, podría "depolimerizar" localmente a la matríz del cúmulus cerca o en la superficie de la ZP, permitiendo así que la cola del espermatozoide se mueva libremente facilitando la penetración de la ZP. En el caso de acrosina, estudios con animales KO han replanteado el papel de esta enzima en el proceso de fertilización ya que los machos carentes de esta proteína son fértiles (Baba et al., 1994) a pesar de mostrar un retardo en la fertilización *in vitro* comparado con

animales control (Adham et al., 1997). No obstante, una combinación de estudios posteriores a nivel genético, bioquímico y funcional apoya la hipótesis que la interacción proacrosina/acrosina con ZP2 es importante para la unión del espermatozoide reaccionado a la ZP, postulando la existencia de otras proteasas que pudieran reemplazar a proacrosina/acrosina en esos animales KO (Howes et al., 2001).

La interacción entre el espermatozoide y la ZP continúa con la etapa de penetración de la ZP para la cual se han propuesto 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 la hidrólisis de 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 "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, favorecerían la penetración de la ZP. Esta hipótesis ha sido respaldada fuertemente por las características estructurales y funcionales de la cabeza de los espermatozoides de los mamíferos euterianos, incluyendo la rigidez del núcleo, la forma aplanada de la cabeza, el perfil filoso del perforatorium y la rigidez de la membrana acrosomal interna (Bedford, 2004). Por otra parte, 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 (O'Rand et al., 1986). Se produciría entonces la degradación de las moléculas de la ZP involucradas en esa interacción, dejando libres, 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 recientes que apoyan el modelo de la "exocitosis acrosomal" (ver sección RA) esta teoría no tendría tanto consenso (Jin et al., 2011).

La interacción espermatozoide-ZP es, en general, especie-específica. Esto significa que un espermatozoide es capaz de unirse y penetrar sólo la ZP de un ovocito de la misma especie. Si bien se conoce la existencia de casos de mamíferos híbridos provenientes de dos especies diferentes, en general la reproducción interespecífica no tiene lugar ya sea por mecanismos comportamentales y anatómicos, como por barreras celulares adicionales como la ZP (Hanada and Chang, 1972). Al respecto, en el modelo de animales quiméricos, mencionado anteriormente, donde la ZP2 y la ZP3 del ratón han sido reemplazadas por las proteínas humanas se observó que los ovocitos provenientes de esos animales fueron fertilizados por espermatozoides de ratón y no por los humanos sugiriendo que los oligosacaridos unidos más que la secuencia peptídico en si misma, serían los responsables de la especie especificidad (Rankin et al., 2003). Por otra parte, cada vez existe más consenso 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). Esta remodelación podría ser facilitada por el montaje de un complejo multimérico de reconocimiento de la ZP formado por proteínas, por chaperonas, y "rafts" lipídicos. La formación y el montaje de dicha estructura ocurriría sobre la región dorsal en la cabeza del espermatozoide y, una vez ensamblado, migraría hacia el tip (Reid et al., 2011).

Fusión del espermatozoide con el ovocito

Una vez que el espermatozoide ha atravesado la ZP y el espacio perivitelino, ocurre la fusión entre las membranas plasmáticas del espermatozoide y el ovocito. Sólo luego de la ocurrencia de esta fusión, un ovocito puede considerarse fertilizado. La fusión del espermatozoide con el ovocito comprende dos fases de interacción entre las membranas de ambas gametas: una primera de unión, y una segunda de fusión propiamente dicha. Este proceso comienza con la unión de la cabeza del espermatozoide a la membrana plasmática del ovocito y, luego de un breve período, que varía según la especie, se produce una abrupta declinación o cesación del movimiento de la cola (Gaddum-Rosse, 1985). Finalmente, todo el espermatozoide es gradualmente incorporado al citoplasma del ovocito (Shalgi 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 14**).



Figura 15: Fusión espermatozoide-ovocito. Se muestra un esquema de los eventos involucrados en el proceso de fusión de gametas. A) inicio de la interacción entre el segmento ecuatorial y el oolema, B) fusión de algunos puntos, C) la membrana del ovocito rodea la parte anterior de la cabeza, D) se incorpora el espermatozoide al ooplasma mediante fusión de la parte posterior de cabeza y la cola, y "fagositosis" de la parte anterior. 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 ambas celulas. 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), y a través de la cual, raramente, ocurre la fusión del espermatozoide (Ebensperger and Barros, 1984); (Johnson et al., 1975). Esto podría deberse a que el segundo corpúsculo polar se forma y se libera por esta región luego de la fertilización, resultando "peligroso" que el espermatozoide se fusione y se incorpore por allí ya sea por interferir con la correcta liberación del corpúsculo, o bien por ser eliminado durante el proceso de extrusión. Si bien al asociarse al oolema, el espermatozoide entra en contacto con las microvellosidades, aún no se conoce si las mismas son esenciales para la ocurrencia de la fusión (Bedford and Cooper, 1978). En el caso del espermatozoide, es aceptado que la membrana plasmática que cubre al SE es la que primero se fusiona con el ovocito (Arts et al., 1993);(Yanagimachi, 1988b). La motilidad parecería no ser un requisito absoluto para la ocurrencia de la fusión ya que ha sido demostrado que espermatozoides inmótiles o de muy baja motilidad son capaces de fusionarse con el ovocito. Por el contrario, la RA es un requisito fundamental para la ocurrencia de la fusión ya que, como se mencionó anteriormente, los espermatozoides no

reaccionados (intactos) son incapaces de fusionarse con el oolema (Yanagimachi, 1994).

En cuanto a la especificidad de especie en el proceso de fusión de gametas, la misma es menos restringida que para la penetración de la ZP. La fusión de gametas heterólogas es posible, en algunos casos, pero sólo con gametas provenientes de determinadas especies, y no siempre en ambas direcciones. Como ejemplo, los ovocitos de rata pueden ser penetrados heterólogamente por espermatozoides de ratón, pero los ovocitos de ratón no pueden ser penetrados por espermatozoides de rata (Yanagimachi, 1994).

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., 2002). Asimismo, la importancia de las integrinas para la fusión ha sido replanteada en vista de que un estudio utilizando diferentes combinaciones de animales KO para integrinas y ensayos de fusión in vitro en presencia de anticuerpos, demostró que ninguna de las integrinas conocidas en la superficie del ovocito (integrina $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, αV , $\beta 3$ y $\beta 5$) sería esencial para este proceso (He et al., 2003).

La asociación entre la integrina α 6 β 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 KO para esta proteína (Kaji et al., 2000);(Le Naour et al., 2000);(Miyado et al., 2000), demostrando que las hembras mutantes son estériles y que sus ovocitos, a pesar de unirse a espermatozoides, son incapaces de fusionarse con los mismos. De acuerdo a estos resultados, CD9 sería una de las moléculas del ovocito responsable del proceso

de fusión entre el espermatozoide y el ovocito. Estos estudios fueron los primeros en identificar a una molécula del ovocito esencial para la fertilidad femenina y para la fusión de gametas. Experimentos posteriores demostraron que CD9 actúa en "cis" con otros elementos, aún no identificados, presentes en la membrana del ovocito, funcionando como un organizador de la superficie ovocitaria (Zhu et al., 2002). Estos resultados no descartan la posibilidad de que CD9 pueda también interactuar en "trans" como ligando de una proteína del espermatozoide. Resultados más recientes indicaron que CD9 generaría sitios específicos de adhesión que regularían la fusión espermatozoide-ovocito, acercando y reuniendo a todos los intermediarios de este proceso (Jegou 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 descripto 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). Por otra parte, 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, los estudios se limitan, principalmente, a las proteínas de la familia ADAM, a una proteína descripta denominada "Izumo" y a la proteína epididimaria CRISP1.

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., 2006a), tres de los cuales han sido postulados como mediadores del proceso de fusión espermatozoide-ovocito: fertilina α /ADAM1 (existen 2 subunidades: a y b), fertilina β /ADAM2 y ciritestina/ADAM3 (revisión de trabajos en Evans, 1999). A pesar de que el análisis de la fertilidad de ratones KO deficientes para fertilina α /ADAM1a (sólo presente en células germinales testiculares) ó fertilina β /ADAM2 indicó que los machos son infértiles (Cho et al., 1998);(Nishimura et al., 2004) el fenotipo de los ratones fue inesperado y complejo. En ambos casos, la infertilidad *in vivo* se debió a que los espermatozoides presentaban defectos en el transporte a través del oviducto y en la etapa de unión a la ZP. Los ratones deficientes en fertilina β , además, presentaban una disminución en la capacidad espermática de unirse y fusionarse con el oolema *in vitro* (Nishimura et al., 2001);(Cho et al., 1998). Por otro lado, ratones KO para la otra subunidad α , es decir, ADAM1b resultaron fértiles (Kim et al., 2006a). En

cuanto a ciristestina/ADAM3, los resultados fueron similares a los de fertilina ya que si bien, los estudios previos in vitro (revisión de trabajos Evans, 1999) postulaban a esta proteína como mediadora del proceso de fusión, los ratones macho KO exhibieron una capacidad de fusión normal pero resultaron infértiles debido a una unión deficiente entre los espermatozoides y la ZP (Nishimura et al., 2001);(Shamsadin et al., 1999). Estudios de expresión de proteínas sobre estas cuatro líneas de animales KO indicaron la ausencia de otras proteínas ADAMs en la célula germinal testicular o en el espermatozoide, además de la proteína ADAM que se deseaba anular (Kim et al., 2006a); (Kim et al., 2006b); (Nishimura et al., 2001);(Suzuki et al., 2005). Más aún, animales KO para calmegina, chaperona requerida para el proceso de fertilización (Ikawa et al., 1997);(Ikawa et al., 2010);(Nishimura et al., 2004), presentan el mismo fenotipo que los animales deficientes en ADAM1a, y disminución o ausencia de alguna de estas proteínas ADAMs. Por lo tanto, en base a todos los resultados obtenidos, se concluye que, por lo menos en el ratón, el heterodímero ADAM1b/ADAM2 sería dispensable para el proceso de fertilización, ya sea a nivel de la migración del espermatozoides a través del oviducto, de la unión espermatozoide-ZP o de la fusión espermatozoide-ovocito. Por otro lado, ADAM1a/ADAM2 sería esencial para la correcta localización de ADAM3 en la superficie del espermatozoide, y ADAM3 sería la molécula requerida para la unión espermatozoide-ZP (Stein et al., 2005); (Kim et al., 2006a). Aún no se descarta que otras proteínas ADAMs presentes sobre el espermatozoide estén involucradas en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito (Stein et al., 2004).

En cuanto a la proteína Izumo corresponde a un miembro de expresión testicular de la familia de inmunoglobulinas IgSF localizado en el acrosoma del espermatozoide (Inoue et al., 2005). La relevancia de esta proteína para la fertilidad y su rol en el proceso de fusión fueron confirmados mediante el análisis de los animales KO para Izumo. Los machos mutantes son estériles debido a que tienen comprometida la capacidad fusogénica de sus espermatozoides (Inoue et al., 2005). Asimismo, se observó que, luego de la RA, la proteína Izumo se relocalizaba a la región por la cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito. En este sentido, resultados utilizando ratones KO para Tssk6 (testis-specific serine kinase 6) mostraron que sus espermatozoides eran incapaces de fusionarse con el ovocito debido a que la proteína Izumo no se redistribuía correctamente (Sosnik et al., 2009).

Finalmente, la proteína CRISP1 y su participación en el proceso de fertilización serán desarrolladas en profundidad en una sección posterior de la introducción.

Activación del ovocito:

Luego de la fusión con el espermatozoide, el ovocito inicia una serie de eventos morfológicos y bioquímicos que llevan a la división celular y diferenciación, o sea a la formación de un nuevo individuo. A este reinicio de la actividad del ovocito se lo denomina activación. Unos segundos luego de que la fusión ha ocurrido se produce un aumento transitorio de los niveles de Ca²⁺ citoplasmático en el ovocito (Yanagimachi, 1994). Los indicadores más visibles de la activación son la exocitosis de los gránulos corticales y el reinicio de la meiosis.

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 han sido expulsados por exocitosis (Ducibella, 1991);(Hoodbhoy and Talbot, 1994). Su función es modificar la ZP, como así también el oolema de forma tal de prevenir la polispermia.

Luego de la fusión se reinicia la meiosis, razón por la cual es liberado el segundo corpúsculo polar y el complemento haploide resultante se transforma en el pronúcleo femenino. En tanto, el núcleo del espermatozoide se decondensa y se transforma en el pronúcleo masculino. En ambos pronúcleos comienza la síntesis de ADN. Una vez que los pronúcleos han completado su desarrollo, migran al centro del ovocito (Figura 16), sus envolturas nucleares se desintegran y los cromosomas se unen (singamia) para dar lugar a la primera división mitótica.



Figura 16: Ovocito fertilizado. Microfotografía de un ovocito humano ya fertilizado. Obsérvese los dos pronúcleos en el centro del ovocito conteniendo varios nucleolos cada uno.

Familia de proteínas CRISP (Cysteine-RIch Secretory Proteins)

Como se mencionara anteriormente, una de las proteínas propuestas como mediadoras del proceso de fertilización es la proteína epididimaria CRISP1, identificada por nuestro grupo en la rata (Cameo and Blaquier, 1976) y primer miembro descripto de la familia de proteínas CRISP.

Las CRISP (Cysteine-RIch Secretory Proteins), como su nombre lo indica, son proteínas secretorias ricas en cisteínas que se caracterizan por tener 16 cisteínas conservadas, 10 de las cuales se encuentran en el dominio C-terminal de la molécula (Gibbs et al., 2008). Estudios de cristalografía indican que todos los miembros de la familia presentan una estructura general caracterizada por la presencia de dos dominios definidos: el N-terminal llamado Pathogenesis Related 1 (PR-1) o dominio CAP de aproximadamente 21 kDa y el C-terminal, que recibe el nombre de Cysteine Rich Domain (CRD) o dominio CRISP, de aproximadamente 6 kDa (Guo et al., 2005; Gibbs et al., 2006) (Gibbs et al., 2008). El CRD, a su vez, está compuesto por dos regiones el Hinge y el ICR. De acuerdo a las evidencias obtenidas hasta el momento, se ha sugerido que cada uno de estos dominios tendría funciones biológicas independientes. Mientras se ha encontrado que el dominio CRD de varias proteínas CRISP, a través de su región ICR, presenta la capacidad de regular canales iónicos (Guo et al., 2005);(Gibbs et al., 2006);(Gibbs et al., 2011), resultados de nuestro laboratorio 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). Por otra parte, el dominio CRD se conecta a través del Hinge con el PR-1, no existiendo ningún contacto ente el PR-1 y el ICR (Gibbs et al., 2008) (Figura 17).



Figura 17: Representación esquemática de los dominios estructurales de las proteínas de la familia CRISP y su relación con las funciones propuestas.

En mamíferos, se han caracterizado cuatro miembros: CRISP1 de expresión mayormente epididimaria, la proteína CRISP2, sintetizada casi exclusivamente en el testículo (Hardy et al., 1988); (Kasahara et al., 1989), la proteína CRISP3, con una distribución más amplia que incluye órganos reproductivos y no reproductivos (Haendler et al., 1993); (Kjeldsen et al., 1996);(Udby et al., 2005a), y la proteína CRISP4, expresada casi exclusivamente en el epidídimo (Jalkanen et al., 2005); (Nolan et al., 2006). En la **Figura 18** se muestra una comparación de los porcentajes de identidad y similitud entre las proteínas CRISP identificadas en diferentes especies de mamíferos, como así también la relación filogenética entre las mismas. Asimismo, se ha descripto la existencia de otros miembros de la familia CRISP 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).

Existen además, proteínas en especies más alejadas evolutivamente que poseen similitud con las proteínas CRISP en el extremo N-terminal y que tienen incompleto o carecen totalmente del dominio C-terminal rico en cisteínas. Entre ellas, se encuentran los alergenos de insectos Ag5 (Antigen 5), proteínas muy abundantes e inmunogénicas de los venenos de insectos, y las proteínas de plantas PR-1 (Pathogenesis-Related-1), altamente expresadas en respuesta a la invasión de patógenos (Fernandez et al., 1997);(Henriksen et al., 2001). Por su parte, en mamíferos, también se describieron proteínas con homología en el dominio N-terminal pertenecientes a la familia GLIPR1 (glioma PR-1) y a la familia GAPR1 (Golgiassociated PR-1) (Gibbs et al., 2008). En su conjunto, todas las proteínas denominada superfamilia mencionadas componen la de proteínas CAP (CRISP/Aq5/PR-1). Si bien existen numerosos miembros de esta superfamilia expresados en diversos sistemas y organismos, muy pocos han sido estudiados en relación a su función biológica. En este sentido, nuestro laboratorio ha llevado a cabo numerosos estudios para determinar la función de las proteínas CRISP1 y CRISP2 durante el proceso de fertilización en distintas especies (revisión de trabajos en Cohen et al., 2008).

Δ		% IDENTIDAD									
~		CRISP1			CRISP2			CRISP3		CRISP4	
		humano	ratón	rata	humano	ratón	rata	humano	raton	ratón	rata
CRISP1	humano	ļ į	40,2	38,6	43,8	40,0	39,6	41,4	36,8	60,8	61,4
	ratón	50,6		69,9	56,7	54,3	53,1	55,1	75,0	42,1	40,6
	rata	50,2	79,3		52,6	54,7	55,5	54,7	59,6	41,6	38,2
CRISP2	humano	53,4	64,9	65,2		68,9	66,4	69,8	45,8	40,8	41,3
	ratón	50,8	63,7	65,6	78,7		85,6	58,8	45,4	38,4	37,8
	rata	50,8	62,9	64,4	76,6	90,5		61,2	45,8	38,8	37,8
CRISP3	humano	49,4	64,9	65,6	75,9	69,0	70,2		47,4	44,0	42,9
	ratón	45,8	77,4	66,0	55,4	55,8	55,0	57,0		36,2	34,9
CRISP4	ratón	71,6	50,8	51,6	48,8	48,4	49,6	51,6	44,9		87,8
	rata	68,9	50,4	48,8	48,0	46,1	47,6	56,0	42,6	91,3	
			% SIMILITUD								

В





Proteína CRISP1

Como se mencionara anteriormente, la proteína CRISP1 (32 kDa) de rata ha sido identificada, caracterizada y purificada en nuestro laboratorio (Cameo and Blaquier, 1976; Garberi et al., 1979; Garberi et al., 1982). CRISP1, es una de las principales glicoproteínas secretadas por el epidídimo de rata, especie en la cual se sintetiza en

forma andrógeno-dependiente (Kohane et al., 1983) y se asocia a los espermatozoides a medida que los mismos transitan por el epidídimo (Kohane et al., 1980b; Kohane et al., 1980a). Resultados posteriores indicaron la existencia de dos poblaciones asociadas a la superficie del espermatozoide con afinidades diferentes: una población mayoritaria que se asocia en forma débil, y una fracción minoritaria que se asocia con alta afinidad (Cohen et al., 2000b). Recientes resultados de nuestro grupo permitieron esclarecer los mecanismos por los cuales las dos poblaciones de CRISP1 se asociarían a la membrana del espermatozoide durante la maduración epididimaria. Tal como se muestra en el Figura 19, en el caput epididimario, la proteína CRISP1 fuertemente unida a los espermatozoides provendría de la trasferencia de la misma desde los epididimosomas (unas vesículas presentes en el fluido epididimario) (A) (Maldera et al, en preparación). A medida que transitan por el epididimo, los espermatozoides se expondrían a concentraciones cada vez mayores de CRISP1, la cual se uniría débilmente a la gameta por un mecanismo que involucra la formación de complejos entre la proteína y el zinc (B) (Maldera et al., 2011). De esta manera, el espermatozoide maduro presentaría ambas poblaciones de CRISP1 en su superficie (C).



maduración epididimaria



Figura 19: Mecanismos involucrados en la asociación de las dos poblaciones de CRISP1 al espermatozoide durante la maduración epididimaria.

Durante la incubación de espermatozoides en condiciones capacitantes, se produce la liberación de una gran cantidad de CRISP1 (Kohane et al., 1980b);(Cohen et al., 2000b), lo cual sugiere que esta proteína podría actuar como un factor decapacitante. En este sentido, Roberts y colaboradores (Roberts et al., 2003a) han descripto que espermatozoides de rata capacitados en presencia de CRISP1 presentan una inhibición tanto en la fosforilación de proteínas en residuos tirosina como en la ocurrencia de la RA inducida por progesterona, ambos fenómenos asociados con la capacitación.

Si bien CRISP1 se libera durante la capacitación, estudios de microscopia electrónica detectaron la permanencia de la misma en espermatozoides reaccionados (Cameo et al., 1986). Posteriormente, se observó que, luego de la capacitación tanto in vitro como in vivo, la proteína CRISP1 migraba de la región dorsal de la cabeza del espermatozoide hacia el segmento ecuatorial, (Rochwerger and Cuasnicu, 1992) (Figura 20A). Considerando que sólo las proteínas que permanecen en el espermatozoide luego de la capacitación y/o RA pueden estar involucradas en la interacción con el ovocito, en nuestro laboratorio se realizaron diversos estudios con el fin de investigar la posible participación de CRISP1 en la interacción de gametas. La exposición de espermatozoides de rata a anticuerpos anti-CRISP1 previo a la inseminación intrauterina produjo una disminución significativa en los porcentajes de ovocitos fertilizados (Cuasnicu et al., 1984). Este resultado constituyó la primera evidencia de la posible participación de CRISP1 en el proceso de fertilización. Estudios posteriores demostraron que la presencia de CRISP1 purificada durante la coincubación de espermatozoides y ovocitos de rata sin ZP provocaba una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados. La presencia de CRISP1 no afectó, sin embargo, la unión inicial de los espermatozoides al oolema, indicando que la proteína participaría en un evento posterior a la unión de las gametas y conducente a la fusión de las membranas (Rochwerger and Cuasnicu, 1992). Estos resultados sugerían la existencia de sitios de unión para CRISP1 en la membrana del ovocito, los cuales fueron detectados mediante experimentos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en toda la superficie del ovocito, exceptuando un área negativa correspondiente a la membrana plasmática que recubre el huso meiótico (Rochwerger and Cuasnicu, 1992) por el cual, raramente, ocurre la fusión (Figura 20B).



Figura 20: Localización de la proteína CRISP1 sobre el espermatozoide y de sus sitios complementarios en el ovocito. A. Esquema de la cabeza de un espermatozoide de rata en donde se distinguen la región dorsal (RD) y el segmento ecuatorial (SE) (a). Microfotografía de la cabeza de un espermatozoide de rata con marca fluorescente para CRISP1 en la región dorsal (b), y el segmento ecuatorial (c). **B.** Microfotografías de un ovocito de rata sin ZP con marca fluorescente correspondiente a los sitios de unión para CRISP1. Se muestran dos planos focales del mismo ovocito. La flecha indica el área negativa.

Estudios posteriores utilizando la proteína CRISP1 nativa deglicosilada, la proteína recombinante expresada en un sistema procariótico y una serie de fragmentos recombinantes, indicaron no sólo que los carbohidratos no serían esenciales para la el rol de la proteína en fusión (Ellerman et al., 2002) sino también que la región comprendida entre los aminoácidos 114-158 del dominio PR-1 mantendría la actividad biológica de la proteína completa. Un hallazgo muy interesante fue el hecho de que esta secuencia de 45 aminoácidos contuviera los dos motivos característicos de la familia CRISP, denominados Signature 1 y Signature 2 (Tabla 1). El uso de péptidos sintéticos correspondientes a estos dominios (P1 y P2, respectivamente) en ensayos de IFI y de fertilización in vitro indicó que P2, pero no así P1, era capaz de unirse a la superficie del ovocito e interferir con la fusión de gametas. En conjunto, estos resultados indicaron que CRISP1 se uniría al ovocito a través de una región de 12 aminoácidos altamente conservada de la familia CRISP, correspondiente al Signature 2 (Ellerman et al., 2006). Según nuestro conocimiento, ésta fue la primera vez que se describió un rol funcional para un motivo de la familia CRISP, y que se logró delimitar la actividad de una proteína CRISP a una región tan pequeña.

	Signature 1	Signature 2
RnCRISP1	GHYTQVWNST	FYVCHYCPGGNY
MmCRISP1	GHYTOVWNST	YYVCHYCPVGNY
HSCRISP1	DHYTQIVWATS	LYVCHYCHEGND
RnCRISP2	GHYTQLVWYSS	FYVCHYCPMGNN
MmCRISP2	GHYTQLVWYSS	FYVCHYCPMGNN
HsCRISP2	GHYTQLVWYST	Y YVC QYCPAGNN
MmCRISP3	GHHTQVWKSN	FYVCRYCPVLNY
HSCRISP3	GHYTQVWYSS	YYVCQYCPAGNW
RnCRISP4	YHYTOMVWAPS	LYVCHYCHEGNS
MmCRISP4	DHYTOMVWAST	LYVCHYCHEGNH

Tabla 1: Signatures 1 y 2 de la familia de proteínas CRISP. Se muestran las secuencias de los *Signatures* de las proteínas CRISP1, CRISP2, CRISP3 y CRISP4 de rata (*R. norvegicus*), ratón (*M. musculus*) y humano (*H. sapiens*). Nótese los aminoácidos idénticos en todas las secuencia (gris oscuro) y conservados en al menos el 50 % de las secuencias (gris claro)

Por otra parte, la proteína CRISP1 de rata presenta alta homología con la proteína AEG/CRISP1 de ratón (70%) (Mizuki and Kasahara, 1992); (Haendler et al., 1993) y con una proteína humana denominada ARP o hCRISP1 (Kratzschmar et al., 1996); (Hayashi et al., 1996) Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que ambas proteínas se encuentran presentes en la superficie del espermatozoide y también participan en el proceso de fusión espermatozoide-ovocito. Más aún, ensayos de IFI mostraron la existencia de sitios complementarios para las proteínas en la región fusogénica de los correspondientes ovocitos, tal como previamente se había observado para la rata (Cohen et al., 2000a);(Cohen et al., 2001).

Más allá de la participación de CRISP1 en la etapa de fusión de gametas, estudios posteriores realizados, tanto en rata como en ratón, demostraron que la co-incubación de espermatozoides y ovocitos rodeados de ZP en presencia ya sea de anti-CRISP1 o de proteína CRISP1 nativa, producía una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos fertilizados (Busso et al., 2007a). Ensayos posteriores en los cuales se evaluó el efecto de anti-CRISP1 y CRISP1 en el número de espermatozoides unidos por ovocito, indicaron que la proteína participaría en el paso inicial de unión del espermatozoide a la ZP. Por otro lado, si bien la presencia de la proteína CRISP1 recombinante también inhibió significativamente la fertilización, en este caso se produjo un aumento en el número de espermatozoides perivitelinos, indicando que

existía un bloqueo a nivel del oolema sin efectos sobre la etapa de interacción con la ZP. Ensayos de IFI indicaron que mientras CRISP1 nativa era capaz de unirse al oolema y a la ZP (Figura 21), la proteína recombinante sólo se unía al oolema, sugiriendo que la glicosilación y/o la conformación de CRISP1 serían importantes para su unión a ZP. En conjunto, estos resultados indicaron que CRISP1 cumpliría una doble función en la interacción de gametas, participando tanto en la etapa de fusión como de la interacción espermatozoide-ZP (Busso et al., 2007a). Es importante destacar que resultados aún no publicados de nuestro laboratorio sugirieren que hCRISP1 también participaría en la etapa de interacción del espermatozoide con la ZP (Maldera et al, en preparación).

Además de su participación en el proceso de fertilización, CRISP1 resultó relevante para la fertilidad a juzgar por experimentos indicando que la inmunización activa de ratas hembras y machos con CRISP1 era capaz de producir anticuerpos específicos contra la proteína como así también, una inhibición significativa de la fertilidad en ambos sexos (Cuasnicú et al., 1990);(Perez Martinez et al., 1995). Estudios posteriores indicaron que dicho efecto ocurriría a través de un mecanismo específico que involucra la entrada de los anticuerpos al tracto reproductivo, su asociación a los espermatozoides, y la posterior inhibición de su capacidad fertilizante sin provocar efectos patológicos (Ellerman et al., 1998). Posteriormente, se demostró que la proteína CRISP1 recombinante también era capaz de generar una respuesta inmune en ratas tanto machos como hembras, resultando en una disminución significativa en la fertilidad de los animales (Ellerman et al., 2008). Estos resultados, confirmaron la relevancia de CRISP1 para la fertilidad de un individuo como así también, el potencial uso de esta proteína para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad. En este sentido, recientemente, hemos evaluado si la inmunización con la proteína humana recombinante generaba una respuesta inmune específica en primates no humanos. Los resultados indicaron que la inmunización de monos hembra y macho (M.fascicularis) con hCRISP1 produjo una respuesta inmune específica en ambos sexos. Los sueros inmunes fueron capaces de reconocer a la proteína nativa de mono (mARP) tanto en extractos de espermatozoides de mono, por Western Blot, como sobre espermatozoides frescos, por IFI. Además, ensavos de ELISA e IFI indicaron que los anticuerpos anti-hCRISP1 no sólo se encontraban presentes en el plasma seminal sino que también se encontraban unidos a los espermatozoides provenientes de animales inmunizados con hCRISP1, sin observarse efectos sobre el número, morfología y motilidad de dichos espermatozoides, excluyendo así posibles efectos deletéreos de la inmunización (Ellerman et al., 2010). Estos resultados sugieren que

los anticuerpos anti-hCRISP1 estarían involucrados en inmunoinfertilidad abriendo la posibilidad de utilizar a la proteína hCRISP1 para el desarrollo de métodos de regulación y diagnóstico de la fertilidad.



Figura 21: Localización de los sitios complementarios a CRISP1 en el ovocito. Microfotografías de un ovocito de ratón con ZP con marca fluorescente correspondiente a los sitios de unión de CRISP1 nativa (A y B) y de CRISP1 recombinante (C y D) tanto en la ZP (punta de flecha) como en el oolema (flecha).

Con el fin de investigar más profundamente la relevancia de CRISP1 para la fertilidad, en el laboratorio se generó una línea de ratones KO para dicha proteína. La estrategia utilizada para obtener esta línea murina fue interrumpir el gen correspondiente a CRISP1 en el genoma de células embrionarias totipotenciales (embryonic stem cells: células ES) de ratón de la cepa 129/SvEv mediante recombinación homóloga. Posteriormente, aquellos clones en los cuales había ocurrido una correcta recombinación, fueron microinyectados en blastocistos de ratón C57BL/6. El siguiente paso consistió en obtener ratones quimeras con la mutación en la línea germinal, los cuales dieron origen a los animales heterocigotas (HT: *Crisp1*^{+/-}). A continuación ratones hembras y machos *Crisp1*^{+/-} fueron puestos en apareo a fin de obtener los animales homocigotos para la mutación (KO: *Crisp^{-/-}*). De esta manera, y por sucesivos apareos, se logró establecer una colonia de animales *Crisp1*^{-/-} "exocriada" con un fondo genético mixto (129/SvEvxC57B/6). Estos fueron los primeros animales KO producidos para una proteína de la familia CRISP.

El fenotipo de los animales carentes de CRISP1 mostró que los mismos eran normales en cuanto a su viabilidad y crecimiento y no presentaban diferencias en su fertilidad respecto a los animales control. Sin embargo, el análisis de diversos parámetros funcionales de los espermatozoides reveló que si bien los mismos presentaban una motilidad, viabilidad y reacción acrosomal normal, exhibían una marcada disminución en el nivel de fosforilación de proteínas en tirosina, evento clave dentro del proceso de capacitación (Da Ros et al., 2008).

En relación a la capacidad fertilizante, se observó que los espermatozoides de los animales carentes de CRISP1 fueron capaces de fertilizar in vitro un porcentaje de ovocitos similar al de los espermatozoides control cuando los ovocitos se encontraban rodeados de células de cúmulus. Sin embargo, al remover estas células, los espermatozoides KO mostraron una capacidad fertilizante significativamente menor que los controles, sin acumulación de espermatozoides en el espacio perivitelino, apoyando la participación de CRISP1 en la interacción espermatozoide-ZP. Más aún, en concordancia con el rol propuesto para la proteína en la etapa de fusión de gametas, los ensayos de fertilización in vitro utilizando ovocitos sin ZP mostraron una disminución significativa en la capacidad fusogénica de los espermatozoides mutantes (Da Ros et al., 2008). Para explorar la posibilidad de que otras proteínas CRISP estuvieran compensando la ausencia de CRISP1, se investigó el efecto inhibitorio in vitro tanto de la proteína CRISP1 de rata como de otras proteínas CRISP en la capacidad fusogénica de espermatozoides Crisp1^{-/-}. La idea de estos experimentos radicaba en que, si la presencia de la proteína CRISP1 inhibía aún más la capacidad fusogénica del espermatozoide KO, dicho espermatozoide se estaría uniendo, probablemente, al mismo sitio complementario de CRISP1 en el oolema, pero a través de otra proteína del espermatozoide. El hallazgo de que las proteínas CRISP1 y CRISP2 pero no así la proteína hCRISP1, redujeran significativamente la penetración de ovocitos sin ZP, apoyó la idea de que otra proteína homóloga a CRISP1, y con un S2 muy similar (Ver Tabla 1), estaría involucrada en la fusión de gametas. Si bien la falta de efecto sobre la fertilidad podría deberse a una compensación por otras proteínas, relacionadas o no con la familia CRISP, existen varios trabajos en los cuales se ha observado que una mutación puede producir fenotipos marcadamente diferentes dependiendo del fondo genético de los animales (Erickson, 1996). Un ejemplo de ello, es el caso de CD81, tetraspanina esencial para la fertilidad de hembras C57BL/6 ó BALB/c pero dispensable en los ratones híbridos originales (Muller, 1999) (Maecker and Levy, 1997); (Rubinstein et al., 2006). Por otra parte, los animales KO generados en un fondo genético mixto para GPR56, un receptor acoplado a proteína G, resultaron totalmente fértiles. Sin embargo, luego de ser retrocruzados al fondo genético de la cepa C57BL/6 fueron incapaces de producir descendencia debido a un defecto en la formación de los túbulos seminíferos (Chen et al., 2010). Asimismo, se ha descripto que ciertos factores génicos presentes en algunas cepas de ratones podrían compensar parcialmente la función de la proteína mutada (Rozmahel et al., 1996). Estas evidencias abren la posibilidad de que la ausencia de CRISP1 en animales con diferente fondo genético genere un fenotipo diferente.

Proteína CRISP2

En al año 1987, se reportó la identificación de una secuencia en el cromosoma 17 de ratón, de expresión testicular (Kasahara et al., 1987), cuyo producto resultó tener una alta homología (67%) con la proteína de rata CRISP1 (Kasahara et al., 1989). La secuencia codificante predecía una proteína secretoria rica en residuos cisteína en su porción C-terminal, a la que se denominó Testicular Protein 1 (Tpx-1). Dada la similitud de Tpx-1 con CRISP1, posteriormente se propuso denominarla CRISP2 (Haendler et al., 1993). A lo largo de los años, la proteína ha sido identificada en varias especies diferentes con un alto grado de conservación de secuencia aminoacídica entre ellas (ver Figura 18B). Más aún, se ha demostrado que CRISP2 es la única CRISP que se expresa, mayoritariamente, en el testículo, no está glicosilada y cuya expresión no se encuentra regulada por andrógenos (Gibbs et al., 2008).

Casi en forma simultánea a la identificación del gen para CRISP2, se identificó a una proteína en cobayo que, posteriormente, resultó corresponder al homólogo de CRISP2 en esa especie (Hardy et al., 1988; Foster and Gerton, 1996; Kasahara et al., 1989). Los resultados de ese trabajo postulaban que dicha proteína, denominada AA1 (autoantigen 1) (25 kDa), se encontraba localizada en el acrosoma y estaba involucrada en la aparición de auto-anticuerpos contra el espermatozoide en un modelo de orquitis experimental, por lo que se postuló que, la misma sería un agente causante de orguitis autoinmune (Hardy et al., 1988; Foster and Gerton, 1996). Si bien los autores reportaron que la presencia de anticuerpos anti-AA1 no afectaba los porcentajes de fertilización in vitro de cobayo, se sugirió que la especificidad y abundancia de AA1 indicaban que la proteína debería ser funcionalmente importante para el espermatozoide. En un trabajo posterior, se confirmó, por microscopía electrónica, la localización de AA1 en el interior del acrosoma del espermatozoide maduro de cobayo (Hardy et al., 1991). Como fuera mencionado anteriormente, casi diez años después del primer trabajo en el que se describe a AA1, su clonado y secuenciación permitieron determinar que la misma correspondía al homólogo de la proteína testicular CRISP2 cuyo gen había sido ya descripto en ratón y humano

(Foster and Gerton, 1996; Kasahara et al., 1989). En ese trabajo, además de mostrar que AA1 correspondía a CRISP2 de cobayo, se determinó su expresión en células espermatogénicas haploides (Foster and Gerton, 1996; Hardy et al., 1988).

Aproximadamente en la misma época que se postulaba a CRISP2 como uno de los componentes mayoritarios del acrosoma en el cobayo, un trabajo proveniente de otro laboratorio la proponía como una de las proteínas estructurales de las fibras densas de la cola en la rata (O'Bryan et al., 1998). En ese trabajo, se aisló a CRISP2 de una biblioteca de expresión de testículo de rata mediante un anticuerpo generado contra proteínas totales de las fibras densas, por lo que se propuso que la misma correspondería a una de las proteínas mayoritarias de dicha estructura. En un trabajo publicado posteriormente, los mismos autores detectaron a CRISP2 en el acrosoma y la cola de rata por microscopía electrónica, y sugirieron que la proteína podría estar involucrada en la conformación y la función de ambas estructuras (O'Bryan et al., 2001a). Por otra parte, CRISP2 fue localizada en la superficie de las células espermatogénicas en el testículo (Maeda et al., 1998). Dichas evidencias provinieron de un estudio desarrollado para identificar proteínas de las células espermatogénicas que participaban de la interacción con las células de Sertoli. Con ese fin, células Jurkat fueron transfectadas con una biblioteca de ADNc de células espermatogénicas, y luego co-cultivadas in vitro con células de Sertoli. Posteriormente, aquellas colonias que adquirían la capacidad de asociarse a células de Sertoli se seleccionaron y los plásmidos en las mismas fueron recuperados para su secuenciación. Entre los clones secuenciados, se identificó una secuencia altamente homóloga a CRISP2. El anticuerpo específico contra la proteína recombinante expresada a partir de la secuencia identificada, inhibió la asociación de células espermatogénicas con células de Sertoli in vitro. En un trabajo posterior del mismo grupo, se determinó que CRISP2 sería secretada al medio de cultivo tanto por las células Jurkat transfectadas como por las células espermatogénicas (Maeda et al, 1999). Tomando en cuenta estos resultados y la participación de CRISP2 en la adhesión a las células de Sertoli, los autores postularon que la proteína se encontraría localizada en la superficie de las células espermatogénicas.

Experimentos de hibridización *in situ en* ratón, determinaron que CRISP2 se expresaba, al igual que en el cobayo, en células espermatogénicas haploides (Mizuki et al., 1992). Los autores de ese trabajo sugirieron que CRISP2 se encontraba localizada en el acrosoma ya que, si bien la proteína tenía un péptido señal, característico de las proteínas secretorias, el hecho de que se expresara en células

61

incapaces de realizar procesos secretorios como son las espermátides, indicaba que la misma sería transportada a la vesícula acrosomal en ese tipo celular.

Muchos años después, se demostró que la región ICR del dominio CRD de la proteína CRISP2 recombinante era capaz de regular el flujo del Ca²⁺ a través de los canales rianodínicos (Gibbs et al., 2006) en forma análoga a otras CRISP aisladas del veneno de ciertos reptiles (Yamazaki and Morita, 2004). El mismo grupo en los últimos años, ha descripto varias proteínas capaces de interactuar con CRISP2 en diferentes compartimentos del espermatozoide, entre las cuales se encuentran SHTAP (sperm head and tail associated protein), MAP311 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 11) y GGN1 (gametogenetin 1) (Gibbs et al., 2007; Jamsai et al., 2008; Jamsai et al., 2010). Si bien se ha demostrado que la unión de CRISP2 a estos ligandos es estabilizada por la región denominada Hinge del dominio CRD, hasta el momento se desconoce la relevancia de dichas interacciones.

A lo largo de los últimos años, nuestro grupo ha realizado diversos estudios con el fin de investigar la posible participación de CRISP2 en la interacción de gametas. Mediante ensayos de extracción proteica y de inmunofluorescencia indirecta, observamos que tanto en el ratón como en el humano, CRISP2 es una proteína acrosomal que se mantiene asociada el espermatozoide luego de la RA (Figura 22A). Asimismo, hemos demostrado que la presencia de anticuerpos anti-CRISP2 durante la co-incubación de espermatozoides y ovocitos de ratón con ZP, provocaba una disminución significativa del porcentaje de ovocitos penetrados con un aumento en el número de espermatozoides perivitelinos, sugiriendo que CRISP2 participaría en la etapa de fusión de gametas en el ratón pero no así en la etapa previa de interacción con la ZP. En concordancia con dicho resultado, la proteína CRISP2 recombinante purificada es capaz de unirse específicamente al oolema de los ovocitos de ratón (Figura 22B) (Busso et al., 2007b). En el caso de CRISP2 humana, observamos que anticuerpos específicos contra la proteína eran capaces de inhibir los significativamente la penetración de ovocitos de hámster por espermatozoides humanos (Busso et al., 2005).

La localización similar para los sitios de unión de CRISP1 y CRISP2 en la superficie de los ovocitos de roedor nos llevó a estudiar si cada proteína tenía un sitio de unión particular o si ambas proteínas del espermatozoide compartían un único sitio en el oolema. Los resultados de nuestros ensayos indicaron que, en condiciones *in vitro*, CRISP1 y CRISP2 compiten por los mismos sitios en el ovocito, (Busso et al., 2007b). Si bien estos resultados podrían deberse a la utilización de las proteínas en solución,

lo cual tal vez no refleje la situación real de cada proteína sobre el espermatozoide en cuanto a cantidad, localización y afinidad por el sitio, también abren la posibilidad de que la unión de CRISP1 y CRISP2 al mismo receptor tenga una relevancia fisiológica para la fusión. En este sentido, la comparación de las secuencias de CRISP1 y CRISP2 reveló que estas proteínas comparten 10 de los 12 aminoácidos del S2, dominio en el que, según nuestros resultados, se encontraría el sitio activo de CRISP1 para su rol en fusión (Ellerman et al., 2006) (ver Tabla 1). Más aún, como se mencionara anteriormente, los estudios de fertilización in vitro realizados en el modelo de animales KO para CRISP1 mostraron que la presencia de CRISP2 durante la coincubación de gametas disminuye significativamente la penetración de ovocitos sin ZP por espermatozoides Crisp1^{-/-} (Da Ros et al., 2008). A diferencia de ello, la presencia de la proteína hCRISP1, la cual posee un S2 con 4 aminoácidos distintos a los de CRISP1 de ratón, no afecta el porcentaje de fertilización logrado por los espermatozoides KO, apoyando la idea de que una proteína con un S2 similar al de CRISP1 estaría compensando la ausencia de CRISP1 en el animal KO. En el caso de la rata, los estudios realizados utilizando la proteína recombinante de ratón indicaron que CRISP2 es capaz de unirse al oolema de ovocitos de rata, y que esa asociación sería funcional ya que fue capaz de impedir la fusión de los espermatozoides a los ovocitos (Dra. Dolores Busso, Tesis Doctoral 2005).



Figura 22: Localización de la proteína CRISP2 en los espermatozoides y de sus sitios complementarios en el ovocito. A. Microfotografía de la cabeza de un espermatozoide humano con marca fluorescente para CRISP2 en la región acrosomal de un espermatozoide fresco (panel izquierdo), y en el segmento ecuatorial de un espermatozoide reaccionado (panel derecho). B. Microfotografías de campo claro (panel izquierdo) y de fluorescencia (panel derecho) de un ovocito de ratón con ZP con marca fluorescente correspondiente a los sitios de unión de CRISP2 en el oolema.

Más allá de su participación en la interacción de gametas, CRISP2 parecería ser relevante para la fertilidad de un individuo a juzgar por el hecho de que se ha encontrado una relación entre los niveles de expresión de CRISP2, su localización y la infertilidad masculina (Du et al., 2006). De acuerdo con dicha observación, recientemente, se han observado menores niveles de expresión del mensajero y de la proteína CRISP2 en pacientes con astenozoospermia, sugiriendo que la modificación en la expresión de esta proteína podría estar relacionada con la disminución en la motilidad de los espermatozoides observada en estos pacientes (Jing et al., 2011). Más aún, se han detectado anticuerpos anti-CRISP2 en pacientes inmuno-infértiles con anticuerpos anti-espermatozoides en el plasma seminal. (Domagala et al., 2007). En conjunto, estas observaciones en el humano abren la posibilidad de que CRISP2 represente un potencial blanco para el desarrollo de métodos para la regulación y de diagnóstico de la fertilidad.

Proteína CRISP3

El tercer miembro de la familia CRISP fue originalmente identificado en la glándula salival del ratón, donde se observó que el promotor del gen presentaba dos elementos de respuesta a andrógenos (Schwidetzky et al., 1995). A continuación, describieron la expresión del mensajero de CRISP3 en las células linfoides pre-B en el ratón (Pfisterer et al., 1996) y a una glicoproteína de aproximadamente 28 kDa homóloga a CRISP2 en la matriz de los gránulos de los neutrófilos humanos. Casi simultáneamente, se caracterizó la expresión y distribución de los mensajeros de CRISP1, CRISP2 y CRISP3 en los tejidos humanos observando que esta última presentaba la más amplia distribución en su expresión, encontrándose predominantemente en glándula salival, páncreas y próstata, y en menor proporción en el epidídimo, ovario, timo y colon (Kratzschmar et al., 1996).

En el caballo, CRISP3 originalmente denominada HSP-3, es una proteína abundante del plasma seminal (aproximadamente 1 mg / ml) que se produce, principalmente, en la ampolla del conducto deferente y en las vesículas seminales (Magdaleno et al., 1997). CRISP3 equina no se encuentra glicosilada y se mantiene unida a la región post-acrosomal y pieza media de los espermatozoides (Magdaleno et al., 1997). Al respecto, en un análisis de SNPs (single nucleotide polymorphism) del gen de CRISP3 equina, los autores identificaron tres polimorfismos asociados a infertilidad en los machos, no encontrándose ninguna asociación entre la fertilidad y los polimorfismos de los genes de CRISP1 y de CRISP2 (Hamann et al., 2007). En el humano, CRISP3

se encuentra en altas concentraciones en saliva y plasma seminal, y en menor medida en plasma sanguíneo y sudor. En todos los fluidos, se encuentran dos formas de la proteína madura, una N-glicosilada que presenta un peso molecular aparente de entre 29-31 KDa, y otra no glicosilada con un peso molecular aparente de entre 27-29 KDa (Udby et al., 2002). Se ha observado que, tanto en plasma sanguíneo como en el plasma seminal, CRISP3 se encuentra formando un complejo con las proteínas, α1βglicoprotein y β-microseminoprotein (MSP), respectivamente (Udby et al., 2004);(Udby et al., 2005b). Si bien la importancia de dichas interacciones se desconoce, se ha observado la existencia de una interacción específica de alta afinidad entre MSP y el dominio PR-1 de la proteína CRISP3 (Gibbs et al., 2008). Por otra parte, se ha descripto la expresión de CRISP3 en el epitelio secretor de todo el tracto reproductor masculino, desde el testículo hasta la próstata. Curiosamente, si bien detectaron una altísima expresión en el cauda epididimario, no encontraron diferencias en la concentración de CRISP3 en el plasma seminal de los pacientes vasectomizados respecto a los controles. En base a ello, los autores sugieren que la mayor fuente de CRISP3 en el plasma seminal serían los órganos que se encuentran río abajo del epidídimo (Udby et al., 2005a). Vale destacar que en este trabajo, los autores describieron, además, la presencia de la proteína en espermatozoides frescos. Estas evidencias, junto a nuestras observaciones en el modelo de animales KO indicando que otras proteínas CRISP podrían compensar la ausencia de CRISP1 en la interacción espermatozoide-ovocito, sugieren que la proteína CRISP3 también podría estar participando en el proceso de fertilización.

Diversas evidencias han identificado a CRISP3 como una proteína que modifica su expresión en diversas patologías. Sin embargo, no se conoce si esta característica es causa o consecuencia de dichas enfermedades. Es así que CRISP3 se expresa en bajos niveles en el tejido prostático normal y es una de las proteínas que más aumenta su expresión en pacientes con cáncer prostático. Por el contrario, la expresión de MSP (posible ligando de CRISP3) se encuentra disminuida en este tipo de cáncer (Chan et al., 1999). En base a ello, en los últimos años, se han publicado numerosos trabajos que intentan dilucidar la relevancia de CRISP3 y de su interacción con MSP en cáncer de próstata (Hoogland et al., 2011); (Brase et al., 2011; Dahlman et al., 2011; Van Eynde et al., 2011; Pathak et al., 2010). Por otra parte, CRISP3 se expresa en forma andrógeno dependiente en las glándulas salivales y lacrimales en ratón y en humano. En las mujeres que padecen la enfermedad auto-inmune "Sjogren's Syndrome", se observó una disminución en la producción de CRISP3. Esta enfermedad se caracteriza por presentar modificaciones en la distribución y en la función de un canal iónico

(acuaporina-5) con lo cual se cree que podría existir, como ocurre en otras CRISP, una actividad reguladora de canales en el ICR de CRISP3 involucrada en la enfermedad (Laine et al., 2007; Porola et al., 2008);(Tapinos et al., 2002). Además de los casos mencionados anteriormente, se ha observado una modificación en la expresión de CRISP3 en pancreatitis y en cáncer de lengua (Ye et al., 2008),(Ko et al., 2012);(Liao et al., 2003);(Friess et al., 2001). En base a estas observaciones, numerosos autores han sugerido un rol para CRISP3 en la regulación del sistema inmune. Sin embargo, hasta el momento, esta hipótesis no ha sido evaluada.

Objetivos

Con el fin de profundizar los conocimientos sobre la participación de las proteínas CRISP en el proceso de fertilización y su relevancia para la fertilidad, como así también estudiar si, al igual que en organismos inferiores, estas proteínas cumplen un rol inmunoregulatorio en mamíferos, en la presente Tesis se plantearon los siguientes objetivos:

Considerando que existen numerosas evidencias que indican que una mutación puede producir fenotipos marcadamente diferentes dependiendo del origen genético, el primer objetivo de esta Tesis ha sido estudiar la influencia del origen genético sobre el fenotipo de los animales KO para CRISP1 (CAPÍTULO 1).

En base a las evidencias indicando que CRISP2 no solo participaría en el proceso de fertilización sino también que podría ser relevante para la fertilidad de un individuo, el segundo objetivo de esta Tesis ha sido investigar la relevancia de CRISP2 para la fertilidad a través de la inmunización de ratas machos y hembras tal como fuera evaluado para CRISP1 (CAPÍTULO 2).

Finalmente, teniendo en cuenta la presencia de CRISP3 en espermatozoides humanos y en ciertos órganos del sistema inmune como así también su expresión diferencial en diversas patologías el tercer objetivo de esta Tesis ha sido evaluar la posible participación de la proteína CRISP3 en el proceso de fertilización y explorar su posible rol en el sistema inmune (CAPÍTULO 3).

Metodología

Animales

Todos los animales fueron mantenidas en el bioterio del IBYME, con alimento y agua *ad libitum* y con un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad 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).

Ratones

• Cepa C57BL/6:

- machos adultos de entre 2 y 6 meses

- hembras adultos de entre 2 y 6 meses
- Línea *Crisp1^{-/-}* de origen genético mixto 129SvEv/C57BL/6:
 - machos adultos de 2 a 12 meses de edad
 - hembras adultas de 2 a 6 meses de edad
- Línea Crisp1^{-/-} de origen genético homogéneo C57BL/6:

- machos adultos de 2 a 6 meses de edad para evaluar fertilidad y parámetros espermáticos, y de 6 a 12 semanas para los ensayos inmunológicos

- hembras adultas de 2 a 6 meses para evaluar fertilidad, pre-púberes y adultas jóvenes de 1 a 3 meses para superovular, y de 6 a 12 semanas para los ensayos inmunológicos.

Ratas

- Cepa Wistar:
 - machos adultos 70-90 días de edad
 - hembras adultas de 70 a 90 días de edad
- Cepa Sprague-Dawley
 - machos adultos de 3 a 12 meses de edad
 - hembras prepúberes de 25 a 30 días de edad.

Hamsters

- Cepa Golden Syrian
 - hembras de 30 a 45 días de edad

Proteína CRISP1 nativa

La proteína CRISP1 utilizada en este trabajo fue purificada de acuerdo a lo descripto por Garberi y colaboradores (Garberi et al., 1979);)Garberi et al., 1982). Brevemente, la purificación incluye la precipitación del citosol epididimario con (NH₄)₂SO₄, seguido

Metodología

de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y un paso final de cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-Concanavalina A (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia). Cuando este material es sometido a electroforesis y tinción con plata, sólo se detectan las bandas correspondientes a CRISP1.

Proteína CRISP3 nativa equina

La proteína CRISP3 equina fue gentilmente provista por el grupo de la Dra. Edda Topfer-Petersen de la Universidad de Hannover, Germany. Dicha proteína fue purificada de acuerdo a lo descripto por el Dr Schambony (Schambony et al., 1998)

Proteínas recombinantes

La secuencia codificante de la proteína epididimaria de rata CRISP1 y de la proteína testicular de ratón CRISP2 fueron clonadas en el vector de expresión pMAL-C2 (New England Biolabs, Beverly, MA, Estados Unidos) que produce una proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa MBP (Maltose Binding Protein). Asimismo, el plásmido comercial pMAL-C2 sin inserto fue utilizado para expresar la proteína MBP en forma aislada. Para la expresión de cada una de las proteínas recombinantes, los plásmidos respectivos fueron utilizados para transformar bacterias E. coli BL21, las cuales fueron crecidas a 37ºC en LB (triptona 1%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 1%) con 2% ampicilina y 0,2% Glucosa hasta una $DO_{600nm} = 0,5$. Posteriormente, se agregó a los cultivos 0,1 mM final de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido; Promega, Madison, WI, Estados Unidos) y la incubación se continuó por 5 hs a 27ºC. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación durante 20 min a 4000 x g, resuspendidas en buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 M NaCl, 1 mM 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 acoplada a amilosa (New England Biolabs), eluyéndose la proteína de fusión con 10 mM maltosa. Las distintas fracciones eluidas fueron analizadas por espectrometría a 280nm y geles de poliacrilamida al 10% teñidos con Azul de Coomassie. Aquellas fracciones conteniendo la proteína de interés fueron dializadas 24 hs contra H₂O y, finalmente, liofilizadas.

Anticuerpos

A continuación, se describen los anticuerpos utilizados según la metodología empleada:

Western Blot: Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: <u>Anti-CRISP1</u> (1/500) anticuerpo policional fue desarrollado anteriormente en el laboratorio mediante
la inmunización de conejos con la proteína epididimaria de rata CRISP1 purificada (Kohane et al., 1983). <u>Anti-CRISP3</u>: anticuerpo policional comercial (HyCult Biotechnology, b. v., Plymouth Meeting, USA) (1/500) para inmunodetectar CRISP3 sobre espermatozoides humanos y el policional comercial (Proteintech Group, Burlington, Canada) (1/1000) para inmunodetectar CRISP3 de ratón en las células dendríticas. <u>Anti-MBP</u>: anticuerpo policional comercial (NEB) (1/500). <u>Anti-fosfotirosina</u>: Anticuerpo monocional (clone 4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, Estados Unidos) (1/1000). <u>Anti-β-tubulina</u>: el anticuerpo monocional (clone D66, Sigma) (1/50000). Y los siguientes anticuerpos secundarios de la compañía Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU, el <u>anti-Ig G normal de conejo</u> acoplado a peroxidasa (1/4000) y el anti.Ig G normal de ratón acoplado a peroxidasa (1/4000), y de la compañía Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina el anti-IgG de rata acoplado a biotina (1/500).

Inmunofluorescencia indirecta: Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: <u>Anti-CRISP1</u>: anticuerpo policional mencionado anteriormente (1/50) y el <u>Anti-CRISP3</u>: policional comercial (Proteintech Group, Burlington, Canada) (1/50) para inmunodetectar CRISP1 y CRISP3 de ratón en las células dendríticas. El <u>anti-CRISP3</u> (HyCult Biotechnology, b. v., Plymouth Meeting, USA) (1/50) para inmunodetectar CRISP3 sobre espermatozoides humanos. Y como anticuerpos secundarios de la compañía Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina el anti-IgG de rata y el anti- IgG de conejo acoplados a FITC (1/100)

Citometría de flujo: Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: de la compañía BD Becton-Dickinson, Buenos Aires, Argentina, el <u>anti-CD11c (HL3)</u> acoplado a PE y el <u>anti-CD86 (GL1)</u> acoplado a FITC, el <u>anti- IgG 2b1 k</u> acoplado a FITC como control de isotipo y el <u>anti- IgG</u> acoplado a PE como control de isotipo. La dilución utilizada en todos los casos fue 1/10.

Evaluación de la fertilidad

La evaluación de la fertilidad se evaluó en las diferentes especies de la siguiente manera:

Ratón: Un macho heterocigotas (*Crisp1*^{+/-}) u homocigotas (*Crisp1*^{-/-}) para la mutación en el gen CRISP1 fue puesto en apareo con 2 hembras control por un período de 14 días. Al cabo de ese período, las hembras fueron separadas en jaulas independientes y evaluadas por signos de preñez o parición hasta 3 semanas posteriores. Este esquema se repitió 2 veces para cada macho. El comportamiento sexual fue evaluado por la presencia de tapón vaginal todas las mañanas que durara

Metodología

el apareo. El número de crías fue determinado contando los animales nacidos dividido en número de hembras colocadas en apareo. El tiempo transcurrido desde el primer día de apareo hasta la parición fue calculado considerando las hembras preñadas. La fertilidad de cada macho fue expresada como: (número de hembras preñadas/número total de hembras apareadas) x 100.

Rata: Cada macho, inmunizado o control, fue alojado en una caja junto con tres hembras control durante 7 días, luego de lo cual el macho fue retirado. Las hembras fueron examinadas para evaluar signos de preñez determinándose, posteriormente, el número de sus crías. La fertilidad de cada macho fue expresada como: (número de hembras preñadas/3) x 100. En el caso de las hembras, se colocaron dos, de diferente tratamiento, con un macho control durante 7 días, luego fueron examinadas para evaluar signos de preñez determinándose, posteriormente, el número de crías. La fertilidad de cada macho fue expresada como: (número de hembras preñadas/3) x 100. En el caso de las hembras, se colocaron dos, de diferente tratamiento, con un macho control durante 7 días, luego fueron examinadas para evaluar signos de preñez determinándose, posteriormente, el número de crías. La fertilidad de las hembras fue calculado como: (número de hembras preñadas)/(número total de hembras apareadas)

Superovulación de las hembras y preparación de los ovocitos

Las hembras de rata, ratón y hamster de las edades descriptas anteriormente fueron superovuladas con una invección de gonadotrofina coriónica equina (PMSG) (Syntex), seguida, a las 48 - 72 h, por una inyección de gonadotrofina coriónica humana (hCG) (Sigma). Las dosis de cada hormona fueron diferentes para cada especie, siendo la cantidad de eCG y hGC 20 UI y 25 UI para la rata, 5 UI y 5 UI para el ratón y 25 UI y 25 UI para el hamster. Las hembras fueron sacrificadas a las 12-15 h luego de la inyección de hCG, y ambos oviductos fueron extraídos cuidadosamente en el medio correspondiente. Los medios utilizados para la obtención de los ovocitos correspondieron a aquellos utilizados para la capacitación de los espermatozoides "rat fertilization médium" (RFM) (Kaplan and Kraicer, 1978)para los ovocitos de rata, medio Fraser y Drury para los de ratón (Fraser and Drury, 1975) y medio BWW (Biggers et al, 1971) para los de hámster. Los CCO fueron obtenidos mediante punción de la ampulla. Los CCO fueron tratados con hialuronidasa 0,1% (type IV, Sigma) a temperatura ambiente, para la disociación de las células del cúmulus. Las ZP fueron removidas por 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.

Obtención de espermatozoides

Ratón y rata: Para la obtención de espermatozoides epididimarios, los animales adultos fueron anestesiados, los epidídimos expuestos a través de un corte efectuado en la región escrotal, liberados de grasa y sangre y mantenidos permanentemente humedecidos con solución fisiológica. Los espermatozoides del cauda epididimario se obtuvieron por punción o por cortes en los túbulos correspondientes a dicha región.

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 Salus (OMS) (WHO, 1999). En todos los casos, se solicitó un período de 48 h de abstinencia sexual previo a la donación de la muestra y la firma del consentimiento informado.

Capacitación de espermatozoides

Ratón: La obtención y capacitación de espermatozoides de ratón se realizó en el medio de Fraser y Drury (Fraser and Drury, 1975), suplementado con 3% BSA. Con el fin de obtener una muestra rica en espermatozoides mótiles, se utilizó un sistema de selección en el cual los caudas epididimarios cortados en tres puntos fueron colocados en una gota de 300ul del medio de Fraser y Drury en una placa bajo aceite, y luego incubados por un período de 15 min a 37° C y 5% CO₂ para permitir la dispersión de las células con mayor motilidad ("swim out"). La capacitación fue llevada cabo en gotas de 300 µl de medio bajo aceite a una concentración final de espermatozoides de 0,1-1 10^7 esp/ml, y las células incubadas por un período de 90-120 min a 37° C y 5% CO₂ en una estufa con gaseo automático.

Rata: Los espermatozoides de rata fueron recuperados en medio (Kaplan and Kraicer, 1978). Con el fin de obtener una muestra rica en espermatozoides mótiles, se utilizó un sistema de selección en el cual los espermatozoides obtenidos por punción de los túbulos del cauda fueron colocados en el fondo de un tubo cónico Falcon, cubiertos de 1,5 ml de RFM, y luego incubados por un período de 15 min a $37^{\circ}C$ y 5% CO_2 para permitir que las células con mayor motilidad asciendan hacia la superficie libre ("swim up"). La capacitación fue realizada en placas de cultivo de 24 posillos conteniendo 400 µl de RFM cubiertos por 300 µl de aceite de parafina por hoyo previamente equilibrados durante 30 min en un incubador de gaseo automático (Forma Scientific). A continuación, alícuotas de las capas superiores del swim up fueron agregadas a cada pocillo de capacitación, siendo la concentración final en cada pocillo

Metodología

de 0,5-1 x 10⁶ espermatozoides/ml. Posteriormente, los espermatozoides fueron incubados por un período de 5 hs a 37 °C y 5% CO2.

Humanos: Luego de la licuefacción, el semen fue colocado en el fondo de un tubo cónico de 15 ml conteniendo 1 ml de medio Biggers, Whitten, Whittingham (BWW) (Biggers et al., 1971) conteniendo 3,5% de albúmina sérica humana (Sigma) (BWW-ASH), e incubado durante 1 h a 37°C y 5% CO₂ en una estufa con gaseo automático. Los espermatozoides mótiles recuperados de la superficie del medio luego de 1 hora ("swim up") fueron diluidos en BWW-ASH a una concentración final de 0,5-1 x 10⁷ cels/ml e incubados por 18-22 h a 37°C, en una atmósfera de 5% CO₂.

Ensayo de fertilización in vivo

Dos hembras de ratón superovuladas fueron colocadas en una jaula, 9 hs luego de la inyección de hCG, con un macho *Crisp1*^{+/-} o uno *Crisp1*^{-/-}. A la mañana siguiente, el macho fue separado de la jaula. Aproximadamente 5hs después las hembras fueron sacrificadas y ambos oviductos fueron extraídos cuidadosamente y colocados en una solución de PBS-BSA 0,4%. Los CCO fueron obtenidos mediante la percusión de los oviductos con PBS-BSA 0.4%. Las células del cúmulus fueron removidas Luego de remover las células del cúmulus fueron removidas con un tratamiento con hialuronidasa 0,1% (type IV, Sigma) a temperatura ambiente. Posteriormente los ovocitos/embriones fueron lavados, teñidos con 1 µg Hoescht 33342 de unión al ADN (1mg/ml) durante 10 min a temperatura ambiente, montados y observados en un microscopio Nikon Optiphot (Nikon) equipado con lentes de epifluorescencia y luz de mercurio, determinándose el porcentaje de ovocitos fertilizados (dos pronúcleos y embriones en dos células).

Ensayo de fertilización in vitro

Ovocitos sin ZP

Ratón: Ovocitos de ratón sin ZP fueron inseminados con espermatozoides de ratón capacitados en una concentración final de 0,5-1 x 104 células/ml, y las gametas fueron co-incubadas durante 1 h en una estufa a 37 °C y 5% CO2. Al concluir la co-incubación, los ovocitos fueron lavados y fijados con PFA 2% durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los mismos fueron teñidos con 1 µg Hoescht 33342 de unión al ADN (1mg/ml) durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, los ovocitos fueron lavados y observados en un microscopio Nikon Optiphot (Nikon) equipado con lentes de epifluorescencia y luz de mercurio, determinándose el

Metodología

porcentaje de ovocitos fertilizados. Los ovocitos se consideraron fertilizados si presentaban en el citoplasma al menos un núcleo espermático descondensado.

Rata: Ovocitos de rata sin ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados en una concentración final de 0,5-1 x 10⁴ células/ml pre-incubadas con los distintos anticuerpos durante 30 min a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂, y luego 10-15 ovocitos fueron agregados a cada gota y las gametas co-incubadas durante 2-3 h en las mismas condiciones. Al cabo de ese período, los ovocitos fueron lavados, individualmente montados V observados al microscopio óptico (Nikon), determinándose el porcentaje de ovocitos fertilizados en cada tratamiento. Los ovocitos se consideraron fertilizados si presentaban en el citoplasma dos pronúcleos y la cola del espermatozoide.

Humanos: Ensayo de penetración de ovocitos de hamster (HOPT: hamster oocyte penetration test): El HOPT fue realizado según se describe en el Manual de Laboratorio para la evaluación de semen humano (WHO, 1999). Alícuotas de 100 µl de BWW-ASH conteniendo 3,5 x 10⁵ espermatozoides mótiles fueron pre-incubadas con los distintos anticuerpos durante 30 min a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂, luego de la cual 10-15 ovocitos fueron agregados a cada gota y las gametas co-incubadas durante 2-3 h en las mismas condiciones. Al cabo de ese período, los ovocitos fueron lavados por aspiración para remover los espermatozoides no unidos o débilmente unidos, fijados en glutaraldehído 4% y montados en portaobjetos. Para la observación de los ovocitos, los mismos fueron teñidos con una solución de 1% acetocarmin, con el fin de colorear el núcleo de los espermatozoides. Los ovocitos fueron observados en el microscopio óptico (Nikon), determinándose la presencia de espermatozoides unidos y penetrados para cada ovocito. Se consideraron ovocitos penetrados aquellos que presentaron cabezas descondensadas o pronúcleos, y colas de espermatozoides en el citoplasma.

Ovocitos con ZP

Ovocitos de ratón intactos con ZP fueron inseminados con espermatozoides previamente capacitados en una concentración final de 0,5-2 x 10⁵células/ml, y las gametas co-incubados toda la noche en una estufa a 37°C y 5% CO₂. Luego de 17hs de incubación los ovocitos fueron lavados y observados al microscopio invertido (Nikon) determinándose el porcentaje de embriones en dos células

Ensayo de unión a la ZP

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

Evaluación de la viabilidad de los espermatozoides

Alícuotas de 10ul de las suspensiones de espermatozoides frescos o capacitados fueron colocadas sobre portaobjetos mantenidos a 37 °C y conteniendo 10ul 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 400 x. En algunos casos, los espermatozoides capacitados fueron incubados durante 30 min a 37°C, en presencia de los anticuerpos, luego de la cual se evaluó su viabilidad. En todos los casos se analizó un mínimo de 100 células por determinación.

Evaluación de la motilidad de los espermatozoides

Alícuotas de 10ul de las suspensiones de espermatozoides frescos o capacitados fueron colocadas sobre portaobjetos mantenidos a 37°C y la motilidad evaluada subjetivamente por observación al microscopio óptico utilizando un aumento de 400 x. En los casos en los que se evaluó el efecto de los anticuerpos, los espermatozoides capacitados fueron incubados durante 30 min a 37°C en estufa gaseada, en presencia de los anticuerpos previo a la evaluación de la motilidad.

En los casos donde se evaluó el efecto del AMPc sobre la motilidad, los espermatozoides frescos fueron incubados durante 30 min en medio de capacitación en presencia de 5 mM dibutiril AMPc (dbcAMP, preparado en medio al momento del uso; Sigma), 100 µM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, preparado en DMSO al momento del uso; Sigma). Como control se agregó un tratamiento con DMSO. Una vez concluido el período de incubación, se colocó una alícuota de 10 µl de la suspensión de espermatozoides en un portaobjetos mantenido a 37 °C y se registró, mediante videomicroscopía, diferente campos del portaobjetos por 35 segundos registrándose 7

Metodología

videos por cada tratamiento. Los videos luego fueron analizados, determinándose el porcentaje de espermatozoides motiles.

Inducción de la reacción acrosomal (RA)

En cada especie la inducción de la RA se realizó como se describiera a continuación.

Ratón: La RA fue inducida por exposición de los espermatozoides a 15 μM progesterona (Sigma, preparada 15 mM en dimetilsulfóxido, DMSO), 15 min antes del final del período de capacitación.

Humano y rata: La RA fue inducida por exposición de los espermatozoides a una milésima parte de una solución 10 mM de ionóforo de calcio A23187 (Sigma-Aldrich), resuspendido en dimetilsulfóxido (DMSO) media hora antes del final del período de capacitación.

Evaluación de la ocurrencia de la RA.

Ratón y rata: Los espermatozoides fueron recuperados del medio capacitante, lavados dos veces con PBS y fijados en un volumen de PFA 8% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, y luego lavados 3 veces con acetato de amonio 0,1M pH: 9, por centrifugación, y extendidos sobre portaobjetos. Los portaobjetos fueron luego lavados por inmersión sucesiva en agua, metanol y agua (5 min en cada uno), y posteriormente incubados en una solución de 0,22% Coomasie Brillant Blue en 50% metanol, 10% ácido acético. Al cabo de esa incubación, los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y examinados inmediatamente para evitar la difusión del colorante. Los espermatozoides fueron cuantificados como intactos cuando presentaban una coloración azul intensa en la región acrosomal, y como reaccionados cuando esa región no presentaba color.

Humanos: La evaluación de la RA en los espermatozoides humanos se realizó mediante la tinción del contenido acrosomal con la lectina fluorescente *Pisum sativum agglutinin* conjugada a FITC (Pisum-FITC) (Sigma) según fuera descripto anteriormente (Cross et al., 1986). Previamente, los espermatozoides fueron fijados en 2% PFA en PBS, extendidos sobre portaobjetos y permeabilizados por inmersión en metanol a –20 °C por 5 min. Los espermatozoides fueron luego incubados con 50 µg/ml de Pisum-FITC por 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad, lavados con PBS, montados en 90% glicerol y observados bajo un microscopio de epifluorescencia. Los espermatozoides fueron cuantificados como intactos cuando presentaban una marca brillante en la región acrosomal completa, y como reaccionados cuando la fluorescencia estaba restringida al segmento ecuatorial (SE) o ausente.

78

Inmunofluorescencia indirecta de espermatozoides

Los espermatozoides fueron lavados dos veces con PBS y fijados por el agregado de un volumen de PFA 4% durante 10 min, lavados tres veces por centrifugación con PBS conteniendo 4 mg/ml de BSA (PBS-BSA4) y, finalmente, extendidos sobre portaobjetos. Para la permeabilización de los espermatozoides humanos, los extendidos fueron sumergidos en metanol a -20°C durante 5 min mientras que para los espermatozoides de rata, los extendidos fueron sumergidos en forma seriada en porcentajes decrecientes de metanol frío en PBS por 5 min. Las muestras fueron bloqueadas con PBS-BSA4 por un período de 30 min a 37°C, seguida por una incubación con el anticuerpo primario a la concentración indicada durante toda la noche a 4°C y luego de tres lavados con PBS, incubadas con el anticuerpo secundario diluido en PBS por 30 min a 37°C. Terminada la incubación, las muestras fueron nuevamente lavadas tres veces con PBS y montadas con glicerol 90% y los cubreobjetos sellados con esmalte. Los preparados fueron examinados en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot) con los objetivos de 40x o 100x.

Extracción de proteínas

De los espermatozoide

Las suspensiones de espermatozoides humanos seleccionados por "swim up" fueron lavadas tres veces por centrifugación y resuspendidas en PBS. Los espermatozoides fueron separados en diferentes alícuotas y cada una de ellas fue incubada en 1 ml de la solución de extracción conteniendo las diferentes soluciones de extracción (NaCl, detergente, etc), durante 30 min a temperatura ambiente. Terminado el tratamiento, las suspensiones fueron centrifugadas a 13000xg durante 10 min. Con el fin de concentrar los extractos proteicos para su análisis electroforético, los sobrenadantes fueron tratados con un volumen de ácido tricloroacético (TCA) 10% y luego centrifugados para la precipitación de las proteínas.

De los órganos

Los diferentes órganos utilizados fueron disgregados en frío, mediante cortes con tijeras, hasta obtener una preparación homogénea. Posteriormente, fueron agregados 1,5 vol de una solución Tris-HCl 50 mM pH 7,4 conteniendo 0,2 mM de PMSF, completándose la homogeneización mediante la utilización de un homogeneizador Polytron (Omni International, Marietta, GA, EEUU). Finalmente, la preparación resultante fue centrifugada durante 20 min a 10000 x g a 4ºC y el sobrenadante centrifugado nuevamente.

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

De las células dendríticas

Los extractos proteicos se prepararon colocando a las células en un buffer de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10mM EDTA, 1% NP-40 y 0.2mM PMSF). El lisado se incubó en hielo durante 1 h y luego se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min a 4º C. El sobrenadante obtenido representa el extracto proteico total.

Separación electroforética de las proteínas

Para llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida con SDS de 7,5% a 15% según el caso, de 1,5 mm de espesor, preparados siguiendo la técnica descripta por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras fueron diluidas en buffer de siembra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 conteniendo 10% glicerol y azul de bromofenol) y hervidas durante 8 min en buffer de siembra con 2% SDS. En La corrida se realizó 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 en Azul de Coomasie R250 (CBB) (0,25% en 45% metanol, 10% ácido acético) durante 16h a temperatura ambiente. El exceso de colorante fue eliminado mediante sucesivas incubaciones en desteñidor (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% K₂Cr₂O₇, 0,03% HNO₃. Luego de tres lavados con agua, los geles fueron incubados durante 30 min con 0.2% AgNO₃ y luego lavados con agua durante 10 min. El revelado se inició mediante una incubación de 30 segundos con 3% Na₂CO₃, 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%.

Luego de ambas tinciones, los geles fueron secados mediante vacío y calor, sobre un papel de filtro para su conservación.

Transferencia a nitrocelulosa y PVDF (polifluoruro de vinilideno)

Para la inmovilización de proteínas sobre nitrocelulosa (Bio Rad) y sobre PVDF (Millipore) se siguió la técnica descripta por Towbin y colaboradores (Towbin et al., 1979). Una vez finalizada la electroforesis, los geles fueron sumergidos en buffer Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20%, pH = 8,3 por 30 min. La transferencia fue llevada a cabo en el mismo buffer a 4°C, ya sea durante toda la noche utilizando voltaje constante de 35 V o durante una hora a 100 V. Las membranas de PVDF debieron ser activadas previamente sumergiéndolas en metanol frío durante 5 min.

Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para visualizar la correcta transferencia de las proteínas. Para ello, las membranas fueron incubadas durante 5 min en Ponceau 0,1% en ácido acético 5%, y el exceso de colorante removido mediante lavados con agua deionizada.

Western Blot

Para la detección inmunológica de las proteínas mediante la técnica de Western Blot, las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con una solución 20 mg/ml de leche en polvo descremada en PBS 0,1% Tween 20 (PBST), seguida de una incubación con anticuerpo primario (a las diluciones indicadas) en PBST. Luego de 3 lavados en PBST, las membranas fueron incubadas con anti-lgG (de la especie en la que se produjo el anticuerpo primario) acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU), 1:4000 en PBST. Finalizada la incubación, se repitió el procedimiento de lavado. 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 Inc., Oakville, ON, Canada). Las membranas con el reactivo de guimioluminiscencia fueron expuestas a placas Biomax MR (Eastman Kodax Company, Rochester, NY) durante pocos minutos y luego reveladas por pasajes sucesivos en soluciones de revelador, lavado y fijador. En los casos en los cuales como primer anticuerpo se emplearon sueros, se utilizó como segundo anticuerpo un anti-lgG de rata acoplado a biotina, 1:500 (Sigma-Aldrich) en PBST. Finalizada la incubación, se repitió el procedimiento de lavado. Las membranas fueron luego incubadas con una solución de extravidina-peroxidasa 1:1000 en PBST y nuevamente lavadas. Con el fin de eliminar el Tween 20, se realizó un lavado adicional con Tris 0,1 M, pH 7.5. Por último, se realizó la reacción de revelado con el sustrato diaminobencidina (DAB) (50 µg/ml, H2O2 0,01% en Tris 0,1 M pH 7,5), deteniéndose la reacción por agregado de un exceso de agua. Todas las incubaciones fueron realizadas por un período de 60 min a temperatura ambiente, con agitación.

Ensayos de inmunización

El esquema de inmunización llevado a cabo y las dosis administradas se muestran en la **Figura 2** y en la **tabla 1** del **capítulo 2** respectivamente. Cada inyección se preparó disolviendo la proteína correspondiente (recCRISP2, recCRISP1 o MBP) en 300 µl de solución fisiológica, realizando luego una emulsión con un volumen igual de adyuvante. Para la primera inmunización utilizamos el adyuvante de Freund completo (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) y para las restantes el incompleto. Se administraron 300 µl de la emulsión en forma subcutánea en la región dorsal y 300 µl en forma intramuscular en un miembro trasero.

Obtención y almacenamiento de los sueros

Para la obtención de los sueros, las ratas fueron anestesiadas y sangradas vía yugular, realizándose una incisión que permitiera la visualización de la vena y su punción. Se extrajeron aproximadamente 1.5 ml de sangre por animal, utilizándose jeringa y aguja N° 21. La sangre se incubó durante 1h a temperatura ambiente, para favorecer la coagulación, y luego durante 16 hs a 4°C. Los sueros fueron separados del coágulo por centrifugación durante 15 minutos a 1.700 rpm a 4 °C, y luego fraccionados y almacenados a –20°C.

Enzimoinmunoensayo (ELISA), para el seguimiento de la respuesta inmune.

Se colocaron 50 µl de una solución 1 ng/ µl de proteína (MBP, recCRISP2, nCRISP1 según el caso) en Na₂CO₃ (0.3 M, pH 9.5) por hoyo de placa de ELISA incubándose durante toda la noche a 4°C. La proteína no unida fue eliminada mediante tres lavados con PBS 0,02% Tween 20 (PBS-T20), y luego las placas fueron bloqueadas durante 90 minutos a temperatura ambiente con leche descremada 20 mg/ml en PBS. Descartada la solución de bloqueo, se agregaron 50 µl por hoyo de cada uno de los sueros obtenidos (a las diluciones indicadas en PBS-BSA 0,1%). Posteriormente, las placas fueron incubadas a 37°C durante 1 hora; luego de lo cual las mismas fueron lavadas nuevamente tres veces con PBS-T20. A continuación, las placas fueron incubadas con 50 µl/hoyo de segundo anticuerpo (anti-IgG de rata acoplado a biotina 1:500) diluido en PBS-BSA 0,1%, durante 1 hora a 37°C. Luego de tres lavados, se agregó una dilución 1:1000 de extravidina conjugada a fosfatasa alcalina en PBS-BSA 0,1% y las placas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Metodología

Finalmente, las mismas fueron incubadas con 1mg/ml de p-nitrofenilfosfato (Sigma 104) en buffer dietanolamina (DEA)(10% v/v DEA, 1,25 % HCl 1N, 0,4 mM MgCl₂), hasta la aparición del color (15-20 minutos), deteniéndose la reacción con NaOH 0,5N y efectuándose la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm.

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

Con el fin de medir los anticuerpos específicos contra CRISP2 en los sueros de los animales inmunizados con recCRISP2, se realizó una captura de los anticuerpos anti-MBP. Para ello, la proteína de fusión se acopló a la placa y los sueros se diluyeron en PBS-BSA 0,1% conteniendo 300 ng/µl de proteína MBP soluble. La eficiencia de la captura se evaluó utilizando a MBP como antígeno acoplado a la placa.

Histología

Con el fin de realizar un análisis histológico, las ratas fueron anestesiadas y sus órganos removidos y fijados por inmersión en solución de Bovin durante 24 horas. Los órganos fueron luego incluidos en parafina, y cortados en micrótomo. Finalmente, los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y observados bajo microscopio óptico. La evaluación histológica fue realizada en colaboración con la Dra Livia Lustig (FMED-UBA-CONICET) en el caso de los órganos masculinos, y con la Dra Silvia Vanzulli de la Academia de Medicina.

Obtención de DC de ratón

Las DC se diferenciaron a partir de precursores mieloides de médula ósea. Brevemente, se obtuvo la médula ósea de fémures y tibias de ratones, el tejido se disgregó mediante suaves pasajes a través de una aguja de 21 G y los glóbulos rojos se lisaron con buffer ACK (NH4Cl 0,15 M, KHCO3 10 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,2- 7,4). Las células obtenidas se cultivaron a 2x106 células/ml en medio completo [RPMI 1640 10% SFB, 40 µg/ml gentamicina, 50 µM 2b mercaptoetanol, 2 mM Lglutamina y 10 mM HEPES (todo de Gibco)] suplementado con 10-15% del sobrenadante de cultivo de la línea J588L (mieloma de ratón transfectado con cDNA de GM-CSF), durante 8 días con 3 cambios completos de medio. La maduración de las DC se efectuó al exponerlas a 1µg/ml de LPS durante 24 ó 48 h.

Obtención de RNA total y retrotranscripción reversa:

El ARN de los órganos de ratón fue extraído utilizando el reactivo Trizol® (Gibco BRL) siguiendo las instrucciones del proveedor. Con el fin de generar ADNc, 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.

PCR

Un µl del producto de la transcripción reversa fue sujeto a una PCR utilizando los siguientes "primers" específicos: CRISP1 forward: 5' ACTTCCTGCAGAACAACGC 3' y 5' ACCAACTGCAGATGCAACT 5′ reverse: 3', CRISP3 forward TCCTGGCTGCTGTACTGCCC 3′ y reverse 5′ CCTGGCAGCCTGGACAGG 3′ y Actina primers comerciales (Byodinamics, Buenos Aires, Argentina). La mezcla de reacción contenía 1 µl del ADNc de cada uno de los órganos o células estudiadas, 0,75 U de la polimerasa comercial "Taq" (Byodinamics, Buenos Aires, Argentina) en el buffer apropiado, 0,4 mM de dNTPs; 2,5 mM de cada "primer" específico en un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó en el termociclador "Mastercycler gradient" (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para tubos eppendorfs. Las condiciones en generales de PCR fueron: 1 min a 94°C; 30 seg a 94°C, 30 seg a 59°C y 30 seg a 72ºC por 35 ciclos; 5 min a 72ºC. En el caso específico de las RT-PCR semicuantitativas, la amplificación con los primers de Actina se restringió con 20 ciclos. 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.

Citometría de flujo

Las células se centrifugaron y se resuspendieron en PBS y suero fetal bovino (SFB) 1%. Para realizar la tinción de superficie, las células se incubaron durante 30 min a 4 °C con los anticuerpos monoclonales (o sus controles de isotipo) conjugados a sus respectivos fluorocromos. Luego, las células se lavaron dos veces con PBS/SFB 1% y se resuspendieron en p-formaldehido 1% en PBS hasta su análisis.

Detección de citoquinas por ELISA

Se utilizaron sets de ELISA de captura comerciales de acuerdo a las instrucciones del proveedor. En primer lugar, se incubaron (18 h a 4 °C) placas de 96 pocillos (Costar) con el anticuerpo de captura disuelto en buffer carbonato pH 9,6 o buffer fosfato pH 6,5. Luego las placas se lavaron 3 veces con PBS pH 7,4; 0,01% Tween-20 (PBST 0,01%) y se incubaron con buffer de bloqueo (PBS/10% SFB) durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron las muestras y la curva estándar por duplicado (18 h; 4 °C). Se realizaron 4 lavados con PBST 0,01%, se agregó la solución de detección conteniendo el anticuerpo secundario biotinilado y la estreptavidina-HRP (2 h; temperatura ambiente). Finalmente, se realizaron 6 lavados con PBST 0,01% y se procedió al revelado con una solución de sustrato tetrametilbenzidina (TMB) y 0,03% de H₂O₂ en buffer fosfato-citrato (0,1 M ácido cítrico; 0,1 M Na₂H PO⁴). La reacción se detuvo con H₂SO⁴ 2N determinándose la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro de placa (Labysistems Multiskan).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar para cada serie de experimentos. Los porcentajes (ovocitos fertilizados, viabilidad, motilidad, reacción acrosomal y los patrones de marca fluorescente *de los espermatozoides*) *fueron analizados con el test de Chi cuadrado* (χ^2). Los números de espermatozoides unidos, el número de crías, la fertilidad de los machos inmunizados con recCRISP2, los días transcurridos desde el inicio del apareo hasta el parto, los porcentajes de células dendríticas marcadas, y los niveles de citoquinas fueron analizados mediante el test t de Student. Los resultados fueron considerados significativamente diferentes considerando un *p*<0,05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa "GraphPad Prism" (versión 3,02, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA

CAPÍTULO 1

Influencia del origen genético sobre el fenotipo de los animales KO para CRISP1.

Como se mencionara en la introducción, resultados de nuestro grupo utilizando ratones KO para CRISP1 indican que, si bien los animales son fértiles, sus espermatozoides poseen una menor capacidad fertilizante (Da Ros et al., 2008). Debido a que existen evidencias que indican que una mutación puede producir fenotipos marcadamente diferentes dependiendo del origen genético (Erickson, 1996), decidimos generar una nueva colonia de animales Crisp1^{-/-} con una base genética homogénea para la cepa endocriada C57BL/6. Para ello, los animales Crisp1^{+/-} de la colonia híbrida inicial (129SvEv/C57BL/6) fueron apareados con animales Crisp1+/+ de la cepa C57BL/6. Los ratones adultos HT, producto de dichos apareos, fueron seleccionados mediante genotipificación y apareados nuevamente con ratones Crisp1^{+/+} de la cepa C57BL/6 (Figura 1A). En cada generación de retrocruza, el nivel de heterocigosis se reduce un 50% y aumenta en la misma proporción el fondo genético de la línea receptora (Benavidez, 2006). En la Figura 1B se puede observar que en la septima generación de retrocruza el 99.6% del genoma corresponde a la línea receptora. En base a ello, y considerando que hay ciertas evidencias que indican que seis generaciones de retrocruza son suficientes para manifestar diferencias en el fenotipo de la colonia (Rubinstein et al., 2006), decidimos realizar el análisis en los animales provenientes de dicha generación. Los ratones Crisp1^{+/-} de la generación N₇ fueron cruzados entre sí para obtener los animales homocigotos ($Crisp1^{-1}$) (Figura 1A). Para asegurar que la base genética de los cromosomas sexuales fuera homogénea, en cada generación, intercambiamos el sexo de los ratones provenientes de cada cepa.

La genotipificación de los animales se realizó mediante la técnica de PCR. Para tal fin, el ADN extraído de biopsias de las orejas fue sometido a amplificación utilizando tres primers, uno de ellos complementario a una región homóloga entre el alelo salvaje y el mutado, y los otros dos, específicos para cada alelo. Las muestras amplificadas fueron sometidas a separación en gel de agarosa y teñidas con bromuro de etidio, observándose una banda de 894bp para el alelo salvaje, y otra de 611bp para el alelo mutado (**Figura 2**).



Figura 1: Generación de la colonia *Crisp1*^{-/-} **en una base genética homogénea. A**. Esquema representativo de cómo se realizó la retrocruza entre los animales de la colonia mixta (129SvEv/C57BL6) y la colonia endocriada C57BL/6. **B.** Gráfico mostrando el aumento del porcentaje correspondiente al genoma de la línea de fondo (C57BL/6) en cada generación de retrocruza. N: generación de retrocruza. CI: colonia inicial.



Figura 2: Análisis del genotipo. El ADN extraído fue sometido a amplificación utilizando tres "primers" y analizado, posteriormente, en geles de agarosa. A la izquierda, se muestran los marcadores de tamaño en kb.

El paso siguiente consistió en corroborar que la mutación del gen se hubiera mantenido a lo largo de las generaciones analizando tanto la expresión del mensajero de CRISP1 como de la proteína. Para ello, se extrajo ARN de epidídimos de ratones HT y KO y se realizó un análisis por RT-PCR utilizando "primers" oligo dT para la RT y

primers específicos para CRISP1 para la PCR. Como control del molde, se llevó a cabo una amplificación incluyendo "primers" para el gen de actina. Mientras que se observó la banda correspondiente a actina en ambos genotipos, la banda correpondiente a CRSP1 solo se observó en los animales *Crisp1*^{+/-} (**Figura 3A**). Por otro lado, la expresión de la proteína se evaluó a partir de extractos proteicos provenientes de los epidídimos de los animales de ambos genotipos, los cuales fueron sometidos a separación electroforética e inmunodetección utilizando anti-CRISP1 y anti-tubulina como control. En los animales *Crisp1*^{+/-}, se observaron las bandas de los tamaños esperados para las proteínas CRISP1 y tubulina, mientras que en los animales KO, únicamente se detectó la banda de tubulina (**Figura 3B**). Estos resultados muestran la falta de expresión de CRISP1 en los animales KO, indicando que la mutación se mantuvo a lo largo de las generaciones.



Figura 3: Análisis de la expresión de CRISP1 a nivel de mensajero y de proteína. A. El ADNc proveniente del ARN extraído de los epidídimos de los animales de ambos genotipos fue utilizado como molde en una PCR empleándose "primers" específicos para CRISP1 (panel superior) y para actina (panel inferior). El producto de la PCR fue separado por electroforesis en geles de agarosa. H₂O: producto de PCR sin molde. -RT: ADNc proveniente de una RT-PCR realizada sin la retrotranscriptasa **B.** Extractos proteicos de epidídimo provenientes de ratones de ambos genotipos fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida y analizados por Western Blot utilizando anti-CRISP1 (panel superior) ó anti-tubulina (panel inferior) como primer anticuerpo.

Con el fin de evaluar la fertilidad de los animales *Crisp1*^{-/-} de la nueva colonia, machos HT y KO fueron apareados con hembras control. El esquema consistió en colocar un macho con dos hembras en la misma jaula durante dos semanas, al cabo de las cuales, las hembras fueron separadas y observadas periódicamente por signos de preñez ó parición. Los resultados indicaron que los machos carentes de CRISP1 no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de fertilidad ni en la cantidad de crías por camada respecto a los machos control. Sin embargo, a diferencia de lo observado en la colonia inicial, el tiempo transcurrido desde el inicio del apareo hasta el parto fue significativamente mayor para las hembras apareadas con machos KO que con los controles **(Tabla 1)**. Considerando que las hembras no fueron cicladas previo

al apareo, existía la posibilidad de que la diferencia observada pudiera deberse al error inherente al inicio del ciclo estral de las hembras (duración aproximada: entre 4 y 5 días). Sin embargo, la evaluación de los valores individuales (**Figura 4**) apoya la idea de que la diferencia encontrada podría deberse a la existencia de una subpoblación de machos *Crisp1*^{-/-} que no es capaz de preñar a las dos hembras en un único ciclo estral. Estos resultados sugieren la existencia de una desventaja en su fertilidad respecto a los machos control.

	Crisp1⁺∕-	Crisp1⁻⁄-
% DE FERTILIDAD	79,2 ± 7,2	81,3 ± 6,3
Nº CRIAS	5,3 ± 1,3	$5,9 \pm 0,6$
TIEMPO HASTA PARTO (días)	23,0 ± 0,3	24,9 ± 0,6*

Tabla 1: Fertilidad de los machos de lo nueva colonia.

Los datos representan el promedio \pm SEM de 4 machos evaluados para cada genotipo. *p < 0,05.



Figura 4: Tiempo transcurrido desde el inicio del apareo hasta el parto. Machos *Crisp1^{+/-}* y *Crisp1^{-/-}* fueron colocados en apareo con dos hembras control evaluándose, posteriormente, el tiempo transcurrido desde el primer día del apareo hasta el parto. Se evaluaron 4 machos de cada genotipo. El promedio de los datos se indica con una línea.

Como otra aproximación para estudiar la desventaja en la fertilidad de los animales in vivo, realizamos una serie de apareos colocando en una jaula dos hembras control superovuladas con un macho HT o KO. Al día siguiente, recuperamos los ovocitos del oviducto y evaluamos la presencia de células con dos pronucleos o embriones en dos células. Los resultados mostraron que el porcentaje de ovocitos fertilizados por los

machos KO fue significativamente menor al de los machos control (**Tabla 2**) indicando que el cambio del fondo genético de la colonia permitiría poner de manifiesto una desventaja en la fertilidad de los animales *Crisp1*^{-/-} no observada en la colonia inicial.

Macho	Ovocitos recuperados	Ovocitos fertilizados	% de ovocitos fertilizados
Crisp1⁺'⁻	101	46	45,5
Crisp1⊬	85	25	29,4*

Tabla 2: Capacidad fertilizante in vivo de los machos KO paraCRISP1 de la nueva colonia.

Se evaluaron 3 machos de cada genotipo. *p < 0,05.

Como se mencionara en la introducción, estudios de nuestro laboratorio indican que CRISP1 participaría tanto en la interacción espermatozoide-ZP como en el proceso de fusión de gametas (Busso et al., 2007a);(Rochwerger et al., 1992),(Cohen et al., 1986);(Da Ros et al., 2008). Con el fin de evaluar la capacidad de los espermatozoides en la nueva colonia de interactuar con la ZP, se realizaron ensayos de fertilización in vitro utilizado ovocitos de hembras control desprovistos de las células del cúmulus de manera tal de encontrarse rodeados sólo de su ZP al momento de ser inseminados, con espermatozoides capacitados provenientes de animales HT o KO. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 5A e indican que, al igual que lo observado en la colonia original, los espermatozoides carentes de CRISP1 provenientes de animales de la nueva colonia poseen una capacidad de fertilizar a los ovocitos con ZP significativamente menor a la de los espermatozoides control. Considerando que la interacción del espermatozoide con la ZP consta de un primer paso de unión a dicha matriz seguido de la etapa de penetración de la misma, a continuación se realizaron ensayos diseñados para evaluar, específicamente, la etapa de unión de los espermatozoides a la ZP. Para ello, ovocitos con ZP fueron coincubados por tiempos más cortos (30 min) con espermatozoides capacitados, luego fueron lavados para remover los espermatozoides asociados débilmente a la ZP, y finalmente observados al microscopio óptico. La cuantificación de los espermatozoides unidos por ovocito indicó que los espermatozoides KO de la nueva colonia presentaron una capacidad de unirse a la ZP significativamente menor que la correspondiente a los espermatozoides control (Figura 5B).

El próximo paso consistió en evaluar la capacidad fusogénica de los espermatozoides provenientes de los animales de la nueva colonia. Para ello, ovocitos desprovistos tanto de las células del cúmulus como de la ZP fueron inseminados con espermatozoides capacitados provenientes de animales HT o KO de la nueva colonia. Los resultados mostraron que los espermatozoides carentes de CRISP1 mostraron una reducción significativa en su capacidad de fusionarse con el ovocito respecto a los espermatozoides de animales control (Figura 5C).



Figura 5: Evaluación de la capacidad fertilizante de los espermatozoides de la nueva colonia. Espermatozoides epididimarios fueron capacitados por 90 min y luego utilizados para inseminar ovocitos con (**A - B**) o sin (**C**) ZP. **A.** Al cabo de 24hs de co-incubación, se evaluó el porcentaje de embriones en dos células (panel izquierdo). Foto representativa de un ensayo (panel derecho). **B.** Luego de 30 min de co-incubación, los ovocitos fueron recuperados, lavados y observados al microscopio óptico, determinándose el número de espermatozoides unidos por ovocito. **C.** Al cabo de 1 h de coincubación, los ovocitos sin ZP fueron lavados y teñidos con Hoescht 33342 determinándose el porcentaje de los mismos con al menos una cabeza espermática descondensada en su citoplasma. En todos los casos, los datos representan el promedio ± SEM de al menos 3 experimentos independientes.

* p<0,05.

El análisis de diversos parámetros funcionales del espermatozoide de la nueva colonia no mostró diferencias en cuanto al número de espermatozoides recuperados del cauda epididimario o su viabilidad (**Tabla 3**). Sin embargo, la observación al microscopio óptico reveló una disminución en la motilidad total de los espermatozoides *Crisp1^{-/-}* tanto al inicio de la capacitación (t=0) (**Figura 6A**) como luego de haber sido incubados 90 min en un medio capacitante. (t = 90 min) (**Figura 6B**). Estos resultados indican que, a diferencia de lo que ocurre en la colonia hibrida inicial, la ausencia de CRISP1 en la nueva colonia afecta la motilidad de los espermatozoides.

Tabla 3: Viabilidad y número de espermatozoides epididimarios.

	Crisp1⁺ [⊬]	Crisp1 ^{-/-}
n° de espermatozoides epididimarios (x10°)	30 ± 5	25 ± 6
Viabilidad (%)	50 ± 4	46 ± 2

Los datos representan el promedio ± SEM de al menos 3 experimentos independientes.



Figura 6: Evaluación de la motilidad espermática. La motilidad total fue evaluada mediante observación al microscopio óptico en espermatozoides al inicio de la capacitación (A) así como también una vez finalizada la misma (90 min) (B). Los datos representan el promedio \pm SEM de al menos 3 ensayos independientes. * p< 0,05.

Teniendo en cuenta que se ha sugerido que el AMPc sería el un mensajero secundario clave en la regulación de la motilidad (Eddy, 2006), decidimos evaluar si la exposición de los espermatozoides al AMPc era capaz de modificar el patrón de motilidad de los mismos. Para ello, espermatozoides de ambos genotipos fueron incubados en condiciones capacitantes durante 30 min en presencia de un análogo de AMPc (dibutiril AMPc) y un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) (3-isobutyl-1-methylxanthine; IBMX) registrándose la motilidad de los espermatozoides mediante videomicroscopia. Los resultados mostraron que bajo estas condiciones se logró revertir el defecto en la motilidad observado en los espermatozoides *Crisp*1^{-/-} (**Figura 7**).



Figura 7: Efecto del agregado de AMPc sobre la motilidad espermática. Espermatozoides provenientes del cauda epididimario fueron incubados en condiciones capacitantes durante 30 min en presencia de dibutiril AMPc (AMPc) e IBMX, analizándose, posteriormente, la motilidad total de los espermatozoides. Los datos representan el promedio ± SEM de al menos 3 ensayos independientes. * p< 0,05

Numerosas evidencias indican que el aumento en los niveles de fosforilación en tirosina es un evento clave dentro del proceso de capacitación (Visconti, 2009). En este sentido, los estudios realizados en la colonia hibrida original indicaron que la ausencia de CRISP1 produce una disminución en los niveles de fosforilación en tirosina (Da Ros et al., 2008). Sin embargo, la evaluación de dicho parámetro, mediante ensayos de Western Blot, en la nueva colonia reveló que los

espermatozoides *Crisp1^{-/-}* presentaban el mismo patrón de fosforilación que los espermatozoides control (**Figura 8**).



Figura 8: Evaluación de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina Extractos proteicos de espermatozoides *Crisp1^{+/-}* o *Crisp1^{-/-}* frescos (F) o capacitados (C) durante 90 min fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida y analizados por Western Blot utilizando anti-fosfotirosina como primer anticuerpo. Se realizaron al menos 3 experimentos independientes, mostrándose uno representativo. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en Kb.

A continuación, se estudió la capacidad de los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} de la nueva colonia de sufrir la RA tanto espontánea como inducida por progesterona. Si bien no se observaron diferencias entre los espermatozoides KO y los controles en cuanto al porcentaje de RA espontánea luego de la capacitación, a diferencia de lo observado en la colonia híbrida original, la progesterona no fue capaz de inducir la RA en los espermatozoides *Crisp1*^{-/-} provenientes de la nueva colonia (**Figura 9**).

En conjunto, los animales *Crisp1*^{-/-} de la colonia con origen genético homogéneo para la cepa endocriada C57BL/6 presentaron un fenotipo claramente diferente al de la colonia hibrida original, confirmando la influencia de CRISP1 sobre la capacidad de los espermatozoides de interactuar con la ZP y con el oolema y revelando no solo la importancia de CRISP1 para la motilidad y la RA inducida de los espermatozoides sino también una desventaja en la fertilidad de los machos carentes de la proteína (**Tabla 4**).



Figura 9: Reacción acrosomal espontánea e inducida. El porcentaje de reacción acrosomal fue evaluado mediante la técnica de Coomassie blue en espermatozoides frescos (F), capacitados (C) y expuestos a progesterona 15 μ M (P). Los datos representan el promedio ± el SEM de al menos 3 ensayos independientes. a vs b, a vs c y b vs c : P<0,001.

	COLONIA		
FENOTIPO	Inicial híbrida 129SvEv/C57BL/6	Endocriada C57/BL6	
Fertilidad	Normal	con desventaja	
Interacción con ZP	disminuida	disminuida	
Fusión	Disminuída	disminuída	
Motilidad	Normal	disminuida	
Fosforilación	disminuida norma		
RA inducida	Normal	al disminuida	

|--|

CAPÍTULO 2

Estudio de la relevancia de la proteína testicular CRISP2 para la fertilidad.

Con el fin de estudiar tanto la relevancia de CRISP2 para la fertilidad como así también su potencial uso para el desarrollo de métodos de regulación de la fertilidad, en el presente capítulo ratas machos y hembras fueron inmunizadas con la proteína CRISP2 expresada en forma recombinante en nuestro laboratorio (recCRISP2). Dado que la proteína recombinante se encuentra fusionada a MBP (maltose binding protein), la inmunización podía realizarse tanto con la proteína de fusión como con la proteína CRISP2 previamente escindida de MBP. En este sentido, el empleo de la proteína acoplada a MBP presenta las ventajas de una obtención sencilla que involucra un único paso de cromatografía de afinidad, y una inmunogenicidad potencialmente mayor debido tanto a su tamaño como a la presencia de epitopes bacterianos. La desventaja del empleo de la proteína de fusión es la posterior generación de anticuerpos anti-MBP que podrían provocar una reacción cruzada con otras proteínas endógenas. Por su parte, la opción de utilizar la proteína CRISP2 escindida de MBP, si bien permite obtener una respuesta mas específica, implica la separación de ambas proteínas mediante el tratamiento con una proteasa específica seguida de un paso adicional de purificación, lo cual disminuye considerablemente la cantidad de proteína final obtenida. En base a ello, y considerando que la inmunización con CRISP1 recombinante (recCRISP1) realizada previamente en nuestro laboratorio demostró que la presencia de anticuerpos anti-MBP circulantes no afecta ningún parámetro reproductivo, decidimos realizar los estudios utilizando la proteína de fusión. De todos modos, con el fin de controlar posibles efectos debidos a la presencia de anticuerpos anti-MBP, un grupo de animales fue inmunizado con la proteína recombinante MBP como control. Por otra parte, teniendo en cuenta resultados previos indicando que la inmunización de ratas con recCRISP1 produce una inhibición en la fertilidad (Ellerman et al., 2008), un tercer grupo fue inyectado con dicha proteína epididimaria como control de inhibición.

Para la expresión de las proteínas recombinantes, se transformaron bacterias de la cepa Bl21 con los plásmidos (p-Mal) inducibles por IPTG, conteniendo las secuencias de expresión de la proteína MBP sola, de la proteína MBP unida a CRISP2 de ratón (93% homóloga a CRISP2 de rata) o a CRISP1 de rata. A modo de ejemplo, se muestra en la **Figura 1A** cómo el agregado de IPTG a los cultivos bacterianos indujo la expresión de una proteína del tamaño molecular esperado para la proteína de fusión (62kDa). La purificación de la proteína fue realizada mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina acoplada a amilosa, un polímero de maltosa con capacidad de unir a la proteína a través de su porción MBP. El proceso de purificación permitió la obtención de una proteína con un alto grado de pureza, evaluado tanto por la técnica de tinción con plata (**Figura 1B**) como por Western Blot (utilizando anti-MBP) (**Figura 1C**)



Figura 1: Expresión y purificación de CRISP2. Bacterias Bl21 conteniendo el vector p-MAL-recCRISP2 fueron cultivadas en presencia (+) o ausencia (-) de IPTG y los extractos proteicos de los cultivos fueron separados por electroforesis y teñidos con Coomasie Blue. En el extracto de bacterias IPTG+, la banda de 62 kDa correspondiente a CRISP2 se encuentra indicada por una flecha (A). CRISP2 purificada, sometida a electroforesis y analizada por tinción con plata (**B**) o Western Blot (**C**) utilizando anti-MBP como primer anticuerpo.

La cantidad de proteína utilizada y la distribución de los animales en los distintos tratamientos se muestran en la **Tabla 1**. En cuanto a la cantidad inyectada, los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio al

inmunizar con CRISP1 indicaron que la mayor inhibición de la fertilidad se obtenía al inmunizar con 100µg de proteína (Ellerman et al., 2008). Considerando que la secuencia correspondiente a CRISP2 constituye el 40% de la proteína de fusión (25 kDa de un total de 62kDa), la cantidad de proteína recombinante necesaria para obtener 100µg de la porción correspondiente a CRISP2 es 248µg. El mismo cálculo se realizó para recCRISP1. Las cantidades utilizadas para las inmunizaciones con MBP provienen de restar la masa de CRISP2 presente en la proteína recombinante.

Grupo	Cantidad -	Número de animales		
		Machos	Hembras	Total
recCRISP2	248µg	10	10	20
MBP	168µg	9	9	18
recCRISP1	268µg	6	6	12
Total		25	25	50

Tabla 1: Distribución de los animales en los distintosgrupos experimentales

En la **Figura 2** se muestra el esquema de inmunización, sangrados y apareos llevados a cabo para todos los grupos.



Figura 2: Esquema experimental de inmunización. I: inyección, S: sangrado, A: apareo

La respuesta inmune generada contra CRISP2 fue evaluada mediante la técnica de ELISA utilizando como primer anticuerpo los sueros obtenidos luego de cada inyección. Teniendo en cuenta que los animales inmunizados con recCRISP2 presentaban anticuerpos tanto contra CRISP2 como contra MBP, y no disponiendo de CRISP2 libre de MBP, el próximo paso fue desarrollar un método que permitiera medir los anticuerpos específicos contra CRISP2. La estrategia consistió en realizar un ELISA contra recCRISP2 utilizando los sueros diluidos en presencia de un exceso de proteína MBP soluble. Con el fin de controlar que la captura fuera completa, los sueros así diluidos se utilizaron en un ELISA contra MBP (**Figura 3**).



Figura 3: Esquema de ELISA de captura para evaluar la presencia de anticuerpos específicos contra CRISP2. En A y en B se muestra lo esperado al acoplar a la placa recCRISP2 y MBP respectivamente.

Con el fin de definir el protocolo óptimo que permitiera detectar la respuesta inmune específicamente contra CRISP2, primeramente, se estimó el título de los sueros utilizando diluciones seriadas de los mismos como primer anticuerpo, en presencia de un exceso de MBP soluble (100 veces la cantidad acoplada a la placa). Los resultados correspondientes al último sangrado se muestran en la Figura 4A e indican que si bien el título de los sueros fue de 10⁴, el método de competencia no fue eficiente para capturar los anticuerpos anti-MBP en ninguna de las diluciones ensayadas. Dado que se realizaron varios sangrados de cada animal y que el número de animales era considerable, se decidió evaluar la eficiencia del método de competencia seleccionando una dilución fija intermedia entre aquellas que habían resultado positivas (dilución 1/1000 y 1/10000), considerando positivos aquellos valores de absorbancia mayores a 0,2. Teniendo en cuenta que en la dilución 1/10000, la absorbancia fue muy baja o negativa para algunos sueros, y que la dilución 1/1000 demostró ser saturante en muchos casos, la dilución fija seleccionada fue 1/5000. En base a ello, se realizaron ensayos de ELISA utilizando como primer anticuerpo los sueros provenientes del último sangrado, a la dilución fija elegida (1/5000) y en presencia de diferentes cantidades de MBP soluble. Los resultados representados en la Figura 4B indican que el método de competencia resultó eficiente para capturar los anticuerpos anti-MBP cuando la cantidad de MBP soluble fue 300 veces la de la proteína acoplada a la placa (300ng).



Figura 4: Titulación de los sueros y captura de los anticuerpos anti-MBP. Los sueros de los animales inmunizados fueron utilizados como primer anticuerpo en ELISA contra recCRISP2. A. Diluciones seriadas en presencia de un exceso de MBP soluble (100ng). B. Dilución fija (1/5000) en presencia de concentraciones crecientes de MBP soluble.

Habiendo encontrado las condiciones optimas para capturar los anticuerpos anti-MBP, el paso siguiente consistió en evaluar la cinética de la respuesta inmune contra CRISP2. Los resultados indicaron que los anticuerpos contra CRISP2 pudieron detectarse en los sueros obtenidos a partir de la segunda inyección, aumentando sus niveles en función del tiempo tanto en machos (**Figura 5A**) como en hembras (**Figura 5B**). Asimismo, se observó que los anticuerpos dirigidos contra MBP habían sido capturados correctamente.



Figura 5: Cinética de la respuesta inmune en animales inmunizados con recCRISP2. Los sueros anti-recCRISP2 provenientes de machos (A) y hembras (B) fueron utilizados como primer anticuerpo a una dilución fija y en presencia de un exceso de MBP soluble en ELISA. Los valores representan la media ± el SEM de las absorbancias correspondientes a cada grupo experimental. Como antígeno, se utilizó recCRISP2 (----) o MBP (----). S: sangrado

Con el fin de evaluar si los niveles de anticuerpos alcanzados luego de la última inmunización con recCRISP2 eran similares a los alcanzados al inmunizar con recCRISP1, se realizaron ensayos de ELISA utilizando como antígeno la proteína CRISP1 nativa disponible en el laboratorio y, como primer anticuerpo, los sueros anti-recCRISP1. Los resultados indicaron que la inmunización con recCRISP2 fue capaz de generar niveles de anticuerpos similares a los producidos al inmunizar con recCRISP1 (**Figura 6**).



Figura 6: Respuesta inmune contra recCRISP2 y recCRISP1. Una dilución fija (1/5000) de los sueros provenientes de los animales inmunizados con recCRISP2 o con recCRISP1 fueron utilizados como primer anticuerpo en ELISA contra CRISP1 nativa o recCRISP2, respectivamente. En el caso de CRISP2, la dilución fue realizada en presencia de un exceso de MBP soluble

Para evaluar la especificidad de los sueros provenientes de machos y hembras inmunizados con recCRISP2, se realizaron ensayos de Western Blot sobre extractos de distintos tejidos. Los resultados mostraron que los anticuerpos generados fueron capaces de detectar CRISP2 en testículo y en espermatozoide, mostrando una reacción negativa al ser enfrentados a una serie de órganos reproductivos masculinos y femeninos así como también no reproductivos (**Figura 7A y B**). Cabe mencionar que los sueros inmunes reconocieron una banda con un peso molecular mayor al de CRISP2 en epidídimo y en ovario, no siendo capaces de detectar a CRISP1 nativa. Asimismo, los sueros pre-inmunes y anti-MBP fueron incapaces de reconocer a CRISP2 u otra proteína en todos los tejidos evaluados (**Figura 7C**).



Figura 7: Análisis de la especificidad tisular de los sueros. Ensayos de Western Blot sobre extractos proteicos de tejidos masculinos (**A**) y femeninos (**B**) utilizando los sueros anti-CRISP2 como primer anticuerpo. Como control, los ensayos se realizaron sobre extractos de espermatozoide y testículo, utilizando los sueros pre-inmune (PI) y anti-MBP (**C**).

Teniendo en cuenta que los anticuerpos circulantes capaces de reconocer a un antígeno en un determinado tejido pueden causar un efecto deletéreo sobre el mismo, se decidió evaluar la histopatología de aquellos tejidos con reacción positiva. Los resultados indicaron que los cortes de testículos y epidídimo de los animales inmunizados con recCRISP2 mostraron túbulos seminíferos (**Figura 8A**) y epididimarios (**Figura 8B**) normales, conteniendo espermatozoides en su lumen. Por su parte, los ovarios mostraron presencia de folículos en crecimiento y de cuerpos lúteos sin signos de degeneración o atresia (**Figura 8C**). Ninguno de los tejidos evaluados presentó signos de infiltración leucocitaria.

En conjunto, estos resultados nos permiten excluir un posible efecto patológico de los anticuerpos generados sobre los tejidos estudiados.



Figura 8. Histología de los órganos reproductivos. Cortes de testículo (**A**), epidídimo (**B**) y ovario (**C**) de ratas inmunizadas con recCRISP2, teñidos con hematoxilina eosina y analizados bajo microscopio óptico. Muestra representativa de un total de 4 animales.

Habiendo demostrado la especificidad de los sueros, se evaluó, mediante ensayos de IFI, si los mismos eran capaces de detectar a la proteína en su conformación nativa sobre el espermatozoide de rata. Es importante destacar que, inicialmente, los ensayos se realizaron sobre espermatozoides fijados sin permeabilizar y los resultados mostraron que la marca se encontraba ausente o era muy débil. Por el contrario, las IFI realizadas sobre espermatozoides fijados y posteriormente permeabilizados con metanol frio, indicaron que los sueros anti-CRISP2 fueron capaces de reconocer a la proteína en espermatozoides frescos, capacitados e inducidos a sufrir la RA con ionóforo de calcio. Los resultados revelaron dos patrones claramente diferentes: uno representado por una marca en la región dorsal de la cabeza, acompañada por una marca en el acroplaxoma (**Patrón I, Figura 9A a,b**) estructura que se encuentra entre la membrana acrosomal y la membrana nuclear (**Figura 9B**), y el otro representado

por una marca en el acroplaxoma únicamente (**Patrón II, Figura 9A c,d**). En todos los casos, los espermatozoides expuestos a los sueros anti-CRISP2 mostraron una marca adicional en la cola, mientras que aquellos tratados con los sueros anti-MBP mostraron una reacción negativa (**Figura 9A e,f**). Mientras que el patrón I fue observado en la mayoría de los espermatozoides frescos ($67 \pm 3\%$), el porcentaje de células que presentaban el patrón II fue significativamente mayor (p<0,0001), respecto a los frescos ($33 \pm 4\%$), en los espermatozoides capacitados ($52 \pm 8\%$) y en los reaccionados ($72 \pm 3\%$). En conjunto, los resultados de IFI indicarían que los sueros anti-CRISP2 son capaces de reconocer a la proteína en su conformación nativa sobre los espermatozoides y que, en el espermatozoide de rata, CRISP2 se localizaría intracelularmente en la región acrosomal, en el acroplaxoma y en la cola.



Figura 9. Inmunolocalización de CRISP2 en espermatozoides de rata. A: Microfotografía de campo claro (izquierda) y de fluorescencia (derecha) de espermatozoides recuperados del cauda epididimario, fijados, permeabilizados y sometidos a IFI utilizando los sueros anti-CRISP2 (a,b,c y d) o anti-MBP (e y f) como primer anticuerpo. **B:** Esquema de un espermatozoide de rata mostrando las estructuras marcadas por el anticuerpo en la cabeza del espermatozoide. Con el fin de estudiar si la proteína CRISP2 sufre alguna modificación post traduccional durante el proceso de capacitación y RA, realizamos ensayos de Western Blot sobre extractos de espermatozoides frescos, capacitados e inducidos a reaccionar con ionoforo de calcio. Los resultados indicaron que CRISP2 permaneció unida al espermatozoide luego de la capacitación y la RA (**Figura 10**) sin sufrir modificaciones post traduccionales a juzgar por la presencia de una única banda que mantiene su movilidad electroforética en los extractos proteicos de las tres poblaciones.



Figura 10: Comportamiento de la proteína CRISP2 durante la capacitación y la RA. Extractos de espermatozoides frescos (F), capacitados (C) y reaccionados (R) fueron separados por electroforesis y revelados por Western Blot utilizando los sueros anti-CRISP2 como primer anticuerpo. La flecha indica la proteína CRISP2.

Una vez determinada la capacidad de los sueros de reconocer y unirse a la proteína CRISP2 en su conformación nativa sobre el espermatozoide, el próximo paso consistió en evaluar si dicha interacción era capaz de inhibir la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Para ello, se realizaron ensayos de fertilización in vitro en los cuales espermatozoides capacitados fueron co-incubados con ovocitos sin ZP en presencia de los sueros anti-CRISP2 o anti-MBP como control. Los resultados mostraron que la exposición de los espermatozoides a los sueros anti-CRISP2 producía una disminución significativa en el porcentaje de ovocitos penetrados respecto al control (**Figura 11**). Cabe aclarar que estos estudios no pudieron realizarse utilizando ovocitos con ZP debido a las conocidas dificultades que presenta este ensayo en la rata.

El próximo paso consistió en evaluar si los sueros habían producido algún efecto sobre otros parámetros funcionales del espermatozoide que pudieran afectar, indirectamente, su capacidad fertilizante. La evaluación de la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides expuestos a los anti-sueros descartó efectos sobre dichos
parámetros como así también la presencia de aglutinación (**Tabla 2**), apoyando una inhibición especifica de los sueros a nivel de la interacción espermatozoide-ovocito.



Figura 11. Efecto de los sueros anti-CRISP2 sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Espermatozoides de rata capacitados fueron preincubados con los distintos anticuerpos y luego co-incubados con ovocitos de de rata sin ZP, determinándose, posteriormente, el porcentaje de ovocitos penetrados. Los datos representan el promedio ± SEM de al menos tres ensayos independientes. *p<0.05.

Tabla 2. Determinación de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides.

	anti- CRISP2	anti- MBP
% de motilidad	45±6	49±6
% de viabilidad	58±2	58±7

Los datos representan el promedio ± SEM de al menos 3 ensayos independientes.

Habiendo observado que los anticuerpos anti-CRISP2 no producían un efecto patológico sobre los órganos reproductivos, y eran capaces tanto de reconocer a CRISP2 sobre el espermatozoide como de inhibir su capacidad fertilizante, el siguiente paso consistió en evaluar el efecto de la respuesta inmune sobre la fertilidad de los animales. Para ello, ratas machos y hembras inmunizadas con recCRISP2, MBP o recCRISP1 fueron puestos en apareo con animales control no tratados. En todos los

casos, los animales fueron apareados en dos períodos en los que se detectaron altos niveles de anticuerpos (ver **Figura 2**). Mientras que los machos y las hembras inmunizados con recCRISP1 presentaban una disminución en la fertilidad en el segundo apareo, tal como había sido descripto anteriormente (Ellerman et al., 2008), no se detectaron diferencias en la fertilidad de los animales inmunizados con recCRISP2 respecto a los animales controles para ningún sexo y en ninguno de los dos apareos (**Tabla 3**).

	Tratamiento	Nº de animales evaluados	Nº de hembras apareadas	Nº de hembras preñadas	% de fertilidad	Promedio de crías
Macho	MBP	5	15	11	73 ± 12	7.1 ± 0.8
	recCRISP2	7	21	17	81 ± 10	5.6 ± 0.7
	recCRISP1	5	15	7	47 ± 13*	5.2 ± 1.7
Hembras	MBP	6	6	5	83	8.3 ± 2.3
	recCRISP2	10	10	9	90	5.7 ± 1.3
	recCRISP1	5	5	2	40*	1.6 ± 1.2*

Tabla	3.	Fertilidad	de los	animales	inmunizados.	Apareo 2
Tubiu	υ.	i ci illiada	ac 103	annaico	minumzuu03.	

En conjunto, los resultados descriptos en el presente capítulo nos permiten concluir que CRISP2 participaría del proceso de fertilización en la rata, y que la misma es capaz de generar una respuesta inmune específica en ambos sexos, la cual no genera orquitis autoinmune y, a diferencia de CRISP1, no compromete la fertilidad de los animales. Sin excluir la relevancia de CRISP2 para la fertilidad, estos observaciones no apoyan CRISP2 como una molécula responsable de generar orquitis autoinmune o immunoinfertilidad

CAPÍTULO 3:

Estudio de CRISP3 en el proceso de fertilización y de su posible rol inmunoregulatorio.

Como se mencionara en la introducción, en nuestro laboratorio, hemos estudiado la asociación de CRISP1 y CRISP2 a los espermatozoides de distintas especies (humano, ratón y rata) encontrando que ambas proteínas permanecen unidas a la gameta luego de la capacitación y de la RA y que cumplen un rol en el proceso de fertilización (Busso et al., 2005);(Cohen et al., 1996);(Cohen et al., 2001);(Busso et al., 2007a). Sin embargo, poco se sabe aún de la función que podría cumplir CRISP3. Al respecto, cabe destacar que si bien el genoma de la rata no contiene al gen de CRISP3, en el ratón ha sido descripta su expresión en útero y varios órganos y glándulas esenciales tales como timo, bazo, glandula salival, entre otras, encontrándose ausente en el epidídimo y en el testículo (Reddy et al., 2008). Considerando la dificultad de trabajar con espermatozoides eyaculados de ratón, y teniendo en cuenta que en el humano CRISP3 está presente a lo largo de todo el tracto reproductor masculino como así también en el espermatozoide y el plasma seminal (Udby et al., 2005a), se decidió estudiar el tipo de asociación de CRISP3 al espermatozoide humano, su comportamiento durante la capacitación y su posible rol en el proceso de fertilización.

Para tal fin, se analizó mediante ensayos de Western Blot, la especificidad del anticuerpo anti-CRISP3 comercial y su capacidad de reconocer a la proteína en plasma seminal y en espermatozoides humanos. Los resultados mostraron que el anticuerpo utilizado fue capaz de reconocer, específicamente, tanto en el plasma seminal como en el espermatozoide, las dos formas de CRISP3 previamente descriptas (Udby et al., 2005a), una glicosilada con un peso molecular aparente de 31 KDa y otra no glicosilada con un peso molecular aparente de 29 KDa (**Figura 1**).

Habiendo corroborado la especificidad del anticuerpo y la presencia de la proteína en el espermatozoide humano, se llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin de estudiar el tipo de asociación de CRISP3 a la gameta masculina. Para ello, se realizaron diferentes tratamientos de extracción proteica evaluándose, posteriormente, la remoción o permanencia de CRISP3 en los espermatozoides mediante ensayos de Western Blot. Los resultados mostraron que mientras la proteína correspondiente a la

Resultados

banda de 31kDa fue removida por lavados con PBS, una proporción de la forma de 29kDa permaneció unida al espermatozoide luego del tratamiento con NaCl 0,6M, siendo totalmente extraída por Tritón X-100 1% (Figura 2, panel superior). Para evaluar la eficiencia del tratamiento con alta fuerza iónica, se realizó una segunda extracción secuencial, observándose nuevamente que, a diferencia de lo que ocurre con el detergente (Tritón X-100), dos extracciones consecutivas con NaCl 0,6M no lograban extraer la proteína (Figura 2, panel inferior). En conjunto, los resultados sugieren que mientras la banda de 31kDa se estaría comportando como una proteína periférica, una proporción de la de 29kDa se encontraría fuertemente unida a la membrana.



Figura 1: Presencia de CRISP3 en plasma seminal y espermatozoides humanos. Extractos proteicos de plasma seminal y espermatozoides humanos fueron separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida y analizados por Western Blot utilizando anti-CRISP3 como primer anticuerpo. La figura corresponde a un Western Blot representativo de al menos tres ensayos independientes.

El paso siguiente consistió en investigar el comportamiento de CRISP3 durante la capacitación y la RA. Para ello, los espermatozoides humanos fueron incubados en condiciones capacitantes e inducidos a sufrir la RA mediante su exposición a ionóforo de calcio evaluándose, luego, la presencia de la proteína sobre la gameta mediante ensayos de Western Blot. Los resultados mostraron que mientras la banda de 31kDa no se encontraba en los espermatozoides capacitados, la banda de 29kDa permanecía unida a los espermatozoides tanto capacitados como reaccionados (**Figura 3A**). A continuación, los espermatozoides capacitados fueron sometidos a diferentes tratamientos de extracción proteica para evaluar el tipo de asociación de la

proteína sobre dicha subpoblación de células. En la **Figura 3B** puede observarse que, luego de la capacitación, la proteína no sólo mantiene su movilidad electroforética sino también el mismo tipo de unión, siendo liberaba por Triton X-100 1% pero no así por fuerza iónica (NaCl 6,0M). Estos resultados sugieren que la forma de 29kDa de CRISP3 permanecería unida al espermatozoide luego de la RA sin sufrir, a juzgar por la movilidad electroforética, modificaciones post traduccionales.



Figura 2: Asociación de CRISP3 a los espermatozoides humanos. Espermatozoides humanos fueron sometidos a distintos tratamientos de extracción y centrifugados para obtener los sobrenadantes (sn) y los precipitados (pl), los cuales fueron separados electroforéticamente y analizados por Western Blot utilizando anti-CRISP3 como primer anticuerpo. La figura corresponde a un Western Blot representativo de al menos tres ensayos independientes.

Es sabido que durante la capacitación de los espermatozoides se produce la remoción o alteración de factores estabilizantes de la membrana del espermatozoide que impiden la ocurrencia de una capacitación prematura. La mayoría de dichos factores, denominados "factores decapacitantes", corresponden a proteínas periféricas asociadas a la membrana por fuerzas electroestáticas (Cooper, 1998). Considerando que una población de CRISP3 cumplía con dichas características, se decidió evaluar si su presencia durante la capacitación era capaz de afectar la fosforilación de proteínas en residuos tirosina, uno de los eventos claves del proceso de capacitación. Para ello, espermatozoides humanos fueron incubados en medio capacitante conteniendo CRISP3, analizándose, posteriormente, la fosforilación de proteínas en tirosina mediante Western Blot. Cabe aclarar que para realizar dichos ensayos se utilizó la proteína CRISP3 equina nativa (80% homóloga a la humana), la cual fue gentilmente provista por la Dra. Edda Topfer-Petersen (Universidad de Hannover, Germany). Los resultados mostraron que, bajo estas condiciones, los espermatozoides capacitados presentaron un nivel de fosforilación similar al de los espermatozoides control **(Figura 4)** sugiriendo que CRISP3 no actuaría como un factor decapacitante capaz de inhibir la fosforilación en tirosina.



Figura 3 Comportamiento de la proteína CRISP3 durante la capacitación y RA. A. Extractos de proteínas totales de espermatozoides frescos (F), capacitados (C) y tratados con ionóforo de calcio (I), fueron sometidos a electroforesis y analizados por Western Blot. B. Espermatozoides capacitados fueron sometidos a distintos tratamientos de extracción y la presencia de CRISP3 en los extractos analizada por Western Blot. Tanto en A como en B se utilizó anti-CRISP3 como primer anticuerpo. sn: sobrenadante. pl: pellets. La figura corresponde a un Western Blot representativo de al menos tres ensayos independientes.

En paralelo, se estudió la localización de la proteína CRISP3 en los espermatozoides humanos mediante IFI. Para ello, espermatozoides frescos, capacitados y reaccionados con ionóforo fueron fijados y sometidos a IFI utilizando anti-CRISP3 o lgG normal como primer anticuerpo. El análisis de los resultados mostró dos patrones de marcación fluorescentes en las diferentes poblaciones evaluadas. Mientras que la mayoría de los espermatozoides frescos presentaba marca fluorescente en la región acrosomal (Figura 5A), los espermatozoides capacitados y reaccionados exhibían, además, un patrón fluorescente en el segmento ecuatorial (Figura 5B). En todos los casos, la fluorescencia en la cabeza estuvo acompañada de una marcación en la pieza media. La Figura 5C muestra la reacción negativa obtenida cuando se utilizó anti-IgG como primer anticuerpo.



Figura 4: Efecto de CRISP3 sobre la fosforilación de proteínas en tirosina. Extractos proteicos de espermatozoides humanos frescos (F) o capacitados (C) en ausencia (-) o presencia de CRISP3 (6µM) fueron analizados por Western Blot utilizando anti-fosfotirosina como anticuerpo. La figura corresponde a un Western Blot representativo de tres ensayos independientes.



Figura 5. Localización de CRISP3 en espermatozoides humanos. Espermatozoides humanos frescos, capacitados y tratados con ionóforo de calcio fueron fijados y sometidos a IFI utilizando anti-CRISP3 (A y B) o IgG de conejo normal (C) como primeros anticuerpos. **A**: Imagen representativa de la marca fluorescente observada en la región acrosomal y en la pieza media. **B**: Imagen representativa de la marca en el segmento ecuatorial y en la pieza media.

Si bien la localización de CRISP3 en el capuchón acrosomal, región por la cual los espermatozoides se unen a la ZP, nos permite especular acerca de la posible participación de la proteína en la interacción con la ZP, las nuevas normas existentes en las clínicas de reproducción asistida dificultan la obtención de ZP humana para realizar estos estudios. Por otra parte, la presencia de CRISP3 en el SE, dominio responsable de la fusión con el oolema, abre la posibilidad de que la proteína participe en esta etapa especifica del proceso de fertilización. Con el fin de evaluar esta hipótesis, se utilizó el ensavo heterólogo conocido como HOPT (Hamster Oocyte Penetration Test), el cual evalúa la capacidad de espermatozoides humanos de fusionarse con la membrana plasmática de ovocitos de hamster sin ZP (Yanagimachi et al., 1976). Para ello, espermatozoides humanos capacitados fueron preincubados con el anticuerpo anti-CRISP3 y luego co-incubados con ovocitos de hamster sin ZP, evaluándose el efecto del anticuerpo sobre la capacidad fertilizante de los espermatozoides. Teniendo en cuenta resultados previos de nuestro laboratorio mostrando que tanto el anticuerpo anti-CRISP1 como anti-CRISP2 son capaces de inhibir la capacidad de los espermatozoides humanos de penetrar ovocitos de hámster, utilizamos dichos anticuerpos como control positivo de inhibición (Busso et al., 2005);(Cohen et al, 2001). Por otra parte, como control negativo, las gametas fueron incubadas en presencia de IgG de conejo normal. Los resultados mostraron que, a diferencia de lo que ocurre con anti-CRISP1 y anti-CRISP2, el anticuerpo anti-CRISP3 no produjo una disminución en el porcentaje de ovocitos fertilizados (Figura 6) sugiriendo que CRISP3 no estaría participando en la etapa de fusión de gametas en el humano.

En base a estas observaciones, y considerando que CRISP3 se expresa diferencialmente en ciertos tipos de cánceres y enfermedades autoinmunes (Gibbs el at, 2008), el siguiente paso consistió en explorar si CRISP3 podría estar cumpliendo, en realidad, un rol en la regulación del sistema inmune. Con el fin de investigar dicha posibilidad, nuestro laboratorio estableció una colaboración con el Dr. Gabriel Rabinovich (IBYME), investigador reconocido a nivel internacional por su importante trabajo sobre el rol inmunoregulador de galectinas y glicanos.



Figura 6: Efecto del anti-CRISP3 sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides humanos. Espermatozoides humanos capacitados fueron preincubados con los distintos anticuerpos y luego co-incubados con ovocitos de hamster sin ZP, evaluándose el porcentaje de ovocitos penetrados. Los datos representan el promedio ± SEM de al menos 3 ensayos independientes. *p < 0.05.

Como una primera aproximación para estudiar dicho rol decidimos analizar, en el modelo del ratón, la expresión de CRISP3 en las células dendríticas (DC) cuya función es clave en la interfase entre inmunidad innata y adaptativa. Teniendo en cuenta que CRISP3 exhibe una gran homología con la proteína epididimaria CRISP1, para la cual contábamos con una colonia de animales KO, decidimos también evaluar la expresión de CRISP1 en las DC. Para ello, las DC fueron obtenidas estimulando la diferenciación de las células provenientes de la médula ósea de ratones con el factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GMC-SF) en cultivo. Concluido el período de diferenciación, las DC obtenidas, denominadas inmaduras (DCi), fueron expuestas a un ambiente inflamatorio cultivándolas en presencia de lipopolisacaridos (LPS) por 24hs para obtener las células dendríticas maduras (DCm).

En el caso de CRISP3, se evaluó la expresión del mensajero mediante la técnica de PCR. Para ello, se utilizaron primers especificos y, como molde, ADNc obtenido mediante RT-PCR del ARN extraído de las DCi y de las DCm. Considerando que la expresión de CRISP3 habia sido previamente demostrada en varios tejidos entre los cuales se encontraba el útero (Reddy et al., 2008), empleamos ADNc proveniente de

Resultados

dicho órgano como control. Por otro lado, los primers para el gen de actina fueron utilizados para controlar la cantidad de ADNc presente en cada tubo de reacción. Los resultados mostraron que CRISP3 se expresa tanto en las DCi como en las DCm. Asimismo, para evaluar si la expresión de la proteína se mantenía cuando las células eran incubadas por tiempos más largos en presencia de LPS, se realizó una incubación por 48hs detectándose, nuevamente, la presencia del mensajero de CRISP3 (**Figura 7A**). La semi-cuantificación de las bandas no mostró diferencias significativas en la expresión del mensajero a lo largo del tiempo (**Figura 7B**).



Figura 7: Análisis de la expresión de CRISP3 a nivel de ARN mensajero. El ADNc de las DCi y de las DCm cultivadas por 24 hs o 48 hs fue utilizado como molde en una PCR y su producto separado por electroforesis en geles de agarosa (A). Cuantificación de las bandas realizada mediante densitometría utilizando el programa Image J (B). UT: útero, -RT: ADNc proveniente de una RT-PCR realizada sin la retrotranscriptasa.

La expresión de la proteína CRISP3 en DC se evaluó a partir de extractos proteicos provenientes de las DCi y de las DCm, los cuales fueron sometidos a separación electroforética e inmuno-detección utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína CRISP3 de ratón. Los resultados mostraron que la proteína CRISP3 se expresa en ambas subpoblaciones de células (**Figura 8**).

El siguiente paso consistió en estudiar la localización de CRISP3 en DC mediante ensayos de IFI. Los resultados indicaron que, a diferencia de lo que ocurre con el anticuerpo control (IgG normal), las células expuestas a anti-CRISP3 mostraron una marca fluorescente en el citoplasma de la célula, consistente con lo esperado para una proteína secretoria (**Figura 9**).



Figura 8: Análisis de la expresión de CRISP3 a nivel proteico. Extractos proteicos provenientes de DCi, DCm y utero (control) de ratón fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida y analizados por Western Blot utilizando anti-CRISP3 como primer anticuerpo.



Figura 9: Localización de CRISP3 en las células dendríticas. A. Las DC de ratón fueron fijadas, permeabilizadas y sometidas a IFI utilizando anti-CRISP3 como primer anticuerpo. Aumento 200X (panel izquierdo), 1000X (panel central), campo claro (panel derecho). **B.** Se empleó IgG normal como control. Aumento 200x (izquierda), campo claro (derecha).

Por otra parte, estudiamos la expresión de CRISP1 en las DC mediante PCR utilizando el modelo de animales KO. Mientras que tanto en las DCi como las DCm provenientes de los animales *Crisp1*^{+/-} se observó una banda del tamaño esperado para el mensajero de CRISP1, en las células de los animales *Crisp1*^{-/-}, se detectó

Resultados

únicamente la banda de actina (**Figura 10A**). Por otra parte, estudios de IFI confirmaron la ausencia de expresión de CRISP1 en las DC detectandose su presencia en el citoplasma celular de los animales control (**Figura 10B**).



Figura 10: Expresión y localización de CRISP1 en DC de ambos genotipos. A. El ADNc proveniente de las DCi y DCm de animales *Crisp1^{+/-}* y *Crisp1^{-/-}* fue utilizado como molde en una PCR empleando "primers" específicos para CRISP1 o para actina y luego separado por electroforesis en geles de agarosa. **B.** Las DC fueron fijadas, permeabilizadas y sometidas a IFI utilizando anti-CRISP1 como primer anticuerpo. Microfotografía de fluorescencia (**panel izquierdo**) de campo claro (**panel derecho**).

Habiendo demostrado la expresión de CRISP1 en las DC, el paso siguiente consistió en evaluar si su ausencia era capaz de producir cambios fenotípicos sobre dichas células. Para ello, se analizó por citometría de flujo, el porcentaje de células positivas para los marcadores de superficie CD11c (característico de DC de ratón) y CD86, (altamente expresada en las DC activadas) (**Figura 11**). Al respecto, cabe aclarar que el desplazamiento de la curva hacia mayores intensidades de fluorescencia indica la existencia de una población de células positivas para el marcador de superficie que se esta analizando. Los resultados mostraron que, luego del tratamiento con GM-CSF, las células provenientes de la médula ósea de los animales de ambos genotipos fueron capaces de diferenciarse a DCi (**Figura 11A**), mostrando fenotipos de superficie similares, con aproximadamente un 70% de DC positivas para CD11c y un 10% de células positivas para CD86 (**Figura 11B**).



Figura 11: Efecto de la ausencia de CRISP1 sobre el fenotipo celular de las DCi. A. Se muestra un ensayo representativo del análisis del fenotipo de la superficie de las DCi por citometria de flujo, utilizando los anticuerpos anti-CD11c y anti-CD86. En ambos casos, la curva gris corresponde al anticuerpo control (IgG del isotipo correspondiente). **B.** Porcentaje de células positivas para cada marcador de superficie. Los resultados son expresados como el promedio ± SEM de 4 ensayos independientes.

Por otro lado, el LPS fue capaz de inducir la maduración de las DCi provenientes tanto de los animales KO como de los controles, tal como lo demuestra el aumento en el porcentaje de células positivas para el marcador de superficie CD86 (**Figura 12A**). Si bien se observó una tendencia de las células provenientes de los animales *Crisp1^{-/-}* a presentar un porcentaje mayor de CD86 luego de la activación, no se observaron diferencias significativas respecto a los controles (**Figura 12B**).



Figura 12: Efecto de la ausencia de CRISP1 sobre el fenotipo celular de las DCm. A. Se muestra un ensayo representativo del analisis del fenotipo de la superficie de las DCm por citometria de flujo, utilizando los anticuerpos anti-CD11c y anti-CD86. En ambos casos, la curva gris corresponde al anticuerpo control (IgG del isotipo correspondiente). B. Porcentaje de células positivas para cada marcador de superficie para ambos genotipos. Los resultados son expresados como el promedio ± SEM de 4 ensayos independientes.

El siguiente paso consistió en estudiar la relevancia de CRISP1 en la funcionalidad de las DC. Para ello, se evaluó mediante ELISA si la ausencia de la proteína era capaz de modular el perfil de secreción de citoquinas de las células. Los resultados revelaron que, mientras no se observaron diferencias significativas en la secreción de las citoquinas inmunosupresoras IL-10 o IL-27 como así tampoco de la citoquina proinflamatoria IL-23, hubo una disminución significativa en la capacidad de las DCm de animales *Crisp1^{-/-}* de secretar IL-12 (**Figura 13**), sugiriendo que CRISP1 podría cumplir una función a favor de una respuesta inmunoestimulatoria.

Cabe destacar que, al analizar los resultados, observamos ciertas diferencias en el patrón de secreción entre machos y hembras. En base a ello, y considerando que la expresión de CRISP1 se encuentra regulada por andrógenos en diferentes órganos (Haendler et al., 1997), decidimos realizar el análisis sobre ambos grupos en forma independiente. Los resultados indicaron que mientras los machos presentaron un perfil de secreción similar al descripto para todo el grupo (**Figura 14A**), las hembras

presentaron un perfil diferente, mostrando una disminución en la secreción de la citoquina inmunosupresora IL-10, sin observarse diferencias en IL-27 ni en las citoquinas pro-inflamatorias IL-23 e IL-12 (**Figura 14B**). Estos resultados sugerirían que, en las hembras, CRISP1 parecería cumplir un rol inmunosupresor.



Figura 13: Efecto de la ausencia de CRISP1 sobre la capacidad de secreción de citoquinas de las DCm. Las DCi fueron estimuladas con LPS y la producción de citoquinas fue determinada por ELISA. Los datos representan el promedio ± SEM de al menos 3 experimentos independientes.

En resumen, los resultados presentados en este capítulo indican que, a diferencia de otras proteínas CRISP, la proteína CRISP3 no participaría en el proceso de fertilización apoyando la idea de que, junto a CRISP1, podría tener un rol en la regulación del sistema inmune.





CAPÍTULO 1

Influencia del origen genético sobre el fenotipo de los animales KO para CRISP1.

A pesar de la importancia del proceso de fertilización, es aún muy escasa la información disponible acerca de la identidad de las moléculas involucradas, limitándose a unas pocas tanto para el ovocito como para el espermatozoide. A lo largo de estos últimos años, el uso de ratones genéticamente modificados para el estudio del proceso de fertilización ha sido una herramienta muy poderosa que permitió evaluar *in vivo* los resultados obtenidos mediante estudios de fertilización *in vitro*.

Para dilucidar el papel funcional de la proteína epididimaria CRISP1 en el proceso de fertilización, en el laboratorio se generó una línea murina con una depleción selectiva del gen *Crisp1*, siendo éste el primer KO descripto para una proteína de la familia CRISP. El análisis del fenotipo de los ratones carentes de CRISP1 en una base genética mixta (129SvEv/C57BL/6) mostró que los animales resultaron normales en cuanto a su viabilidad y fertilidad. Sin embargo, en forma consistente con los roles propuestos para CRISP1 en el proceso de fertilización, los espermatozoides provenientes de dichos animales presentaron una disminución significativa en su capacidad de interactuar con la ZP y fusionarse con el oolema, como así también una marcada disminución en el nivel de fosforilación de proteínas en tirosina, evento clave dentro del proceso de capacitación (Da Ros et al., 2008).

El hecho de que los espermatozoides de los animales KO para CRISP1 exhiban *in vitro* una deficiencia funcional que no afecta la fertilidad ha sido también observado en ratones KO para numerosas proteínas espermáticas tales como acrosina, (Baba et al., 1994); (Adham et al., 1997), β -1,4-galactosiltransferasa (Lu and Shur, 1997), SED1 (Ensslin and Shur, 2003), zonadhesin (Tardif et al., 2010), entre otras (Ikawa et al., 2010). En la mayoría de estos modelos murinos, si bien la fertilidad no está afectada, se observa fallas en la capacidad fertilizante de los espermatozoides *in vitro* concordante con la función descripta previamente para cada proteína. Existen varias explicaciones no excluyentes que podrían justificar un efecto a nivel de la funcionalidad del espermatozoide sin que se afecte la fertilidad de los animales. Una de ellas es el fenómeno de redundancia funcional como el que existe en familias de

proteínas cuyos miembros, estructuralmente similares, pueden compensar funcionalmente a la proteína faltante o, bien la compensación que existe entre proteínas no homólogas pero con función biológica similar (Reiss and Saftig, 2009);(Kim et al., 2005).

Otro motivo posible por el cual el fenotipo producido por la falta de la proteína en estudio no se haga evidente es el efecto del fondo genético. En este sentido, existen varios trabajos en los cuales se ha observado que una mutación puede producir fenotipos marcadamente diferentes dependiendo del origen genético (Erickson, 1996). Los animales generados por recombinación homóloga, en la mayoría de los casos, son híbridos entre las cepas 129/SvEv y C57BL/6. En la literatura, existen numerosos ejemplos de modelos animales portadores de una mutación que exhiben un fenotipo normal cuando su origen genético es mixto, si bien presentan un defecto funcional cuando el ADN es homogéneo (Muller, 1999). Un ejemplo de ello es el modelo de animales KO generado para CD81, tetraspanina esencial para la fertilidad de las hembras de la cepa C57BL/6 ó BALB/c pero dispensable en los ratones híbridos originales (Rubinstein et al., 2006); (Maecker and Levy, 1997). Asimismo, los animales KO para la proteína SMCP (Sperm Mitochondria Associated Cystein Rich Protein) son fértiles cuando su base genética es mixta y totalmente infértiles cuando los ratones son retrocruzados hasta obtener un contenido génico homogéneo (Navernia et al., 2002). Una posible explicación para esta variabilidad en los fenotipos surgió a partir de un modelo animal de fibrosis quística donde se descubrió que otro factor génico, presente en algunas cepas de ratones, podría compensar parcialmente la función de la proteína mutada (Rozmahel et al., 1996). Esto sugiere que en los casos anteriores de CD81 y SMCP, podría existir un alelo específico de la cepa 129 que interactúe con la mutación, produciendo así un fenotipo normal. Teniendo en cuenta dichas observaciones, y que el uso de cepas endocriadas facilita la comparación de resultados entre diferentes laboratorios, uno de los objetivos de esta Tesis consistió en analizar la influencia del origen genético sobre el fenotipo de los animales carentes de CRISP1.

La elección de la cepa utilizada para realizar las retrocruzas estuvo basada, fundamentalmente, en dos aspectos. En primer lugar, la cepa C57BL/6 es una de las más utilizadas para realizar retrocruzas ya que los animales con un origen genético mixto poseen un 50% del ADN correspondiente a dicha cepa. Segundo, si bien existen otras cepas disponibles en el bioterio, nuestro laboratorio ha realizado numerosos

126

ensayos in vitro con animales provenientes de la cepa C57BL/6, lo cual nos ha permitido conocer ampliamente este modelo.

Las líneas congénicas, creadas por la introducción de una región cromosómica en una línea co-sanguínea, se obtienen por retrocruzas repetidas de la línea donante (animales *Crisp1*^{-/-} de la colonia mixta) con una línea consanguínea receptora (cepa C57BL/6) a lo largo de varias generaciones (N1, N2, etc). En cada generación de retrocruza, el nivel de heterocigosis se reduce un 50% y aumenta en la misma proporción la base genética de la línea receptora. Si bien, idealmente, es necesario realizar por lo menos 10 generaciones de retrocruzas, en la séptima generación el 99,6% del genoma corresponde a la línea receptora (Fernando J.Benavides and Jean-Louis Guénet, 2003). Por otra parte, la disminución en la fertilidad para los animales deficientes en la tetrasparina CD81 se puso en evidencia luego de la cuarta-quinta generación de retrocruza tanto para la cepa C57BL/6 como para la cepa BALB/c (Rubinstein et al., 2006). En base a estas observaciones, y considerando que bajo las condiciones de nuestro bioterio, la obtención de la séptima generación demoró más de dos años, el análisis del fenotipo fue realizado una vez alcanzada dicha generación.

Habiendo confirmado la falta de expresión de CRISP1 en los animales mutados tanto a nivel de mensajero como a nivel proteico, evaluamos la fertilidad de los animales. Los resultados mostraron que las hembras colocadas en apareo con los machos carentes de CRISP1 presentaban, a diferencia de lo observado en la colonia hibrida inicial, un retraso significativo respecto a los machos control en el tiempo transcurrido desde el inicio del apareo hasta el parto. El análisis de los datos obtenidos reveló que la diferencia encontrada podría deberse a la existencia de una subpoblación de machos *Crisp1*^{-/-} que no es capaz de preñar a las dos hembras en un único periodo estral. Estudios posteriores en los cuales los apareos fueron realizados con hembras superovuladas, descartaron la posibilidad de que esto se debiera a la variabilidad en el inicio del ciclo estral, confirmando que los animales KO presentarían una desventaja en su capacidad fertilizante in vivo respecto a los animales control. Estos resultados concuerdan con diversos trabajos demostrando que, bajo esquemas de apareos restrictivos, puede evidenciarse la desventaja de los animales KO frente a los controles (Sutton et al., 2008);(Navarro et al., 2011).

Si bien no puede descartarse la posibilidad de que la ausencia de CRISP1 en animales con otro fondo genético pueda producir infertilidad, es importante recordar que la familia de proteínas CRISP presenta una alta homología de secuencia entre sus miembros, muchos de los cuales participan en la interacción de gametas. En

particular, resultados de nuestro laboratorio sugieren la participación de CRISP2 en la etapa de fusión y, recientemente, dos grupos de investigación demostraron la participación de CRISP4 en la interacción espermatozoide-ZP mediante la utilización de un modelo de animales KO (Gibbs et al., 2011);(Turunen et al., 2012). En base a ello, la ausencia de un fenotipo infértil en los animales Crisp1^{-/-} de ambas colonias, así como también en los animales Crisp4^{-/-}, podría ser consecuencia de la existencia de una fuerte compensación funcional entre los miembros de esta familia, restando aún por evaluar los niveles de expresión de las otras proteínas de la familia en cada modelo. En este sentido, cabe mencionar que, a través de una colaboración con el grupo del Dr M. Okabe (Osaka University, Japón), hemos recibido una línea de ratones KO para CRISP2 y otra para CRISP4, lo cual nos permitirá generar los animales dobles KO y analizar su fertilidad, colocando a nuestro grupo en una posición única al contar con los animales KO para tres de las cuatro CRISP descriptas en mamíferos. Estos estudios nos brindarán importante información tanto sobre la posible redundancia funcional entre las proteínas CRISP como sobre los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de fertilización.

Como se mencionara anteriormente, estudios de nuestro laboratorio indican que la presencia tanto de la proteína CRISP1 purificada como del anticuerpo anti-CRISP1 durante la co-incubación de gametas produce un efecto inhibitorio a nivel de la interacción de los espermatozoides tanto con la ZP (Busso et al., 2007a) como con el oolema (Rochwerger et al., 1992);(Cohen et al., 2000a). En este sentido, los resultados presentados en esta Tesis indican que los espermatozoides Crisp1^{-/-} provenientes de los animales de la nueva colonia poseen una capacidad fertilizante significativamente menor a los controles al ser co-incubados con ovocitos con ZP. Más aún, los ensayos posteriores a tiempos cortos, indicaron que la menor capacidad fertilizante de los espermatozoides mutantes se encontraría a nivel de la etapa de unión a la ZP. Por otro lado, en concordancia con el rol propuesto para CRISP1 en fusión, los ensayos realizados con ovocitos sin ZP mostraron una reducción significativa en la capacidad fusogénica de los espermatozoides Crisp1^{-/-} provenientes de la nueva colonia. Cabe destacar que tanto en los ensayos de interacción con la ZP como en los de fusión, se obtuvieron porcentajes de inhibición similares a los encontrados al realizar los estudios en la colonia original. En este sentido, las evidencias indican que la comparación del fenotipo de diferentes cepas endocriadas permite distinguir entre el efecto de la mutación en sí misma y el efecto del contexto genético sobre la mutación (Montagutelli, 2000). Dichos antecedentes, junto a los resultados obtenidos en los ensayos de fertilización in vitro, apoyan la importancia de

la proteína CRISP1 tanto en la etapa de interacción con la ZP, como con el oolema independientemente del fondo genético.

Como se mencionara en la introducción, uno de los mayores cambios que ocurre durante el proceso de capacitación del espermatozoide es la desestabilización de la membrana plasmática como resultado de la redistribución de lípidos, la pérdida de colesterol, y la liberación de factores decapacitantes. La remoción del colesterol cambia la permeabilidad de la membrana y su fluidez, lo cual permite el flujo de iones y la activación de mensajeros secundarios intracelulares. Asimismo, numerosos estudios correlacionan al proceso de capacitación con ciertos cambios bioquímicos tales como el aumento en los niveles de fosforilación de proteínas en residuos tirosina, y la nitrosilación de proteínas (Revisión de trabajos en Buffone et al 2012). Las modificaciones que sufre el espermatozoide durante la capacitación permiten, fundamentalmente, que el espermatozoide pueda sufrir la rápida activación de la motilidad y que, luego de un largo período de incubación, pueda sufrir la RA y desarrollar el fenómeno de hiperactivación (revisión de trabajos en Florman y Ducibella, 2006 y en Visconti, 2009). En este sentido, la evaluación de la motilidad espermática indicó que los espermatozoides Crisp1^{-/-} presentaron una disminución en la motilidad total tanto al inicio de la capacitación como una vez finalizada la misma. Considerando que en la colonia original no se había observado un efecto sobre la motilidad, los resultados presentados en esta Tesis indican, por primera vez, la importancia de la proteína CRISP1 para la motilidad espermática así como también la influencia del origen genético sobre dicho parámetro. Esta última observación es consistente con los resultados obtenidos en el modelo de animales KO para la proteína SMCP del espermatozoide, en el cual también el defecto en motilidad se observó sólo cuando el origen genético era homogéneo (Nayernia et al, 2002).

Por otra parte, durante la capacitación, la entrada de HCO₃⁻ y Ca²⁺ produce la activación de la sAC, llevando a un aumento del AMPc con la consecuente activación de la PKA (Visconti, 2009). Dado que existen diversos estudios que indican que los ratones mutantes para genes relacionados con la cascada de señales del AMPc (PKA sub Cα, AKAP4, sNHE; sAC y CatSper) poseen espermatozoides con severos defectos en la motilidad (Miki et al., 2002; Ren et al., 2001; Skalhegg et al., 2002; Wang et al., 2007) evaluamos si la exposición de los espermatozoides a un análogo permeable del AMPc (dibutiril AMPc, dbAMPc) junto a un inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX) producía algún efecto sobre dicho parámetro. Los resultados mostraron que la presencia de ambos reactivos durante la capacitación logró revertir el

defecto en la motilidad que presentaban los espermatozoides KO a niveles comparables a los controles, sugiriendo que un defecto en la acumulación del AMPc sería la causa más probable del defecto en la motilidad producido por la falta de CRISP1. El hecho de que los mismos resultados hayan sido obtenidos utilizando espermatozoides provenientes de los animales KO para sAC, una enzima indispensable para producir el aumento intracelular de AMPc (Esposito et al., 2004); (Xie et al., 2006) nos permite especular que la ausencia de CRISP1 podría estar generando una desregulación en la cascada de señales sAC/AMPc/PKA. En este sentido, numerosas evidencias apoyan la existencia de una conexión entre canales iónicos y la cascada de señales del AMPc (Wang et al., 2007); (Brenker et al., 2012). Más aún, esta hipótesis se encuentra avalada por la observación de que el agregado de ciertos análogos permeables del AMPc produce un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular (Ren et al., 2001). Asimismo, se ha descripto que, además de las proteínas CRISP de venenos de reptiles (Guo ert al, 2005), las proteínas de mamíferos CRISP2 y CRISP4 tendrían la capacidad de regular la actividad de canales de Ca2+ rianodinicos y el canal de Ca²⁺ TRPM8, respectivamente (Gibbs et al., 2006);(Gibbs et al., 2011);(Guo et al., 2005). Estas observaciones, junto a los resultados obtenidos en esta Tesis, abren la posibilidad de que CRISP1 actúe regulando el flujo de iones que controla la cascada de señales que llevan a la capacitación. Al respecto, cabe destacar que ya hemos iniciado una colaboración con el Dr. Alberto Darszon (Universidad Nacional Autónoma de México, México) experto en el estudio de canales iónicos en el espermatozoide, con el fin de determinar la actividad de CRISP1 sobre canales individuales en el espermatozoide mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas. Los resultados obtenidos hasta el momento parecen confirmar que CRISP1 tendría la capacidad de regular canales de Ca²⁺ TRP, tal como se observa para CRISP4 (Gibbs et al., 2011). Por otra parte, cabe destacar que Roberts y sus colaboradores (2008) describieron la presencia de una población de CRISP1 en la cola de los espermatozoides de rata apoyando la idea de que la ausencia de esta población podría ser la responsable de generar el defecto en la motilidad. Asimismo, la motilidad se adquiere durante la maduración epididimaria y se activa durante la capacitación (Eddy, 2006). En base a ello, las altas concentraciones de CRISP1 en el epidídimo (Gibbs et al., 2008), lugar donde se uniría al espermatozoide (Kohane et al., 1980b; Cameo et al., 1986), abre la posibilidad de que la disminución observada en la motilidad espermática se deba a un defecto en la maduración epididimaria producida por la ausencia de CRISP1.

Diversos estudios sugieren que la proteína epididimaria de rata CRISP1 podría actuar como un factor decapacitante. Por un lado, durante la capacitación de espermatozoides de rata, se produce la remoción de una gran cantidad de CRISP1 de la superficie de los mismos (Kohane et al., 1980a; Cohen et al., 2000b) y, por otro, la presencia de esta proteína durante la capacitación inhibe la fosforilación en tirosina y la ocurrencia de la RA inducida por progesterona (Roberts et al., 2003b). En este sentido, nuestro laboratorio describió que los animales KO para CRISP1 de la colonia original presentaban una disminución en la fosforilación de proteínas en tirosina (Da Ros et al., 2008), la cual a su vez podía ser compensada por el agregado conjunto de dbAMPc y IBMX. Dicho resultado sugeriría la existencia de un defecto en la acumulación de AMPc en el espermatozoide mutante, lo cual fue confirmado mediante ensayos de RIA (Tesis doctoral Maldera JA). En base a ello, y como una lógica continuación de nuestros estudios, se investigó el nivel de fosforilación de proteínas en residuos tirosina luego de la capacitación. Los resultados mostraron que, una vez finalizada la capacitación, los espermatozoides Crisp1^{-/-} no mostraron diferencias respecto a los controles. Si bien se desconocen las razones genéticas de la discrepancia entre las dos colonias, los resultados sugieren que la ausencia de CRISP1 en sí misma podría desregular la cascada de señales sAC/AMPc/PKA, produciendo fenotipos diferentes dependiendo del origen genético, es decir bajo el efecto de los genes que rodean a CRISP1 en la cepa C57BL/6 se ve afectada la motilidad mientras que, en el contexto genético de la colonia mixta, se ve afectada la fosforilación en residuos tirosina.

Como se mencionara anteriormente, las modificaciones bioquímicas que ocurren durante el proceso de capacitación permiten al espermatozoide sufrir la RA (Revisión de trabajos en Buffone et al., 2012). La secuencia de eventos que llevan a la ocurrencia de dicha reacción incluye la activación de canales de Ca²⁺ y, como consecuencia, el aumento sostenido de la concentración intracelular del catión y de otros mensajeros secundarios tales como el AMPc. Este hecho desencadena una cascada de señales que eleva el pH intracelular y dispara la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios (Abou-haila and Tulsiani, 2009). El análisis de los animales *Crisp1^{-/-}* de la nueva colonia mostró que si bien los espermatozoides presentaban un incremento en el porcentaje de RA luego de la capacitación similar al de los controles, a diferencia de lo observado en la colonia inicial, eran incapaces de responder a la inducción por progesterona. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos en los espermatozoides KO para la proteína epididimaria CRISP4, los cuales también presentaron dificultades para responder a la

progesterona (Gibbs et al., 2011);(Turunen et al., 2012), y apoyan, nuevamente, la idea de que CRISP1 pueda cumplir un rol en la regulación de canales de Ca²⁺. Por otra parte, el hecho de que el AMPc sea un mensajero secundario que participa en la ocurrencia de la RA (Branham et al., 2006; Breitbart and Etkovitz, 2011) abre la posibilidad de que, al igual que lo propuesto para la motilidad, la causa del fenotipo observado a nivel de la inducción de la RA sea la desregulación en la cascada de señales sAC/AMPc/PKA.

En los espermatozoides murinos, existen evidencias que indican que CRISP1 es una de las proteínas que se liberan de la superficie durante la capacitación in vitro. (Nixon et al., 2006). Sin embargo, resultados recientes de nuestro laboratorio, indican que, a diferencia de los que ocurre en la rata, la presencia de CRISP1 durante la capacitación de los espermatozoides de ratón no es capaz de inhibir ni la fosforilación en tirosina ni la RA espontánea o inducida, sugiriendo que CRISP1 desempeña un papel regulador en la capacitación de los espermatozoides de ratón diferente al previamente propuesto para la rata (Roberts et al., 2003b; Roberts et al., 2006; Da Ros et al., 2008). (Tesis doctoral Dr J. Maldera). En este sentido, los resultados presentados en esta Tesis indican que CRISP1 sería capaz de afectar la RA inducida de forma dependiente del origen genético sugiriendo que CRISP1 en el ratón, pese a no cumplir un rol como factor decapacitante, sería una proteína necesaria para que la capacitación ocurra correctamente. En conjunto, considerando que CRISP1 y CRISP4 son proteínas que se expresan en altas concentraciones en el epidídimo, las evidencias encontradas hasta el momento sugieren que ambas proteínas podrían generar juntas un ambiente epididimario propicio para que, posteriormente, el espermatozoide pueda sufrir el proceso de capacitación correctamente y desarrollar normalmente su función.

Las evidencias en la bibliografía indican que el estado de capacitación de un espermatozoide se correlaciona con su capacidad de interactuar con la ZP. Tal es el caso de los espermatozoides KO para sAC, los cuales tienen completamente abolida la fosforilación en tirosina y la motilidad espermática, no siendo capaces de fertilizar ovocitos con ZP (Esposito et al., 2004; Xie et al., 2006). En este sentido, la disminución tanto en la RA inducida como en la motilidad observada en los espermatozoides de la nueva colonia sugiere que la inhibición en los ensayos de fertilización in vitro podría deberse a un defecto en la capacitación espermática. Sin embargo, es interesante resaltar que, tanto en los ensayos de interacción con ZP como en los de fusión, se obtuvieron porcentajes de inhibición similares a los encontrados al realizar los estudios con animales de la colonia original, los cuales

132

presentan niveles de RA y motilidad espermática normales con una disminución en la fosforilación en tirosina. En base a ello, el hecho de que tanto la ZP murina como el oolema posean sitios de unión para CRISP1 (Busso et al., 2007a; Rochwerger et al., 1992) apoyan la idea de que la inhibición en las etapas de interacción con la ZP y el oolema, observada en ambas colonias de animales KO, se deba a efectos a nivel de la interacción de CRISP1 con sus sitios complementarios en el ovocito.

En resumen, los resultados observados en la nueva colonia nos permiten concluir que el rol de la proteína CRISP1 en la etapa de interacción espermatozoide-ZP y de fusión de gametas sería independiente del contexto genético, mientras que la participación de CRISP1 en la motilidad, la fosforilación de proteínas en tirosina y la RA sería dependiente del mismo. Más aún, estos resultados sugieren que la ausencia de CRISP1 en las diferentes etapas del proceso de fertilización sería la responsable de producir el defecto en la fertilidad de los animales KO de la cepa C57BL/6.

Finalmente, es interesante resaltar que, debido a que una mutación se encuentra modulada por los genes que la rodean, en la mayoría de las enfermedades genéticas humanas, los pacientes presentan una amplia gama de manifestaciones clínicas con diversa severidad (ver curva Figura 1). Un ejemplo de ello lo constituye la fibrosis quística, una enfermedad autosómica recesiva donde los pacientes pueden presentar diferentes síntomas, desde pancreatitis a tratornos gastrointestinales, siendo las más frecuentes las afecciones respiratorias crónicas (Guevara et el, 2009). En este sentido, nuestros resultados apoyan la idea de que estudiar el fenotipo de una mutación en diferentes cepas endocriadas de ratón (ejemplificadas como A, B y C en Figura 1) permitiría obtener información puntual comparable a la que se observa en determinado subgrupos de pacientes (Montagutelli, 2000), haciendo que los modelos murinos se asemejen más a las características particulares de las enfermedades genéticas humanas tanto en el grado de severidad como en el tipo de lesión.

De esta manera, caracterizar los diferentes fenotipos posibles asociados a una única mutación en diferentes cepas endocriadas constituye una herramienta sumamente importante para mejorar el diagnóstico y "personalizar" el tratamiento de numerosas enfermedades humanas con componentes genéticos



Figura 1: Comparación de la severidad de una enfermedad producida por una única mutación en la población humana con el fenotipo asociado a la misma mutación en las diferentes cepas endocriadas de ratón.

CAPÍTULO 2

Estudio de la relevancia de la proteína testicular CRISP2 para la fertilidad

Tal como se mencionara anteriormente, la inmunización de animales con una proteína y el posterior estudio de su fertilidad continúa siendo una muy buena estrategia para investigar tanto la relevancia de dicha proteína para la fertilidad como su potencial uso para el desarrollo de métodos anticonceptivos. En base a ello, y considerando que existen evidencias previas que proponen a CRISP2 como una molécula involucrada en la fertilidad (Du et al., 2006);(Jing et al., 2011), en el presente capítulo se investigó la relevancia de CRISP2 para la fertilidad a través de la inmunización de ratas machos y hembras con dicha proteína.

Los resultados obtenidos, evaluados por ELISA, mostraron que la inmunización con recCRISP2 produce una respuesta inmune especifica tanto en machos como en hembras, la cual aumenta en función del tiempo y presenta los mismos niveles que los observados utilizando los sueros de los animales inmunizados con recCRISP1. Estos resultados confirman la inmunogenicidad de la proteína CRISP2 y concuerdan con observaciones previas describiendo la presencia de anticuerpos contra CRISP2 en sueros de pacientes vasectomizados y en el plasma seminal de pacientes con anticuerpos anti-espermatozoides (Domagala et al., 2007). Más allá de la capacidad propia de CRISP2 de generar una respuesta inmune, es muy probable que la inmunogenicidad de recCRISP2 se encuentre aumentada debido a la presencia de MBP, una proteína bacteriana altamente inmunogénica (Martineau et al., 1996)

Dado que para poder estudiar la relevancia de CRISP2 para la fertilidad utilizando la estrategia de inmunización es muy importante descartar la posibilidad de que los anticuerpos generados sean capaces de reconocer otras proteínas, se investigó la especificidad de la respuesta inmune. Para ello, los sueros de los animales inmunizados fueron utilizados en ensayos de Western Blot de extractos de diferentes tejidos. Los resultados indicaron que los sueros anti-recCRISP2 fueron capaces de reconocer a la proteína en testículo, epidídimo y espermatozoide pero no así en los otros órganos reproductivos y no reproductivos evaluados. Si bien resultados de nuestro laboratorio indican la presencia de CRISP2 en ovario de rata (Tesis Doctoral Dr Juan I. Ernesto), en concordancia con lo previamente descripto en el ratón (Reddy et al., 2008) los sueros anti-CRISP2 no fueron capaces de reconocer ninguna banda

con el peso molecular esperado para CRISP2, aunque si detectaron una banda con un peso molecular diferente. A pesar de ello, el análisis histológico de los ovarios provenientes de los animales inmunizados con recCRISP2 no mostró evidencias de daño patológico.

CRISP2 fue originalmente descripta como uno de los principales autoantigenos presentes en el acrosoma del cobayo (Hardy et al., 1988) sugiriéndose que podría ser una de las moléculas responsables de generar orquitis autoinmune (Foster and Gerton, 1996). Al respecto, resulta interesante mencionar que el gen de CRISP2 en el ratón se encuentra localizado en el cromosoma 17, en la misma región que Orch-1, un gen que controla la susceptibilidad a generar orquitis (Kasahara et al., 1989; Himmelbauer et al., 1993). Dichas observaciones abrían la posibilidad de que la inmunización de ratas macho con recCRISP2 pudiera producir orquitis autoinmune comprometiendo la espermatogénesis. Por otra parte, debido a que CRISP2 está presente en el epidídimo, también podía esperarse un efecto perjudicial sobre dicho órgano. Sin embargo, el estudio histológico de los órganos reproductivos de los animales inmunizados con recCRISP2 no reveló ninguna patología testicular o epididimaria, descartando la existencia de efectos adversos sobre los órganos reproductivos del macho como consecuencia de la inmunización. Estos resultados sugieren que, a diferencia de otros antígenos testiculares, CRISP2 no sería una de las moléculas responsables de la generación de la orquitis autoinmune en la rata. En este sentido, recientemente, se ha demostrado que los sueros provenientes de ratones que presentan orquitis autoinmune espontánea o inducida no fueron capaces de detectar, mediante Western Blot, proteínas cuyo peso molecular se encuentre en el rango que corresponde a las proteínas CRISP (20-30 kDa) (Wheeler et al., 2011). Sin embargo, dichos sueros reaccionan fuertemente con la proteína intra-acrosomal spermadhesin (340 kDa), descripta como el primer antígeno murino identificado capaz de generar orquitis (Wheeler et al., 2011). Asimismo, considerando la conocida facilidad con la que se puede inducir la orquitis autoinmune en el cobayo a través de la inmunización con antígenos testiculares (Itoh et al., 1991), la falta de efecto observada en nuestros estudios sugiere que, muy probablemente, CRISP2 tampoco sea causante de orguitis en otras especies.

Los ensayos de IFI no sólo confirmaron la habilidad de los sueros anti-CRISP2 de reconocer a la proteína en su conformación nativa, sino que también revelaron la localización de la proteína en la cabeza y en la cola de los espermatozoides de rata frescos, capacitados y reaccionados. El hecho de que se haya observado la marca

únicamente en las células permeabilizadas, es consistente con la localización intracelular previamente descripta para la proteína CRISP2 de ratón y humano (O'Bryan et al., 2001a; Hardy et al., 1988; Busso et al., 2005; Busso et al., 2007b). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que la proteína CRISP2 secretada al medio por las células germinales de la rata, sería capaz de re-asociarse a la superficie célular, participando en la interacción de las células germinales con las células de Sertoli durante la espermatogénesis (Maeda et al., 1998; Maeda et al., 1999). Si bien las diferentes localizaciones de CRISP2 ya sea en la superficie de las células espermatogénicas o en el interior del espermatozoide maduro resultan controvertidas, es posible que las mismas reflejen la participación de la proteína en funciones diferentes durante las distintas etapas por las que atraviesa el espermatozoide. En particular, la marca de CRISP2 observada en la cabeza de la mayoría de los espermatozoides frescos se localiza en la región dorsal y en la zona cóncava de la cabeza, una región que podría corresponder a la teca perinuclear (O'Bryan et al., 2001b) o acroplaxoma, ubicado entre la membrana acrosomal y la membrana nuclear (Rivkin et al., 2009). Cabe destacar que dicha región ha sido implicada en la interacción entre las células de Sertoli y las células germinales, lo cual es consistente con el rol propuesto para CRISP2 como una molécula puente entre dichas células (Maeda et al., 1998; Maeda et al., 1999). A diferencia de ello, cuando los espermatozoides capacitados son expuestos a ionóforo de calcio, la mayoría de las células presentan marca fluorescente sólo en la región cóncava de la cabeza. sugiriendo la liberación de CRISP2 de la región dorsal como consecuencia de la ocurrencia de la RA. Por otro lado, el hecho de que la marca en la cola no haya mostrado modificaciones luego de la capacitación y la RA sugeriría que CRISP2 podría cumplir una función estructural en esta porción de la gameta.

Existen evidencias que indican que durante la capacitación y la RA ciertas proteínas del espermatozoide sufrirían modificaciones post-transduccionales (Wen et al., 1999; Moos et al., 1993). En este sentido, los ensayos de Western Blot descartaron la existencia de un procesamiento durante la capacitación y RA, a juzgar por la ausencia de diferencias en la movilidad electroforética y, confirmaron la permanencia de la proteína en los espermatozoides capacitados y reaccionados apoyando la posible participación de CRISP2 en el proceso de fertilización en la rata.

La capacidad de los sueros anti-CRISP2 de reconocer a la proteína en espermatozoides reaccionados nos llevó a evaluar su habilidad de inhibir la capacidad fusogénica de los espermatozoides mediante ensayos de fertilización in vitro. Si bien el

efecto inhibitorio de los sueros podría haber sido atribuido a un efecto bloqueante de los anticuerpos sobre la proteína CRISP1 (altamente homóloga a CRISP2), la ausencia de reconocimiento cruzado evaluada mediante ensayos de Western Blot descarta esta posibilidad. Asimismo, como se mencionara en la introducción, observaciones previas de nuestro laboratorio muestran que recCRISP2 es capaz de unirse al oolema de los ovocitos de rata sin ZP e inhibir su penetración por los espermatozoides (Dra Dolores Busso, Tesis doctoral, 2005). Dichas evidencias, junto a los resultados obtenidos en el presente capítulo, apoyan la participación de la proteína CRISP2 en la etapa de fusión de gametas en la rata a través de su unión a sitios complementarios en el ovocito, al igual que lo observado en humano y ratón (Busso et al., 2005; Busso et al., 2007b).

Debido a las dificultades que presenta la realización de ensayos de fertilización in vitro con ovocitos de rata con ZP, no hemos podido evaluar el rol de CRISP2 en la interacción espermatozoide-ZP. En este sentido, estudios previos de nuestro laboratorio en el ratón, indican que CRISP2 no estaría involucrada en la etapa de interacción con la ZP sino en la etapa de fusión de gametas (Busso et al., 2007b). En base a la similitud encontrada en los resultados obtenidos en rata y ratón, es posible que en la rata CRISP2 también participe sólo en la etapa de fusión de gametas. En concordancia con el hecho de que los espermatozoides adquieren su capacidad fusogénica sólo luego de haber sufrido la RA, diversos estudios sugieren la participación de proteínas intra-acrosomales en el desarrollo de la capacidad fusogénica del espermatozoide, entre ellas, acrosina, metaloproteinasas, SLLP1, ESP, etc (Takano et al., 1993; Diaz-Perez and Meizel, 1992; Herrero et al., 2005; Lv et al., 2010). La evidencia más fuerte proviene de un estudio que muestra la infertilidad de los animales KO para la proteína intra-acrosomal IZUMO, la cual se expone únicamente luego de la ocurrencia de la RA (Inoue et al., 2005). Los espermatozoides provenientes de los animales KO para IZUMO son capaces de unirse y penetrar la ZP pero incapaces de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito. Nuestros resultados en la rata, sumado a aquellos obtenidos previamente por nuestro grupo en humano y ratón (Busso et al., 2005); (Busso et al., 2007b), apoyan a CRISP2 como otra molécula intra-acrosomal que participa en el proceso de fusión de gametas.

A pesar de la presencia de anticuerpos anti-CRISP2 circulantes, capaces de reconocer a CRISP2 y de inhibir el proceso de fertilización *in vitro*, la fertilidad de machos y hembras inmunizados con recCRISP2, no mostró diferencias en ninguno de los dos apareos respecto a la de los controles inmunizados con MBP, en contraste a lo

observado en el segundo apareo con recCRISP1. Múltiples factores podrían explicar la falta de efecto sobre la fertilidad de los animales inmunizados con recCRISP2. Uno de ellos, podría ser que los anticuerpos circulantes no hayan ingresado el tracto reproductor masculino y femenino. En este sentido, si bien no hemos evaluado la cantidad de anticuerpos presentes en el tracto reproductor de los animales, numerosas evidencias indican el traspaso inespecífico de los mismos desde el suero hacia el tracto (Kille and Goldberg, 1979);(Oliphant et al., 1977);(Ellerman et al., 1998) lo cual, sumado a los niveles similares de anticuerpos anti-CRISP2 y anti-CRISP1 evaluado por ELISA, no respalda la hipótesis mencionada anteriormente. Más aún, aunque los anticuerpos anti-CRISP2 probablemente no entren al testículo debido a la existencia de una barrera hemato-testicular altamente restrictiva, los mismos podrían entrar al lumen del epidídimo ya que la barrera hemato-epididimaria es mas permeable que la testicular (Naz and Bhargava, 1990; Weininger et al., 1982; Lee et al., 1987). Una explicación alternativa sería que la proteína expresada en bacterias careciera de los epítopes conformacionales presentes en la molécula nativa e importantes para el bloqueo inmunológico de la proteína del espermatozoide. Sin embargo, nuestros resultados revelaron que los sueros anti-CRISP2 eran capaces tanto de reconocer a la proteína nativa como de inhibir la capacidad fusogénica de los espermatozoides in vitro. Estas observaciones, junto al hecho de que tanto recCRISP1 como recCRISP2 sean capaces de generar anticuerpos específicos que inhiben la interacción espermatozoide-ovocito in vitro, apoyan la idea de que la accesibilidad de CRISP2 a los anticuerpos in vivo sea la razón principal para explicar la diferencias encontradas en la fertilidad de los animales inmunizados con proteínas tan homólogas como CRISP1 y CRISP2. Al respecto, es importante mencionar que CRISP1 es una proteína de superficie localizada en la membrana plasmática que recubre el capuchón acrosomal y el segmento ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, mientras que CRISP2 es una proteína intra-acrosomal en el espermatozoide maduro, localizada eventualmente en la superficie de las células germinales, y expuesta sólo luego de la ocurrencia de la RA en el tracto reproductor femenino. Por esta razón, los anticuerpos específicos deben estar presentes en las concentraciones necesarias en un momento y espacio en particular tanto en machos como en hembras para poder unirse a la proteína nativa y afectar su función biológica. Esta estrecha ventana de tiempo y espacio requerida para la interacción entre el anticuerpo y el antígeno podría también explicar la falta de inhibición observada sobre la fertilidad en machos y hembras inmunizadas con otra proteína intra-acrosomal como lo es IZUMO (Wang et al., 2008). En base a ello, podría especularse que se necesitarían mayores niveles de anticuerpos, que los necesarios para inhibir a CRISP1, circulando en el tracto

reproductor masculino y femenino para poder bloquear efectivamente a CRISP2 in vivo. Por otra parte, no podemos excluir la posibilidad de que la participación de CRISP1 en más de una etapa de la interacción de gametas (interacción con la ZP y fusión de gametas) (Busso et al., 2007a; Rochwerger and Cuasnicu, 1992; Cohen et al., 2000b) constituya otro factor que contribuye a la inhibición de la fertilidad observada en los animales inmunizados con la proteína epididimaria. Todas estas observaciones sugieren que, a pesar de la presencia de anticuerpos anti-CRISP2 en el plasma seminal de pacientes inmunoinfértiles (Domagala et al., 2007), los mismos no parecerían estar entre los factores responsables de generar inmunoinfertilidad.

El hecho de que la inmunización con CRISP2 no afecte la fertilidad de los animales, no descarta la idea de que esta proteína testicular sea relevante para la fertilidad de un individuo y, por lo tanto, un buen marcador para el diagnóstico de la infertilidad como se ha sugerido en ciertos estudios realizados en humanos (Du et al., 2006) (Jing et al., 2011). La generación de ratones KO para CRISP2 contribuirá sin duda a dilucidar su relevancia para la fertilidad. Al respecto, cabe mencionar que, recientemente, hemos generado una colonia de animales KO para CRISP2 en colaboración en el grupo del Dr Okabe (Osaka University, Japón), la cual nos está permitiendo llevar a cabo los estudios funcionales correspondientes.

En conclusión, nuestros resultados indican que CRISP2 es capaz de generar una respuesta inmune específica en ratas macho y hembra que no genera orquitis autoinmune ni compromete la fertilidad. Si bien no se excluye la relevancia potencial de CRISP2 para la fertilidad, estas observaciones no apoyan a CRISP2 como un buen target para inmuno-anti-concepción o como una molécula responsable de generar orquitis autoinmune o inmuno-infertilidad.

CAPÍTULO 3

Estudio de CRISP3 en el proceso de fertilización y de su posible rol inmunoregulatorio.

Las evidencias encontradas hasta el momento por nuestro grupo y otros laboratorios parecen indicar que las proteínas CRISP "escoltarían" a los espermatozoides desde su producción en el testículo, continuando con su maduración en el epidídimo, su contacto con las secreciones de las glándulas sexuales durante la eyaculación, su capacitación en el tracto femenino y finalmente, su participación en las diferentes etapas del proceso de fertilización (Gibbs et al., 2008). La mayor parte de los resultados obtenidos fueron acerca de la participación de CRISP1, CRISP2 y CRISP4 en estas etapas del proceso existiendo muy pocos estudios acerca del posible rol de la proteína CRISP3 en fertilización. En este sentido, si bien CRISP3 es la proteína CRISP que presenta una mayor distribución en su expresión en el organismo, también se encuentra presente en el tracto reproductor en distintas especies de mamíferos. En equinos se localiza en la superficie de los espermatozoides habiéndose encontrado un polimorfismo del gen asociado a la fertilidad (Hamann et al., 2007). En humanos se han identificado una forma glicosilada y otra no glicosilada no sólo en el epitelio secretor de todo el tracto reproductor masculino sino también en el plasma seminal y en el espermatozoide (Udby et al., 2005a). Cabe mencionar que las bases de datos indican que el gen de CRISP3 no se encuentra presente en el genoma de la rata razón por la cual, no es posible utilizar a dicha especie como modelo de estudio (Gibbs et al., 2008). Por otra parte, si bien el gen se encuentra presente en el ratón, su expresión se ha observado en ovario, útero y varios órganos y glándulas esenciales (Reddy et al., 2008), estando ausente en testículo y epidídimo y por lo tanto, en espermatozoides epididimarios. La presencia de CRISP3 en los espermatozoides humanos, junto con la alta dificultad de trabajar con espermatozoides eyaculados de roedor, nos llevaron a estudiar el rol de CRISP3 utilizando el modelo humano.

Como se mencionara anteriormente, las evidencias indican la existencia de dos isoformas de CRISP3, una glicosilada de aproximadamente 31 kDa y otra no glicosilada de 29 kDa presentes en los gránulos de los neutrófilos humanos como así también a lo largo del tracto reproductor masculino, incluyendo el plasma seminal y los espermatozoides (Udby et al, 2002);(Udby et al 2005). En base a ello, inicialmente, corroboramos la capacidad del anticuerpo comercial anti-CRISP3 humana de

reconocer en el plasma seminal y en espermatozoides humanos a las isoformas de CRISP3 previamente descriptas.

Cabe recordar que durante la maduración epididimaria, los espermatozoides adquieren nuevas proteínas secretadas por el epidídimo (Yanagimachi, 1994) que actúan como factores estabilizantes de la membrana del espermatozoide impidiendo la ocurrencia de una capacitación prematura. La mayoría de dichos factores, denominados "factores decapacitantes", corresponden a proteínas periféricas, asociadas a la membrana por fuerzas electroestáticas y liberadas del espermatozoide durante la capacitación. Con el fin de evaluar si CRISP3 se encontraba unida por fuerzas electrostáticas a la membrana de los espermatozoides humanos, los mismos fueron sometidos a diferentes tratamientos de extracción proteica. Los resultados mostraron que el tratamiento con baja fuerza iónica fueron capaces de remover a la forma glicosilada (31KDa) en su totalidad como así también una proporción de la forma no glicosilada (29KDa), sugiriendo que CRISP3 podría ser una proteína periférica que interactúa con la membrana a través de fuerzas electroestáticas. Sin embargo, en el caso de la forma no glicosilada, se observó que una fracción de la proteína permanecía unida al espermatozoide aún luego del tratamiento con alta fuerza iónica, siendo completamente liberada por exposición a un detergente no iónico. Estas observaciones indicarían la existencia de dos poblaciones de CRISP3 en la gameta, una débilmente unida a la membrana que se comportaría como una proteína periférica conformada por la forma glicosilada como así también por la no glicosilada y otra fuertemente unida correspondiente a una proporción de la forma no glicosilada. Estos resultados concuerdan con lo observado para la proteína CRISP1, la cual también presenta una población asociada débilmente a la membrana a través de interacciones iónicas, y otra población fuertemente unida que se comporta como una proteína integral de membrana (Kohane et al., 1980b; Kohane et al., 1980a); (Cohen et al., 2000b).

Resultados recientes de nuestro laboratorio realizados en la rata indican que, a medida que los espermatozoides transitan por el epidídimo se exponen a mayores concentraciones de CRISP1, la cual se uniría débilmente a la gameta por un mecanismo que involucraría la formación de complejos entre la proteína y el zinc (Maldera et al., 2011). Teniendo en cuenta que diversas proteínas CRISPs serían capaces de unir zinc (Shikamoto et al., 2005);(Suzuki et al., 2008), y que la interacción entre una proteína y este catión podría producir cambios conformacionales (Huang et al., 1995), existe la posibilidad de que la unión débil de CRISP3 al espermatozoide

también se encuentre mediada por dicho catión. Sin embargo, el hecho de solo poder trabajar con espermatozoides humanos eyaculados dificulta la evaluación de esta hipótesis. Por otra parte, el hecho de que una proporción de la forma no glicosilada de la proteína se libere con fuerza iónica y la otra sólo por tratamiento con detergentes sugiere que el tipo de asociación de CRISP3 al espermatozoide no sería directamente dependiente de su estado de glicosilación. En este sentido, existen evidencias que indican que la proteína CRISP3 humana presente en el plasma seminal se encuentra asociada a β -Microseminoprotein (MSP) (Udby et al., 2005b; Manaskova-Postlerova et al., 2011). MSP, también denominada PSP94, es una de las proteínas más abundantes del plasma seminal de diversas especies y se encuentra presente en el espermatozoide (Anahi et al., 2008; Tollner et al., 2004; Udby et al., 2005b; Manaskova-Postlerova et al., 2011). Curiosamente, la interacción específica entre CRISP3 y MSP ocurre, al igual que con el espermatozoide, a través de fuerzas electrostáticas e independientemente del estado de glicosilación de CRISP3 (Udby et al., 2005b) abriendo la posibilidad de que la unión CRISP3-MSP pueda ocurrir también en la superficie de los espermatozoides humanos.

A pesar de que las proteínas CRISP no presentan en su estructura un dominio transmembrana y contienen un péptido señal característico de las proteínas secretorias, con frecuencia se las encuentra asociadas fuertemente a la membrana plasmática (Gibbs et al., 2008). Teniendo en cuenta que CRISP3 se expresa en testículo, epidídimo, vas deferens, próstata y vesícula seminal, existe la posibilidad de que la proteína CRISP3 presente en los espermatozoides eyaculados tenga distintos orígenes. Los resultados presentados en esta Tesis descartan en primer lugar la posibilidad de que la asociación fuerte de CRISP3 a la membrana se deba a la formación de puentes disulfuro intermoleculares entre CRISP3 y una proteína de membrana ya que el detergente no iónico, tratamiento incapaz de romper uniones covalentes, libera a la proteína de los espermatozoides y no a un complejo CRISP3receptor. En segundo lugar, considerando la expresión de la proteína CRISP3 en testículo y la localización intra-acrosomal de la proteína testicular CRISP2, existe la posibilidad de que la asociación fuerte de CRISP3 al espermatozoide de deba a su localización intra-acrosomal. Sin embargo, el hecho de que los ensayos de IFI hayan sido realizados sin permeabilizar las células no apoyaría esta última idea. En tercer lugar, es interesante recordar que recientes estudios realizados en la rata en nuestro laboratorio indican que la población de CRISP1 fuertemente unida al espermatozoide se asociaría al mismo por un mecanismo mediado por unas pequeñas vesículas membranosas denominadas "epididimosomas" (Yanagimachi et al., 1985), (Fornes et
Discusión

al., 1991);(Frenette and Sullivan, 2001);(Griffiths et al., 2008). En base a ello, la expresión de CRISP3 en el epidídimo, nos permite plantear la hipótesis de que la asociación fuerte de la proteína a la membrana plasmática de los espermatozoides se encuentre también mediada por epididimosomas. Sin embargo, la evaluación de esta idea resulta dificultosa debido a la problemática de trabajar con espermatozoides epididimarios en el modelo humano. Finalmente, la no detección de CRISP3 en los prostasomas (Udby et al., 2005a), unas vesículas membranosas pequeñas secretadas por la próstata, excluyen la posibilidad de que CRISP3 se una fuertemente a los espermatozoides por un mecanismo mediado por dichas vesículas.

Existen numerosas evidencias que indican que varias proteínas del espermatozoide sufrirían modificaciones post-transduccionales luego de la capacitación y la RA (Wen et al., 1999; Moos et al., 1993) siendo solamente aquellas proteínas que permanecen en el espermatozoide luego de la capacitación, las que podrían participar en la interacción de gametas. Por ese motivo, previo a evaluar la participación de CRISP3 en dicho proceso, estudiamos el destino de la misma en los espermatozoides luego de sufrir la capacitación y la RA. Para tal fin, evaluamos la presencia, el tipo de asociación y la localización de CRISP3 en la gameta luego de la ocurrencia de dichos eventos. En primer lugar, los ensayos de Western Blot mostraron que las formas glicosilada y no glicosilada de CRISP3 que se encuentran débilmente unidas a la membrana no están presentes en los espermatozoides capacitados, indicando que las mismas se liberarían durante la capacitación y, por ende, podrían cumplir una función como factor decapacitante. Los resultados presentados en esta Tesis mostraron que la presencia de CRISP3 durante la capacitación no es capaz de afectar los niveles de fosforilación de proteínas en tirosina del espermatozoide, un importante evento de la capacitación que ha sido correlacionado con la liberación de factores decapacitantes (Visconti, 2009). Si bien es posible que la falta de actividad inhibitoria se deba a que utilizamos una proteína de origen equino, la gran homología entre las proteínas equina y humana (80%) sugiere que CRISP3 no actuaría como un factor decapacitante al menos a nivel de la fosforilación de proteínas en tirosina. Por otra parte, existen numerosas evidencias que indican que el agregado de la proteína MSP durante la capacitación in vitro en porcinos inhibe la ocurrencia de la RA y disminuye la motilidad (Anahi et al., 2008), sugiriendo fuertemente que MSP actúe como factor decapacitante. Teniendo en cuenta que tanto CRISP3 como MSP se liberan del espermatozoide durante la capacitación, y se encuentran formando un complejo en el plasma seminal, resultaría interesante estudiar la posibilidad de que CRISP3 cumpla, junto a MSP, un rol en la regulación del proceso de capacitación. En este sentido, se contempla la posibilidad

de purificar la proteína CRISP3 humana a partir del plasma seminal y llevar a cabo los estudios funcionales en colaboración con el Dr Coronel (Universidad Nacional de Córdoba) quien, en los últimos años, ha trabajado con la proteína MSP humana.

Asimismo, los ensayos de Western Blot también indicaron que la forma no glicosilada que se encuentra fuertemente unida al espermatozoide permanece asociada luego de la capacitación y de la RA sin sufrir modificaciones post-traduccionales, a juzgar por su movilidad electroforética. Este último resultado descarta la existencia de un procesamiento durante la capacitación y RA mientras que la permanencia de CRISP3 en los espermatozoides capacitados y reaccionados apoya la posibilidad de que esta proteína cumpla una función en la etapa de interacción de gametas.

La localización y destino de la proteína CRISP3 en los espermatozoides fue evaluada por ensayos de IFI. Los resultados mostraron que CRISP3 se localiza en la región acrosomal y pieza media en la mayoría de los espermatozoides frescos, luego de la capacitación y RA, se encuentra presente también en el segmento ecuatorial, región por la cual el espermatozoide se fusiona con el ovocito (Bedford et al., 1979; Yanagimachi, 1988b). La localización de CRISP3 en el segmento ecuatorial en los espermatozoides reaccionados concuerda con lo observado para la proteína CRISP2 y para la población fuertemente unida de CRISP1, localizadas en esta región sólo en los espermatozoides reaccionados apoyando la idea de una redundancia funcional entre las tres proteínas. Para estudiar la potencial relevancia de CRISP3 en el proceso de fertilización, se realizaron ensayos funcionales en los cuales se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-CRISP3 de afectar la capacidad fusogénica de los espermatozoides humanos. Dado que por razones éticas no es posible realizar ensayos de fertilización in vitro utilizando ambas gametas humanas, la participación de CRISP3 en el proceso de fusión fue analizada a través del ensayo heterólogo denominado HOPT (Hamster Oocyte Penetration Test), que evalúa la capacidad de los espermatozoides humanos capacitados de fusionarse e incorporarse a ovocitos de hámster. En estos ensayos, la ZP es removida de los ovocitos de hámster dado que, según se describiera en la introducción, dicha matriz es una de las barreras más eficientes para impedir la fertilización entre diferentes especies. Los resultados de estos ensayos indicaron que los anticuerpos anti-CRISP3 fueron incapaces de afectar la habilidad de los espermatozoides humanos de penetrar a los ovocitos de hámster. Dicha observación, junto a la disminución observada en el porcentaje de ovocitos fertilizados en presencia de los anticuerpos anti-CRISP1 y anti-CRISP2, sugieren que CRISP3 no participaría en la etapa de fusión de gametas.

En cuanto a la posible participación de CRISP3 a nivel de la etapa de interacción con la ZP, cabe aclarar que, en los últimos años, las clínicas de reproducción asistida comenzaron a vitrificar los ovocitos en metafase II no fertilizados, razón por la cual, ha disminuido considerablemente la disponibilidad de material para realizar estudios en investigación básica. Debido a ello, no fue posible la realización de estudios funcionales sobre la participación de la proteína CRISP3 en la interacción espermatozoide-ZP. Al respecto, según se describiera en la introducción, existen varias proteínas del espermatozoide a las que se les ha otorgado una función en la interacción con la ZP, por lo que se ha postulado que podría existir cierta redundancia entre dichas moléculas, las cuales podrían actuar en forma conjunta para mantener al espermatozoide hiperactivado asociado a la ZP (Castle, 2002). En este sentido, diversos grupos han sugerido que MSP podría participar en la interacción entre el espermatozoide y la ZP (Anahi et al., 2008):(Manaskova-Postlerova et al., 2011). Si bien falta evaluar si MSP y CRISP3 se encuentran interactuando sobre el espermatozoide, las evidencias encontradas hasta el momento y la localización de CRISP3 en la región acrosomal de los espermatozoides capacitados abren la posibilidad de que CRISP3 participe en esta etapa. En base a ello, y teniendo en cuenta los resultados recientes de nuestro laboratorio mostrando que la proteína CRISP1 humana (hCRISP1) participaría en la etapa de interacción con la ZP a través de su unión específica a ZP3 (Maldera et al, en preparación), resultaría de sumo interés investigar la posible existencia de un mecanismo de redundancia funcional durante la interacción entre el espermatozoide y la ZP humana. Si así fuera, CRISP1 actuaría a nivel de la fusión de gametas en conjunto con CRISP2 y a nivel de la interacción espermatozoide-ZP junto a CRISP3.

Si bien no se descarta la posible participación de CRISP3 en algún evento del proceso de fertilización, es importante destacar que CRISP3 es la proteína de la familia que presenta la mayor distribución en su expresión, encontrándose no solo en órganos reproductivos, sino también en glándulas salivales, glándulas exócrinas y órganos del sistema inmune. Más aún, se ha visto que CRISP3 se encuentra regulada diferencialmente en diversas patologías con componentes inmunológicos. En base a ello, decidimos explorar si CRISP3 podría estar cumpliendo, en realidad, un rol en la regulación del sistema inmune. Con el fin de investigar dicha posibilidad, comenzamos una colaboración con el Dr. Gabriel Rabinovich del laboratorio de inmunopatología del IBYME investigador reconocido a nivel internacional por su importante trabajo sobre el rol inmunoregulador de galectinas y glicanos. Cabe mencionar que, al igual que Galectina-1, CRISP3 es también una proteína secretoria que se expresa en diversos

Discusión

tejidos del sistema inmune y presenta una expresión modificada en ciertos tipos de cánceres y enfermedades autoinmunes.

El primer paso consistió en evaluar la expresión de CRISP3 en una importante célula del sistema inmune como lo es la célula dendrítica (DC) cuyo rol es clave en la interfase entre la inmunidad innata y adaptativa. Dado que CRISP3 presenta un alto porcentaje de homología (el más alto entre las proteínas de la familia) con CRISP1 (**Figura 1A**), la cual se expresa también en órganos del sistema inmune tales como el bazo y el timo, y considerando que nuestro laboratorio cuenta con una colonia de animales *Crisp1*^{-/-}, decidimos también estudiar la presencia de CRISP1 en las DC. En este sentido, cabe destacar que el análisis filogenético de las proteínas CRISP reveló que CRISP1 de rata y de ratón, en lugar de agruparse con CRISP1 humana, se agrupan con CRISP3 humana (**Figura 1B**). Esta distribución indicaría que CRISP1 de roedor sería la ortóloga de CRISP3 humana (Gibbs et al., 2008) apoyando el empleo del modelo de ratones *Crisp1*^{-/-} para el estudio de la proteína CRISP3 humana.

Como se mencionara anteriormente, la expresión de la proteína CRISP3 en ratón había sido descripta en la médula ósea, en el bazo y, en menor medida, en el timo. Estos órganos están formados por una variedad de compartimentos celulares, habiéndose demostrado, hasta el momento, la expresión del mensajero de CRISP3 sólo en los linfocitos pre-B (Pfisterer et al., 1996). Los resultados presentados en este capítulo muestran, por primera vez, la expresión de la proteína CRISP3 tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico en el compartimento de las DC. En particular, observamos niveles similares de expresión tanto en DCi (diferenciadas de médula ósea) como en DCm (estimuladas con LPS). Dicha observación marca una diferencia en la regulación de la expresión de CRISP3 en los distintos linajes celulares ya que, en las células B, se observó una reducción en la expresión del mensajero de CRISP3 luego de diferenciar las células pre-B a células plasmáticas con LPS (Patterson et al., 1992). Los ensayos de Western Blot mostraron la presencia de una única banda correspondiente a CRISP3 de ratón en las DCi y en las DCm corroborando la presencia de la proteína en dichas células. A pesar de que aún no hemos evaluado su estado de glicosilación, cabe destacar que el resultado obtenido difiere de lo observado en el humano donde se han identificado dos formas de la proteína con diferente estado de glicosilación (Udby et al., 2005a). Estudios complementarios de IFI en los que se analizó la localización de la proteína en las DC mostraron una marca predominante en el citoplasma consistente con la naturaleza secretoria de las proteínas CRISPs y la presencia del característico péptido señal en su secuencia (Kratzschmar et al., 1996).



Figura 1: Análisis filogenético. **A.** Análisis de identidades y similitud entre las proteínas CRISPs de ratón. **B.** Relación filogenética de las proteínas homologas de la familia CRISPs de diferentes especies (Gibbs et al., 2008).

En cuanto a los resultados obtenidos para la proteína CRISP1, observamos que, al igual que CRISP3, se expresa tanto a nivel de mensajero como a nivel proteico en las DCi y DCm presentando una localización predominantemente citoplásmica. En base a ello, como una primera aproximación para revelar el papel que podrían cumplir las CRISP en el sistema inmune y, particularmente, en la fisiología de las DC, decidimos utilizar el modelo de animales *Crisp1*^{-/-}. El análisis del fenotipo celular mostró que las células provenientes de ambos genotipos fueron capaces no sólo de diferenciarse a DCi en cultivo sino también de responder a la estimulación con LPS de forma similar. A continuación evaluamos si la ausencia de CRISP1 era capaz de modular el espectro de citoquinas producido por las DC, lo cual refleja el estado funcional e inmune de estas células. Los resultados mostraron una disminución significativa en la secreción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 al estimular las DCi con LPS, sin observarse modificaciones en el resto de las citoquinas evaluadas (IL-23, IL-10, IL-27). El fenotipo

Discusión

y los cambios funcionales que sufre la célula dendrítica maximizan su capacidad de inducir la proliferación y, por lo tanto, la activación de las células T, centrales en la ejecución de la respuesta inmune. En este sentido, el hecho de que IL-12 sea con frecuencia la primer citoquina secretada por las DC y los macrófagos luego de una invasión por un patógeno, siendo crucial en la iniciación y la polarización de la respuesta hacia un perfil inmunogénico (Revisión de trabajos en Trinchieri, 2003), nos lleva a pensar que CRISP1 podría estar cumpliendo un rol a favor de una respuesta inmune estimulatoria.

Al analizar los resultados observamos ciertas diferencias en el patrón de secreción correspondiente a los machos y las hembras. Al respecto, se ha observado que el sistema inmune de las hembras tiene una respuesta humoral más exacerbada (Butterworth et al., 1967), mayor rechazo a los transplantes, menor incidencia de tumores y mayor incidencia a las enfermedades autoinmunes que el de los machos (Liva and Voskuhl, 2001). Asimismo, en diferentes órganos se ha encontrado que tanto la expresión de CRISP1 como la de CRISP3 se encuentran reguladas por andrógenos en forma consistente con la presencia de elementos regulatorios para andrógenos en sus promotores (Haendler et al., 1997). Por esta razón, nos resultó interesante observar que mientras las DCm Crisp1^{-/-} provenientes de machos secretaban al medio menores cantidades de la citoquina proinflamatoria IL-12 sin mostrar diferencias en el resto de las citoquinas evaluadas (IL-23, IL-27, IL-10), las DCm provenientes de las hembras Crisp1^{-/-} presentaban un perfil de citoquinas diferente, con una disminución en la secreción de la citoquina inmuno-supresora IL-10 y sin diferencias en IL-27 ni en las citoquinas pro-inflamatorias IL-23 e IL-12. Estos resultados sugieren que CRISP1 podría estar cumpliendo funciones diferentes en el sistema inmune de los machos y de las hembras. En este sentido, se ha sugerido que la proteína Galectina 1 podría tener un papel bifuncional actuando como señal tolerogénica o promoviendo la maduración de las DC, dependiendo de su concentración relativa (llarregui et al., 2009). Cabe destacar que si bien durante muchos años CRISP1 ha sido considerada como una proteína de expresión exclusivamente epididimaria, recientemente, se ha descripto su expresión en una cantidad significativamente menor, en diferentes órganos del tracto reproductor femenino (Ernesto et al, en preparación). En base a ello, existe la posibilidad de que una variación en la concentración proteica, producida por las células de cada sexo, sea la causa del rol bifuncional que podría cumplir CRISP1 en la fisiología de las DC.

Discusión

Como se mencionara en la introducción, durante el proceso de fertilización los espermatozoides se enfrentan a células fagocíticas del tracto reproductor femenino. En equinos los espermatozoides inducen una respuesta inflamatoria uterina que se caracteriza por un flujo rápido y transiente de neutrófilos polimorfosnucleares (PMNs), los cuales, se unen a los espermatozoides para su posterior eliminación. Si bien la consecuente inflamación es un proceso normal en el cual el exceso de espermatozoides es eliminado del tracto reproductor de la yegua, esta inflamación podría ser perjudicial para los espermatozoides durante las primeras etapas del transporte (Kotilainen et al., 1994);(Rozeboom et al., 1998);(Doty et al., 2011). En el humano, se ha demostrado que el plasma seminal inhibe en forma transitoria y reversible la unión de los PMN a los espermatozoides (D'Cruz and Haas, Jr., 1995). Por otra parte, en el ratón se ha demostrado que tanto el plasma seminal como los espermatozoides actuarían sobre los macrófagos y las DC del útero las cuales, una vez en los ganglios linfáticos, presentarían los antígenos provenientes del plasma seminal a los linfocitos T regulatorios. Posteriormente, los linfocitos T migrarían al sitio de implantación, encargándose de proteger al embrión del ataque inmunológico materno (Clark, 2011). Sin embargo, hasta el momento existen muy pocos trabajos que describan moléculas presentes en el plasma seminal responsables tanto de inhibir la unión de los PMN a los espermatozoides como de modular el estado funcional de las DC. Un trabajo reciente realizado en humanos indica que la interacción entre las DC y los espermatozoides sería independiente del estado funcional del espermatozoide, y que el plasma seminal (probablemente, a través de las prostaglandinas) no sólo inhibe dicha interacción sino que, además, afecta el fenotipo de las DC (Rennemeier et al., 2011). Por otra parte, recientemente, el grupo del Dr Troeddson ha demostrado que CRISP3 equina sería la proteína del plasma seminal responsable de proteger a los espermatozoides de la unión de los PMNs (Doty et al., 2011). En este sentido, tanto CRISP1 como CRISP3 están presentes en el espermatozoide y en el plasma seminal humano. En base a ello, los resultados presentados en este capítulo sumado al hecho de que existan proteínas capaces de gatillar mecanismos que regulan el potencial inmunológico de las DC de forma endógena y exógena, nos permiten especular que CRISP1 y CRISP3 podrían cumplir un rol en la regulación de las DC del útero y colaborar con la protección del espermatozoide y/o favorecer la implantación.

En conjunto los resultados del presente capítulo indican que, al igual que CRISP1, existirían dos poblaciones de CRISP3 asociada al espermatozoide humano con diferentes afinidades las cuales, no cumpliría un rol como factor decapacitante no

participarían en la etapa de fusión de gametas. Estos resultados junto a las evidencias indicando la expresión diferencial de CRISP3 en cáncer y enfermedades autoinmunes nos llevaron a evaluar la función de esta proteína en la regulación del sistema inmune. En este sentido, los resultados presentados indican que tanto CRISP3 como su homóloga CRISP1 están presentes en las DCi y DCm de ratón y, que al menos CRISP1, cumplirían un rol en la fisiología de las células. Estos hallazgos, apoyan la participación de las proteínas CRISP en la regulación del sistema inmune con posibles implicancias en la evolución de las enfermedades con componentes inmunológicos.

Conclusión

Teniendo en cuenta que las proteínas CRISP de mamíferos han sido propuestas como mediadores del proceso de fertilización y presentan una alta homología con otras familias involucradas en el sistema de defensa, el objetivo de esta Tesis ha sido investigar la relevancia de las proteínas CRISP tanto para la fertilidad como para el sistema inmune. Los resultados obtenidos utilizando una combinación de estrategias experimentales tanto in vivo como in vitro, como así también diferentes modelos experimentales (ratones modificados genéticamente, rata y humano) se describen en los tres capítulos que conforman esta Tesis.

El primer capítulo estuvo enfocado al estudio de la relevancia de la proteína epididimaria CRISP1 tanto para la fertilidad como para el proceso de fertilización. Dado que los animales KO para CRISP1 generados en nuestro laboratorio resultaron ser fértiles pese a exhibir defectos a nivel de parámetros espermáticos, y considerando que una mutación puede producir fenotipos diferentes dependiendo del origen genético, decidimos generar animales KO para CRISP1 con un fondo genético diferente al original y estudiar su fenotipo. Los resultados mostraron que los machos de la nueva colonia (fondo genético homogéneo C57BL/6) presentaron un fenotipo claramente diferente al de la colonia original (fondo genético mixto C57BL/6/129Sv), exhibiendo una desventaja en la fertilidad no detectada en la colonia original. Asimismo, mientras la capacidad de los espermatozoides de unirse a la ZP y fusionarse con el oolema permanecieron afectados, indicando que la relevancia de CRISP1 para estas funciones seria independiente del contexto genético, otros parámetros tales como la motilidad y la RA acrosomal inducida se vieron afectados sólo en la nueva colonia, sugiriendo que la participación de CRISP1 en estos eventos sería dependiente del contexto genético. En conjunto, estos hallazgos indican la relevancia de CRISP1 para la fertilidad y el proceso de fertilización, confirmando a CRISP1 como otro ejemplo de la influencia del origen genético sobre el fenotipo de los animales. Estos estudios apoyan la importancia de caracterizar los diferentes fenotipos reproductivos generados por una mutación en varios fondos genéticos, con el fin de mejorar el desarrollo de métodos tanto de diagnóstico como de tratamiento de la infertilidad.

El capitulo 2 estuvo orientado al estudio de la relevancia de la proteína testicular CRISP2 para la fertilidad. Teniendo en cuenta evidencias de nuestro laboratorio indicando que CRISP2 sería un mediador del proceso de fertilización como así también el hecho de que la misma había sido propuesta como el principal auto-antígeno candidato a generar orquitis autoinmune, evaluamos su relevancia para la

Conclusión

fertilidad a través de la inmunización de ratas macho y hembra con la proteína. Los resultados indicaron que CRISP2 fue capaz de generar una respuesta inmune específica en todos los animales que no produjo orquitis autoinmune y que, a diferencia de lo observado para CRISP1, no comprometió la fertilidad de los animales. Si bien los resultados no permiten descartar una potencial relevancia de CRISP2 para la fertilidad, podemos concluir que CRISP2 no sería un buen target para inmuno-anticoncepción ni una de las moléculas responsables de generar orquitis autoinmune o inmuno-infertilidad.

El capitulo 3 se centró en el estudio de la función biológica del tercer miembro de la familia CRISP, la proteína CRISP3. Dada su expresión en órganos tanto reproductivos como inmunes, decidimos evaluar tanto la participación de esta proteína en el proceso de fertilización como su posible rol inmunoregulatorio. Los resultados indicaron la presencia de dos poblaciones de CRISP3 asociadas con diferentes afinidades a la membrana del espermatozoide humano. Una débilmente unida que se libera durante la capacitación y que no regularía la fosforilación de proteínas en tirosina, y otra fuertemente unida que se mantiene en el espermatozoide aún luego de la RA y que, a diferencia de CRISP1 y CRISP2, no participaría en la interacción de gametas. Dado la expresión diferencial de CRISP3 en diversas patologías y su alta homología con la proteína CRISP1, evaluamos la presencia de ambas proteínas en una importante célula del sistema inmune tal como la célula dendrítica. Los resultados indicaron la expresión tanto de CRISP3 como de CRISP1 en células dendríticas inmaduras y maduras de ratón. Más aún, posteriores estudios utilizando los animales KO para CRISP1, revelaron que CRISP1 sería capaz de regular el perfil de citoquinas secretado por las células dendríticas, en forma diferencial para machos y hembras. En conjunto, estas evidencias indican la importancia de las proteínas CRISP para la fisiología de la célula dendrítica, apoyando su rol como reguladores del sistema inmune.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta Tesis, trabajando con tres de las cuatro proteínas CRISP existentes en mamíferos, indican que las proteínas de esta familia cumplen roles que, tal cual se describe en el titulo de este trabajo, van desde su participación en el proceso de fertilización hasta su función como posibles reguladores del sistema inmune.

Consideramos que los estudios presentados en esta Tesis permitirán una mayor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados tanto en el proceso de fertilización como en la regulación del sistema inmune, contribuyendo al desarrollo de nuevos y mejores métodos para el diagnóstico y tratamiento de la infertilidad y de enfermedades con componentes inmunológicos

Bibliografía

Abou-haila, A. and Tulsiani, D.R. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. Arch. Biochem. Biophys. 2009;485:72-81.

Adham, I.M., Nayernia, K., and Engel, W. Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. Mol. Reprod. Dev. 1997; *46*:370-376.

Alfieri, J.A., Martin, A.D., Takeda, J., Kondoh, G., Myles, D.G., and Primakoff, P. Infertility in female mice with an oocyte-specific knockout og GPI-anchored proteins. J. Cell Sci. 2003; *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. Mouse egg integrin $\alpha 6\beta 1$ functions as a sperm receptor. Cell1995;*81:*1095-1104.

Anahi, F.N., Avendano, C., Molina, R.I., Tissera, A.D., Maldonado, C.A., Oehninger, S., and Coronel, C.E. beta-Microseminoprotein in human spermatozoa and its potential role in male fertility. Reproduction.2008;*136*:157-166.

Araneo, B.A., Dowell, T., Diegel, M., and Daynes, R.A. Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. Blood1991;78:688-699.

Arcelay, E., Salicioni, A.M., Wertheimer, E., and Visconti, P.E. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. Int. J Dev. Biol.2008;*52*:463-472.

Arts,E.G.J.M., Kuiken,J., Jager,S., and Hoekstra,D. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa- -Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. Eur. J. Biochem.1993;*217:*1001-1009.

Aumuller,G., Renneberg,H., Schiemann,P.J., Wilhelm,B., Seitz,J., Konrad,L., and Wennemuth,G. The role of apocrine released proteins in the post-testicular regulation of human sperm function. Adv. Exp. Med. Biol.1997;424:193-219.

Austin, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust J Sci Res [B]1951;4:581-596.

Austin, C.R. The "capacitation" of the mammalian sperm. Nature1952; 170:326.

Austin, C.R. Ageing and reproduction. Post-ovulatory deterioration of the egg. J. Reprod. Fertil. (suppl.) 1970; *12*:39-53.

Austin, C.R. (1982). The egg. In Reproduction in Mammals, C.R.Austin and R.V.Short, eds. Cambridge University Press), pp. 46-62.

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. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 can pass through the layer of cumulus cells and fertilize the egg. J. Biol. Chem.2002;*277*:30310-30314.

Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., and Toyoda, Y. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. J. Biol. Chem. 1994;*269*:31845-31849.

Baibakov,B., Gauthier,L., Talbot,P., Rankin,T.L., and Dean,J. Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. Development2007;*134*.933-943.

Baumber, J. and Meyers, S.A. Changes in membrane lipid order with capacitation in rhesus macaque (Macaca mulatta) spermatozoa. J Androl2006;*27*:578-587.

Bedford, J.M. (1979). Evolution of the sperm maturation and sperm storage functions of the epididymis. In The Spermatozoon., D.W.Fawcett and J.M.Bedford, eds. (Baltimore: Urban and Schwarzenberg), pp. 7-21.

Bedford, J.M. Enigmas of mammalian gamete form and function. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.2004; 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. Cumulus oophorus as a sperm sequestering device, in vivo. J. Exp. Zool. 1993; *265:* 321-328.

Bedford, J.M., Moore, H.D.M., and Franklin, L.E. Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. Exp. Cell Res. 1979; *119*:119-126.

Benavidez. Manual de genetica de roedores de laboratorio. 2006. Ref Type: Generic

Berger, T., Turner, K.O., Meizel, S., and Hedrick, J.L. Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. Biol. Reprod. 1988; *40*:525-530.

Bi,M., Hickox,J.R., Winfrey,V.P., Olson,G.E., and Hardy,D.M. Processing, localization and binding activity of zonadhesin suggest a function in sperm adhesion to the zona pellucida during exocytosis of the acrosome. Biochem. J.2003;*375*:477-488.

Biggers, J.D., Whitten, W.K., and Whittingham, D.G. Methods in mammalian embrology, Ed. JC Daniel, Freeman, San Frascisco. .1971;86-116.

Bigler, D., Takahashi, Y., Chen, M.S., Almeida, E.A., Osbourne, L., and White, J.M. Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. J. Biol. Chem. 2000. Apr. 21;275(16):11576-84.2000;*275*:11576-11584.

Blackmore, P.F. Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca²⁺ influx and the acrosome reaction in human sperm. Cell. Signal.1993;*5:*531-538.

Blaquier, J.A., Cameo, M.S., and Burgos, M.H. The role of androgens in the maturation of epididymal spermatozoa in the guinea pig. Endocrinology1973;90:839-842.

Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. Synthesis of zona pellucida proteins by denuded and follicle-enclosed mouse oocytes during culture in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A1980;77:1029-1033.

Bleil,J.D. and Wassarman,P.M. Sperm-egg interaction in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. Dev. Biol.1983;*95*:317-324.

Bleil,J.D. and Wassarman,P.M. Identification of a ZP3-binding protein on acrosomeintact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. Proc. Natl. Acad. Sci. USA1990;*87*:5563-5567.

Boatman, D.E. and Robbins, R.S. Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. Biol. Reprod. 1991;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. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. Biol. Reprod.2012;88:21.

Bork, P. and Sander, C. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF- R~. FEBS. Lett.1992;300:237-240.

Branham, M.T., Mayorga, L.S., and Tomes, C.N. Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. J. Biol. Chem. 2006; *281*. 8656-8666.

Brase, J.C., Johannes, M., Mannsperger, H., Falth, M., Metzger, J., Kacprzyk, L.A., Andrasiuk, T., Gade, S., Meister, M., Sirma, H., Sauter, G., Simon, R., Schlomm, T., Beissbarth, T., Korf, U., Kuner, R., and Sultmann, H. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling. BMC. Cancer2011;*11:*507.

Breitbart,H. and Etkovitz,N. Role and regulation of EGFR in actin remodeling in sperm capacitation and the acrosome reaction. Asian J. Androl2011;13:106-110.

Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N.D., Naruse, M., Krahling, M., Muller, A., Kaupp, U.B., and Strunker, T. The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. EMBO J.2012;*31:*1654-1665.

Buffone,M.G., Ijiri,T.W., Cao,W., Merdiushev,T., Aghajanian,H.K., and Gerton,G.L. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. Mol. Reprod. Dev.2012;79:4-18.

Busso, D., Cohen, D.J., Hayashi, M., Kasahara, M., and Cuasnicu, P.S. Human testicular protein TPX1/CRISP-2: localization in spermatozoa, fate after capacitation and relevance for gamete interaction. Mol. Hum. Reprod.2005;*11*:299-305.

Busso, D., Cohen, D.J., Maldera, J.A., Dematteis, A., and Cuasnicu, P.S. A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: Involvement in sperm-zona pellucida interaction. Biol. Reprod.2007a;77:848-854.

Busso, D., Goldweic, N.M., Hayashi, M., Kasahara, M., and Cuasnicu, P.S. Evidence for the involvement of testicular protein CRISP2 in mouse sperm-egg fusion. Biol. Reprod.2007b; *76:*701-708.

Bustos, M.A., Lucchesi, O., Ruete, M.C., Mayorga, L.S., and Tomes, C.N. Rab27 and Rab3 sequentially regulate human sperm dense-core granule exocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2012; *109*:E2057-E2066.

Butterworth, M., McClellan, B., and Allansmith, M. Influence of sex in immunoglobulin levels. Nature 1967; *214*:1224-1225.

Cameo, M.S. and Blaquier, J.A. Androgen-controlled specific proteins in rat epididymis. J. Endocr. 1976; *69*:317-324.

Cameo,M.S., Gonzalez Echeverria,M.F., Blaquier,J.A., and Burgos,M.H. Immunochemical localization of epididymal protein DE on rat spermatozoa: Its fate after induced acrosome reaction. Gam. Res.1986;*15:*247-258.

Castle, P.E. Could multiple low-affinity bonds mediate primary sperm-zona pellucida binding? Reproduction.2002;*124:*29-32.

Chan, P.S., Chan, L.W., Xuan, J.W., Chin, J.L., Choi, H.L., and Chan, F.L. In situ hybridization study of PSP94 (prostatic secretory protein of 94 amino acids) expression in human prostates. Prostate1999;41:99-109.

Chang, H. and Suarez, S.S. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. Biol. Reprod. 2010;83:507-513.

Chang, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. Nature1951;*168:*697-698.

Chen,G., Yang,L., Begum,S., and Xu,L. GPR56 is essential for testis development and male fertility in mice. Dev. Dyn.2010;*239*:3358-3367.

Chen,L., Russell,P.T., and Larsen,W.J. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: Roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. Mol. Reprod. Dev.1993;*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. 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.1999;*96*:11830-11835.

Cherr,G.N., Lambert,H., Meizel,S., and Katz,D.F. In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous solubilized zona. Dev. Biol.1986;*114*:119-131.

Cherr,G.N., Meyers,S.A., Yudin,A.I., Vandevoort,C.A., Myles,D.G., Primakoff,P., and Overstreet,J.W. The PH-20 protein in cynomolgus macaque spermatozoa: Identification of two different forms exhibiting hyaluronidase activity. Dev. Biol.1996;*175*:142-153.

Cho,C., Bunch,D.O., Faure,J.E., Goulding,E.H., Eddy,E.M., Primakoff,P., and Myles,D.G. Fertilization defects in sperm from mice lacking fertilin beta. Science1998;*281:*1857-1859.

Clark, D.A. Seminal Advances in Immunology of Reproduction. Biol. Reprod.2011.

Cohen, A.M., Liu, S.C., Derick, L.H., and Palek, J. Ultrastructural studies of the interaction of spectrin with phosphatidylserine liposomes. Blood1986;*68*:920-926.

Cohen, D.J., Busso, D., Da, R., V, Ellerman, D.A., Maldera, J.A., Goldweic, N., and Cuasnicu, P.S. Participation of cysteine-rich secretory proteins (CRISP) in mammalian sperm-egg interaction. Int. J. Dev. Biol. 2008; *52*:737-742.

Cohen,D.J., Ellerman,D.A., Busso,D., Morgenfeld,M., Piazza,A., Hayashi,M., Young,E.T., Kasahara,M., and Cuasnicu,P.S. Evidence that human epididymal protein ARP plays a role in gamete fusion through complementary sites on the surface of the human egg. Biol. Reprod.2001;65:1000-1005.

Cohen, D.J., Ellerman, D.A., and Cuasnicú, P.S. Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. Biol. Reprod.2000a;*63*:462-468.

Cohen, D.J., Rochwerger, L., Ellerman, D.A., Morgenfeld, M., Busso, D., and Cuasnicu, P.S. Relationship between the association of rat epididymal protein DE with spermatozoa and the behavior and function of the protein. Mol. Reprod. Dev.2000b;*56*:180-188.

Cohen, D. J., Urrutia, M., and Cuasnicu, P. S. Epididymal protein DE is involved in mouse-rat sperm-egg fusion. Biology of Reproduction 54[Suppl.1], 100. 1996. Ref Type: Abstract

Cooper, T.G. (1986). The epididymis, sperm maturation and fertilization. (Berlin: Springer Verlag).

Cooper, T.G. Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. J Reprod. Fertil. Suppl1998; *53*:119-136.

Cowan,A.E., Koppel,D.E., Vargas,L.A., and Hunnicutt,G.R. Guinea pig fertilin exhibits restricted lateral mobility in epididymal sperm and becomes freely diffusing during capacitation. Dev. Biol.2001;*236*:502-509.

Crane, L.H. and Martin, L. Postcopulatory myometrial activity in the rat as seen by videolaparoscopy. Reprod. Fertil. Dev. 1991; 3:685-698.

Crosby, J.A., Jones, R., Barros, C., and Carvallo, P. Characterization of the functional domains of boar acrosin involved in nonenzymatic binding to homologous zona pellucida glycoproteins. Mol. Reprod. Dev. 1998; *49*:426-434.

Cross, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol. Reprod. 1998; 59:7-11.

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., and Hanson, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gam. Res. 1986; *15:*213-226.

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., and Hanson, F.W. Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida. Biol. Reprod. 1988; *38*:235-244.

Cuasnicú,P.S., Cohen,D.J., Ellerman,D.A., Busso,D., Da Ros,V.G., and Morgenfeld,M. (2002). Changes in sperm proteins during epididymal maturation. In The Epididymis. From Molecules to Clinical Practice., B.Robaire and B.T.Hinton, eds. (New York.: Kluwer Academic/Plenum Publishers.), pp. 389-404.

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., Gonzalez Echeverria, F., Piazza, A., and Blaquier, J.A. Antibody against epididymal glycoprotein blocks fertilizing ability in rats. J. Reprod. Fertil. 1984; 72:467-471.

D'Cruz,O.J. and Haas,G.G., Jr. Beta 2-integrin (CD11b/CD18) is the primary adhesive glycoprotein complex involved in neutrophil-mediated immune injury to human sperm. Biol. Reprod.1995;*53*:1118-1130.

D'Cruz,O.J., Wang,B.L., and Haas,G.G., Jr. Phagocytosis of immunoglobulin G and C3-bound human sperm by human polymorphonuclear leukocytes is not associated with the release of oxidative radicals. Biol. Reprod.1992;46:721-732.

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. Impaired sperm fertilizing ability in mice lacking Cysteine-RIch Secretory Protein 1 (CRISP1). Dev. Biol. 2008; *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. 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.2004;*70*:1325-1332.

Dahlman,A., Rexhepaj,E., Brennan,D.J., Gallagher,W.M., Gaber,A., Lindgren,A., Jirstrom,K., and Bjartell,A. Evaluation of the prognostic significance of MSMB and CRISP3 in prostate cancer using automated image analysis. Mod. Pathol.2011;24:708-719.

De Blas,G.A., Roggero,C.M., Tomes,C.N., and Mayorga,L.S. Dynamics of SNARE assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. PLoS. Biol.2005;*3*:e323.

Diaz-Perez, E. and Meizel, S. Importance of mammalian sperm metalloendoprotease activity during the acrosome reaction to subsequent sperm-egg fusion: Inhibitor studies with human sperm and zona-free hamster eggs. Mol. Reprod. Dev.1992;*31*:122-130.

Diaz-Perez, E., Thomas, P., and Meizel, S. Evidence suggesting a role for sperm metalloendoprotease activity in penetration of zona-free hamster eggs by human sperm. J. Exp. Zool.1988;*248*:213-221.

DMedicina. 2010. Ref Type: Internet Communication

Domagala, A., Pulido, S., Kurpisz, M., and Herr, J.C. Application of proteomic methods for identification of sperm immunogenic antigens. Mol. Hum. Reprod. 2007; *13*:437-444.

Dostal, J., Veselsky, L., Marounek, M., Zelezna, B., and Jonakova, V. Inhibition of bacterial and boar epididymal sperm immunogenicity by boar seminal immunosuppressive component in mice. J. Reprod. Fertil. 1997; *111*:135-141.

Doty,A., Buhi,W.C., Benson,S., Scoggin,K.E., Pozor,M., Macpherson,M., Mutz,M., and Troedsson,M.H. Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils (PMNs). Biol. Reprod.2011.

Du,Y., Huang,X., Li,J., Hu,Y., Zhou,Z., and Sha,J. Human testis specific protein 1 expression in human spermatogenesis and involvement in the pathogenesis of male infertility. Fertil. Steril.2006;85:1852-1854.

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., Duffy, P., and Buetow, J. Quantification and localization of cortical granules during oogenesis in the mouse. Biol. Reprod. 1994; *50*:467-473.

Dyson,A.L. and Orgebin-Crist,M.C. Effect of hypophysectomy, castration and androgen replacement upon fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. Endocrinology1973;93:391-395.

Ebensperger, C. and Barros, C. Changes at the hamster oocyte surface from germinal vesicle stage to ovulation. Gam. Res. 1984; *9*:387-397.

Eddy, E.M. (2006). The spermatozoon. In Physiology of Reproduction., J.D.Neill, ed. (New York: Academic Press), pp. 3-54.

Eisenbach, M. Sperm chemotaxis. Rev. Reprod. 1999; 4:56-66.

Eisenbach, M. and Tur-Kaspa, I. Human sperm chemotaxis is not enigmatic anymore. Fertil. Steril. 1994;*62:*233-235.

Ellerman, D.A., Brantua, V.S., Martinez, S.P., Cohen, D.J., Conesa, D., and Cuasnicu, P.S. Potential contraceptive use of epididymal proteins: immunization of male rats with epididymal protein DE inhibits sperm fusion ability. Biol. Reprod.1998;59:1029-1036.

Ellerman, D.A., Busso, D., Maldera, J.A., and Cuasnicu, P.S. Immunocontraceptive properties of recombinant sperm protein DE: implications for the development of novel contraceptives. Fertil. Steril.2008;*89*:199-205.

Ellerman, D.A., Cohen, D.J., Da Ros, V.G., Morgenfeld, M.M., Busso, D., and Cuasnicu, P.S. Sperm protein "DE" mediates gamete fusion through an evolutionarily conserved site of the CRISP family. Dev. Biol. 2006; *297*:228-237.

Ellerman, D.A., Cohen, D.J., Weigel, M.M., Da Ros, V.G., Ernesto, J.I., Tollner, T.L., and Cuasnicu, P.S. Immunologic behavior of human cysteine-rich secretory protein 1 (hCRISP1) in primates: prospects for immunocontraception. Fertil. Steril.2010;*93:*2551-2556.

Ellerman, D.A., Da Ros, V.G., Cohen, D.J., Busso, D., Morgenfeld, M.M., and Cuasnicu, P.S. Expression and structure-function analysis of DE, a sperm cysteine-rich secretory protein that mediates gamete fusion. Biol. Reprod.2002;*67*:1225-1231.

Ensslin, M., Vogel, T., Calvete, J.J., Thole, H.H., Schmidtke, J., Matsuda, T., and Topfer-Petersen, E. Molecular cloning and characterization of P47, a novel boar spermassociated zona pellucida-binding protein homologous to a family of mammalian secretory proteins. Biol. Reprod. 1998; *58*:1057-1064.

Ensslin, M.A. and Shur, B.D. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. Cell2003;*114*:405-417.

Eppig, J.J. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. Nature1979;*281:*483-484.

Erickson, R.P. Mouse models of human genetic disease: which mouse is more like a man? BioEssays1996; *18*:993-998.

Esposito,G., Jaiswal,B.S., Xie,F., Krajnc-Franken,M.A., Robben,T.J., Strik,A.M., Kuil,C., Philipsen,R.L., Van Duin,M., Conti,M., and Gossen,J.A. Mice deficient for

soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2004;*101:*2993-2998.

Evans, J.P. Sperm disintegrins, egg integrins, and other cell adhesion molecules of mammalian gamete plasma membrane interactions. Front. Biosci. 1999; *4*: D114-31.

Fabro,G., Rovasio,R.A., Civalero,S., Frenkel,A., Caplan,S.R., Eisenbach,M., and Giojalas,L.C. Chemotaxis of capacitated rabbit spermatozoa to follicular fluid revealed by a novel directionality-based assay. Biol. Reprod.2002;*67:*1565-1571.

Fernandez, C., Szyperski, T., Bruyere, T., Ramage, P., Mosinger, E., and Wuthrich, K. NMR solution structure of the pathogenesis-related protein P14a. J. Mol. Biol. 1997; *266*:576-93.

Fernando J.Benavides and Jean-Louis Guénet (2003). Manual de Genética de Roedores de Laboratorio.

Flesch,F.M., Brouwers,J.F., Nievelstein,P.F., Verkleij,A.J., van Golde,L.M., Colenbrander,B., and Gadella,B.M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. J Cell Sci.2001;*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. 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.1988;*128:*453-463.

Florman, H.M. and Storey, B.T. Mouse gamete interactions. The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization *in vitro*. Dev. Biol. 1982;*91*:121-130.

Fornes, M.W., Barbieri, A., Sosa, M.A., and Bertini, F. First observations on enzymatic activity and protein content of vesicles separated from rat epididymal fluid. Andrologia1991;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. 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. 1997;*272*:12714-12722.

Foster, J.A. and Gerton, G.L. 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.1996;44:221-229.

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

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

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

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

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

Friess,H., Ding,J., Kleeff,J., Liao,Q., Berberat,P.O., Hammer,J., and Buchler,M.W. Identification of disease-specific genes in chronic pancreatitis using DNA array technology. Ann. Surg.2001;*234*:769-778.

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

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

Gadella,B.M. and Harrison,R.A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. Development2000;*127*:2407-2420.

Gadella,B.M. and Harrison,R.A. 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.2002;*67*:340-350.

Gadella,B.M., Miller,N.G., Colenbrander,B., van Golde,L.M., and Harrison,R.A. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. Mol. Reprod. Dev.1999;*53*:108-125.

Gakamsky,A., Armon,L., and Eisenbach,M. Behavioral response of human spermatozoa to a concentration jump of chemoattractants or intracellular cyclic nucleotides. Hum. Reprod.2009;*24:*1152-1163.

Garberi, J.C., Fontana, J.D., and Blaquier, J.A. Carbohydrate composition of specific rat epididymal protein. Int. J. Androl. 1982; *5*:619-626.

Garberi, J.C., Kohane, A.C., Cameo, M.S., and Blaquier, J.A. Isolation and characterization of specific rat epididymal proteins. Mol. Cell. Endocrinol. 1979; *13:*73-82.

Guevara, C M; Gutiérrez Schwanhauser J P. Expresión fenotípica en pacientes con fibrosis quística. Acta pediátr costarric. 2009, 21:26-32.

Gibbs,G.M., Bianco,D.M., Jamsai,D., Herlihy,A., Ristevski,S., Aitken,R.J., Kretser,D.M., and O'Bryan,M.K. Cysteine-rich secretory protein 2 binds to mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11 in mouse sperm. Biol. Reprod.2007;77:108-114.

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. 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. A2011;*108:*7034-7039. Gibbs,G.M., Roelants,K., and O'Bryan,M.K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins--roles in reproduction, cancer, and immune defense. Endocr. Rev.2008;*29*:865-897.

Gibbs,G.M., Scanlon,M.J., Swarbrick,J., Curtis,S., Gallant,E., Dulhunty,A.F., and O'Bryan,M.K. The cysteine-rich secretory protein domain of Tpx-1 is related to ion channel toxins and regulates ryanodine receptor Ca2+ signaling. J. Biol. Chem.2006;*281*:4156-4163.

Giojalas,L.C. and Rovasio,R.A. Mouse spermatozoa modify their motility parameters and chemotactic response to factors from the oocyte microenvironment. Int. J. Androl1998;*21*:201-206.

Gmachl, M., Sagan, S., Ketter, S., and Kreil, G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. FEBS Lett. 1993; *336:*545-548.

Go,K.J. and Wolf,D.P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. Biol. Reprod.1985;*32:*145-153.

Green, D.P.L. The induction of the acrosme reaction in guinea pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. J. Cell Sci.1978;*32:*137-151.

Griffiths,G.S., Galileo,D.S., Reese,K., and Martin-Deleon,P.A. Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. Mol. Reprod. Dev.2008;*75:*1627-1636.

Guo,M., Teng,M., Niu,L., Liu,Q., Huang,Q., and Hao,Q. 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.2005;*280*:12405-12412.

Haddad,A. and Nagai,E. Radioautographic study of glycoprotein biosynthesis and renewal in the ovarian follicles of mice and the origin of the zona pellucida. Cell Tissue Res.1977;177:347-369.

Haendler, B., Habenicht, U.F., Schwidetzky, U., Schuttke, I., and Schleuning, W.D. Differential androgen regulation of the murine genes for cysteine-rich secretory proteins (CRISP). Eur. J. Biochem. 1997; *250*:440-446.

Haendler, B., Kratzschmar, J., Theuring, F., and Schleuning, W.D. 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. Endocrinology1993;133:192-198.

Ham,K.N., Hurley,J.V., Lopata,A., and Ryan,G.B. A combined isotopic and electron microscopic study of the response of the rat uterus to exogenous oestradiol. J. Endocrinol.1970;46:71-81.

Hamann,H., Jude,R., Sieme,H., Mertens,U., Topfer-Petersen,E., Distl,O., and Leeb,T. A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. Anim Genet.2007;*38*:259-264.

Hanada, A. and Chang, M.C. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. Biol. Reprod. 1972; *6:*300-309.

Hardy,D.M. and Garbers,D.L. A sperm membrane protein that binds in a speciesspecific manner to the egg extracellular matrix is homologous to von Willebrand factor. J. Biol. Chem.1995;*270*.26025-26028.

Hardy, D.M., Huang, T.T.F., Driscoll, W.J., Tung, K.S.K., and Wild, G.C. Purification and characterization of the primary acrosomal autoantigen of guinea pig epididymal spermatozoa. Biol. Reprod. 1988; *38*:423-437.

Hardy, D.M., Oda, M.N., Friend, D.S., and Huang, T.T., Jr. A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction. Biochem. J.1991;275 (*Pt 3):*759-766.

Hayashi,M., Fujimoto,S., Takano,H., Ushiki,T., Abe,K., Ishikura,H., Yoshida,M., Kirchhoff,C., Ishibashi,T., and Kasahara,M. Characterization of a human glycoprotein with potential role in sperm-egg fusion: cDNA cloning, immunohistochemical localization, and chromosomal assignment of the gene (AEGL1). Genomics1996;*32*:367-374.

He,Z.Y., Brakebusch,C., Fassler,R., Kreidberg,J.A., Primakoff,P., and Myles,D.G. 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.2003;*254*:226-237.

Henriksen, A., King, T.P., Mirza, O., Monsalve, R.I., Meno, K., Ipsen, H., Larsen, J.N., Gajhede, M., and Spangfort, M.D. Major venom allergen of yellow jackets, Ves v 5: structural characterization of a pathogenesis-related protein superfamily. Proteins 2001;45:438-448.

Hermo, L. and Jacks, D. Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. Mol. Reprod. Dev.2002;63:394-410.

Herrero, M.B., Mandal, A., Digilio, L.C., Coonrod, S.A., Maier, B., and Herr, J.C. Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization. Dev. Biol. 2005; *284*:126-142.

Himmelbauer,H., Artzt,K., Barlow,D., Fischer-Lindahl,K., Lyon,M., Klein,J., and Silver,L.M. Encyclopedia of the mouse genome III. October 1993. Mouse chromosome 17. Mamm. Genome1993; *A Spec No:*S230-S252.

Hinrichsen, M. and Blaquier, J.A. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. J. Reprod. Fertil. 1980;*60*:291-294.

Ho,K., Wolff,C.A., and Suarez,S.S. CatSper-null mutant spermatozoa are unable to ascend beyond the oviductal reservoir. Reprod. Fertil. Dev.2009;*21*:345-350.

Hoodbhoy, T. and Dean, J. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. Reproduction2004; *127*:417-422.

Hoodbhoy, T. and Talbot, P. Mammalian cortical granules: Contents, fate, and function. Mol. Reprod. Dev.1994;*39:*439-448.

Hoogland,A.M., Dahlman,A., Vissers,K.J., Wolters,T., Schroder,F.H., Roobol,M.J., Bjartell,A.S., and van Leenders,G.J. Cysteine-rich secretory protein 3 and betamicroseminoprotein on prostate cancer needle biopsies do not have predictive value for subsequent prostatectomy outcome. BJU. Int.2011;*108*:1356-1362. Howes, E., Pascall, J.C., Engel, W., and Jones, R. Interactions between mouse ZP2 glycoprotein and proacrosin; a mechanism for secondary binding of sperm to the zona pellucida during fertilization. J. Cell Sci.2001;*114*:4127-4136.

Huang, Y.H., Luo, C.W., Yu, L.C., Chu, S.T., and Chen, Y.H. The protein conformation and a zinc-binding domain of an autoantigen from mouse seminal vesicle. Biophys. J.1995;*69*:2084-2089.

Hunter, R.H. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. J. Reprod. Fertil. 1981; *63:* 109-117.

Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A.M., and Okabe, M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. J Clin. Invest2010; *120*:984-994.

Ikawa, M., Wada, I., Kominami, K., Watanabe, D., Toshimori, K., Nishimune, Y., and Okabe, M. The putative chaperone calmegin is required for sperm fertility. Nature 1997;*387:*607-611.

Ilarregui, J.M., Croci, D.O., Bianco, G.A., Toscano, M.A., Salatino, M., Vermeulen, M.E., Geffner, J.R., and Rabinovich, G.A. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. Nat. Immunol. 2009; *10*.981-991.

Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. Nature2005;*434:*234-238.

Isobe, T., Minoura, H., Tanaka, K., Shibahara, T., Hayashi, N., and Toyoda, N. The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. Hum. Reprod. 2002; *17*:1441-1446.

Itoh, M., Hiramine, C., and Hojo, K. A new murine model of autoimmune orchitis induced by immunization with viable syngeneic testicular germ cells alone. I. Immunological and histological studies. Clin. Exp. Immunol.1991;83:137-142.

Jalkanen, J., Huhtaniemi, I., and Poutanen, M. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): a member of the crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. Biol. Reprod.2005;*72*:1268-1274.

Jamsai, D., Bianco, D.M., Smith, S.J., Merriner, D.J., Ly-Huynh, J.D., Herlihy, A., Niranjan, B., Gibbs, G.M., and O'Bryan, M.K. 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.2008; *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. 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 2010; *102*:93-106.

Jegou, A., Ziyyat, A., Barraud-Lange, V., Perez, E., Wolf, J.P., Pincet, F., and Gourier, C. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for mammalian fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2011;*108*:10946-10951.

Jin,M., Fujiwara,E., Kakiuchi,Y., Okabe,M., Satouh,Y., Baba,S.A., Chiba,K., and Hirohashi,N. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2011;*108:*4892-4896.

Jing,X.W., Xing,R.W., Zhou,Q.Z., Yu,Q.F., Guo,W.B., Chen,S.M., Chu,Q.J., Feng,C.Q., and Mao,X.M. [Expressions of cysteine-rich secretory protein 2 in asthenospermia]. Zhonghua Nan. Ke. Xue.2011;*17:*203-207.

Johnson, M.H., Eager, D., Muggleton-Harris, A., and Grave, H.M. Mosaicism in organisation of concanavalin A receptors on surface membranes of mouse eggs. Nature 1975;*257*.321-322.

Jovine, L., Darie, C.C., Litscher, E.S., and Wassarman, P.M. Zona pellucida domain proteins. Annu. Rev. Biochem. 2005; 74:83-114.

Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Litscher, E., and Wassarman, P.M. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. Nat. Cell Biol. 2002;4:457-461.

Kaji,K., Oda,S., Shikano,T., Ohnuki,T., Uematsu,Y., Sakagami,J., Tada,N., Miyazaki,S., and Kudo,A. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9deficient mice. Nat. Genet.2000;*24*:279-282.

Kaplan, R. and Kraicer, P.F. Effect of elevated calcium concentration on fertilization of rat oocytes in vitro. Gam. Res. 1978; *1:*281-285.

Kasahara, M., Figueroa, F., and Klein, J. Molecular cloning of a testis-specific gene from mouse chromosome 17. Transplant. Proc. 1987; *19*:815-816.

Kasahara, M., Gutknecht, J., Brew, K., Spurr, N., and Goodfellow, P.N. Cloning and mapping of a testis-specific gene with sequence similarity to a sperm-coating glycoprotein gene. Genomics 1989; *5*:527-534.

Kaupp,U.B., Kashikar,N.D., and Weyand,I. Mechanisms of sperm chemotaxis. Annu. Rev. Physiol2008;70.93-117.

Kille, J.W. and Goldberg, E. Female reproductive tract immunoglobulin responses to a purified sperm specific antigen (LDH-C4). Biol. Reprod. 1979;*20:*863-871.

Kim,E., Baba,D., Kimura,M., Yamashita,M., Kashiwabara,S., and Baba,T. Identification of a hyaluronidase, Hyal5, involved in penetration of mouse sperm through cumulus mass. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2005;*102:*18028-18033.

Kim,E., Yamashita,M., Nakanishi,T., Park,K.E., Kimura,M., Kashiwabara,S., and Baba,T. Mouse sperm lacking ADAM1b/ADAM2 fertilin can fuse with the egg plasma membrane and effect fertilization. J. Biol. Chem.2006a;*281:*5634-5639.

Kim,K.S., Foster,J.A., and Gerton,G.L. Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. Biol. Reprod.2001;*64:*148-156.

Kim,K.S. and Gerton,G.L. Differential release of soluble and matrix components: evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. Dev. Biol.2003;264:141-152.

Kim,T., Oh,J., Woo,J.M., Choi,E., Im,S.H., Yoo,Y.J., Kim,D.H., Nishimura,H., and Cho,C. Expression and relationship of male reproductive ADAMs in mouse. Biol. Reprod.2006b;*74:*744-750.

Kimura, M., Tomita, Y., Watanabe, H., Sato, S., and Abo, T. Androgen regulation of intraand extra-thymic T cells and its effect on sex differences in the immune system. Int. J. Androl1995; *18*:127-136.

Kirchhoff, C. and Hale, G. Cell-to-cell transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins during sperm maturation. Mol. Reprod. Dev.1996;*2*:177-184.

Kjeldsen,L., Cowland,J.B., Johnsen,A.H., and Borregaard,N. SGP28, a novel matrix glycoprotein in specific granules of human neutrophils with similarity to a human testis-specific gene product and a rodent sperm-coating glycoprotein. FEBS Lett.1996;*380*:246-250.

Ko,W.C., Sugahara,K., Sakuma,T., Yen,C.Y., Liu,S.Y., Liaw,G.A., and Shibahara,T. Copy number changes of CRISP3 in oral squamous cell carcinoma. Oncol. Lett.2012;*3*:75-81.

Kohane, A.C., Cameo, M.S., Piñeiro, L., Garberi, J.C., and Blaquier, J.A. Distribution and site of production of specific proteins in the rat epididymis. Biol. Reprod. 1980a; *23*:181-187.

Kohane, A.C., Gonzalez Echeverria, F., Piñeiro, L., and Blaquier, J.A. Interaction of proteins of epididymal origin with spermatozoa. Biol. Reprod. 1980b; *23*:737-742.

Kohane, A.C., Piñeiro, L., and Blaquier, J.A. Androgen-controlled synthesis of specific protein in the rat epididymis. Endocrinology1983;*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. Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm capacitation. Mol. Reprod. Dev.2010;77:773-783.

Kotilainen, T., Huhtinen, M., and Katila, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. Theriogenology1994;41.629-636.

Kratzschmar, J., Haendler, B., Eberspaecher, U., Roosterman, D., Donner, P., and Schleuning, W.D. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. Eur. J. Biochem. 1996; *236*:827-836.

Krutzsch,P.H., Crichton,E.G., and Nagle,R.B. Studies on prolonged spermatozoa survival in Chiroptera: a morphological examination of storage and clearance of intrauterine and cauda epididymal spermatozoa in the bats Myotis lucifugus and M. velifer. Am. J. Anat.1982;*165*:421-434.

Laemmli,U.K. Cleavege of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature1970;*227*:680-685.

Laine, M., Porola, P., Udby, L., Kjeldsen, L., Cowland, J.B., Borregaard, N., Hietanen, J., Stahle, M., Pihakari, A., and Konttinen, Y.T. Low salivary dehydroepiandrosterone and androgen-regulated cysteine-rich secretory protein 3 levels in Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum. 2007; *56*:2575-2584.

Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. Science2000;*287*:319-321.

Lee,C.G., Zhang,J., Wong,E., Chow,S.N., Yang,Y., and Leung,W. Sex differences of antifertility effect by passively immunized monoclonal sperm antibodies. Am. J. Reprod. Immunol.1987;*13*.9-14.

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. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. Hum. Reprod.2004;19:1580-1586.

Legare, C., Berube, B., Boue, F., Lefievre, L., Morales, C.R., El-Alfy, M., and Sullivan, R. Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. Mol. Reprod. Dev. 1999;*52*:225-233.

Leyton,L. and Saling,P. Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction. J. Cell Biol.1989;*108*:2163-2168.

Liao, Q., Kleeff, J., Xiao, Y., Guweidhi, A., Schambony, A., Topfer-Petersen, E., Zimmermann, A., Buchler, M.W., and Friess, H. Preferential expression of cystein-rich secretory protein-3 (CRISP-3) in chronic pancreatitis. Histol. Histopathol.2003;*18:*425-433.

Lin,Y., Mahan,K., Lathrop,W.F., Myles,D.G., and Primakoff,P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. J. Cell Biol.1994;*125:*1157-1163.

Lishko, P.V., Botchkina, I.L., and Kirichok, Y. Progesterone activates the principal Ca2+ channel of human sperm. Nature2011;471:387-391.

Liva,S.M. and Voskuhl,R.R. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. J. Immunol.2001;*167:*2060-2067.

Lopez,L.C. and Shur,B.D. Redistribution of mouse sperm surface galactosyltransferase after the acrosome reaction. J. Cell Biol. 1987; *105:* 1663-1670.

Lu,Q.X. and Shur,B.D. Sperm from β 1,4-galactosyltransferase-null mice are refractory to ZP3-induced acrosome reactions and penetrate the zona pellucida poorly. Development1997;*124:*4121-4131.

Lv,Z.M., Wang,M., and Xu,C. Antifertility characteristics of the N-terminal region of mouse equatorial segment protein. Anat. Rec. (Hoboken.)2010;293:171-181.

M.P.Hedger and D.B.Hales (2006). Immunophysiology of the Male Reproductive Tract. In Physiology of Reproduction, Knobil and Neill's, eds. Academic Press is an imprint of Elsevier), pp. 1195-1286.

Maecker, H.T. and Levy, S. Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. J. Exp. Med.1997; *185*:1505-1510.

Maeda, T., Nishida, J., and Nakanishi, Y. Expression pattern, subcellular localization and structure-function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. Dev. Growth Differ.1999;41:715-722.

Maeda, T., Sakashita, M., Ohba, Y., and Nakanishi, Y. Molecular cloning of the rat Tpx-1 responsible for the interaction between spermatogenic and Sertoli cells. Biochem. Biophys. Res. Commun.1998;*248*:140-146.

Magdaleno,L., Gasset,M., Varea,J., Schambony,A.M., Urbanke,C., Raida,M., Topfer-Petersen,E., and Calvete,J.J. Biochemical and conformational characterisation of HSP-3, a stallion seminal plasma protein of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. FEBS Lett.1997;*420*:179-185.

Maldera, J.A., Vasen, G., Ernesto, J.I., Weigel-Munoz, M., Cohen, D.J., and Cuasnicu, P.S. Evidence for the Involvement of Zinc in the Association of CRISP1 with Sperm During Epididymal Maturation in Rats. Biol. Reprod.2011.

Manaskova-Postlerova, P., Davidova, N., Sulc, M., Philimonenko, A., Hozak, P., and Jonakova, V. Reproductive tissue expression and sperm localization of porcine betamicroseminoprotein. Cell Tissue Res. 2011;*344*:341-353.

Martineau, P., Leclerc, C., and Hofnung, M. Modulating the immunological properties of a linear B-cell epitope by insertion into permissive sites of the MalE protein. Mol. Immunol.1996;*33*:1345-1358.

Mashiach, R., Tadir, Y., Fisch, B., Ovadia, J., Eltes, F., and Bartoov, B. The relationship between sperm ultrastructural features and fertilizing capacity in vitro. Fertil. Steril. 1992;*57*:1052-1057.

Matsudaira, P. Limited N-terminal sequence analysis. Methods Enzymol. 1990; *182:*602-613.

Miki,K., Willis,W.D., Brown,P.R., Goulding,E.H., Fulcher,K.D., and Eddy,E.M. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. Dev. Biol.2002;*248*:331-342.

Miller, D.J., Shi, X., and Burkin, H. Molecular basis of mammalian gamete binding. Recent Prog. Horm. Res. 2002; *57*:37-73.

Milne, T.J., Abbenante, G., Tyndall, J.D., Halliday, J., and Lewis, R.J. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. J. Biol. Chem. 2003;*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. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. Science2000;*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. The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2008;*105*:12921-12926.

Mizuki,N. and Kasahara,M. Mouse submandibular glands express an androgenregulated transcript encoding an acidic epididymal glycoprotein-like molecule. Mol. Cell. Endocrinol.1992;*89:*25-32.

Mizuki,N., Sarapata,D., García-Sanz,J.A., and Kasahara,M. The mouse male germ cell-specific gene Tpx-1: Molecular structure, mode of expression in spermatogenesis,

and sequence similarity to two non-mammalian genes. Mamm. Genome1992;3:274-280.

Montagutelli,X. Effect of the genetic background on the phenotype of mouse mutations. J. Am. Soc. Nephrol.2000;*11 Suppl 16:*S101-S105.

Moos, J., Peknicova, J., and Tesarik, J. Relationship between molecular conversions of acrosin and the progression of exocytosis in the calcium ionophore-induced acrosome reaction. Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res. 1993;*1176*:199-207.

Morrissette, J., Kratzschmar, J., Haendler, B., El-Hayek, R., Mochca-Morales, J., Martin, B.M., Jitandrakumar, R.P., Moss, R.L., Schleuning, W.D., Coronado, R., and Possani, L.D. Primary structure and properties of helothermine, a peptide that blocks ryanodine receptors. Biophys. J.1995;*68:*2280-2288.

Muller, U. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. Mech. Dev.1999;82:3-21.

Murer, V., Spetz, J.F., Hengst, U., Altrogge, L.M., de Agostini, A., and Monard, D. Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2001;*98*:3029-3033.

Myles, D.G. and Primakoff, P. Why did the sperm cross the cumulus? To get to the oocyte. Functions of the sperm surface proteins PH-20 and fertilin in arriving at, and fusing with, the egg. Biol. Reprod.1997;*56*:320-327.

Navarro, B., Miki, K., and Clapham, D.E. ATP-activated P2X2 current in mouse spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2011;108:14342-14347.

Nayernia,K., Adham,I.M., Burkhardt-Gottges,E., Neesen,J., Rieche,M., Wolf,S., Sancken,U., Kleene,K., and Engel,W. Asthenozoospermia in mice with targeted deletion of the sperm mitochondrion-associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. Mol. Cell Biol.2002;*22*:3046-3052.

Naz,R.K. and Bhargava,K.K. Antibodies to sperm surface fertilization antigen (FA-1): their specificities and site of interaction with sperm in the male genital tract. Mol. Reprod. Dev.1990;*26*:175-183.

Nishimura,H., Cho,C., Branciforte,D.R., Myles,D.G., and Primakoff,P. Analysis of Loss of Adhesive Function in Sperm Lacking Cyritestin or Fertilin beta. Dev. Biol.2001;*233:*204-213.

Nishimura,H., Kim,E., Nakanishi,T., and Baba,T. Possible function of the ADAM1a/ADAM2 Fertilin complex in the appearance of ADAM3 on the sperm surface. J. Biol. Chem.2004;*279*.34957-34962.

Nixon,B., Asquith,K.L., and John,A.R. The role of molecular chaperones in mouse sperm-egg interactions. Mol. Cell Endocrinol.2005;240:1-10.

Nolan,M.A., Wu,L., Bang,H.J., Jelinsky,S.A., Roberts,K.P., Turner,T.T., Kopf,G.S., and Johnston,D.S. Identification of rat cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) as the ortholog to human CRISP1 and mouse Crisp4. Biol. Reprod.2006;74:984-991.

O'Bryan,M.K., Loveland,K.L., Herszfeld,D., McFarlane,J.R., Hearn,M.T., and De Kretser,D.M. Identification of a rat testis-specific gene encoding a potential rat outer dense fibre protein. Mol. Reprod. Dev.1998;*50*:313-322.

O'Bryan,M.K., Sebire,K., Meinhardt,A., Edgar,K., Keah,H., Hearn,M.T., and De Kretser,D.M. Tpx-1 is a component of the outer dense fibers and acosome of rat spermatozoa. Mol. Reprod. Dev.2001a;*58*:116-125.

O'Bryan,M.K., Sebire,K., Meinhardt,A., Edgar,K., Keah,H.H., Hearn,M.T., and De Kretser,D.M. Tpx-1 is a component of the outer dense fibers and acrosome of rat spermatozoa. Mol. Reprod. Dev.2001b;*58*:116-125.

O'Rand,M.G. and Fisher,S.J. Localization of zona pellucida binding sites on rabbit spermatozoa and induction of the acrosome reaction by solubilized zona. Dev. Biol.1987;*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.

Oliphant,G. Removal of sperm-bound seminal plasma components as a prerequisite to induction of acrosome reaction. Fertil. Steril.1976;*9:*404-414.

Oliphant,G. and Brackett,B.G. Capacitation of mouse spermatozoa in media with elevated ionic strengh and reversible capacitation with epididymal extracts. Fertil. Steril.1973;24:948-955.

Oliphant, G., Randall, P., and Cabot, C.L. Immunological components of rabbit fallopian tube fluid. Biol. Reprod. 1977; *16*:463-469.

Oliphant, G., Reynolds, A.B., and Thomas, T.S. Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. Am. J. Anat. 1985; *174*:269-283.

Oliveira, R.G., Tomasi, L., Rovasio, R.A., and Giojalas, L.C. Increased velocity and induction of chemotactic response in mouse spermatozoa by follicular and oviductal fluids. J. Reprod. Fertil. 1999; *115*:23-27.

Olson, J.H., Xiang, X., Ziegert, T., Kittelson, A., Rawls, A., Bieber, A.L., and Chandler, D.E. Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2001;*98*:11205-11210.

Osheroff, J.E., Visconti, P.E., Valenzuela, J.P., Travis, A.J., Alvarez, J., and Kopf, G.S. 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. 1999; *5*:1017-1026.

Pandya, I.J. and Cohen, J. The leukocytic reaction of the human uterine cervix to spermatozoa. Fertil. Steril. 1985; 43: 417-421.

Parinaud, J., Labal, B., and Vieitez, G. High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. Fertil. Steril. 1992;*58*:599-602.

Pathak, B.R., Breed, A.A., Nakhawa, V.H., Jagtap, D.D., and Mahale, S.D. Growth inhibition mediated by PSP94 or CRISP-3 is prostate cancer cell line specific. Asian J. Androl 2010; *12*:677-689.

Patterson,S.D., Hess,D., Yungwirth,T., and Aebersold,R. High-Yield recovery of electroblotted proteins and cleavege fragments from a cationic polyvinylidene fluoride-based membrane. Anal. Bioch.1992;*202*:193-203.

Peitz,B. and Olds-Clarke,P. Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse. Biol. Reprod.1986;*35*:608-617.

Perez Martinez, S., Conesa, D., and Cuasnicú, P.S. 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.1995;29:31-45.

Pfisterer, P., Konig, H., Hess, J., Lipowsky, G., Haendler, B., Schleuning, W.D., and Wirth, T. CRISP-3, a protein with homology to plant defense proteins, is expressed in mouse B cells under the control of Oct2. Mol. Cell Biol. 1996; *16*:6160-6168.

Porola, P., Virkki, L., Przybyla, B.D., Laine, M., Patterson, T.A., Pihakari, A., and Konttinen, Y.T. Androgen deficiency and defective intracrine processing of dehydroepiandrosterone in salivary glands in Sjogren's syndrome. J. Rheumatol. 2008; *35*:2229-2235.

Primakoff, P., Hyatt, H., and Myles, D.G. A role for the migrating sperm surface antigen PH-20 in guinea pig sperm binding to the egg zona pellucida. J. Cell Biol.1985;101:2239-2244.

Rankin,T., Familari,M., Lee,E., Ginsberg,A., Dwyer,N., Blanchette-Mackie,J., Drago,J., Westphal,H., and Dean,J. Mice homozygous for an insertional mutation in the *Zp3* gene lack a zona pellucida and are infertile. Development1996;*122:*2903-2910.

Rankin, T., Talbot, P., Lee, E., and Dean, J. Abnormal zonae pellucidae in mice lacking ZP1 result in early embryonic loss. Development1999; *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. Fertility and taxon-specific sperm binding persist after replacement of mouse sperm receptors with human homologs. Dev. Cell 2003; *5*:33-43.

Rankin,T.L., O'Brien,M., Lee,E., Wigglesworth,K., Eppig,J., and Dean,J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. Development2001;*128*:1119-1126.

Rankin, T.L., Tong, Z.B., Castle, P.E., Lee, E., Gore-Langton, R., Nelson, L.M., and Dean, J. Human ZP3 restores fertility in Zp3 null mice without affecting order-specific sperm binding. Development 1998; *125*:2415-2424.

Reddy,T., Gibbs,G.M., Merriner,D.J., Kerr,J.B., and O'Bryan,M.K. Cysteine-rich secretory proteins are not exclusively expressed in the male reproductive tract. Dev. Dyn.2008;*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. Dynamin regulates specific membrane fusion events necessary for acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. J. Biol. Chem.2012;*287*:37659-37672.

Reid,A.T., Redgrove,K., Aitken,R.J., and Nixon,B. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. Asian J. Androl2011;*13*:88-96.

Reiss,K. and Saftig,P. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. Semin. Cell Dev. Biol.2009;20:126-137.

Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., and Clapham, D.E. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. Nature 2001;*413:*603-609.

Rennemeier, C., Schwab, M., Lermann, U., Albert, C., Kammerer, U., Frambach, T., Morschhauser, J., Dietl, J., and Staib, P. Seminal plasma protects human spermatozoa and pathogenic yeasts from capture by dendritic cells. Hum. Reprod.2011;*26*:987-999.

Richardson, R.T. and O'Rand, M.G. Site-directed mutagenesis of rabbit proacrosin -Identification of residues involved in zona pellucida binding. J. Biol. Chem.1996;271:24069-24074.

Rivkin, E., Kierszenbaum, A.L., Gil, M., and Tres, L.L. Rnf19a, a ubiquitin protein ligase, and Psmc3, a component of the 26S proteasome, tether to the acrosome membranes and the head-tail coupling apparatus during rat spermatid development. Dev. Dyn.2009;*238*:1851-1861.

Roberts,K.P., Ensrud,K.M., Wooters,J.L., Nolan,M.A., Johnston,D.S., and Hamilton,D.W. Epididymal secreted protein Crisp-1 and sperm function. Mol. Cell Endocrinol.2006;250:122-127.

Roberts,K.P., Ensrud-Bowlin,K.M., Piehl,L.B., Parent,K.R., Bernhardt,M.L., and Hamilton,D.W. Association of the protein D and protein E forms of rat CRISP1 with epididymal sperm. Biol. Reprod.2008;*79:*1046-1053.

Roberts, K.P., Wamstad, J.A., Ensrud, K.M., and Hamilton, D.W. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. Biol. Reprod.2003a;*69:*572-581.

Roberts,K.P., Wamstad,J.A., Ensrud,K.M., and Hamilton,D.W. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein crisp-1. Biol. Reprod.2003b;69:572-581.

Roblero,L.S., Guadarrama,A., Ortiz,M.E., Fernandez,E., and Zegers-Hochschild,F. High potassium concentration and the cumulus corona oocyte complex stimulate the fertilizing capacity of human spermatozoa. Fertil. Steril.1990;*54*:328-332.

Rochwerger, L., Cohen, D.J., and Cuasnicú, P.S. Mammalian sperm-egg fusion: The rat egg has complementary sites for a sperm protein that mediates gamete fusion. Dev. Biol. 1992; *153*:83-90.

Rochwerger, L. and Cuasnicu, P.S. Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vivo and in vitro capacitation. Mol. Reprod. Dev.1992;*31*:34-41.

Roldan, E.R.S., Murase, T., and Shi, Q.X. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. Science. 1994; *266*: 1578-1581.

Rozeboom,K.J., Troedsson,M.H., and Crabo,B.G. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. J. Reprod. Fertil. 1998; *114*:195-199.

Rozmahel, R., Wilschanski, M., Matin, A., Plyte, S., Oliver, M., Auerbach, W., Moore, A., Forstner, J., Durie, P., Nadeau, J., Bear, C., and Tsui, L.C. Modulation of disease severity in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficient mice by a secondary genetic factor. Nat. Genet. 1996; *12*:280-287.

Rubinstein, E., Ziyyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J.P., Levy, S., Le Naour, F., and Boucheix, C. Reduced fertility of female mice lacking CD81. Dev. Biol. 2006; *290*. 351-358.

Saling, P.M. and Storey, B.T. Mouse gamete interactions during fertilization *in vitro*. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. J. Cell Biol.1979;*83*:544-555.

Schambony, A., Gentzel, M., Wolfes, H., Raida, M., Neumann, U., and Topfer-Petersen, E. Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. Biochim. Biophys. Acta1998; *1387*:206-216.

Schambony, A., Hefele, J.A., Gentzel, M., Wilm, M., and Wedlich, D. A homologue of cysteine-rich secretory proteins induces premature degradation of vitelline envelopes and hatching of Xenopus laevis embryos. Mech. Dev.2003;*120*:937-948.

Schroer,S.C., Yudin,A.I., Myles,D.G., and Overstreet,J.W. Acrosomal status and motility of guinea pig spermatozoa during in vitro penetration of the cumulus oophorus. Zygote.2000;*8*:107-117.

Schwidetzky, U., Haendler, B., and Schleuning, W.D. Isolation and characterization of the androgen-dependent mouse cysteine- rich secretory protein-3 (CRISP-3) gene. Biochem. J.1995;*309*:831-836.

Shalgi,R. and Phillips,D.M. Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. J. Ultrastruct. Res.1980;71:154-161.

Shamsadin, R., Adham, I.M., Nayernia, K., Heinlein, U.A., Oberwinkler, H., and Engel, W. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. Biol. Reprod. 1999;*61*:1445-1451.

Shikamoto,Y., Suto,K., Yamazaki,Y., Morita,T., and Mizuno,H. Crystal structure of a CRISP family Ca2+ -channel blocker derived from snake venom. J. Mol. Biol.2005;*350*:735-743.

Shur,B.D. and Hall,N.G. A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding to the egg zona pellucida. J. Cell Biol.1982;*95:*574-579.

Simons, K. and Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2000; 1:31-39.

Skalhegg,B.S., Huang,Y., Su,T., Idzerda,R.L., McKnight,G.S., and Burton,K.A. Mutation of the Calpha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. Mol. Endocrinol.2002;*16:*630-639.

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. Cloning and expression of a novel cysteine-rich secreted protein family member expressed in thyroid and pancreatic mesoderm within the chicken embryo. Mech. Dev.2001;102:223-226.

Sosnik, J., Miranda, P.V., Spiridonov, N.A., Yoon, S.Y., Fissore, R.A., Johnson, G.R., and Visconti, P.E. Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. J. Cell Sci.2009;*122*:2741-2749.

Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J.A., Wetzel, C.H., Zimmer, R.K., and Hatt, H. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. Science2003;299:2054-2058.

Stein,K.K., Go,J.C., Primakoff,P., and Myles,D.G. Defects in secretory pathway trafficking during sperm development in Adam2 knockout mice. Biol. Reprod.2005;73:1032-1038.

Stein,K.K., Primakoff,P., and Myles,D. Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. J. Cell Sci.2004;*117*:6269-6274.

Suarez, S.S. Hyperactivated motility in sperm. J. Androl. 1996; 17:331-335.

Suarez,S.S., Katz,D.F., Owen,D.H., Andrew,J.B., and Powell,R. Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. Biol. Reprod.1991;44:375-381.

Sullivan, R., Frenette, G., and Girouard, J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. Asian J Androl2007;*9:*483-491.

Susan S.Suarez (2006). Gamete and Zygote Transport. In Physiology of Reproduction, Knobil and Neill• fs, ed. Academic Press), pp. 113-145.

Sutton,K.A., Jungnickel,M.K., and Florman,H.M. A polycystin-1 controls postcopulatory reproductive selection in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2008;*105:*8661-8666.

Suzuki,N., Yamazaki,Y., Brown,R.L., Fujimoto,Z., Morita,T., and Mizuno,H. Structures of pseudechetoxin 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.2008;*64:*1034-1042.

Suzuki,N., Yamazaki,Y., Fujimoto,Z., Morita,T., and Mizuno,H. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analyses of pseudechetoxin and pseudecin, two snake-venom cysteine-rich secretory proteins that target cyclic nucleotide-gated ion channels. Acta Crystallograph. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.2005;*61*:750-752.

Tachibana, I. and Hemler, M.E. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. J. Cell Biol. 1999; *146*:893-904.

Takano, H., Yanagimachi, R., and Urch, U.A. Evidence that acrosin activity is important for the development of fusibility of mammalian spermatozoa with the oolemma: inhibitor studies using the golden hamster. Zygote1993; *1*:79-91.

Talbot, P. Sperm penetration through oocyte investments. Am. J. Anat. 1985; *174*:331-346.

Talbot, P. and Dandekar, P. Perivitelline space: does it play a role in blocking polyspermy in mammals? Microsc. Res. Tech.2003;*61*:349-357.

Tamba,S., Yodoi,R., Segi-Nishida,E., Ichikawa,A., Narumiya,S., and Sugimoto,Y. Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2008;*105*:14539-14544.

Tanaka,K., Fujimura-Kamada,K., and Yamamoto,T. Functions of phospholipid flippases. J. Biochem.2011;*149*:131-143.

Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., and de Kruif, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. Mol. Reprod. Dev.2002;*61*:414-424.

Tapinos,N.I., Polihronis,M., Thyphronitis,G., and Moutsopoulos,H.M. Characterization of the cysteine-rich secretory protein 3 gene as an early-transcribed gene with a putative role in the pathophysiology of Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum.2002;*46*:215-222.

Tardif,S., Wilson,M.D., Wagner,R., Hunt,P., Gertsenstein,M., Nagy,A., Lobe,C., Koop,B.F., and Hardy,D.M. Zonadhesin is essential for species specificity of sperm adhesion to the egg zona pellucida. J. Biol. Chem.2010;*285*:24863-24870.

Teves, M.E., Barbano, F., Guidobaldi, H.A., Sanchez, R., Miska, W., and Giojalas, L.C. Progesterone at the picomolar range is a chemoattractant for mammalian spermatozoa. Fertil. Steril. 2006;*86:*745-749.

Tollner, T.L., Yudin, A.I., Treece, C.A., Overstreet, J.W., and Cherr, G.N. Macaque sperm release ESP13.2 and PSP94 during capacitation: the absence of ESP13.2 is linked to sperm-zona recognition and binding. Mol. Reprod. Dev.2004;*69*:325-337.

Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamyde gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA1979;76:4350-4360.

Travis, A.J. and Kopf, G.S. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. J Clin. Invest2002;*110*:731-736.

Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol.2003; *3*:133-146.

Turunen,H.T., Sipila,P., Krutskikh,A., Toivanen,J., Mankonen,H., Hamalainen,V., Bjorkgren,I., Huhtaniemi,I., and Poutanen,M. Loss of cysteine-rich secretory protein 4 (Crisp4) leads to deficiency in sperm-zona pellucida interaction in mice. Biol. Reprod.2012;*86:*1-8.

Udby,L., Bjartell,A., Malm,J., Egesten,A., Lundwall,A., Cowland,J.B., Borregaard,N., and Kjeldsen,L. Characterization and localization of cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP-3) in the human male reproductive tract. J. Androl2005a;*26*:333-342.

Udby,L., Cowland,J.B., Johnsen,A.H., Sorensen,O.E., Borregaard,N., and Kjeldsen,L. An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. J. Immunol. Methods2002;*263:*43-55.

Udby,L., Lundwall,K., Johnsen,A.H., Fernlund,P., Valtonen-Andre,C., Blom,A.M., Lilja,H., Borregaard,N., Kjeldsen,L., and Bjartell,A. beta-Microseminoprotein binds CRISP-3 in human seminal plasma. Biochem. Biophys. Res. Commun.2005b.

Udby,L., Sorensen,O.E., Pass,J., Johnsen,A.H., Behrendt,N., Borregaard,N., and Kjeldsen,L. Cysteine-rich secretory protein 3 is a ligand of alpha1B-glycoprotein in human plasma. Biochemistry2004;*43*:12877-12886.
Uto,N., Yoshimatsu,N., Lopata,A., and Yanagimachi,R. Zona-induced acrosome reaction of hamster spermatozoa. J. Exp. Zool.1988;*248*:113-120.

Van Eynde, A., Litovkin, K., and Bollen, M. Growth inhibition properties of the putative prostate cancer biomarkers PSP94 and CRISP-3. Asian J. Androl2011;*13*:205-206.

van Gestel,R.A., Brewis,I.A., Ashton,P.R., Helms,J.B., Brouwers,J.F., and Gadella,B.M. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. Mol. Hum. Reprod.2005;*11:*583-590.

Visconti, P.E. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2009; *106*:667-668.

Visconti, P.E., Bailey, J.L., Moore, G.D., Pan, D., Olds-Clarke, P., and Kopf, G.S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. Development1995; *121*:1129-1137.

Visconti,P.E., Stewart-Savage,J., Blasco,A., Battaglia,L., Miranda,P., Kopf,G.S., and Tezon,J.G. Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm. Biol. Reprod.1999;*61*:76-84.

Wang,D.G., Huang,T.H., Xie,Q.D., and An,G. Investigation of recombinant mouse sperm protein izumo as a potential immunocontraceptive antigen. Am. J. Reprod. Immunol.2008;*59*:225-234.

Wang,H.X., Kolesnikova,T.V., Denison,C., Gygi,S.P., and Hemler,M.E. The C-terminal tail of tetraspanin protein CD9 contributes to its function and molecular organization. J. Cell Sci.2011;124:2702-2710.

Wassarman, P.M. Zona pellucida glycoproteins. Annu. Rev. Biochem. 1988; 57: 415-442.

Wassarman, P.M., Bleil, J.D., Florman, H.M., Greve, J.M., Roller, R.J., Salzmann, G.S., and Samuels, F.G. The mouse egg's receptor for sperm: what is it and how does it work? Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1985; *50*:11-19.

Wassarman, P.M., Jovine, L., Qi, H., Williams, Z., Darie, C., and Litscher, E.S. Recent aspects of mammalian fertilization research. Mol. Cell Endocrinol. 2005; *234*:95-103.

Wassarman, P.M. and Litscher, E.S. Towards the molecular basis of sperm and egg interaction during mammalian fertilization. Cells Tissues. Organs2001;*168*:36-45.

Weininger, R.B., Fisher, S., Rifkin, J., and Bedford, J.M. Experimental studies on the passage of specific IgG to the lumen of the rabbit epididymis. J. Reprod. Fertil. 1982;66:251-258.

Weinstein,Y. and Berkovich,Z. Testosterone effect on bone marrow, thymus, and suppressor T cells in the (NZB X NZW)F1 mice: its relevance to autoimmunity. J. Immunol.1981;*126*.998-1002.

Wen,Y., Richardson,R.T., and O'Rand,M.G. Processing of the sperm protein Sp17 during the acrosome reaction and characterization as a calmodulin binding protein. Dev. Biol.1999;*206:*113-122.

Wheeler,K., Tardif,S., Rival,C., Luu,B., Bui,E., Del Rio,R., Teuscher,C., Sparwasser,T., Hardy,D., and Tung,K.S. Regulatory T cells control tolerogenic versus autoimmune response to sperm in vasectomy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A2011;*108*:7511-7516.

WHO (1999). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction., World Health Organization, ed. (Cambridge: Cambridge University Press).

Xie,F., Garcia,M.A., Carlson,A.E., Schuh,S.M., Babcock,D.F., Jaiswal,B.S., Gossen,J.A., Esposito,G., Van Duin,M., and Conti,M. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. Dev. Biol.2006;*296*:353-362.

Yamazaki, Y. and Morita, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. Toxicon2004;44:227-231.

Yanagimachi, R. In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. J. Reprod. Fertil. 1969; *18*:275-286.

Yanagimachi, R. (1988a). Mammalian Fertilization. In The Physiology of Reproduction., E.Knobil and J.Neill, eds. (New York: Raven Press), pp. 135-185.

Yanagimachi, R. (1988b). Sperm-egg fusion. In Current topics in membranes and transport., N.Duzgunes and F.Bronner, eds. (Orlando, FL: Academic Press), pp. 3-43.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian Fertilization. In The Physiology of Reproduction., E.Knobil and J.D.Neill, eds. (New York: Raven Press), pp. 189-317.

Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Mikamo, K., Suzuki, F., and Yanagimachi, H. Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. Am. J Anat. 1985; *172*:317-330.

Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., and Rogers, B.J. The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol. Reprod. 1976; *15:*471-476.

Ye,H., Yu,T., Temam,S., Ziober,B.L., Wang,J., Schwartz,J.L., Mao,L., Wong,D.T., and Zhou,X. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. BMC. Genomics2008;*9*:69.

Yoshida, M. and Yoshida, K. Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca2+. Mol. Hum. Reprod.2011;17:457-465.

Yudin,A.I., Cherr,G.N., and Katz,D.F. 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.1988;*251*:555-564.

Yudin,A.I., Vandevoort,C.A., Li,M.W., and Overstreet,J.W. PH-20 but not acrosin is involved in sperm penetration of the macaque zona pellucida. Mol. Reprod. Dev.1999;*53*:350-362.

Zhang, H. and Martin-Deleon, P.A. Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor. J Androl 2003;24:51-58.

Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P.J., Yang, X., and Godke, R.A. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. Mol. Reprod. Dev. 1995;40:338-344.

Zhou, C., Kang, W., and Baba, T. Functional characterization of double-knockout mouse sperm lacking SPAM1 and ACR or SPAM1 and PRSS21 in fertilization. J. Reprod. Dev.2012;*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. Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. Development2002; *129:*1995-2002.

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