

Tesis Doctoral

Participación del citoesqueleto de actina y el calcio intracelular en el control de la exocitosis acrosomal espermática

Romarowski, Ana

2017

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:

Romarowski, Ana. (2017). Participación del citoesqueleto de actina y el calcio intracelular en el control de la exocitosis acrosomal espermática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6238_Romarowski

Cita tipo Chicago:

Romarowski, Ana. "Participación del citoesqueleto de actina y el calcio intracelular en el control de la exocitosis acrosomal espermática". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6238_Romarowski

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Participación del citoesqueleto de actina y el
calcio intracelular en el control de la exocitosis
acrosomal espermática**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Ana Romarowski

Director de tesis: Dr. Mariano G. Buffone
Consejero de estudios: Dra. Fabiana L. Lo Nostro

Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Reproducción
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Fecha de defensa: 16 de Marzo 2017, Buenos Aires

PARTICIPACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA Y EL CALCIO INTRACELULAR EN EL CONTROL DE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL ESPERMÁTICA

Los espermatozoides de mamífero adquieren su capacidad fecundante después de una serie de modificaciones bioquímicas en el tracto reproductor femenino, colectivamente llamadas capacitación. Estos cambios son esenciales para que los espermatozoides puedan realizar la exocitosis acrosomal (EA), un proceso que es fundamental para la fecundación. En este trabajo se estudiaron los cambios en el citoesqueleto de actina en la preparación para la ocurrencia de la EA así como también, los cambios en los niveles de calcio intracelular como evento fundamental para las etapas finales de la fusión de membranas.

La dinámica del citoesqueleto de actina juega un rol central en controlar el proceso de exocitosis en células somáticas así como en los espermatozoides de varias especies de mamíferos. A pesar de que en células somáticas, las pequeñas GTPasas de la familia Rho son ampliamente conocidas como reguladores principales de la dinámica de la actina, su función en espermatozoides es desconocida. En el presente trabajo se caracterizó la participación de las pequeñas GTPasas de la familia Rho en la vía de señalización que conduce a la polimerización de actina durante la capacitación del espermatozoide de ratón. Se observó que la mayoría de las proteínas de esta cascada de señalización y sus proteínas efectoras se expresan en el espermatozoide de ratón. La activación de las vías de señalización de AMPc/PKA, RhoA/C y Rac1 es esencial para la activación por fosforilación de LIMK1 en Treonina 508. Cofilin es fosforilada en Serina 3 por LIMK1 durante la capacitación de manera transitoria. La inhibición de LIMK1 por un inhibidor específico (BMS-3) resultó en menores niveles de polimerización de actina durante la capacitación y una marcada disminución en el porcentaje de espermatozoides que realizan EA.

Asimismo se sabe que es necesario un aumento en el Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) para que la EA se produzca. La progesterona producida por las células del cúmulus ha sido asociada con diversos procesos fisiológicos en los espermatozoides, incluyendo la estimulación de la EA. En este trabajo, investigamos la correlación espacio-temporal entre los cambios en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la EA en espermatozoides individuales de

ratón en respuesta a la progesterona. Se encontró que la progesterona estimula un incremento en el $[Ca^{2+}]_i$ en cinco patrones diferentes: gradual, oscilatorio, transitorio tardío, transitorio inmediato, y sostenido. También se observó que el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ promovido por la progesterona puede comenzar tanto en el flagelo como en la cabeza del espermatozoide. Se validó la utilización de FM4-64 como un indicador de la ocurrencia de la EA mediante la detección simultánea del aumento de su fluorescencia y la pérdida del EGFP en espermatozoides transgénicos EGFP_{Acr}. Por primera vez, se logró visualizar simultáneamente el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ y el proceso de exocitosis en respuesta a la progesterona, observándose que sólo un aumento transitorio específico en el $[Ca^{2+}]_i$ originado en la cabeza del espermatozoide promueve la iniciación de la EA.

En conclusión, en esta tesis se logró evidenciar la importancia de las pequeñas GTPasas de la familia Rho y sus efectores principales LIMK1 y Cofilin en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina en la preparación del espermatozoide para poder realizar la EA. A su vez, se identificó el tipo de aumento de $[Ca^{2+}]_i$ específico que es necesario para iniciar los eventos finales de la EA estimulada por progesterona.

Palabras clave:

Espermatozoide

Pequeñas GTPasas

LIMK1

Cofilin

Citoesqueleto de actina

Exocitosis acrosomal

Calcio

Progesterona

INVOLVEMENT OF ACTIN CYTOSKELETON AND INTRACELLULAR CALCIUM IN THE CONTROL OF SPERM ACROSOMAL EXOCYTOSIS

Mammalian sperm must acquire their fertilizing ability after a series of biochemical modifications in the female reproductive tract collectively called capacitation to undergo acrosomal exocytosis (AE), a process that is essential for fertilization. In this work, the changes in the actin cytoskeleton in preparation for the occurrence of the AE as well as the changes in intracellular calcium levels as a crucial event to the final stages of membrane fusion, were studied.

Actin dynamics play a central role in controlling the process of exocytosis in somatic cells as well as in sperm from several mammalian species. In somatic cells, small GTPases of the Rho family are widely known as master regulators of actin dynamics. However, the role of these proteins in sperm has not been studied in detail. In the present work the role of the small GTPases of the Rho family in the signaling pathway that leads to actin polymerization during mouse sperm capacitation was studied. It was observed that most of the proteins of this signaling cascade and their downstream effector proteins are expressed in mouse sperm. The activation of the cAMP/PKA, RhoA/C and Rac1 signaling pathways are essential for LIMK1 activation by phosphorylation on Threonine 508. Serine 3 of Cofilin is phosphorylated by LIMK1 during capacitation in a transiently manner. Inhibition of LIMK1 by specific inhibitors (BMS-3) resulted in lower levels of actin polymerization during capacitation and a dramatic decrease in the percentage of sperm that undergo acrosomal exocytosis.

In addition, it is well known that an increase in intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is necessary for AE to occur. Progesterone produced by cumulus cells has been associated with various physiological processes in sperm, including stimulation of AE. In this study, the spatio-temporal correlation between the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and AE in single mouse spermatozoa in response to progesterone was investigated. Progesterone stimulated an $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in five different patterns: gradual, oscillatory, late transitory, immediate transitory and sustained. It was also observed that the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase promoted by progesterone started at either the flagellum or the head. The use of FM4-64 as an indicator for the occurrence of the AE was validated by simultaneously detecting its fluorescence increase and the loss of EGFP

in transgenic EGFP^{Acr} sperm. For the first time, it was simultaneously visualized the rise in $[Ca^{2+}]_i$ at the onset of AE in response to progesterone. Only a specific transitory increase in $[Ca^{2+}]_i$ originated in the sperm head promoted the initiation of AE.

In conclusion, in this thesis it was demonstrated the importance of the small GTPases of the Rho family and its main effector proteins LIMK1 and Cofilin in the regulation of the actin cytoskeleton in preparation for AE. Moreover, it was identified the type of $[Ca^{2+}]_i$ increase necessary to trigger the final events of AE induced by progesterone.

Key words:

Sperm

Small GTPases

LIMK1

Cofilin

Actin cytoskeleton

Acrosomal exocytosis

Calcium

Progesterone

AGRADECIMIENTOS

A **Mariano**, mi director de Tesis. Fui afortunada en la vida de haber tenido un director como vos. Por haber depositado tu confianza en mí, porque me compartiste tus ideas e hiciste que fueran más. Porque tuve tu apoyo cada vez que lo necesité, tanto a nivel científico como a nivel personal. Porque siento que hacemos un equipo del que no me quiero ir nunca (siempre seré del Team Buffone!), porque disfruto las reuniones juntos, porque aprendo mucho, porque me transmitís esas ganas de avanzar y de trabajar lo que más pueda, porque me siento cómoda para decir lo que pienso y porque me divierto, porque en tu laboratorio se la pasa muy bien. Te admiro y deseo que después de estos 5 años juntos ojalá yo haya podido adquirir al menos alguna de tus cualidades como investigador: tu creatividad, tus ganas y pilas constantes, tu capacidad de atrapar a la audiencia por transmitir con pasión tus ideas, tu capacidad de leer muchos papers por unidad de tiempo y estar siempre actualizado, tu perseverancia cuando las cosas no salen pero también tu capacidad de cambiar de rumbo a tiempo. Te agradezco también por todas las oportunidades que me diste a lo largo del doctorado, porque logramos que esta sea una experiencia hermosa y súper rica en mi vida en todo sentido.

Al Team Buffone. A **Flor**, mi compañera de la aventura de poner en marcha de cero un laboratorio y hacer que esa experiencia sea divertida y productiva a la vez. Tengo tantos recuerdos en mi cabeza (juro que podría llenar otra tesis sólo con nuestras anécdotas y vos lo sabés!), cómo nos reímos trabajando!!!!... Mariano nos tenía que decir: “Chicas no se dispersen...”. Extraño esos momentos juntas. Aprendí mucho de vos (sabés que en México y en el FIR se hizo famosa tu técnica de abrir los ratoncitos: es la técnica Flor) y te agradezco por haberme compartido tus conocimientos y enseñarme. Fuiste generosa conmigo en todo sentido, no sólo a nivel laboral sino también personal, siempre compartiendo tus amistades y haciendo que el otro se sienta cómodo. Sabés que me gustaría que estés acá, pero te tengo conmigo igual en mi corazón. A **Lis**, por estar siempre dispuesta a darme una mano sin esperar nada a cambio. Cada vez que me iba a México te quedabas conmigo hasta última hora ayudándome con todo. Por esas tantas noches trabajando juntas, en las cuales se nos hundían los barcos (y chau experimento)! Porque compartimos la autoexigencia y la frustración de cuando algo no sale, y está bueno poder compartir ese sentimiento y que el otro te entienda, te ayude a pensar y te apoye, gracias. A **Gui**, la nueva investigadora del Team. Desde el día que entraste al laboratorio fue una suerte tenerte. Siempre tirando para adelante y ayudándonos a todos en todo. Sos la mejor adquisición que el Team podría tener. Gracias a tu ayuda, apenas entraste logramos publicar mi primer paper, te pusiste mi paper al hombro conmigo y me

hiciste sentir que somos un gran equipo, lo cual para mí es un valor importantísimo. Tu orden y organización nos ayudó a todos. Esta Tesis no hubiera sido lo mismo sin vos, te hice revisármela a la velocidad de la luz y con la mejor de las ganas me ayudaste. Gracias.

A todo el **Team Buffone (Mariano, Flor, Lis y Gui)** por soportarme día a día, por apoyarme, ayudarme, aconsejarme y escuchar mis problemas, mis locuras y mis logros. Por acompañarnos en lo laboral y en lo personal y hacer que el trabajo sea muy disfrutable.

A todos los integrantes del **laboratorio del Dr. Darszon** en México. A **Alberto** por darme la oportunidad de tener una de las mejores experiencias de mi vida que fue ir a trabajar a su laboratorio. Porque aprendí muchísimo y me permitió desarrollar todos los resultados del Capítulo II de mi Tesis. Por su apoyo constante tanto a nivel laboral como personal. Por las palabras justas en el momento justo, tanto a nivel científico y académico como personal. Espero poder seguir teniendo la dicha de poder trabajar con alguien a quien admiro profundamente por su infinita sabiduría en el campo de la Reproducción. Por ponerme en el camino a **Claudia Sánchez**. Clau, gracias por enseñarme a trabajar en célula única y transmitirme tu sabiduría. En esos experimentos no solo formamos un gran equipo (que espero prontito volvamos a trabajar juntas) sino que además se forjó una amistad para mí muy valiosa. A **Claudia Treviño**, por preocuparte por mí siempre y ayudarme en todo lo que estuviera a tu alcance. A tu marido, **Fernando**, por los viajes ida y vuelta al DF, en los que yo lo pasaba súper y que permitieron que se hagan muchos de los experimentos de esta Tesis. A **José Luis**, por ayudarme en la preparación de los reactivos para los experimentos y en todo lo que necesité. A **Adán** y **Angelitus** por haber hecho que mis últimas estancias en México sean de mucho aprendizaje y muchos resultados. Ya quiero empezar a trabajar en eso!

A mis amigos del laboratorio de México. A **Yolito** y **Gaby** por cuidarme, mimarme, ayudarme, apoyarme, alimentarme... ya saben, les estoy eternamente agradecida por haber aparecido en mi vida y no voy a dejarlas ir nunca. Las extraño horrores. A **Pau**, que desde el primer día que llegué a México estuvo siempre dispuesta a ayudarme en todo, lo laboral y lo personal. Gracias amiga. A **Hippie** por hacerme reír diario y por hacerme comer las delicias de la señora alemana que tanto extraño. A **Adán, Yuri, Rodrigo, Alyeri** y **Angelito**, por hacer que el día a día de trabajo sea muy disfrutable.

A las fuentes que financiaron mi investigación doctoral **CONICET, ANPCyT** y **NIH**, y a las que financiaron mis estancias en México: **Plisser** (Programa Latinoamericano de Salud Sexual y Reproductiva), **AUIP** (Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado) y **Red de Macrouiversidades de América Latina y el Caribe**.

Al **Dr. Pablo Visconti**, por su valiosa participación en mi primer paper, por apoyarme en mi intención de hacer el curso FIR y por su apoyo constante a nuestro grupo.

Al **Dr. Darío Krapf**, por los intercambios de ideas entre su grupo y nuestro grupo que hacen que surjan las mejores ideas.

A mis amigas del IByME. Este doctorado me permitió hacerme de amigas de esas que se cuentan con los dedos de una mano, que valen oro y que me siento muy afortunada de tenerlas. **Maru, Meli, Lu y Agus**. Gracias por haber aparecido en mi vida y porque su amistad diaria hizo que esta experiencia de hacer una Tesis doctoral sea de las mejores de mi vida. En particular a Maru y a Meli que me ayudaron con la preparación de este manuscrito.

Al equipo de escritura de Tesis. **Johi y Eze**: ustedes más que nadie saben que sin esta familia que creamos yo no lo hubiera logrado. Les estoy agradecida por hacer que la escritura de la Tesis sea uno de los mejores momentos de mi vida, lo disfruté y me divertí como nunca imaginé que podía sucederme en esta etapa, en la que todos te dicen que es insufrible. Yo puedo decir que la pasé súper y es gracias a ustedes! Ya les dije que quiero vivir con ustedes, no?!

A todos los integrantes del **laboratorio de JC y Lucre**, a ellos en particular por estar siempre dispuestos a ayudar, y en especial a **Mari** por sus consejos en el momento justo y a **Cami** por su buen humor constante que alegra los días.

A todos los integrantes del **laboratorio de Paty**, por pasarme y explicarme protocolos y prestarme reactivos. A **Paty** en particular por haberme recomendado a Mariano como director de Tesis doctoral y a **Agus** por haber hecho tan buen equipo trabajando juntas y por mostrarme un camino lleno de oportunidades en nuestra área de investigación.

A los vecinitos de enfrente, los integrantes del **laboratorio de Norberto Zwirner**, por compartir días y noches en el pasillo, y por siempre dar una mano con lo que sea.

A todos los integrantes del laboratorio de **Mónica Vázquez**, por prestarme reactivos y compartir protocolos. En especial a **Majín** y a **Lu**, por la amistad que tenemos y a **Clari** por sus valiosos consejos.

A **Flavia, Claudia, Emanuel y Horacio** del área de Comunicación Institucional del IByME, por siempre tenerme en cuenta para participar de los eventos de divulgación científica, en los cuales disfruto y aprendo muchísimo. Y por ayudarme siempre con los trámites administrativos.

A todos los integrantes de los **Seminarios de Reproducción de los viernes**, que nos permiten estar actualizados en las publicaciones de nuestro campo. En especial a **Vani** por ocuparse de organizarlos y a todos por hacer que sea un momento interesante, divertido y gordo.

A todos los integrantes del FIR 2016, que hicieron de este curso una de las mejores experiencias de mi vida. En particular a mis amigos: **Meli, Pau, Albis, Jenni y Lee**.

A mis amigas del ex labo. **Vicky, Pao, Johi y Solci**, por estar en el mismo camino de la ciencia, por entenderme.

A mis amigas del alma que me soportan en mis ausencias y me apoyan siempre de forma incondicional: **Pau, Agus, Vick, Jen, Maguch, Caro, Dolo, Cyn, Danita, Jor y Lar**. Porque festejan conmigo mis logros científicos (hablan de papers y congresos como si fueran parte de su vida, cuando ninguna trabaja en la ciencia) y me sostienen en mis frustraciones porque entienden lo importante que es mi trabajo para mí.

A **Lucía** por hacerme bien y estar siempre. Fuiste fundamental para que yo pueda avanzar en esta experiencia de mi vida. Gracias.

A mi familia. A mis abuelos: a mi baba **Hela** y a mi zeide **Isaac** (de quién tomo mi frase inspiradora de la Tesis, que implica tener una actitud comprometida en la vida, que empuja a la acción y a no quedarse en la pura especulación, que no lleva a nada) y a mi bobe **Berta** que ya la extraño mucho, que me soportó en todas mis ausencias. A **Tovi**, mi mamá postiza, sin tu apoyo no hubiera podido cerrar esta etapa. A mis hermanos, **Benchu y Evi**, y a mi cuñado **Eze**, que son los mejores amigos que uno podría haber elegido y tuve la suerte de que me tocaron. A mi sobrinito **Danchu puncu**, que me alegra la vida y conformamos juntos el Equipo Postre. A **mi mamá y a mi papá**, que me han apoyado y ayudado en todo en mi vida, los admiro profundamente y les estoy infinitamente agradecida por acompañarme en todas mis decisiones.

“Vaya y haga!”

(...consejo de mi zeide Isaac a mi papá)

A mi mamá y a mi papá

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

a) En revistas internacionales.

1. Role of actin cytoskeleton during mammalian sperm acrosomal exocytosis. **Romarowski A**; Luque GM; LA Spina FA; Krapf D; Buffone MG. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2016. Volumen 220: p. 129-144.
2. A specific transitory increase in intracellular calcium induced by progesterone promotes acrosomal exocytosis in mouse sperm. **Ana Romarowski**, Claudia Sánchez-Cárdenas, Héctor V. Ramírez-Gómez, Lis del C. Puga Molina, Claudia L. Treviño, Arturo Hernández-Cruz, Alberto I. Darszon, Mariano G. Buffone. Biol Reprod. 2016. 94(3): 63. Tapa de la revista.
3. PKA-dependent phosphorylation of LIMK1 and Cofilin is essential for mouse sperm acrosomal exocytosis. **Ana Romarowski**; Maria A Battistone; Florenza A La Spina; Lis C Puga Molina; Guillermina M. Luque; Alejandra M Vitale; Patricia S Cuasnicu; Pablo E Visconti; Dario Krapf; Mariano G. Buffone. Dev Biol. 2015. 405(2): p. 237-249.

b) En revistas nacionales.

1. Eventos estructurales y mecanismos moleculares que promueven la exocitosis acrosomal y la motilidad en espermatozoides de mamífero. La Spina F, **Romarowski A**, Buffone MG. Revista de la Sociedad Argentina de Andrología. Vol: 20, Número 2, Diciembre de 2011.
2. Mecanismos moleculares relacionados con la exocitosis acrosomal en espermatozoides de mamífero. Buffone MG, **Romarowski A**, La Spina F. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2011; 45 (4): 599-719.



Esta tesis se realizó con el apoyo de CONICET, ANPCyT, NIH, Plisser, AUIP y Red de Macrouniversidades

Fe de erratas

- Página 5: La oración: “La pieza principal constituye los dos tercios del flagelo, con una longitud de 35-45 μm dependiendo de la especie de mamífero, y está definida por la presencia de una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas y al axonema.” debe ser reemplazada por: “La pieza principal constituye la porción de mayor longitud del flagelo y está definida por la presencia de una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas y al axonema.”

- Página 10: La oración del primer párrafo: “La entrada de HCO_3^- , a través del co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) y la de protones (H^+) a través del intercambiador Na^+/H^+ (NHE), localizados en la pieza principal del espermatozoide murino, serían los responsables del aumento en el pH intracelular.” debe ser reemplazada por: “La entrada de HCO_3^- , a través del co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) y la salida de protones (H^+) a través del intercambiador Na^+/H^+ (NHE), localizados en la pieza principal del espermatozoide murino, serían los responsables del aumento en el pH intracelular.”

- Página 10: La oración del segundo párrafo: “En el espermatozoide se expresan las dos clases generales de adenilato ciclasas: la transmembranal (ADCY1-9) y la soluble (SACY o ADCY10).” debe ser reemplazada por: “En el espermatozoide se expresan las dos clases generales de adenilato ciclasas: la anclada a membrana (ADCY1-9) y la soluble (SACY o ADCY10).”

- Página 13: En la oración del último párrafo donde dice: “...desplazamiento progresivo a través del moco cervical (un medio de alta viscosidad), desprenderse de las criptas oviductales, avanzar hacia la ampula y atravesar con mayor facilidad las capas externas del ovocito.” debe ser reemplazado por: : “...desplazamiento progresivo a través del moco cervical (un medio de alta viscosidad), desprenderse de las criptas oviductales, avanzar hacia el ámpula y atravesar con mayor facilidad las capas externas del ovocito.”

- Cuando se detalla la velocidad de centrifugación adelante del valor numérico debe agregarse un x. Por ejemplo en la página 43: En la sección Extracción de proteínas del espermatozoide donde dice: “Los espermatozoides fueron recolectados por centrifugación durante 5 min a 721 g. Posteriormente se realizó un lavado (5 min, 8014 g) en 1 ml de PBS y finalmente fueron resuspendidos en sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% v/v glicerol). Luego, se

incubaron 4 min a 100°C y fueron sometidos a una centrifugación de 5 min a 13544 g.” debe ser reemplazado por: “Los espermatozoides fueron recolectados por centrifugación durante 5 min a 721 x g. Posteriormente se realizó un lavado (5 min, 8014 x g) en 1 ml de PBS y finalmente fueron resuspendidos en sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% v/v glicerol). Luego, se incubaron 4 min a 100°C y fueron sometidos a una centrifugación de 5 min a 13544 x g.”

- Página 47: En la sección Análisis Estadístico de los Materiales y Métodos, donde dice: “Los análisis estadísticos fueron realizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey utilizando el programa GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA USA).” debe ser reemplazado por: “Los análisis estadísticos fueron realizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett en las Figuras 11 D y 18 A y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en la Figura 19 B. En la Figura 19 A se realizó un ANOVA de dos vías. En todos los casos se utilizó el programa GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA USA).”

- Página 55: En la leyenda de la Figura 15 donde dice: “Cada calle contenía 5 x 10⁶ de espermatozoides.” debe ser reemplazado por: “Cada calle contenía 5 x 10⁶ de espermatozoides.”

- Página 59: En la leyenda de la Figura 18 A donde dice: “Los datos representan la media ± ESM de tres experimentos; **** representa diferencias significativas en comparación con los 60 min, p<0,001.” debe ser reemplazado por: “Los datos representan la media ± ESM de tres experimentos; **** representa diferencias significativas en comparación con los 60 min en ausencia del inhibidor BMS-3, p<0,001.”

- Página 60: En la leyenda de la Figura 19 donde dice: “Los datos representan la media ± ESM de cinco experimentos; * representa una diferencia significativa, p<0,05 comparada con la misma condición sin el inhibidor.” debe ser reemplazado por: “Los datos representan la media ± ESM de cinco experimentos; * representa una diferencia significativa, p<0,05 comparada con la misma condición sin el inhibidor, luego de un ANOVA de dos vías en **A** y luego de un ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey en **B**. ”

- Página 64: En el último párrafo, donde dice: “Demostramos entonces, por primera vez que los reguladores principales de la dinámica de actina de células somáticas están presentes y activos también en el espermatozoide de ratón.” debe ser reemplazado por: “Demostramos entonces, por primera vez, que los reguladores

principales de la dinámica de actina de células somáticas están presentes y activos también en el espermatozoide de ratón.”

- Página 74: En la sección Análisis Estadístico de los Materiales y Métodos, donde dice: “Los resultados obtenidos fueron comparados por un ANOVA de una sola vía con el test de comparaciones múltiples de Tukey, a excepción de las Figuras 21 y 26 en las que se utilizó la prueba t de Student.” debe ser reemplazado por: “Los resultados obtenidos fueron comparados por un ANOVA de una sola vía con el test de comparaciones múltiples de Tukey, a excepción de las Figuras 21, 28 y 29 en las que se utilizó la prueba t de Student.”

- Página 83: En la leyenda de la Figura 24 D y G donde dice: “Retrasos del aumento de calcio en las áreas analizadas en espermatozoides estimulados con progesterona o ionomicina respectivamente (n= 8). *, ** y *** representan diferencias estadísticamente significativas de $p<0,05$, $p<0,001$ y $p<0,0001$, respectivamente, comparadas con la cabeza (H).” debe ser reemplazado por: “Retrasos del aumento de calcio en las áreas analizadas en espermatozoides estimulados con progesterona o ionomicina respectivamente (n= 8). *, **, *** y **** representan diferencias estadísticamente significativas de $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ y $p<0,0001$, respectivamente, comparadas con la cabeza (H).”

- Página 83: En la sección La EA del espermatozoide de ratón puede monitorearse utilizando el colorante FM4-64, donde dice: “Encontramos una correlación total entre los resultados de ambos métodos para medir la EA (n= 3 ratones, 46 células analizadas).” debe ser reemplazado por: “Los resultados obtenidos por ambos métodos para medir la EA fueron idénticos (n= 3 ratones, 46 células analizadas).”

ÍNDICE

ABREVIATURAS UTILIZADAS	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1. EL ESPERMATOZOIDE.....	3
2. MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN ESPERMÁTICA	4
3. MADURACIÓN ESPERMÁTICA	6
4. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA	7
5. HIPERACTIVACIÓN	13
6. EXOCITOSIS ACROSOMAL	15
6.1 MORFOLOGÍA.....	16
6.2 MAQUINARIA DE FUSIÓN DE MEMBRANAS	18
6.3 EL SITIO Y EL/LOS INDUCTOR(ES)	19
6.4 EL ROL DEL CALCIO	22
6.5 EL ROL DEL CITOESQUELETO DE ACTINA	24
6.5.1 Componente clave de la exocitosis eucariótica	24
6.5.2 La actina y sus proteínas de unión en el espermatozoide de los mamíferos.....	26
6.5.3 La capacitación prepara al espermatozoide para experimentar la exocitosis acrosomal.....	29
6.5.3a Polimerización de actina durante la capacitación del espermatozoide de mamífero.....	30
6.5.3b La despolimerización de actina durante la exocitosis acrosomal	33
HIPÓTESIS.....	36
OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
CAPÍTULO I – ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE LAS PEQUEÑAS GTPASAS DE LA FAMILIA RHO EN EL CONTROL DE LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL	39
INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
REACTIVOS.....	42
ANIMALES.....	42
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.....	43

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ESPERMATOZOIDE	43
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ESPERMATOZOIDE INSOLUBLES EN TRITON	43
INMUNOTRANSFERENCIA	44
INMUNOFLUORESCENCIA.....	45
TINCIÓN FLUORESCENTE DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA.....	45
DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE ACTINA A LA FRACCIÓN	
INSOLUBLE EN TRITON DEL CITOESQUELETO DEL ESPERMATOZOIDE.....	46
EVALUACIÓN DE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL MEDIANTE CITOMETRÍA DE	
FLUJO.....	46
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
RESULTADOS.....	48
POLIMERIZACIÓN DE ACTINA INDUCIDA POR LA CAPACITACIÓN	48
LAS PEQUEÑAS GTPASAS Y SUS PROTEÍNAS EFECTORAS SE ENCUENTRAN	
EXPRESADAS EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN.....	49
LIMK1 ES FOSFORILADA EN THR508 DURANTE LA CAPACITACIÓN	50
LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE AMPC/PKA ES ESENCIAL PARA	
LA FOSFORILACIÓN DE LIMK1.....	52
LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE RHOA/C Y RAC1 SON	
ESENCIALES PARA LA FOSFORILACIÓN DE LIMK1	53
COFILIN ES FOSFORILADA EN SER3 POR LIMK1 DURANTE LA CAPACITACIÓN..	56
LA INHIBICIÓN DE LIMK1 DISMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE COFILIN Y	
RESULTA EN BAJOS NIVELES DE POLIMERIZACIÓN DE ACTINA DURANTE LA	
CAPACITACIÓN	58
LA ACTIVACIÓN DE LIMK1/COFILIN ES ESENCIAL PARA LA EXOCITOSIS	
ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN.....	59
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES	66
 CAPÍTULO II – ESTUDIO DE LOS CAMBIOS ESPACIO-TEMPORALES EN EL	
[CA²⁺]_i Y LA EA EN ESPERMATOZOIDES INDIVIDUALES TRAS LA	
ESTIMULACIÓN CON PROGESTERONA.....	67
INTRODUCCIÓN	67
MATERIALES Y MÉTODOS.....	70
REACTIVOS.....	70
ANIMALES.....	70
PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES	70

ESTUDIOS EN CÉLULA ÚNICA.....	70
REGISTRO DE IMÁGENES EN TIEMPO REAL DEL $[Ca^{2+}]_i$ EN ESPERMATOZOIDES INDIVIDUALES DE RATÓN	71
REGISTRO DE IMÁGENES EN TIEMPO REAL DE ESPERMATOZOIDES DE RATONES TRANSGÉNICOS REALIZANDO LA EXOCITOSIS ACROSOMAL.....	72
REGISTRO DE IMÁGENES EN TIEMPO REAL DEL $[Ca^{2+}]_i$ Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES INDIVIDUALES DE RATÓN	72
ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES	73
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	73
RESULTADOS.....	75
LA PROGESTERONA PROMUEVE UN AUMENTO EN EL $[Ca^{2+}]_i$ EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN.....	75
PRINCIPALES PATRONES DE CAMBIOS EN EL $[Ca^{2+}]_i$ INDUCIDOS POR LA PROGESTERONA	76
EN LA MAYORÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES, LA PROGESTERONA ELEVÓ EL $[Ca^{2+}]_i$ PRIMERO EN EL FLAGELO Y LUEGO ESTA ELEVACIÓN SE PROPAGÓ EN DIRECCIÓN ANTERÓGRADA.....	79
LA EA DEL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN PUEDE MONITOREARSE UTILIZANDO EL COLORANTE FM4-64	83
LA PROGESTERONA DESENCADENA UN AUMENTO TRANSITORIO EN EL $[Ca^{2+}]_i$ QUE PROMUEVE LA EA EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN	84
UN AUMENTO CON DIRECCIÓN ANTERIOR-POSTERIOR EN EL $[Ca^{2+}]_i$ PROMOVIDO POR LA PROGESTERONA INDUCE LA EA EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN	88
DISCUSIÓN.....	91
CONCLUSIONES	95
DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	96
BIBLIOGRAFÍA	101

ABREVIATURAS UTILIZADAS

[Ca²⁺]_i	Calcio intracelular
Actina-F	Actina filamentosa
Actina-G	Actina globular
ADCY	<i>Adenylate cyclase</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAP	Capacitante
CatSper	<i>Cation channel of sperm</i>
DAG	Diacylglicerol
dbAMPC	Dibutiril adenosín monofosfato cíclico
EA	Exocitosis acrosomal
ENR	Envoltura nuclear redundante
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDI	<i>Guanosine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosín difosfato
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GTP	Guanosín trifosfato
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
Iono	Ionomicina
IP3	Inositol trifosfato
KO	<i>Knockout</i>
LIMK	<i>LIM Domain Kinase</i>
MAE	Membrana acrosomal externa
MAI	Membrana acrosomal interna
min	Minutos
MP	Membrana plasmática
PA	Ácido fosfatídico
Pi3K	Fosfoinositol 3-quinasa
Pi4K	Fosfoinositol 4-quinasa

PIP2	Fosfatidilinositol bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLD	Fosfolipasa D
Prog	Progesterona
SACY	<i>Soluble adenylyl cyclase</i>
SE	Segmento ecuatorial
SNARE	<i>SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor</i>
ZP	Zona Pelúcida
α-SNAP	<i>Alpha Soluble NSF attachment protein</i>
PKA	Proteína quinasa A

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fecundación es un evento fundamental en el que se unen el espermatozoide y el ovocito para generar un nuevo individuo con características genéticas únicas. Mejorar nuestro conocimiento sobre la fisiología del espermatozoide y la fecundación es esencial para enfrentar distintos retos, como el incremento en los casos de infertilidad masculina en los países industrializados (Skakkebaek et al., 2016), crear anticonceptivos masculinos más seguros, mejorar la reproducción de los animales y preservar la biodiversidad (Darszon et al., 2011). A continuación se describen brevemente las principales características morfológicas del espermatozoide de mamíferos y los eventos fisiológicos que ocurren en él antes de la fecundación, en el marco de los objetivos de esta tesis.

1. EL ESPERMATOZOIDE

Anton van Leeuwenhoek (microscopista Holandés, 1632-1723) observó por primera vez espermatozoides en 1678. Inicialmente creyó que eran animales parásitos que vivían en el semen y que no tenían relación con la reproducción; de allí el término espermatozoide (animales del esperma). Años después se creyó que los espermatozoides contenían un embrión humano preformado en su interior (teoría del homúnculo; 1694). No fue hasta el año 1824 cuando J. L. Prevost y J. B. Dumas afirmaron por primera vez que los espermatozoides no eran parásitos sino que estaban asociados a la fecundación (Prevost and Dumas, 1824). Sin embargo, hubo que esperar hasta el año 1876 para que Oscar Hertwig y Herman Fol demostraran de manera independiente y fehacientemente que la fecundación se daba como consecuencia de la unión de los espermatozoides con los ovocitos (Fol, 1876; Hertwig, 1875).

El espermatozoide maduro es el producto final del proceso de espermatogénesis que consiste en sucesivas rondas de mitosis seguido por una fase de meiosis y una etapa post meiótica de diferenciación (Yanagimachi, 1994a). Este proceso tiene lugar en los túbulos seminíferos del testículo y posteriormente el espermatozoide completa su maduración en el epidídimo, donde recibe diversas proteínas (Busso et al., 2007), probablemente en parte a través de estructuras denominadas epididimosomas (Frenette et al., 2010). El espermatozoide es una célula

altamente especializada, cuya función principal es la de fecundar al ovocito aportando la información genética complementaria a la gameta femenina.

2. MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN ESPERMÁTICA

Los espermatozoides poseen características celulares únicas relacionadas a su función. Morfológicamente, el espermatozoide de mamífero puede dividirse en dos regiones: la cabeza y el flagelo, las cuales se encuentran unidas por el cuello (**Figura 1**). En el cuello están localizados los centríolos: el centríolo proximal se sitúa en la parte basal del núcleo y el centríolo distal da origen a los microtúbulos del axonema. La cabeza contiene al acrosoma y al núcleo. El núcleo es singular ya que contiene la información genética en forma de cromatina altamente condensada, dada la presencia de protaminas en vez de histonas: es así que se postula que no habría replicación ni transcripción en el espermatozoide (Balhorn, 2007). La inactividad transcripcional del núcleo hace que la gameta masculina sea dependiente de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación de proteínas necesarias para adaptar su función de acuerdo a las necesidades. El acrosoma (Gr. Akros = extremo o punta, soma = cuerpo) es un gran gránulo exocítico, formado a partir de la fusión de vesículas procedentes del aparato del Golgi (Martínez-Menárguez et al., 1996) que se encuentra situado en la parte anterior de la cabeza, entre el núcleo y la membrana plasmática. Contiene enzimas que degradan proteínas y glúcidos complejos (Eddy, 2006). El lumen del acrosoma está formado por componentes solubles y elementos particulados, también conocidos como la matriz acrosomal (Buffone et al., 2008; Foster et al., 1997; Kim et al., 2001; Westbrook-Case et al., 1994). La membrana acrosomal externa (MAE) y la membrana plasmática están en estrecha proximidad (O'Brien et al., 1994); sin embargo, no hay interacciones obvias entre estas dos estructuras hasta que el espermatozoide es estimulado en la proximidad del ovocito, para realizar un proceso de exocitosis que se describirá en las secciones siguientes (Buffone et al., 2014b; Hirohashi, 2016; La Spina et al., 2016). El flagelo consta de tres partes: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (**Figura 1**) (O'Brien et al., 1994). Dentro del flagelo se encuentra el axonema, que tiene una estructura conformada por nueve pares de microtúbulos que rodean y están conectados a un par central. Los pares externos de microtúbulos son unidades que contienen espigas

radiales, complejos reguladores y dineínas, siendo estas últimas ATPasas que producen la fuerza motriz necesaria para que el espermatozoide se desplace (Lishko et al., 2012). El axonema se encuentra rodeado de fibras densas exteriores que se extienden desde el cuello a la pieza principal. En la pieza media se localizan las mitocondrias que contribuyen a la generación de energía, la cual es muy importante en estas células para el mantenimiento de los procesos fisiológicos como los que se describen más adelante. La pieza principal constituye los dos tercios del flagelo, con una longitud de 35-45 μm dependiendo de la especie de mamífero, y está definida por la presencia de una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas y al axonema. En cambio, la pieza terminal está compuesta solo de axonema donde los túbulos terminan a diferentes niveles, rodeados del escaso citoplasma y la membrana plasmática.

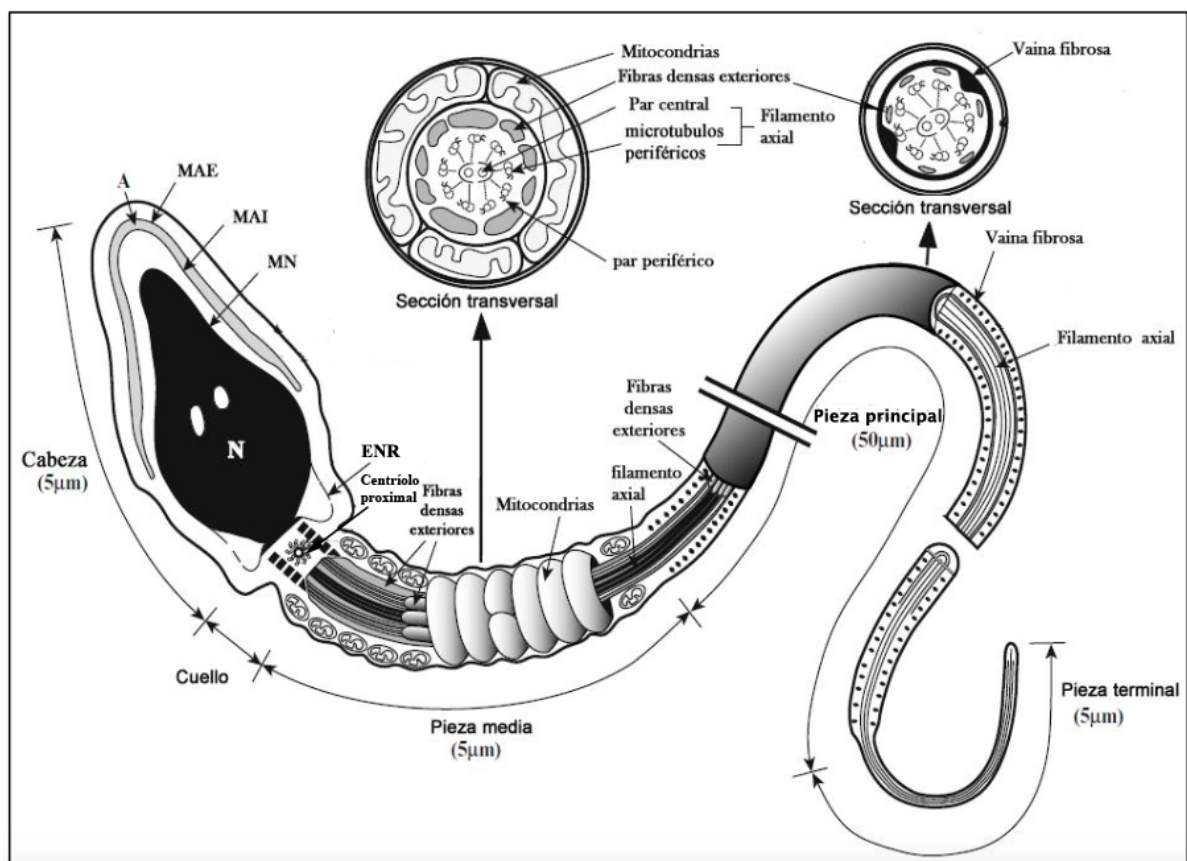


Figura 1. Esquema que representa a un espermatozoide maduro de mamífero. En la cabeza encontramos: al núcleo rodeado de la membrana nuclear (MN), al acrosoma (A) (cuya membrana se divide en dos según su localización, la membrana acrosomal externa (MAE) cercana a la membrana plasmática y la membrana acrosomal interna (MAI), orientada hacia la región del núcleo) y a la envoltura nuclear redundante (ENR). En la pieza media se encuentran las mitocondrias. También se muestran secciones transversales de la pieza media

y la pieza principal, con su respectiva distribución de microtúbulos 9+2. Tomado y modificado del libro de Toshimori, 2009.

3. MADURACIÓN ESPERMÁTICA

La maduración espermática ocurre en el epidídimo e implica principalmente una serie de cambios en la membrana plasmática del espermatozoide. Durante este proceso se produce una reorganización lipídica y proteica que le confiere al espermatozoide nuevas propiedades antigénicas, además de adquirir la movilidad activada progresiva necesaria para la fecundación (Yanagimachi, 1994a).

El epidídimo es un conducto único 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 principales 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) (**Figura 2**). Aunque no todos los espermatozoides adquieren la capacidad fecundante simultáneamente, la gran mayoría obtiene el potencial fertilizante al llegar al *cauda* epididimario (Yanagimachi, 1994a).

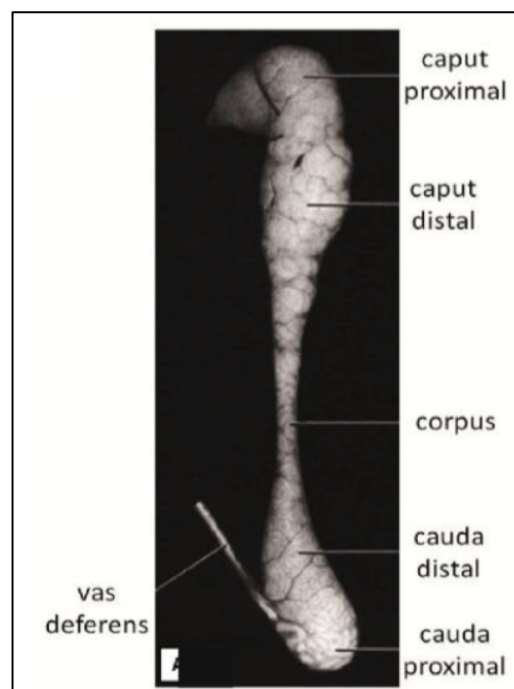


Figura 2. El epidídimo. Microfotografía de un epidídimo, mostrando sus regiones principales.

Respecto a la reorganización proteica que ocurre en el espermatozoide en el epidídimo, Yanagimachi y colaboradores describieron, por primera vez, mediante microscopía electrónica de cortes de epidídimos de hámster, la existencia de pequeñas vesículas membranosas que interactuaban con los espermatozoides (Yanagimachi et al., 1985). Luego de varios años de esta primera observación, el laboratorio del Dr. 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; Légaré et al., 1999). Estas vesículas han sido denominadas epididimosomas, y han sido descritas de distintos mamíferos, tales como la rata (Fornés et al., 1991), el toro (Frenette and Sullivan, 2001), el ratón (Griffiths et al., 2008), e inclusive el humano (Frenette et al., 2005).

4. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Después de la eyaculación, los espermatozoides de los mamíferos no son capaces de fecundar al ovocito ya que la capacidad fecundante adquirida durante la maduración epididimaria es tan sólo de carácter potencial. Esta habilidad la adquieren durante un proceso denominado capacitación espermática, el cual ocurre durante su tránsito por el tracto reproductor de la hembra e implica una serie de cambios fisiológicos (tanto estructurales como bioquímicos) que le confieren al espermatozoide la capacidad de adquirir un patrón característico de movilidad (hiperactivación) e iniciar la exocitosis acrosomal (EA) para fecundar al ovocito (Yanagimachi, 1989; Yanagimachi, 1994a). Austin y Chang en la década del 50 fueron pioneros en la observación y descripción de la capacitación, la definieron como el tiempo que el espermatozoide debe residir en el tracto reproductor femenino antes de que adquiera la competencia de fecundar al ovocito (Austin, 1951; Austin, 1952; Chang, 1951). Entonces, se considera que un espermatozoide está completamente capacitado cuando puede experimentar la hiperactivación y la EA (que se detallan más adelante). Si alguno de estos procesos no sucede en el espermatozoide, la fecundación no se lleva a cabo (Darszon et al., 2011). Aunque a la fecha, todavía no se ha generado una definición global de la capacitación, se ha avanzado en el conocimiento de su naturaleza biológica, implicancia en la fisiología y sus

mecanismos de inducción (Bailey, 2010; Okabe, 2013; Visconti et al., 2011). Entre las modificaciones que ocurren durante la capacitación podemos mencionar:

a) Modificaciones en la membrana plasmática:

- Remoción de factores decapacitantes: estos factores son moléculas que se originan en las secreciones testiculares, epididimarias, prostáticas y de las vesículas seminales, cuya función es proteger al espermatozoide durante el periodo de almacenamiento epididimario y al momento de la eyaculación, estabilizando por ejemplo al acrosoma impidiendo que reaccione antes de tiempo. Un ejemplo de estos son las glicoproteínas no covalentemente unidas a la superficie de la membrana (Ma et al., 2012; Oliphant and Brackett, 1973). La naturaleza de estas moléculas depende de la especie en cuestión.

- Aumento de la fluidez de la membrana plasmática debido principalmente a la pérdida de colesterol (Davis, 1981; Gadella et al., 2008; Jones et al., 2007). Así como modificaciones en su distribución y la de otros esteroides en la membrana (Lishko et al., 2012).

- Hiperpolarización de la membrana plasmática en ratones (Arnoult et al., 1999; Escoffier et al., 2015; Zeng et al., 1995) y humanos (López-González et al., 2014). El papel preciso que cumple este cambio en el potencial de membrana aún no está completamente claro, pero se han planteado algunas hipótesis gracias a experimentos que se han hecho principalmente en espermatozoides de ratón. Se propone que dicha hiperpolarización es necesaria y suficiente al menos para preparar a los espermatozoides de ratón para la EA (De La Vega-Beltran et al., 2012). Los canales involucrados en esta hiperpolarización son los canales de potasio Slo3 en ratones (Martínez-López et al., 2009; Santi et al., 2011; Schreiber et al., 1998) y Slo3 (Schreiber et al., 1998) y Slo1 en humanos (López-González et al., 2014; Mannowetz et al., 2013; Sánchez-Carranza et al., 2015). En ratones, la hiperpolarización provocada por los canales Slo3 promueve un aumento del pH intracelular, a través de la activación de canales o transportadores voltaje dependientes, lo cual activa a CatSper (canal catiónico del espermatozoide) generando un aumento del calcio intracelular (Chavez et al., 2014). Sin embargo, en humanos un aumento del calcio intracelular activa a Slo3 y la apertura de los canales CatSper se encuentra limitada por la hiperpolarización generada vía Slo3 (Brenker et al., 2014).

-Redistribución de proteínas integrales de membrana, cambios en la proporción de proteínas de membrana y difusión de lípidos (Gadella et al., 2008; Töpfer-Petersen et al., 1990; Wolf et al., 1986).

b) Cambios en la concentración intracelular de iones como calcio (Ca^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-), cloro (Cl^-) y sodio (Na^+) (Darszon et al., 2007; Kirichok and Lishko, 2011; Lishko et al., 2012).

Durante la capacitación ocurre un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Baldi et al., 1991; Ruknudin and Silver, 1990). En cuanto al influjo de Ca^{2+} , el único canal de calcio del cual se ha detectado la corriente iónica en espermatozoides epididimarios hasta la actualidad es el llamado CatSper que se expresa exclusivamente en los espermatozoides (Kirichok et al., 2006), mientras que la expulsión de Ca^{2+} de la célula estaría modulada por bombas de Ca^{2+} ATPasa (las PMCA). Los reservorios intracelulares, presentes en la cabeza (acrosoma) y el cuello (envoltura nuclear redundante) también han sido propuestos como mediadores del mantenimiento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Schuh et al., 2004). Entre los canales de calcio intracelulares, los principales serían el receptor de inositol trifosfato (IP_3) (Walensky and Snyder, 1995) y rianodínico (RyR) (Treviño et al., 1998) y la bomba Ca^{2+} -ATPasa de la vía secretora (SPCA1) (Darszon et al., 2011; Harper et al., 2005).

Además, una entrada inicial de HCO_3^- , a través del co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) estaría involucrada en el proceso de capacitación (Demarco et al., 2003). Por otro lado, el Cl^- también sería importante para el ingreso de HCO_3^- ya que recientemente, se ha identificado un co-transportador de Na^+ , K^+ y Cl^- , denominado NKCC, que generaría un aumento intracelular de Cl^- (Wertheimer et al., 2008), lo cual permitiría la activación de un anti-transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ permitiendo un ingreso sostenido de HCO_3^- (Chávez et al., 2012). Asimismo, para el Cl^- también se describió la presencia de dos canales de Cl^- : uno Ca^{2+} dependiente que podría corresponderse con el canal TMEM16A (Orta et al., 2012) y otro denominado CFTR (regulador transmembranal de la fibrosis quística) que regularía la actividad de los canales de Na^+ epiteliales ENaC (canal de Na^+ epitelial) en los espermatozoides de ratón (Hernández-González et al., 2007) y su inhibición estaría asociada a la hiperpolarización de la membrana durante la capacitación (Hernández-González et al., 2006).

c) Incremento del pH citoplasmático (Parrish et al., 1989). La entrada de HCO_3^- , a través del co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) y la de protones (H^+) a través del intercambiador Na^+/H^+ (NHE), localizados en la pieza principal del espermatozoide murino, serían los responsables del aumento en el pH intracelular. En humanos, se ha postulado la participación del canal de protones Hv1 como principal responsable de la alcalinización observada durante la capacitación (Lishko et al., 2010) así como también al transportador CFTR (Puga Molina et al., 2016).

d) Aumento en la actividad de la enzima adenilato ciclasa, que resulta en un incremento del AMPc y la actividad de proteína quinasa A (PKA) (Buffone et al., 2014a; Hess et al., 2005; Xie et al., 2006). En el espermatozoide se expresan las dos clases generales de adenilato ciclasas: la transmembranal (ADCY1-9) y la soluble (SACY o ADCY10). La primera se localiza en la cabeza del espermatozoide (Wertheimer et al., 2013), mientras que la segunda se localiza principalmente en la pieza intermedia del flagelo (Hess et al., 2005). Los ratones *knockout* (KO) para SACY presentan una espermatogénesis normal pero son infértiles por un defecto en la movilidad espermática (Esposito et al., 2004; Hess et al., 2005). La movilidad progresiva en los espermatozoides KO para SACY puede ser restaurada mediante la adición de un análogo permeable del AMPc. KH7, un inhibidor específico de SACY, afecta la movilidad, los patrones de fosforilación de proteínas en tirosina (Tyr), y la competencia fecundante de los espermatozoides *wild-type*, pero la adición de dibutilil-AMPc rescata todas estas características defectuosas. Distinto a los efectos en la movilidad, la EA es normal en espermatozoides de ratones KO para SACY y en espermatozoides *wild-type* tratados con KH7. Los espermatozoides de ratones KO *Adcy3* presentan una disminución en la movilidad y una disminución de la capacidad de fecundación *in vitro*. Sin embargo, la capacidad fecundante puede ser recuperada utilizando ovocitos sin zona pelúcida (ZP) (Livera et al., 2005). Estos resultados, junto con la ausencia de SACY en el acrosoma, indican que ADCY3 desempeña un papel fundamental en la EA.

e) Modulación de la actividad de fosfatasa, quinasas (P3IK, PKC, PTK, Src) (Baker et al., 2006; Krapf et al., 2010) y proteasas (Rotfeld et al., 2014; Signorelli et al., 2013) e incremento en la fosforilación de proteínas en residuos serina/treonina y Tyr

(modulado por una vía dependiente del AMPc) (Galantino-Homer et al., 1997; Visconti et al., 1995a; Visconti et al., 1995b; Visconti et al., 2011). La fosforilación de proteínas en Tyr es mediada por la quinasa FER cuya activación se encuentra río abajo de PKA (Alvau et al., 2016).

f) Aumento del metabolismo celular debido principalmente a la actividad glicolítica y el consumo de O₂ (Hamner, 1962; Storey, 2008).

g) Polimerización de la actina-G (monomérica o globular) en actina-F (polimérica o filamentosa) en la cabeza del espermatozoide (Brenner et al., 2003; Finkelstein et al., 2010). Dado que este cambio que ocurre durante la capacitación es objeto de estudio para esta Tesis, se desarrollará con mayor detalle más adelante.

En la Figura 3 se muestra un modelo esquemático muy resumido y general de la secuencia de eventos de señalización que ocurren durante la capacitación de los espermatozoides de ratón.

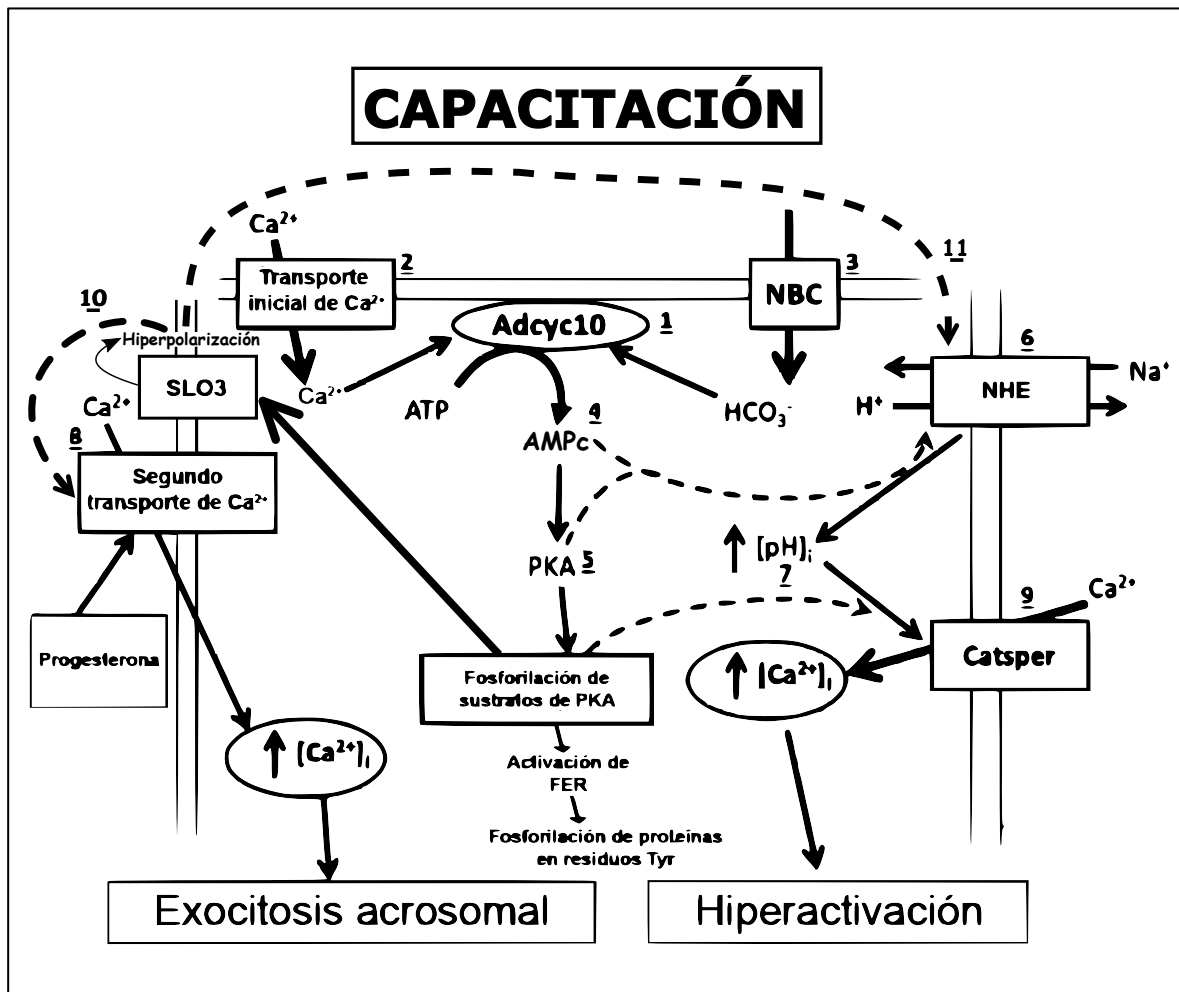


Figura 3. Modelo esquemático de la secuencia de eventos que ocurren durante la capacitación en el espermatozoide de ratón, que permiten el desarrollo de la EA y la hiperactivación (líneas continuas para eventos comprobados, líneas discontinuas para eventos probables). Cuando los espermatozoides son colocados en un medio capacitante, la adenilato ciclasa soluble Adcyc10 (1) es estimulada rápidamente por la acción combinada de Ca^{2+} y HCO_3^- , que entran al espermatozoide a través de un transportador de Ca^{2+} inicial, aún no identificado (2) y un cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) (3), respectivamente. El AMPc elevado (4) activa a la PKA (5) y al antiportador Na^+/H^+ (NHE) (6), resultando en un aumento del pH intracelular (7), que estimula a CatSper (9). La PKA provoca, por un lado, la activación de la proteína FER que produce el aumento característico de proteínas fosforiladas en residuos Tyr y, por otro lado, la activación de la proteína SRC que fosforila al canal Slo3, activándolo y generando así la hiperpolarización de la membrana. Se plantea también la hipótesis de que los sustratos fosforilados de PKA fosforilan a CatSper (9). La hiperpolarización (10) estimula a un segundo transportador de calcio voltaje dependiente (8), que es activado por la progesterona y transporta Ca^{2+} extracelular a la cabeza del espermatozoide para inducir la EA. A su vez, la hiperpolarización estimula al canal NHE (11) que induce el aumento del pH intracelular que activa el ingreso de Ca^{2+} al flagelo del espermatozoide a través de CatSper (9) induciendo la hiperactivación. Esquema modificado de Tateno *et al.*, 2013.

La población de espermatozoides presentes en un eyaculado es heterogénea. El inicio del proceso de capacitación depende del momento en el que son removidos los

factores decapacitantes del plasma seminal que están asociados a la cabeza y a la cola de los mismos. Además, el estado de capacitación es transitorio. Cohen-Dayag y colaboradores demostraron que los espermatozoides humanos incubados *in vitro* se capacitan en grupos a diferentes tiempos y permanecen en este estado entre 50 y 240 minutos (Cohen-Dayag et al., 1995). Esto podría ser parte de un proceso de regulación para mantener un reducido y continuo número de espermatozoides capacitados.

La capacitación se puede llevar a cabo *in vitro* incubando a los espermatozoides en un medio que contenga las concentraciones adecuadas de al menos tres elementos: Ca^{2+} , HCO_3^- y albúmina (Visconti et al., 1995b).

5. HIPERACTIVACIÓN

Después de depositarse en la vagina, los espermatozoides de varias especies de mamíferos inician su movilidad con un batido flagelar simétrico y de corta amplitud conocido como movilidad activada (Suarez and Pacey, 2006). En contraste, los espermatozoides aislados de zonas superiores del tracto presentan una movilidad hiperactivada (Suarez and Pacey, 2006) (**Figura 4**). Este último tipo de movilidad, descrito por primera vez en espermatozoides de hámster (Yanagimachi, 1969), se caracteriza por presentar un batido flagelar asimétrico y de mayor amplitud cuando los espermatozoides se encuentran en un medio de baja viscosidad, sin embargo la adquisición de este tipo de nado más vigoroso le permite a las células llevar a cabo un desplazamiento progresivo a través del moco cervical (un medio de alta viscosidad), desprenderse de las criptas oviductales, avanzar hacia la ampulla y atravesar con mayor facilidad las capas externas del ovocito.

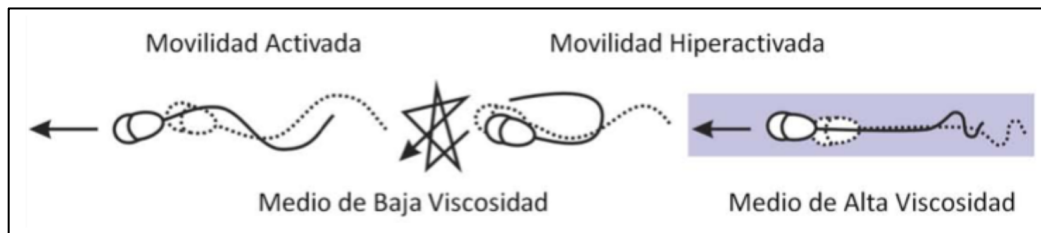


Figura 4. Los cambios de la movilidad en el espermatozoide de mamífero. Se muestra la forma del batido flagelar y la dirección del movimiento (flechas) en espermatozoides activados e hiperactivados colocados en un medio de baja o alta viscosidad. En un medio de baja viscosidad los espermatozoides activados se desplazan con un batido flagelar simétrico, mientras que los hiperactivados no avanzan eficientemente debido a su batido flagelar asimétrico. En un medio de alta viscosidad, la hiperactivación de los espermatozoides ocasiona un desplazamiento progresivo más eficiente que el de los activados. Modificado de Darszon *et al.*, 2011.

La hiperactivación es un evento esencial para que el espermatozoide fecunde al ovocito y aunque aún no se sabe con certeza cuál(es) factor(es) la inicia(n) en condiciones fisiológicas, está demostrado que el calcio proveniente del medio extracelular y de reservorios intracelulares es esencial para regular este proceso (Suarez, 2008). Asimismo la hiperactivación también requiere un incremento del pH intracelular, posiblemente para regular la activación del canal CatSper que depende de la alcalinización intracelular (Suarez, 2008). La participación de este canal es indispensable para que se lleve a cabo el proceso de hiperactivación (Lishko *et al.*, 2012). Un factor que induce un ingreso robusto de Ca^{2+} en los espermatozoides de humano y favorece la hiperactivación es la progesterona (Blackmore *et al.*, 1990; Lishko *et al.*, 2012). El ingreso de Ca^{2+} al espermatozoide inducido por la progesterona en concentraciones picomolares está mediado por los canales CatSper (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011). Los ratones nulos para CatSper son infértiles (Jin *et al.*, 2007; Qi *et al.*, 2007). Además, en humanos las mutaciones en CatSper 1 y 2 se han asociado a astenozoospermia (Avenarius *et al.*, 2009; Avidan *et al.*, 2003; Bhilawadikar *et al.*, 2013; Hildebrand *et al.*, 2010; Tamburrino *et al.*, 2014). Dicha infertilidad estaría relacionada a la incapacidad de desarrollar la movilidad hiperactivada y atravesar la ZP (Carlson *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2001). Recientemente, Chung y colaboradores (2014), utilizando microscopía de fluorescencia de súper-resolución determinaron la distribución 3D de proteínas en el flagelo del espermatozoide de ratón con una resolución del orden de los nanómetros (Chung *et al.*, 2014). Encontraron que CatSper forma un arreglo cuadrilateral a lo largo de la

pieza principal del flagelo, que organiza dominios estructurales de señalización de calcio (**Figura 5**).

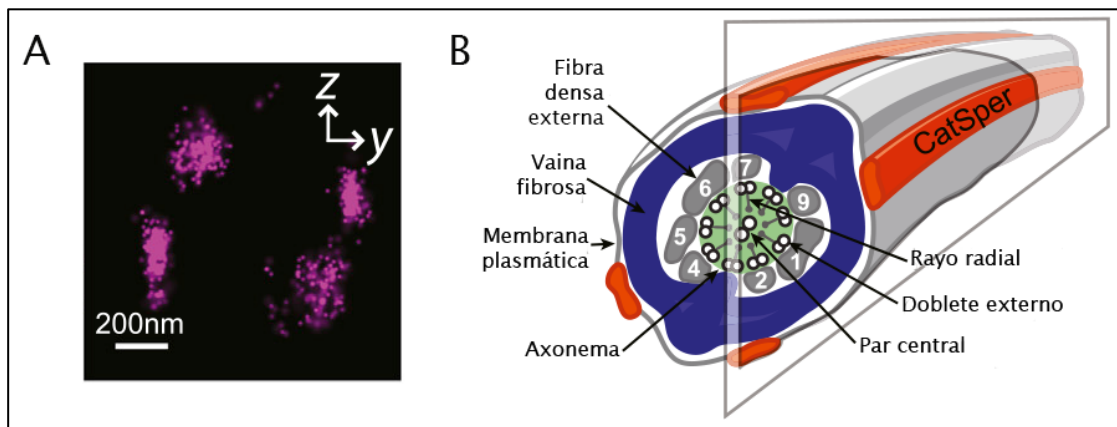


Figura 5. Los canales CatSper forman 4 dominios lineales a lo largo del flagelo. A) Imágenes de la proyección en y-z del inicio de la pieza principal obtenidas mediante microscopía 3D STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) de CatSper δ . **B)** Dibujo que esquematiza el flagelo del espermatozoide para mostrar la localización de los canales CatSper en su arreglo lineal. Cada dominio de calcio se ubica a cada lado de las columnas longitudinales del flagelo. Modificado de Chung *et al.*, 2014.

Además, estos dominios de calcio generan una localización de las proteínas fosforiladas en Tyr confinada al axonema del flagelo. Una disrupción de CatSper provoca la deslocalización de las proteínas fosforiladas en Tyr, indicando que existe una conexión funcional entre las dos vías de señalización principales de la capacitación espermática. En este trabajo demuestran que es indispensable que los dominios de calcio se encuentren intactos para la hiperactivación (Chung *et al.*, 2014).

6. EXOCITOSIS ACROSOMAL

Como ya mencionamos, durante la capacitación el espermatozoide adquiere la capacidad de realizar la EA (**Figura 6**) que permite penetrar la ZP (matriz extracelular que rodea al ovocito) y la relocalización de proteínas esenciales para la fusión con el ovocito (Satouh *et al.*, 2012). En este proceso de exocitosis, la MAE y la membrana plasmática (MP) se fusionan en múltiples puntos, produciéndose la liberación y dispersión del contenido acrosomal (Yanagimachi, 1994a). Esta exocitosis es un tipo particular de secreción regulada, que comparte muchas de las características de los mecanismos básicos que se han descrito en otras células secretoras, como neuronas o células del sistema endócrino (Mayorga *et al.*, 2007a).

Las diferencias esenciales son: 1) el acrosoma es una vesícula secretoria única; 2) se forman múltiples puntos de fusión entre la MAE y la MP; 3) la fusión entre la MAE y la MP forma vesículas híbridas que son liberadas al medio circundante durante la exocitosis; 4) no hay reciclado de las membranas luego de la EA, siendo este un proceso irreversible. Una vez que finaliza la exocitosis, la cabeza del espermatozoide tiene un nuevo límite celular, la MAI que se continúa con la membrana plasmática (Yanagimachi, 1994a) (**Figura 6D**). Estas alteraciones de la topología y composición de la membrana limitante son fundamentales para la interacción con la gameta femenina (Ikawa et al., 2010; Inoue et al., 2011).

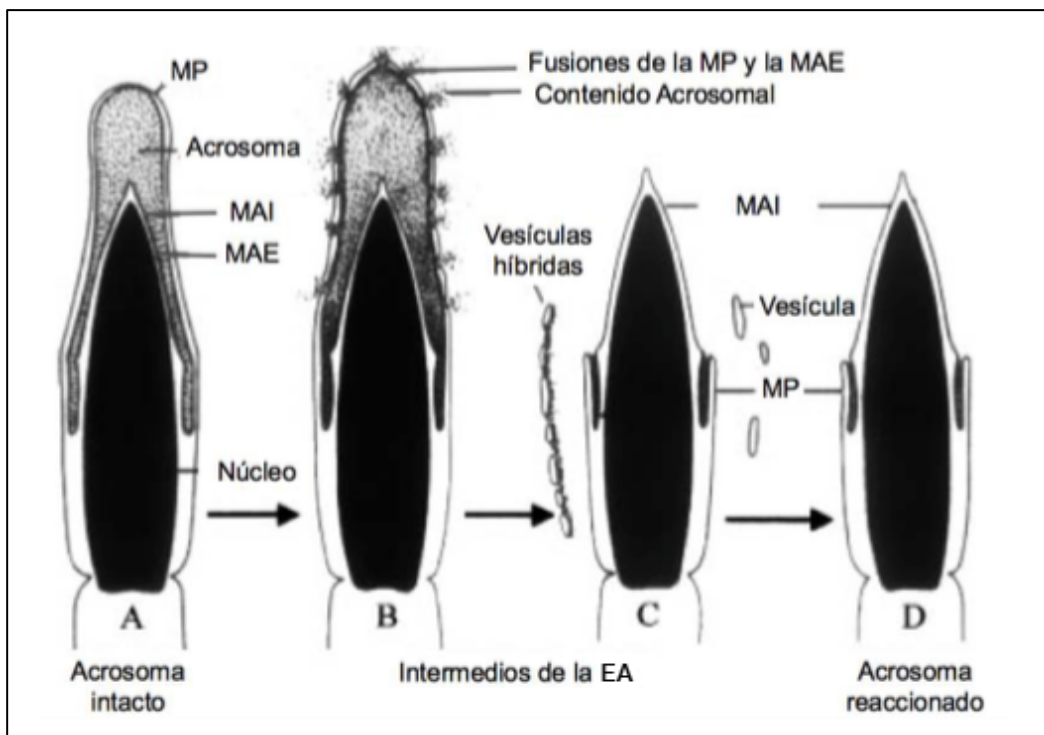


Figura 6. Secuencia de eventos durante la EA. En el diagrama se muestra un espermatozoide de mamífero llevando a cabo el proceso de exocitosis conocido como EA (**A-D**). MAE, membrana acrosomal externa; MAI, membrana acrosomal interna; MP, membrana plasmática. Modificado de Yanagimachi, 1994^a.

6.1 MORFOLOGÍA

En algunas especies, como el cobayo o el erizo de mar, debido al gran tamaño del acrosoma, la exocitosis se puede apreciar claramente por microscopía óptica con contraste de fase. Así fue como Jean Clark Dan en 1952 fue el primero en reportar la EA en espermatozoides de erizo de mar con un microscopio de contraste de fases

(Dan, 1952). Con la incorporación de la microscopía electrónica de transmisión se pudo observar el hinchamiento (swelling) del acrosoma y la pérdida de la electrodensidad del mismo al estimular con el ionóforo de calcio A23187. La MAE se invagina y en ocasiones contacta a la membrana plasmática generándose aposiciones entre ambas membranas. Posteriormente se fusionan dando lugar a la liberación del contenido acrosomal junto con las vesículas híbridas (**Figura 7**) (Zanetti and Mayorga, 2009).

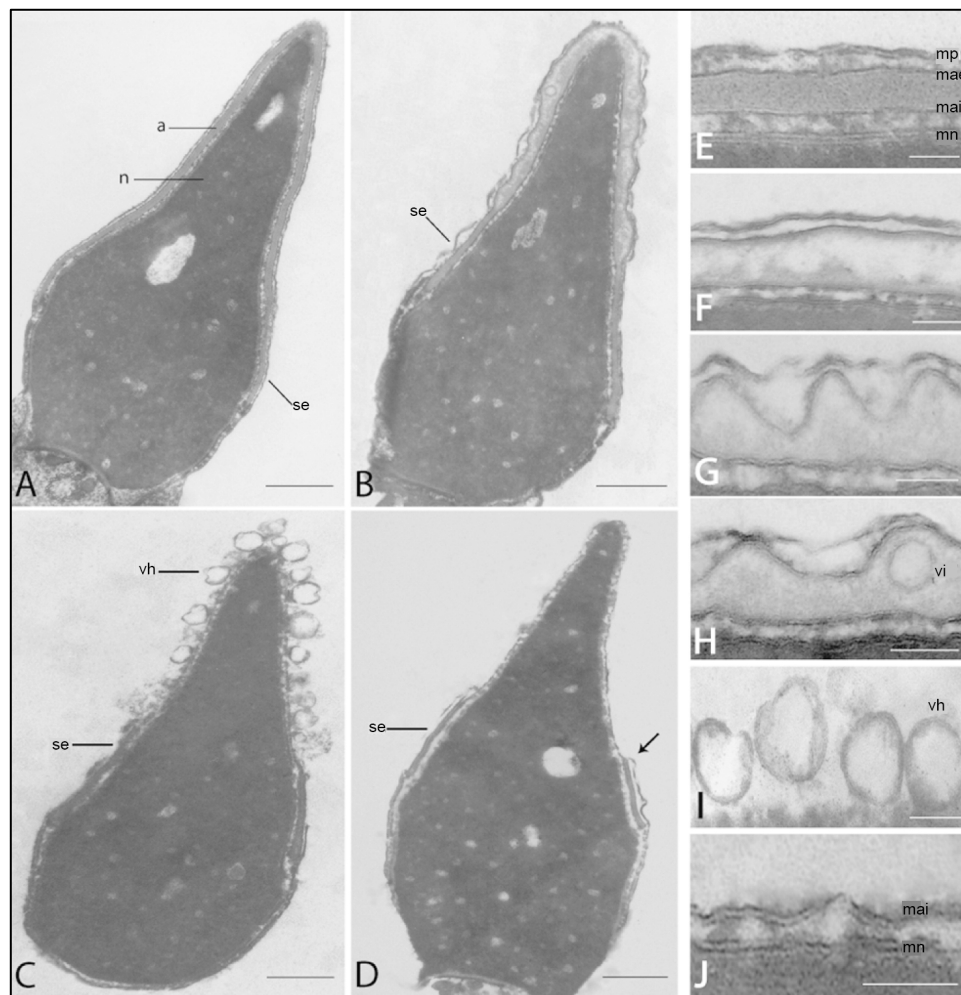


Figura 7. Cambios morfológicos durante la EA en espermatozoides humanos. **A)** Espermatozoide con el acrosoma intacto. **B)** Espermatozoide con el acrosoma hinchado y su MAE ondulada. **C)** Espermatozoide con el acrosoma con vesículas híbridas. **D)** Espermatozoide que ha completado la EA. El segmento ecuatorial se mantiene constante a lo largo de la exocitosis (flecha en D). La MAI queda expuesta al exterior y recubre la cabeza del espermatozoide. **E-J)** Imágenes a mayor magnificación. **E)** Acrosoma intacto sin estimular. **F)** Acrosoma hinchado con la MAE y MP paralelas. **G)** Acrosoma hinchado con su MAE ondulada. **H)** Acrosoma hinchado y ondulado con vesículas intraacrosomales. Nótese que las ondulaciones contactan la membrana plasmática. **I)** Acrosoma vesiculizado. **J)** Espermatozoide reaccionado. a, acrosoma; n, núcleo; se, segmento ecuatorial; vh, vesícula híbrida; mp, membrana plasmática; mae, membrana acrosomal externa; mai, membrana

acrosomal interna; mn, membrana nuclear; vi, vesícula intraacrosomal. Barras=500nm (A–D) y 100nm (E–J). Modificado de Zanetti y Mayorga, 2009.

6.2 MAQUINARIA DE FUSIÓN DE MEMBRANAS

La fusión de una vesícula secretoria con la membrana plasmática en el proceso de exocitosis consta de varias etapas. En primera instancia se produce el reclutamiento de la vesícula secretoria a la membrana plasmática o *tethering* (mediada por GTPasas monoméricas de la familia Rabs). Luego ocurre la asociación física entre la vesícula y la membrana plasmática o *docking* (mediada por proteínas SNAREs: *soluble NSF-attachment protein receptors*). En esta etapa la maquinaria proteica se encuentra lista para comenzar el proceso de fusión de las membranas, generando un estado transitorio de hemifusión. Finalmente la fusión se completa y se produce la apertura del poro a través del cual se libera el contenido del gránulo, produciéndose la incorporación de la vesícula a la membrana plasmática (Mayorga et al., 2007a) (**Figura 8**).

La maquinaria proteica implicada en el proceso de fusión de membranas para la exocitosis está altamente conservada en los diferentes tipos celulares, incluso en espermatozoides y la conforman proteínas como: Rab GTPasas, SNAREs, α -SNAP (α -*NSF attachment protein*), complexinas (proteína que interactúa selectivamente con los complejos SNAREs), sinaptotagminas (proteína sensora de calcio que participa en procesos de exocitosis regulados por calcio), NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), Munc13 y 18 (Südhof and Rothman, 2009; Tomes, 2015).

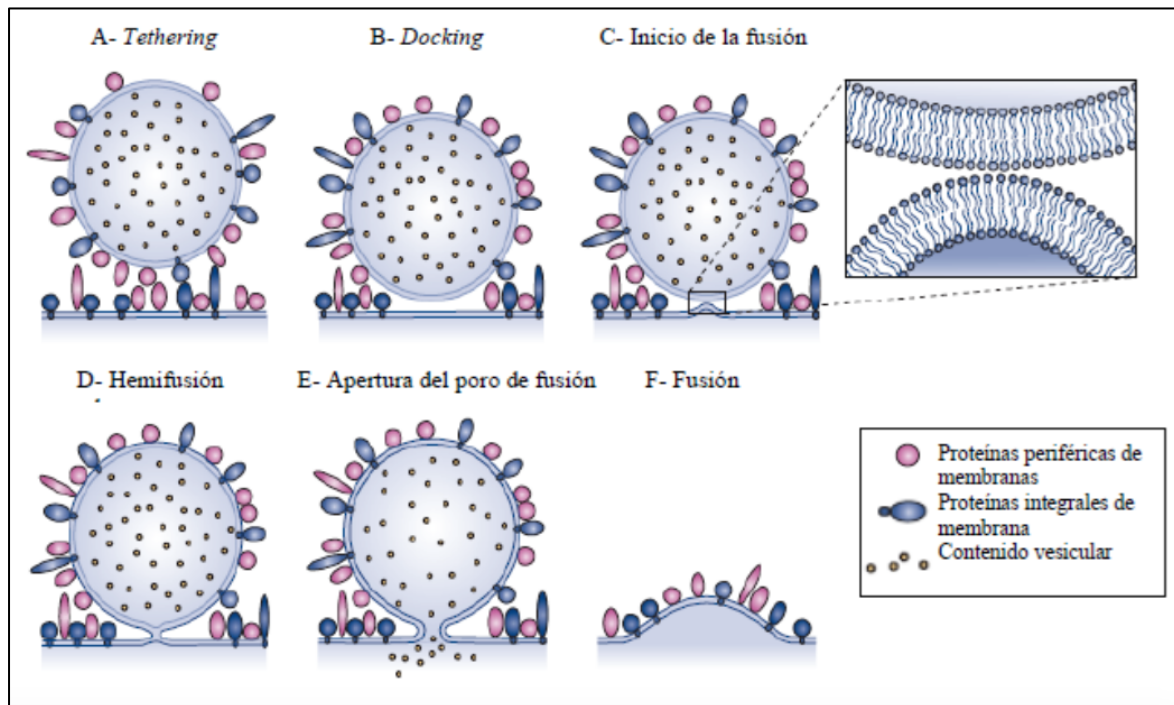


Figura 8. Etapas en los eventos de fusión para la exocitosis. **A)** Se produce el acercamiento de la vesícula a la membrana plasmática, *tethering*. Durante este proceso se activan proteínas específicas y sus moléculas efectoras que participan en el reconocimiento y acercamiento de ambas membranas. **B)** Se produce el *docking*, donde las membranas se acercan aún más y las SNAREs interaccionan formando complejos trans, hasta que un estímulo inicia la fusión **(C)**. **D)** Se genera un estado intermedio de hemifusión entre la membrana plasmática y la membrana de la vesícula. **E)** Se produce la apertura del poro de fusión que permite la liberación del contenido de la vesícula hacia el exterior. **F)** La fusión ya se ha completado y se ha incorporado la membrana de la vesícula en la membrana plasmática. Figura adaptada de Martens y McMahon, 2008.

6.3 EL SITIO Y EL/LOS INDUCTOR(ES)

El lugar específico en donde tiene lugar *in vivo* la EA en mamíferos es motivo de controversia en la actualidad y por lo tanto tampoco se sabe aún con certeza cuál(es) es(son) el(los) inductor(es) fisiológico(s) de la misma. Durante varios años se postuló que el espermatozoide para poder llevar a cabo la exocitosis debía interaccionar directamente con la ZP del ovocito (Saling et al., 1979). Entre las glicoproteínas que conforman a la ZP, ZP3 era el principal inductor de la EA en los espermatozoides de humano y ratón (Gupta and Bhandari, 2011), por lo que los esfuerzos se enfocaron en identificar a las moléculas participantes en la vía de señalización que esta proteína desencadena (Bhandari et al., 2010; José et al., 2010). De esta manera el espermatozoide una vez reaccionado e hiperactivado podía penetrar en el espacio perivitelino (ver **Figura 9, Escenario 4**). Sin embargo recientes reportes comenzaron

a cuestionar el paradigma establecido sobre la identidad del principal inductor fisiológico de la EA, como el lugar en donde sucede este proceso. Un grupo demostró que no era suficiente la unión a la ZP para la inducción de la exocitosis (Baibakov et al., 2007). Una evidencia aún más fuerte apareció recientemente mostrando que los espermatozoides de ratón que logran penetrar la zona y fecundar al ovocito en condiciones *in vitro*, iniciaron la EA antes de tomar contacto con la ZP (Inoue et al., 2011; Jin et al., 2011) (**Figura 9, Escenarios 1 a 3**). En este marco, la progesterona (Prog), esteroide producido por las células del cúmulus y de la granulosa del ovocito, ha emergido nuevamente como el potencial inductor fisiológico de la EA dado que si bien ya se conocía que este esteroide estimulaba la EA (Osman et al., 1989; Roldan et al., 1994), las evidencias utilizando proteínas de la ZP, en particular luego de ser solubilizadas, eran muy consistentes. En las concentraciones encontradas en el tracto reproductor femenino, la progesterona también ha sido implicada en otros aspectos de la fisiología del espermatozoide, tales como la capacitación, la quimiotaxis, la movilidad y la hiperactivación (Gatica et al., 2013; Lishko et al., 2011; Oren-Benaroya et al., 2008; Sagare-Patil et al., 2012; Servin-Vences et al., 2012; Strünker et al., 2011), aunque los mecanismos moleculares o las vías de señalización involucradas en estos procesos son poco conocidos. Se sabe que la progesterona actúa vía mecanismos no genómicos (Lishko et al., 2011; Miller et al., 2016a; Strünker et al., 2011) e induce un aumento del calcio intracelular (Blackmore et al., 1990; Lishko et al., 2012), el cual es indispensable para que se lleve a cabo la EA. Sin embargo hoy en día existe gran variabilidad reportada en el tipo de respuesta del aumento de calcio intracelular inducido por la progesterona.

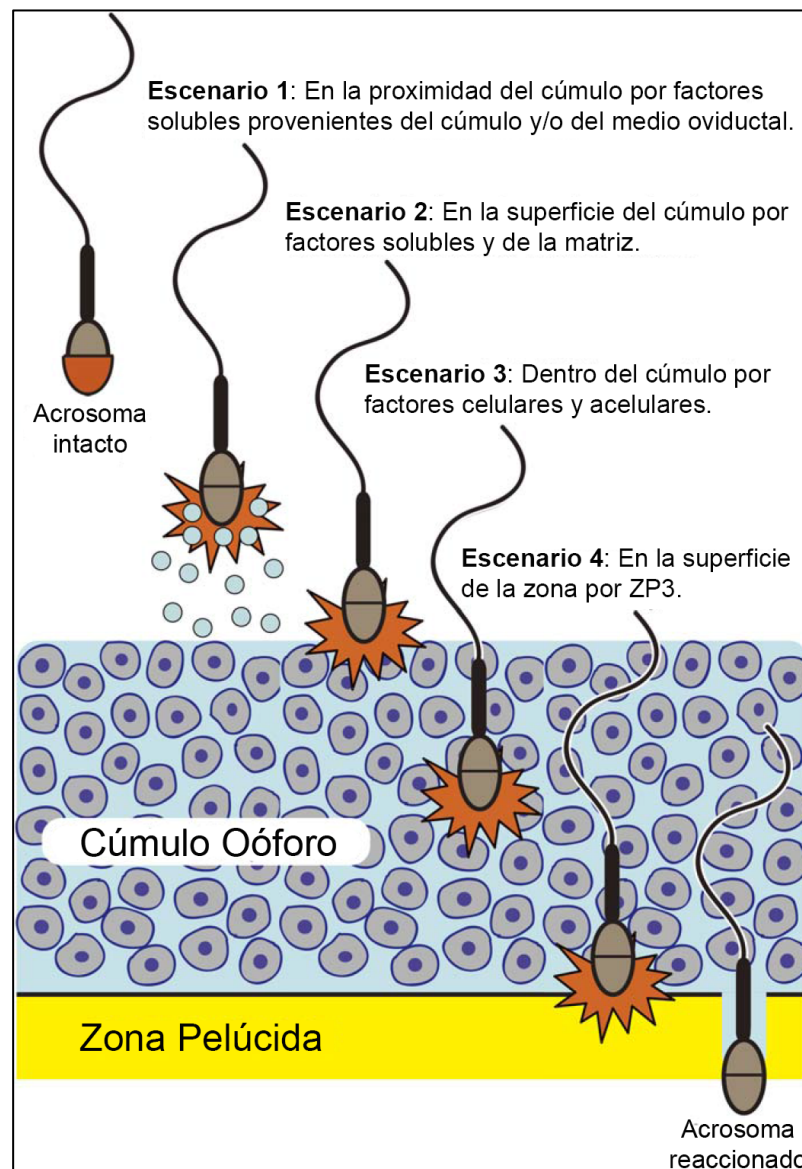


Figura 9. Sitios donde se produciría la EA. Los escenarios 1 a 4 ilustran los posibles lugares donde el espermatozoide puede experimentar EA en su camino a la fecundación. Figura adaptada de Buffone *et al.*, 2014b.

En relación al sitio en donde se produce la exocitosis, gracias a la utilización de espermatozoides de ratones transgénicos que expresan la proteína EGFP en el acrosoma (Hasuwa *et al.*, 2010), algunos trabajos evidencian que la mayoría de los espermatozoides realizan la EA en los segmentos altos del istmo oviductal (La Spina *et al.*, 2016; Muro *et al.*, 2016). Por los motivos expuestos, hoy en día el inductor fisiológico de la EA más utilizado y estudiado es la progesterona. Asimismo agentes farmacológicos no fisiológicos son utilizados de rutina en los laboratorios para inducir la EA entre los que se destacan la tapsigargina (que produce una liberación

del calcio almacenado en reservorios intracelulares) y los ionósforos de calcio (que producen un aumento de calcio intracelular proveniente del medio extracelular).

6.4 EL ROL DEL CALCIO

A pesar de que las vías de señalización asociadas a la EA son complejas, un incremento intracelular de Ca^{2+} , tal como en otros tipos de exocitosis, es indispensable para que la EA suceda. Las variaciones en la concentración del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) están altamente reguladas por canales y bombas en la membrana plasmática y en los sitios de almacenamiento intracelular como el acrosoma y la envoltura nuclear redundante (Correia et al., 2015; Costello et al., 2009; Darszon et al., 2011; Publicover et al., 2007). El calcio puede provenir de fuentes extracelulares e intracelulares (Florman and Ducibella, 2006). En particular, se sabe que el calcio proveniente de los reservorios intracelulares es fundamental para la EA, aunque aún no se sabe cuáles son los reservorios involucrados ni cuál es la dinámica entre este aumento de calcio y la EA. Una teoría postula que el acrosoma es un lugar donde se almacena calcio y que el agotamiento del Ca^{2+} del acrosoma activa canales regulados por almacenaje que permiten una entrada sostenida de Ca^{2+} desde el medio (Herrick et al., 2005). Por otro lado, otros han demostrado que el aumento de Ca^{2+} inducido por exposición a ZP o a progesterona se inicia en diferentes sitios de la cabeza del espermatozoide, indicando que estos agonistas pueden estimular la EA mediante diferentes mecanismos (Meizel et al., 1997; Fukami et al., 2003). Ho y Suarez (2003) identificaron la envoltura nuclear redundante en el extremo posterior de la cabeza del espermatozoide como un lugar de almacenaje de calcio. En este sentido, Xia y Ren (2009) recientemente han capturado imágenes de video utilizando la sonda sensible a las concentraciones de calcio Fluo-4 que indican que el aumento de Ca^{2+} inducido por la ZP se inicia en la cola del espermatozoide (cerca del annulus) y se propaga hacia la cabeza (dirección anterógrada). Mediante estudios de *imaging* de calcio, se determinó que la ola anterógrada de calcio en respuesta a ZP soluble sugiere que un lugar de almacenaje de calcio cercano a la zona de unión cabeza-cola podría estar asociado a la EA estimulada por ZP (Ho y Suarez, 2003; Costello et al., 2009). La dirección de la ola de Ca^{2+} progresando desde la base de la cabeza hacia el extremo apical recuerda a los estudios que demuestran la anterógrada pérdida de GFP acrosomal en espermatozoides de ratones transgénicos expuestos a proteínas de

la ZP solubles (Buffone et al., 2009). Sin embargo, cabe destacar que como se comentó anteriormente, existe una gran variabilidad reportada en la respuesta del calcio a la inducción con progesterona.

En espermatozoides humanos capacitados, el estímulo con progesterona o ZP3 causa un aumento bifásico del $[Ca^{2+}]_i$ (Kirkman-Brown et al., 2002). La señal de calcio generada es compuesta, ya que presenta varias componentes. Por un lado, un aumento transitorio inicial que a menudo es seguido por un aumento sostenido del ión que conduciría a la exocitosis del gránulo (Costello et al., 2009; Darszon et al., 2007; Darszon et al., 2011) y por otro, por oscilaciones de calcio que estarían relacionadas al batido flagelar (Publicover et al., 2007). Se ha demostrado recientemente que la progesterona induce un influxo de Ca^{2+} mediado por canales CatSper (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011) aunque en ratones, los espermatozoides carentes de CatSper experimentan la EA normalmente, lo que sugiere que este canal no es esencial para este proceso en el ratón (Chung et al., 2011). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha registrado en forma simultánea los cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ y la exocitosis en espermatozoides individuales para analizar las respuestas a la progesterona. En un nuevo estudio lograron analizar en simultáneo las movilizaciones de calcio y la EA en espermatozoides humanos y observaron que algunas células presentan un pico de calcio en el instante previo a la exocitosis (Sánchez-Cárdenas et al., 2014). Sin embargo, hasta el momento no se conoce cuáles son las propiedades del aumento de calcio que ocurre al momento de la exocitosis inducida por progesterona en espermatozoides de ratón.

Actualmente, cuatro canales de calcio de membrana plasmática han sido propuestos como candidatos para producir el aumento en la $[Ca^{2+}]_i$: el canal CatSper específico de espermatozoides maduros; los canales SOCC (*stores operated calcium channels*), incluídos los TRPC, STIM y Orai; los canales operados por voltaje (VOCCS) y los canales CNG (*Cyclic Nucleotide-Gated*).

Por otro lado, se sabe que la vía de señalización de las proteínas SNAREs es dependiente de calcio y se encuentra involucrada en las etapas finales de la fusión de la MAE y la MP, a pesar de que aún hoy en día no hay un mecanismo reconocido para los movimientos de membrana que preceden a los puntos de fusión (Burgoyne and Morgan, 2003; De Blas et al., 2005; Mayorga et al., 2007a). Branham y colaboradores (Branham et al., 2006; Branham et al., 2009), han mostrado que el AMPc, vía la

activación de EPAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*), tiene la capacidad de disparar la secuencia completa de eventos necesarios para lograr la EA completa, incluyendo el anclaje del acrosoma a la membrana plasmática, el *priming* de la maquinaria de fusión, la movilización de Ca^{2+} , y la fusión de la MAE y la MP.

Asimismo se sabe que el calcio es fundamental para el proceso de despolimerización de la actina filamentosa que puede funcionar como una barrera para la EA (Aunis and Bader, 1988; Finkelstein et al., 2010; Hernández-González et al., 2000), evento sobre el cual nos referiremos en la sección siguiente.

6.5 EL ROL DEL CITOESQUELETO DE ACTINA

6.5.1 Componente clave de la exocitosis eucariótica

Todas las células eucariotas poseen un citoesqueleto, que constituye una estructura esencial para la biología celular. El citoesqueleto es una red compleja de filamentos entrelazados a través de la célula y se compone de tres elementos principales: los microfilamentos, los microtúbulos, y los filamentos intermedios. La actina es una proteína ATPasa globular y es la subunidad que forma los microfilamentos. Su masa molecular relativa es de alrededor de 42.000 Mr. La actina se presenta como monómero (actina-G o globular) o como parte de un polímero denominado actina-F (de filamentosa) (**Figura 10**). El citoesqueleto de actina participa en varios eventos celulares importantes, tales como la movilidad celular, la contracción muscular, la división celular, la citocinesis, la señalización, el movimiento de organelas, el control y la forma de las uniones intercelulares, y la endo/exocitosis. Algunos de estos procesos son mediados por las estrechas interacciones entre la actina y otras proteínas de la membrana plasmática.

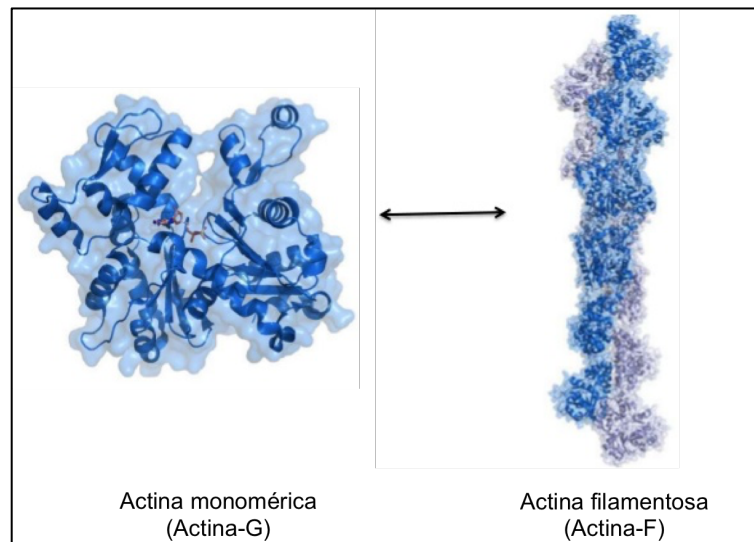


Figura 10. Esquema de la polimerización de actina. La actina se polimeriza pasando de su forma monomérica o globular a su forma filamentosa. Figura adaptada de <http://www.slideshare.net/suknamgoong/structural-basis-of-actin-nucleation>.

Las células simultáneamente forman, mantienen y desarman distintas redes de actina-F para facilitar un proceso determinado (Blanchoin et al., 2014; Chhabra and Higgs, 2007). Las redes de actina-F poseen una organización y una dinámica específica que son controladas mediante la acción de diferentes proteínas de unión a la actina con una variedad de funciones que incluyen el montaje, el capping de los extremos, la unión de monómeros de actina, la agrupación y el corte/desensamblaje (Blanchoin et al., 2014). Por lo tanto, el montaje, la organización y la dinámica de las redes de actina-F son controlados por la regulación espacial y temporal de la actividad de las proteínas de unión a la actina.

Se sabe que los pasos finales de la exocitosis regulada, como el anclaje de las vesículas y la fusión de membranas, son regulados por una maquinaria de fusión que opera constitutivamente y es compartida por muchos procesos de tráfico vesicular y bloqueos especializados para prevenir la fusión hasta que las señales apropiadas sean recibidas (Malacombe et al., 2006; Muallem et al., 1995). El citoesqueleto de actina que se encuentra en estrecha interacción con la membrana plasmática, ha sido propuesto durante mucho tiempo como una barrera física para el anclaje de los gránulos, ya que se despolimeriza transitoriamente durante la exocitosis. Sin embargo, también se ha informado que ciertas drogas que causan la despolimerización de la actina no dan lugar a la exocitosis pero pueden potenciar las respuestas evocadas por agonistas de la exocitosis (Lelkes et al., 1986; Matter et al.,

1989; Sontag et al., 1988), lo que sugiere que la disolución del citoesqueleto de actina es una parte necesaria aunque no suficiente de la exocitosis regulada.

La participación del citoesqueleto de actina en los procesos de secreción controlada fue demostrada por primera vez en células beta pancreáticas. Se encontró que los gránulos que contienen insulina presentes en estas células co-sedimentan con actina filamentosa (Malaisse et al., 1971; Orci et al., 1972). Esta co-sedimentación se redujo tras la adición de calcio (Howell and Tyhurst, 1979). Estudios posteriores han indicado que la actina-F se encuentra organizada como una densa red por debajo de la membrana plasmática, lo que impediría el acceso de los gránulos con insulina a la periferia celular (Howell and Tyhurst, 1979; Orci et al., 1972; Snabes and Boyd, 1982; Somers et al., 1979; Wang et al., 1990). También se ha reportado que los agentes disruptores de la actina-F, tales como las citocalasinas, mostraron una mayor secreción de insulina inducida por secretagogos, lo que sugiere que la actina-F bloquea el movimiento de los gránulos (Li et al., 1994; Malaisse et al., 1976; van Obberghen et al., 1973). Sin embargo, otros autores han demostrado la existencia de conjuntos de filamentos de actina insensibles a la citocalasina (Cassimeris et al., 1990).

El citoesqueleto de actina también está asociado al proceso de endocitosis, el cual está relacionado con cambios en la forma de la membrana como resultado de fusiones e invaginaciones. Estos eventos son adecuadamente coordinados en tiempo y espacio, en parte, por elementos del citoesqueleto en la mayoría de los casos, si no en todos. La interacción entre las maquinarias basales endo y exocitóticas sugiere que estos procesos pueden haber evolucionado como uno, en lugar de dos procesos diferenciados para controlar el tráfico intracelular de membranas (Jaiswal et al., 2009).

6.5.2 La actina y sus proteínas de unión en el espermatozoide de los mamíferos

En el espermatozoide de los mamíferos, la actina está presente tanto en su forma monomérica como filamentosa (De las Heras et al., 1997; Delgado-Buenrostro et al., 2005b; Flaherty et al., 1988; Hernández-González et al., 2000; Moreno Fierros et al., 1992; Oikonomopoulou et al., 2009; Vogl et al., 1993). Las regiones del espermatozoide que contienen actina incluyen la matriz acrosomal (Zepeda-Bastida

et al., 2011), la región ecuatorial y post-acrosomal, y el flagelo (Flaherty et al., 1988). La presencia de actina en el flagelo podría ser importante para la regulación de la movilidad, y su presencia en la cabeza sugiere una posible participación en la EA, así como en la fusión entre el espermatozoide y el ovocito. En particular, la presencia de actina en la matriz del acrosoma podría estar asociada con la liberación diferencial de ciertos componentes acrosomales (Kim and Gerton, 2003) y con la progresión organizada de la exocitosis (Buffone et al., 2009). Sin embargo, son necesarios experimentos adicionales para validar esta hipótesis. La expresión de varias proteínas asociadas a la actina en el espermatozoide de los mamíferos (algunas de las cuales son específicas del testículo) sugiere que la polimerización y despolimerización de actina podría estar involucrada en ciertos aspectos de la función del espermatozoide. En la Tabla 1 se muestra un resumen de las proteínas de unión a la actina registradas en el espermatozoide de mamífero y sus posibles funciones.

Tabla 1. Proteínas relacionadas con la actina en el espermatozoide de mamífero

Proteína	Especie	Posible función en el espermatozoide	Referencias
Alfa actinin	Bovino	Estructura y estabilización del citoesqueleto.	Yagi y Paranko (1992)
Tropomyosin	Bovino	Estructura y estabilización del citoesqueleto.	Yagi y Paranko (1992)
Spectrin	Humano, conejo, cobayo	Estructura y estabilización del citoesqueleto.	Virtanen <i>et al.</i> (1984), Camatini <i>et al.</i> (1991), Ocampo <i>et al.</i> (2005)
Calicin	Humano, jabalí, cobayo, hámster, rata, ratón, toro	Elemento morfogenético del citoesqueleto en la diferenciación espermiogénica. Estructura y estabilización del citoesqueleto.	von Bülow <i>et al.</i> (1995), Longo <i>et al.</i> (1987), Parank <i>et al.</i> (1988)
CPbeta3	Humano, bovino	Componentes del cáliz del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de mamífero.	von Bülow <i>et al.</i> (1997)
CPa3	Ratón	Componentes del cáliz del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de mamífero.	Tanaka <i>et al.</i> (1994)
Arp-T1	Toro	Componentes del cáliz del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de mamífero. Nucleación de filamentos de actina.	Heid (2002)
Arp-T2	Toro	Componentes del cáliz del citoesqueleto de la cabeza del espermatozoide de mamífero. Nucleación de filamentos de actina.	Heid (2002)
Myosin	Humano, bovino	Motores moleculares.	Clarke y Yanagimachi (1978), Tamblin (1983), Oikonomopoulou <i>et al.</i> (2009), Sosnik <i>et al.</i> (2009)
Gelsolin	Carnero, humano, cobayo	Corta los filamentos de actina durante la EA.	De las Heras <i>et al.</i> (1997), Cabello-Agüeros <i>et al.</i> (2003), Finkelstein <i>et al.</i> (2010)
Scinderin	Bovino	Proteína calcio-dependiente que corta filamentos de actina.	Pelletier <i>et al.</i> (1999)
Destrin	Bovino	Corta filamentos de actina (actina-F) y se une a monómeros de actina (actina-G).	Howes <i>et al.</i> (2001)
Cofilin	Bovino, ratón, humano	Nucleación o despolimerización de la actina en el espermatozoide.	Fiedler <i>et al.</i> (2008), Megnagi <i>et al.</i> (2015)
CAPZA3	Ratón	Proteína de capping del extremo positivo de los filamentos de actina específica del espermatozoide que mantiene la actina polimerizada durante la espermiogénesis.	Sosnik <i>et al.</i> (2010), Geyer <i>et al.</i> (2009)
Arc	Ratón	Posible rol en la formación del acrosoma y la EA del espermatozoide.	Maier <i>et al.</i> (2003)
Arp2/3	Ratón, cobayo	Generación de redes ramificadas de actina.	Lee <i>et al.</i> (2015), Chiquete-Felix <i>et al.</i> (2009)

6.5.3 La capacitación prepara al espermatozoide para experimentar la exocitosis acrosomal

Hoy en día, no está claro cuál es el inductor fisiológico de la EA ni el sitio dónde se desarrolla (Buffone et al., 2014b). Lo que queda absolutamente claro es que la EA es un requisito previo indispensable para la fecundación dado que su ocurrencia produce la relocalización de Izumo1 (Inoue et al., 2005), que es esencial para la fusión entre el espermatozoide y el ovocito (Satouh et al., 2012; Sosnik et al., 2009). Como consecuencia, la EA debe ser estrictamente regulada para garantizar una fecundación exitosa.

En el pasado, varios eventos fisiológicos del proceso de capacitación han sido diseccionados. Sin embargo, ¿cuáles son los mecanismos subyacentes que convierten al espermatozoide de un estado insensible a la estimulación de la EA por agonistas a uno dispuesto a responder a estos estímulos?. Es sabido que cuando los espermatozoides son incubados en condiciones capacitantes, atraviesan de forma espontánea estadios intermedios, morfológicos y bioquímicos de exocitosis, que conducen a una exposición creciente y a la eventual liberación de los componentes del acrosoma. La tasa de esta liberación depende de su estado dentro del acrosoma: soluble o particulado (asociado a la matriz acrosomal) (Buffone et al., 2008; Kim and Gerton, 2003; Stock and Fraser, 1987; Yudin et al., 1998). Así, durante la capacitación, el espermatozoide comienza siendo insensible a los estímulos, pero luego, ciertos cambios moleculares que ocurren dentro del tracto reproductor femenino permiten que estas células abandonen el estado “metaestable”, representado por los estadios intermedios de exocitosis durante la capacitación, y finalmente realicen la EA tras la interacción con el estímulo apropiado.

En este escenario, la regulación estricta de la EA para asegurar el éxito de la fecundación es controlada de varias maneras: mediante la activación de vías de señalización específicas, cambios biofísicos a nivel de la membrana plasmática, activación de la maquinaria de fusión, y la estructura del citoesqueleto de actina.

En otras células de mamíferos, la red de actina cortical actúa como una barrera dominante negativa que bloquea la exocitosis constitutiva (Muallem et al., 1995) pero, al mismo tiempo, es necesaria para preparar a la célula para que realice la exocitosis regulada. Por lo tanto, la actina-F estabiliza las estructuras generadas por

la exocitosis y permite la progresión fisiológica de este proceso. ¿Sucedre lo mismo en el espermatozoide de los mamíferos?

6.5.3a Polimerización de actina durante la capacitación del espermatozoide de mamífero

La evidencia de diferentes laboratorios indica que la polimerización de actina ocurre durante la capacitación del espermatozoide en varias especies de mamíferos como el jabalí, el cobayo, el ratón, el conejo, los bovinos y el humano (Baltierrez-Hoyos et al., 2012a; Brener et al., 2003b; Cabello-Agüeros et al., 2003; Castellani-Ceresa et al., 1993; Lee et al., 2015). Se ha observado el aumento en la actina-F tanto en la cabeza del espermatozoide como en el flagelo.

Se sabe que en la mayoría de las células secretoras, las vesículas o gránulos están a cierta distancia de la membrana plasmática, lo que implica que deben ser transportadas para acceder a los sitios exocitóticos (Malacombe et al., 2006). El tráfico entre estos dos depósitos de gránulos está sujeto a una fina regulación por parte del citoesqueleto de actina que incluye el desensamblaje local de los filamentos de actina, lo que permite que los gránulos secretores obtengan acceso a la membrana plasmática, donde el anclaje y la fusión se producen en los sitios exocitóticos (Orci et al., 1972; Sontag et al., 1988; Vitale et al., 1995). Aunque el acrosoma del espermatozoide es una vesícula única, la situación puede ser similar. En informes recientes, Zanetti y colaboradores (Zanetti and Mayorga, 2009) demostraron la coexistencia de diferentes etapas de anclaje del acrosoma a la membrana plasmática en el transcurso de la capacitación como resultado del hinchamiento del acrosoma y, posiblemente, a causa de los cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina. Mientras que en algunas áreas la MP y la MAE no están en contacto o “ancladas”, en otras regiones sí lo están. La primera situación representaría o sería análoga al *pool* de vesículas que no están listas para realizar exocitosis, mientras que la segunda representa los gránulos que fueron transportados a los sitios exocitóticos.

¿Cuáles son las vías de señalización involucradas en la polimerización de actina en el espermatozoide de mamífero? Las siguientes secciones resumen lo que se propone actualmente para el espermatozoide de ratón, humano, cobayo y bovino.

Vías de señalización involucradas en la polimerización de actina en el espermatozoide de mamífero

COMUNICACIÓN CRUZADA ENTRE LA PKA Y LA PKC Y REGULACIÓN DE LA PLD1

Se ha demostrado que la fosfolipasa D (PLD) induce la polimerización de actina durante la capacitación en los espermatozoides bovinos (Cohen et al., 2004). La actividad de la PLD aumenta constantemente durante la capacitación. La polimerización de actina se ve significativamente inhibida por los inhibidores de la PLD butan-1-ol y C2-ceramida, pero no por el butan-2-ol. Además, el agregado de PLD o PA (ácido fosfatídico) exógenos promueven la polimerización de actina, que en este último caso no es inhibida por el butan-1-ol (Cohen et al., 2004).

La PLD1 es activada por una comunicación cruzada entre la PKA y la proteína quinasa C (PKC) durante la capacitación. La PKA, que se sabe que se activa rápidamente cuando los espermatozoides son incubados en condiciones capacitantes (Buffone et al., 2014a), y la PKC, la cual fue reportada previamente como involucrada en la EA (Chen et al., 2000; Liu and Baker, 1997), pueden activar tanto a la PLD como la polimerización de actina (Cohen et al., 2004). Una posibilidad es que la inhibición de la PKA hacia el final de la capacitación cause la activación de la PKC para completar la EA (Cohen et al., 2004). Sin embargo, es necesaria experimentación adicional para aclarar esta vía.

El fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) es necesario como cofactor para la activación de la PLD. Los incrementos en los niveles intracelulares de PIP₂ y actina-F durante la capacitación espermática serían vía la actividad de la PI4K (Etkovitz et al., 2007). La activación de la PKA con dibutiril AMPc incrementa la formación de PIP₂, PIP₃, y actina-F, y estos efectos serían vía la PI3K. Por otra parte, la activación de la PKC mediante acetato de forbol miristato estimularía la formación de PIP₂ y actina-F vía la actividad de la PI4K, mientras que la actividad de la PI3K y los niveles intracelulares de PIP₃ disminuyen (Etkovitz et al., 2007).

Además, se ha reportado recientemente que el diacilglicerol estimula la EA participando de un circuito de retroalimentación positiva dependiente de PKC y PLD1 que produce fosfatidilinositol 4,5-bifosfato de forma constante (Lopez et al., 2012). Roldan y Dawes (1993) han sugerido que la PLD no hace una contribución sustancial

a los eventos que conducen a la EA. Además, los ratones KO para la *pld1* son fértiles, lo que sugiere que esta proteína puede ser funcionalmente compensada por la PLD2 o por cualquiera de las otras enzimas que incrementan los niveles de ácido fosfatídico (Jenkins and Frohman, 2005).

LAS PEQUEÑAS GTPASAS Y LA ACTIVACIÓN DE LIMK1 Y COFILIN

En las células somáticas, las pequeñas GTPasas de la familia Rho son ampliamente conocidas como reguladoras maestras de la dinámica del citoesqueleto de actina (Heasman and Ridley, 2008). Sin embargo, el rol de estas proteínas en el espermatozoide no ha sido estudiado en detalle dado que la eliminación selectiva de las mismas o de cualquiera de sus efectores río abajo resulta en letalidad embrionaria. En los mamíferos, la familia Rho se compone de las pequeñas GTPasas Rho, Rac y Cdc42. Todas ellas alternan entre una forma activa cuando están unidas a GTP y una inactiva cuando se unen a GDP. El ciclo de las GTPasas Rho entre estos dos estados es regulado por tres conjuntos de proteínas: los factores intercambiadores de nucleótidos guanina (GEFs), las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), y los inhibidores de la disociación de los nucleótidos guanina (GDIs). Las pequeñas GTPasas activan proteínas efectoras río abajo que subsiguientemente estimulan una serie de procesos celulares. La activación de Rho, Rac y Cdc42 y la resultante transducción de señales mediante los efectores río abajo resulta en la fosforilación de las quinasas LIM (LIMKs; compuesta por LIMK1 y LIMK2 en los mamíferos) (Ohashi et al., 2000). La activación de las LIMKs resulta en la fosforilación de Cofilin (Bernstein and Bamburg, 2011). Cofilin es una proteína de unión a la actina que regula el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina. La actividad de Cofilin es regulada por varios mecanismos, siendo la fosforilación la mejor caracterizada. Las LIMKs fosforilan a Cofilin específicamente en Serina 3 y por lo tanto inhiben la actividad de unión, corte y despolimerización de la actina propia de Cofilin. Por lo tanto, es de esperar que las proteínas quinasas y fosfatasas asociadas a la fosforilación y desfosforilación de Cofilin en Serina 3 jueguen un papel central en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina.

Reportes previos han demostrado la presencia de algunas pequeñas GTPasas y algunos de sus efectores río abajo en el espermatozoide de mamífero (Baltierrez-Hoyos et al., 2012a; Ducummon and Berger, 2006; Fiedler et al., 2008; Freeman et al.,

2002). En particular, en el espermatozoide de cobayo, se ha sugerido que las pequeñas GTPasas RhoA, RhoB y Cdc42 participan en la EA (Delgado-Buenrostro et al., 2005b).

EL COMPLEJO ARP2/3

Las funciones dinámicas del citoesqueleto de actina requieren la generación de redes de actina ramificadas. El complejo de proteínas asociadas a la actina 2 y 3 (Arp2/3) es la máquina molecular que nuclea estas redes de actina ramificadas (Mullins et al., 1998). El complejo Arp2/3 está compuesto por Arp2, Arp3, y cinco subunidades Arp: Arpc1, Arpc2, Arpc3, Arpc4, y Arpc5 (Campellone and Welch, 2010; Goley and Welch, 2006). Cuando el complejo Arp2/3 es estimulado por proteínas promotoras de la nucleación, se activa para iniciar la formación de un nuevo filamento que emerge de un filamento ya existente en una configuración de ramificación con un ángulo regular de 70° (Amann and Pollard, 2001). El acople entre la nucleación y la ramificación por el complejo Arp2/3 se conoce como ramificación autocatalítica y es clave para sus funciones *in vivo* (Goley et al., 2006).

En el espermatozoide, poco se sabe acerca del papel de estas proteínas. Recientemente, Lee y colaboradores (Lee et al., 2015) informaron que la inhibición del complejo Arp2/3 utilizando elevadas concentraciones del inhibidor CK-636 indujo una movilidad hiperactivada y la EA. Además, la inhibición del complejo Arp2/3 con CK-636 redujo la proporción de actina-F/actina-G de manera dosis-dependiente. Son necesarias investigaciones adicionales para entender estas observaciones.

En el espermatozoide de cobayo, se ha afirmado que la aldolasa A se encuentra estrechamente asociada a estructuras del citoesqueleto donde interactúa con la actina y el complejo Arp2/3 (Chiquete-Felix et al., 2009), lo que sugiere que la aldolasa A sirve de puente entre los filamentos de actina y la maquinaria polimerizadora de actina.

6.5.3b La despolimerización de actina durante la exocitosis acrosomal

Numerosos datos obtenidos por muchos investigadores utilizando drogas que perturban la actina, indicaron que la estabilización de la red de actina inhibe la exocitosis, mientras que la despolimerización de esta red aumenta la cantidad de gránulos secretores anclados y por lo tanto favorece la respuesta exocitótica (Chowdhury et al., 1999; Chowdhury et al., 2000; Ehre, 2004; Gasman et al., 2004; Muallem et al., 1995). Sin embargo, algunas observaciones no respaldan por completo esta única función para la actina, sino que sugieren una participación más activa en el proceso exocitótico (Matter et al., 1989; Muallem et al., 1995; Norman et al., 1994; Pendleton and Koffer, 2001). En general, estos autores han observado que bajas dosis de drogas despolimerizantes de actina promovían la exocitosis mientras que dosis más altas inhibían por completo el proceso, sugiriendo que la actina cortical no es simplemente una barrera que obstaculiza el movimiento de vesículas hacia la membrana plasmática, sino que también juega un rol en la maquinaria exocitótica.

Utilizando un sistema libre de células para estudiar la fusión de membranas durante la exocitosis del espermatozoide, se ha postulado que es necesaria una rápida despolimerización de la red de actina para que la exocitosis se produzca (Spungin et al., 1995). Los autores demostraron que la actina-F cortical sirve como una barrera física para la fusión de membranas que es removida por los aumentos en el calcio y el pH intracelulares, eventos que preceden a la fusión (Spungin et al., 1995). Estos datos son consistentes con los hallazgos que muestran que la actina desaparece del acrosoma tras la exocitosis (Hernández-González et al., 2000) dado que la actina en el espacio citoplasmático entre la MAE y la MP se desprendería dentro de las vesículas de membrana híbrida. Por otra parte, la inhibición de la polimerización de actina bloquea la EA inducida por la ZP, así como la penetración del espermatozoide en ovocitos libres de zona y su capacidad fecundante *in vitro* (Brener et al., 2003b; Castellani-Ceresa et al., 1993; Rogers and Russell, 1989).

¿Cómo es que se despolimeriza la red de actina en el inicio de la EA? En tipos celulares especializados, como las neuronas y las células endócrinas, la exocitosis de neurotransmisores y hormonas se produce en respuesta a un estímulo específico que por lo general culmina en una elevación en el calcio intracelular libre. Algunas proteínas de unión a la actina como Gelsolin y Scinderin cortan los filamentos ensamblados de actina y tapan el extremo positivo de rápido crecimiento de los filamentos libres o recientemente cortados en respuesta a iones de calcio. La proteína

Gelsolin se expresa en el espermatozoide de varias especies de mamíferos (Cabello-Agüeros et al., 2003; Finkelstein et al., 2010). Recientemente, se ha demostrado que Gelsolin permanece inactiva durante la capacitación y es activada previo a la EA. La activación de Gelsolin por su liberación de PIP2 por activación de la PLC, que hidroliza PIP2, causa una rápida despolimerización de la actina-F dependiente de calcio y, por consiguiente, la EA. Sin embargo, es posible que otras proteínas de corte de la actina-F también participen en estas etapas finales de la exocitosis dado que ratones con una delección del gen de *gelsolin* no mostraron ninguna alteración en su capacidad reproductiva (Witke et al., 1995). La proteína Scinderin, que también se expresa en el espermatozoide de los mamíferos (Pelletier et al., 1999), podría ser una de ellas, ya que su actividad se encuentra altamente modulada por los niveles intracelulares de calcio.

HIPÓTESIS

En virtud de nuestro objetivo general, se postulan las siguientes hipótesis de trabajo:

1) Los cambios en el citoesqueleto de actina que ocurren durante la capacitación espermática, necesarios para la ocurrencia de la exocitosis acrosomal, son regulados por la vía de señalización de las pequeñas GTPasas de la familia Rho cuyos efectores principales son la quinasa LIMK1 y la proteína Cofilin.

2) La progesterona produce un aumento en el calcio intracelular en la cabeza de los espermatozoides con un patrón espacio-temporal específico, que determina el inicio de los eventos finales de la exocitosis acrosomal.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos moleculares asociados a la exocitosis acrosomal en espermatozoides de mamífero, el cual es un paso esencial en el proceso de fecundación, investigando la participación de dos actores principales para la ocurrencia de este proceso, como son el citoesqueleto de actina (**Capítulo I**) y el aumento del calcio intracelular (**Capítulo II**).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la participación de la vía de transducción de señales de las pequeñas GTPasas de la familia Rho en el control de la polimerización de actina y la exocitosis acrosomal del espermatozoide de ratón (**Capítulo I**).
2. Estudiar los cambios espacio-temporales en el $[Ca^{2+}]_i$ y la EA en espermatozoides individuales de ratón tras la estimulación con progesterona, por métodos de imagen en célula viva (**Capítulo II**).

CAPÍTULO I – ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE LAS PEQUEÑAS GTPASAS DE LA FAMILIA RHO EN EL CONTROL DE LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de los mamíferos no son capaces de fecundar a los ovocitos inmediatamente después de la eyaculación. Deben someterse a una serie de modificaciones bioquímicas en el tracto reproductor femenino colectivamente llamadas capacitación (Austin, 1951; Chang, 1951). La capacitación prepara al espermatozoide para desarrollar dos características principales que son esenciales para que ocurra la fecundación: la capacidad de desarrollar movilidad hiperactivada y la adquisición de la habilidad para realizar un evento secretorio conocido como EA. Hombres o ratones que portan mutaciones que afectan la formación del acrosoma son infértiles o poseen algún grado de subfertilidad (Dam et al., 2007; Kang-Decker et al., 2001; Lin et al., 2007). Para penetrar la ZP, la matriz extracelular que rodea al ovocito, los espermatozoides de mamífero deben realizar la EA (Buffone et al., 2009; Yanagimachi, 1994b). Además, solo los espermatozoides reaccionados son capaces de relocalizar Izumo1 (Inoue et al., 2005), una proteína esencial para la fusión del espermatozoide-ovocito, al segmento ecuatorial (Miranda et al., 2009).

Una pregunta importante aún sin resolver respecto a la EA es cómo la capacitación desencadena la preparación del acrosoma para la exocitosis. Luego del anclaje o *docking* de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, la maquinaria de fusión necesita ser ensamblada para que se produzca la exocitosis (Mayorga et al., 2007b). Muchos grupos han identificado proteínas en el espermatozoide que previamente han sido involucradas en la exocitosis de células secretoras, como Rab3A, la familia de las SNAREs, α -SNAP, NSF, complexina, la proteína que une calcio sinaptotagmina, calmodulina y dinamina entre otras (De Blas et al., 2005; Hutt et al., 2005; Michaut et al., 2001; Rodríguez et al., 2011; Roggero et al., 2007; Tomes et al., 2005; Yunes et al., 2002; Zhao et al., 2007). Además, se demostró recientemente que la hiperpolarización de la membrana que ocurre durante la capacitación es necesaria

y suficiente para preparar al espermatozoide para realizar la EA bajo el estímulo apropiado (De La Vega-Beltran et al., 2012). Sin embargo, todavía no se conoce cómo un cambio en el potencial de membrana u otros eventos moleculares que preparan al espermatozoide para realizar la exocitosis interactúan durante la capacitación. Un mecanismo posible que podría coordinar diferentes aspectos de la señalización celular en el espermatozoide es la regulación del citoesqueleto de actina. En células somáticas, la dinámica de actina juega un papel central en controlar el proceso de exo/endocitosis (Porat-Shliom et al., 2013). En varias especies de mamíferos, la polimerización de actina ocurre durante la capacitación del espermatozoide (Brenner et al., 2003a; Cabello-Agüeros et al., 2003; Hernández-González et al., 2000). Además, se ha propuesto que los filamentos de actina polimerizada (actina-F) son despolimerizados previo a que la EA tenga lugar (Cabello-Agüeros et al., 2003; Finkelstein et al., 2010; Spungin et al., 1995). La polimerización de actina durante la capacitación ocurre no solo en la cabeza del espermatozoide sino también en el flagelo (Itach et al., 2012). La formación de actina-F inducida por la capacitación que ocurre en la cabeza del espermatozoide podría jugar un papel importante en la estabilización de las estructuras fusogénicas observadas durante la capacitación. En otros sistemas, la red de actina cortical actúa como una barrera que bloquea la exocitosis constitutiva (Muallen et al., 1995). Nemoto et al. (2004) revelaron que los gránulos recientemente fusionados en las células acinares pancreáticas son rápidamente cubiertos con actina-F lo cual enlentece la tasa de fusión sin reducir el nivel general de exocitosis. Por lo tanto, la actina-F estabiliza estructuras generadas por exocitosis y regula la progresión fisiológica de este evento.

Se ha reportado que la polimerización de actina en el espermatozoide depende de la actividad de la PLD y se encuentra regulada por la comunicación cruzada entre la PKA y la PKC (Cohen et al., 2004). En las células somáticas, las pequeñas GTPasas de la familia Rho son ampliamente conocidas como reguladores esenciales de la dinámica de actina. Sin embargo, el rol de estas proteínas en el espermatozoide no ha sido estudiado en detalle. En los mamíferos, la familia Rho está compuesta por las pequeñas GTPasas Rho, Rac y Cdc42 que alternan entre una forma activa unida a GTP y una forma inactiva unida a GDP. El ciclado de las GTPasas Rho entre estos dos estados está regulado por tres tipos de proteínas: los factores intercambiadores de nucleótidos guanina (GEFs), las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) y los

inhibidores de disociación de nucleótidos guanina (GDIs). Algunos reportes han demostrado la presencia de las pequeñas GTPasas en el espermatozoide de mamífero (Baltierrez-Hoyos et al., 2012b; Ducummon and Berger, 2006; Fiedler et al., 2008; Freeman et al., 2002). En el espermatozoide de cobayo, fue sugerido que las pequeñas GTPasas Rho A, Rho B y Cdc42 podrían participar en la EA (Delgado-Buenrostro et al., 2005a). Sin embargo, su función en el espermatozoide maduro de ratón sigue siendo aún desconocida.

Las pequeñas GTPasas, cuando se encuentran unidas a GTP, activan proteínas efectoras estimulando así una variedad de procesos celulares como la morfogénesis, la migración celular, el transporte de vesículas, la dinámica de actina, etc. Interesantemente, la activación de Rho, Rac y Cdc42 y la subsiguiente transducción de la señal a través de efectores específicos promueve la fosforilación de las quinasas LIM (LIMKs; compuesta de LIMK1 y LIMK2 en mamíferos) (Amano et al., 2001; Ohashi et al., 2000). A su vez, la fosforilación de LIMKs resulta en la activación de Cofilin (Bernstein and Bamburg, 2011). Cofilin es una familia de proteínas de unión a actina que regulan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina. La actividad de Cofilin se encuentra regulada por varios mecanismos, de los cuales la fosforilación ha sido el mejor caracterizado. Las LIMKs fosforilan de manera específica a Cofilin en Serina 3 y de esta forma inhiben su unión a actina y su capacidad de despolimerizar la actina-F. Por lo tanto, las proteínas quinasas y fosfatasas involucradas en la fosforilación y desfosforilación de Cofilin en Ser-3 tendrían un rol central en la regulación de la dinámica de actina. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este capítulo nos proponemos estudiar la participación de la vía de transducción de señales de las pequeñas GTPasas de la familia Rho en el control de la polimerización de actina y la EA del espermatozoide de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

Los químicos fueron obtenidos de las siguientes fuentes: la albúmina de suero bovino (BSA), la progesterona, la faloidina marcada con TRITC y el ionóforo de calcio A23187 se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO); la Exoenzima C3 transferasa permeable a la membrana (C4) fue obtenida de Cytoskeleton (Denver, CO); Y-27632 fue adquirido de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI); el inhibidor de RAC1 en solución (CAS1177865-17-6) y H89 de Calbiochem; IPA-3, dibutiril-AMPc (dbAMPc) y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) de Sigma; BMS-3 de SynKinase (Parkville, Australia); el anticuerpo monoclonal anti-fosfo-tirosina (pY) (clone 4G10) se obtuvo de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY); los anticuerpos anti-RHOA, anti-RHOB, anti-RHOC, anti-ROCK, anti-PAK1, anti-LIMK1, anti-LIMK2, anti-Cofilin, anti-fosfo-LIMK1/2 (pLIMK1/2) y anti-fosfo-Cofilin (pCofilin) fueron obtenidos de Cell Signaling (Danvers, MA); el anticuerpo monoclonal anti- β -Tubulina fue obtenido de Sigma. Los anticuerpos anti-RAC1 y anti-ACTINA, y el yoduro de propidio (PI) fueron comprados en Santa Cruz (Santa Cruz, CA); las IgG anti-ratón y anti-conejo conjugadas con la peroxidasa de rabanito fueron adquiridas en Vector Laboratories (Burlingame, CA) y Cell Signaling respectivamente.

ANIMALES

Fueron utilizados, ratones machos híbridos F1 (C57BL/6xBalb/C) maduros (10-12 semanas), así como ratones machos maduros transgénicos [BDF1-Tg (CAG-mtDsRed2, Acr-EGFP) RBGS0020sb] que poseen espermatozoides que expresan la proteína fluorescente verde EGFP en el acrosoma y la proteína fluorescente roja Ds-Red2 en la pieza media (mitocondrias) (Hasuwa et al., 2010). Los animales fueron mantenidos a 23°C con ciclos de 12 hs de luz: 12 hs de oscuridad. Los procedimientos experimentales con animales fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética del IBYME (CE/003-1/2011). Los experimentos fueron realizados en estricto acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aprobados por los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos (NIH).

CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

En todos los experimentos, los espermatozoides de ratón fueron recuperados por incisiones de los cauda epididimarios en 500 µl de un medio Krebs-Ringer modificado (Whitten's-HEPES-buffered (WH) medium: 109.5 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5 mM glucosa, 0.23 mM ácido pirúvico, 4.8 mM ácido láctico L(+)) (Moore et al., 1994). Este medio, el cual no soporta la capacitación, fue preparado sin BSA y sin NaHCO_3 . Luego de 10 min de incubación a 37°C, los epidídimos fueron removidos, y los espermatozoides fueron resuspendidos a una concentración final máxima de 1×10^7 células/ml en el medio apropiado dependiendo del experimento a realizar. Para la capacitación, se utilizó un medio sin HEPES conteniendo 5 mg/ml de BSA y 15 mM de NaHCO_3 , y los espermatozoides fueron incubados a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 en el aire. El pH se mantuvo a 7.4. Para probar el efecto de los inhibidores en la capacitación, los espermatozoides fueron pre-incubados con los inhibidores en un medio no-capacitante durante 10 min previos al comienzo del periodo de capacitación.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides fueron recolectados por centrifugación durante 5 min a 721 g. Posteriormente se realizó un lavado (5 min, 8014 g) en 1 ml de PBS y finalmente fueron resuspendidos en sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% v/v glicerol). Luego, se incubaron 4 min a 100°C y fueron sometidos a una centrifugación de 5 min a 13544 g. Se le añadió 5% β -mercaptoetanol a los sobrenadantes y se incubaron nuevamente 4 min a 100°C. Se agregó azul de bromofenol a una concentración final de 0.0005%. Los extractos de proteínas equivalentes a $2\text{-}5 \times 10^6$ espermatozoides por calle fueron separados por SDS-PAGE e inmunotransferidos.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL ESPERMATOZOIDE INSOLUBLES EN TRITON

Los espermatozoides fueron recolectados por centrifugación por 5 min a 721 g, lavados (5 min, 8014 g) en 1 ml de PBS, resuspendidos en 30 µl de buffer de extracción proteica [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, 0.1% SDS y mezcla de inhibidores de proteasas y metaloproteasas (Thermo Scientific), pH 7.8] y

vortexeados vigorosamente (15 seg). La suspensión de las proteínas extraídas de los espermatozoides fue colocada en hielo durante 10 min. La muestra fue centrifugada a 13544 g por 5 min a 4°C. La fracción insoluble en Triton (I) de la muestra proteica fue obtenida al remover el sobrenadante [fracción soluble en Triton, (S)] del sedimento, que fue luego resuspendido con 40 µl de sample buffer. Los 30 µl de la fracción S fueron combinados con 10 µl de sample buffer 4X. Ambas fracciones fueron incubadas a 100°C nuevamente por 4 min. Luego de centrifugar por 5 min a 13600 g a la fracción I, se agregó 5% de β-mercaptoetanol al sobrenadante y al extracto soluble en Triton y ambos fueron nuevamente incubadas a 100°C por 4 min. A los dos extractos se les agregó azul de bromofenol a una concentración final de 0.0005%. Los extractos proteicos solubles e insolubles en Triton fueron obtenidos a partir de 6×10^6 de espermatozoides y fueron separados por SDS-PAGE e inmunotransferidos.

INMUNOTRANSFERENCIA

Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles conteniendo 10 ó 15% de poliacrilamida de acuerdo con el método de Laemmli (1970) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Li et al., 2015). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche en polvo sin grasa en PBS conteniendo 0.1% de Tween 20 (T-PBS) por 1 h a temperatura ambiente e incubadas *overnight* a 4°C con el anticuerpo primario. Los anticuerpos fueron diluidos en 2% de leche en polvo sin grasa en T-PBS de la siguiente manera: 1:500 para anti-PAK1 y anti-pLIMK1/2; 1:100 para anti-RhoA, B, C, anti-LIMK1, anti-LIMK2, anti-pCofilin, anti-Cofilin y para anti- ACTINA; y 1:200 para anti-Rac1. Los anticuerpos secundarios correspondientes fueron diluidos en 2% de leche en polvo sin grasa en T-PBS de la siguiente manera: 1:1000 para anti-conejo y 1:4000 para anti-ratón. Para las inmunodetecciones de anti-pY (1:3000) y anti-β-Tubulina (1:7000), los anticuerpos primarios y secundarios fueron diluidos en T-PBS. En todos los casos las bandas fueron detectadas por quimioluminiscencia mediante el uso de ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Cuando fue necesario, las membranas fueron estripeadas por 10 min en 2% SDS, 0.67% β-mercaptoetanol, 62.5 mM Tris, pH 6.8. En todos los experimentos, los pesos moleculares fueron expresados en kilodaltons. Como control de carga se usó la fosfohexoquinasa (pHKS) (constitutivamente fosforilada en Tyr y detectada con el anticuerpo anti-pY) (Kalab et al., 1994) o la anti-β-Tubulina. Para la cuantificación de las bandas, se escanearon las

fotografías obtenidas de las inmunotransferencias y se dibujaron rectángulos alrededor de las bandas en las imágenes digitales y la densidad óptica ajustada para cada calle fue obtenida usando el programa ImageJ 1.47 V (National Institute of Health, USA).

INMUNOFLUORESCENCIA

Para realizar las inmunofluorescencias en los espermatozoides de ratón, usamos un método previamente descrito (Sosnik et al., 2010). Brevemente, los espermatozoides de ratón obtenidos de los cauda epididimarios y capacitados por distintos tiempos fueron lavados dos veces por centrifugación durante 5 min a 721 g, resuspendidos en PBS, y colocados en portaobjetos de vidrio. Los espermatozoides fueron secados al aire y luego fijados con PBS conteniendo 4% de paraformaldehído por 15 min a temperatura ambiente. Luego de lavar dos veces por 5 min en T-PBS, los espermatozoides fueron permeabilizados con 0.5% de Triton X-100 en PBS por 5 min. Posteriormente, los portaobjetos fueron lavados dos veces por 5 min e incubados en T-PBS conteniendo 10% de suero normal de cabra (solución de bloqueo) por 1 h a temperatura ambiente y luego con un anticuerpo primario (1:100 para anti-pLIMK1/2 y anti-pCofilin y 1:50 para Cofilin) diluido en T-PBS conteniendo 1% de suero normal de cabra overnight a 4°C. Luego del lavado (tres veces, por 5 min en T-PBS), los portaobjetos fueron incubados con una IgG anti-conejo hecha en cabra conjugada a FITC, diluida 1:200 en T-PBS conteniendo 1% de suero normal de cabra, por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó por tres veces, y se montó usando Vectashield (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). La tinción no específica se determinó incubando los espermatozoides con una IgG de conejo. Los portaobjetos fueron examinados usando un microscopio laser confocal de barrido (Nikon C1 Eclipse 800; Nikon Corporation) y las imágenes fueron capturadas a una magnificación de 40x, N.A=0.69 (aire).

TINCIÓN FLUORESCENTE DE LOS FILAMENTOS DE ACTINA

Las células fueron fijadas en 0.1% de glutaraldehído y 1.5% de formaldehído en PBS por 1 h. Luego de centrifugar a 1282 g durante 5 min, los espermatozoides fueron resuspendidos inmediatamente e incubados con 50 mM NH₄Cl en PBS durante 15 min

y lavados dos veces por resuspensión/centrifugación en PBS y una vez en agua bidestilada. Las células resuspendidas en agua fueron colocadas en un portaobjetos y secadas al aire a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados con PBS por 7 min y luego permeabilizados usando acetona a -20°C por 7 min, y lavados tres veces en PBS. Luego, los portaobjetos fueron incubados con 50 μl de faloidina-TRITC (1:30) en PBS y tapados con cubreobjetos por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, en la oscuridad. Los frotis fueron lavados tres veces con PBS, una vez en agua destilada y se los dejó secar al aire a temperatura ambiente. Para su observación, fueron montados bajo cubreobjetos usando Vectashield. Los portaobjetos fueron examinados utilizando un microscopio confocal laser de barrido Nikon C1 Eclipse 800 y las imágenes fueron capturadas a una magnificación de 40x, N.A = 0.9 (aire). La intensidad de la fluorescencia fue cuantificada usando el programa ImageJ 1.47 V (National Institute of Health, USA), y fue calculada tomando como región de interés la cabeza de los espermatozoides restando la intensidad de fluorescencia del fondo.

DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE ACTINA A LA FRACCIÓN INSOLUBLE EN TRITON DEL CITOESQUELETO DEL ESPERMATOZOIDE

El contenido de actina de la fracción insoluble en Triton (actina-F) fue obtenido como ha sido detallado arriba removiendo los sobrenadantes (la fracción soluble en Triton, actina-G) del sedimento. Las proteínas extraídas fueron separadas por SDS-PAGE e inmunotransferidas y su detección se realizó utilizando un anticuerpo anti-actina (1:100).

EVALUACIÓN DE LA EXOCITOSIS ACROSOMAL MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

La EA fue evaluada como se ha descripto previamente (Muro et al., 2012; Hirohashi et al., 2015). Brevemente, espermatozoides de los ratones Acr-EGFP fueron incubados bajo condiciones capacitantes durante 90 min en presencia o ausencia de concentraciones crecientes del inhibidor de pLIMK, BMS-3. Luego de los 90 min, se añadió progesterona (20 ó 50 μM) o ionóforo de calcio A23187 (10 μM) por 30 min para estimular la EA. Los espermatozoides EGFP fueron analizados en un citómetro

de flujo (FACSCanto II flow cytometer, BD) para evaluar el estado acrosomal luego de añadirles PI para determinar la viabilidad de los mismos. Se utilizó un filtro de 515-545 nm y uno de 650 nm para GFP y PI respectivamente. Los datos de *Forward* (FSC) y *side scatter* (SSC) fueron obtenidos de la colección de 20000 eventos por muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se encuentran expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media (ESM) de al menos tres experimentos para todas las determinaciones. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey utilizando el programa GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA USA). La significancia estadística se indica en las leyendas de las figuras respectivas. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

POLIMERIZACIÓN DE ACTINA INDUCIDA POR LA CAPACITACIÓN

La polimerización de actina durante la capacitación del espermatozoide ha sido postulada como un requisito esencial para la EA (Brener et al., 2003a). Primero, evaluamos la polimerización de actina a lo largo del tiempo, durante la capacitación de los espermatozoides de ratón. Los espermatozoides fueron lisados en un buffer de lisis basado principalmente en un detergente que estabiliza y mantiene las formas G- y F- de la actina. Debido a que el buffer solubiliza a la actina-G pero no solubiliza a la actina-F, fue posible separar actina-G y actina-F por centrifugación (la actina-F en el sedimento y la actina-G en el sobrenadante). Como se representa en la Figura 11A, la cantidad de actina-F aumentó luego de 90 min de capacitación mientras que los niveles de actina-G (soluble) disminuyeron debido a su incorporación en la fracción actina-F. El aumento en la polimerización de actina se observó ya a los 15 min de incubación en condiciones capacitantes (**Figura 11B**). Los resultados obtenidos al separar actina-G y -F por este método reflejan los cambios dinámicos en el citoesqueleto tanto en el flagelo como en la cabeza de los espermatozoides. Para estudiar las regiones donde este evento ocurre, la formación de actina-F fue además visualizada por la tinción con faloidina-TRITC (**Figura 11C**). Cualitativamente, el aumento en la actina-F fue observado tanto en la cabeza como en el flagelo de los espermatozoides. La polimerización de actina fue cuantificada a diferentes tiempos midiendo la intensidad de la fluorescencia en la cabeza de los espermatozoides. Como se muestra en la Figura 11D, la tinción con faloidina aumentó a los 15 min de incubación en el medio de capacitación. Interessantemente, la formación de actina-F en la cabeza del espermatozoide no aumentó en forma continua a lo largo del tiempo, sino que se observó una oscilación entre los 15 y 30 min de incubación en medio capacitante.

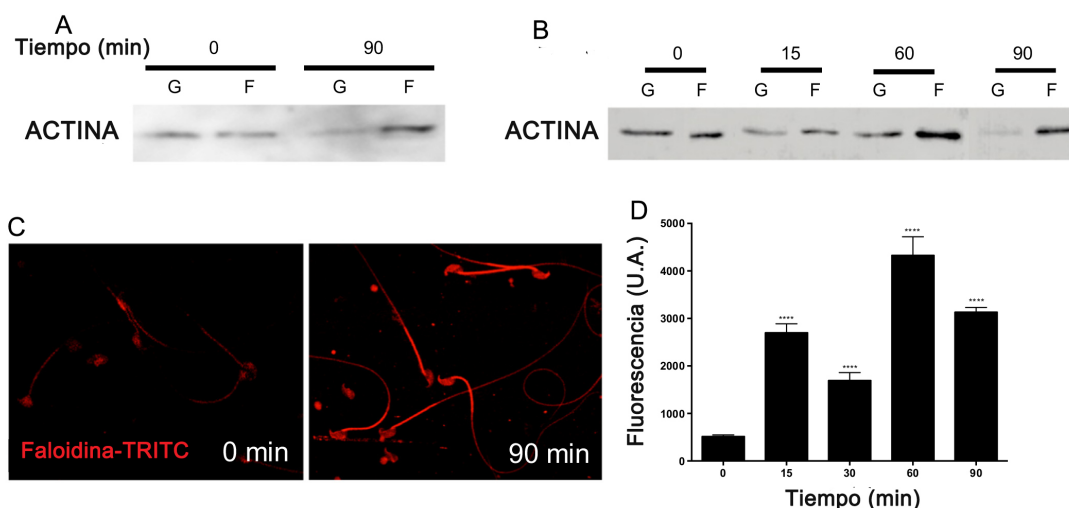


Figura 11. Polimerización de actina inducida por la capacitación. (A) Los espermatozoides de ratón fueron incubados durante 90 min en condiciones capacitantes. Los contenidos de actina-F y actina-G al comienzo y al final de la incubación fueron determinados por inmunotransferencia. (B) Los espermatozoides de ratón fueron incubados por hasta 90 min en condiciones capacitantes. En los tiempos indicados, el contenido de actina-G y actina-F fue determinado por inmunotransferencia. (C) Tinción fluorescente de los filamentos de actina. Imágenes representativas de espermatozoides teñidos con faloidina-TRITC antes y después de la capacitación. (D) Análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia tras la tinción con faloidina-TRITC en diferentes momentos de la incubación en condiciones capacitantes. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ESM de 3 experimentos independientes. **** representa diferencias significativas comparado con el min 0 ($p < 0,0001$). U.A. indica unidades arbitrarias.

LAS PEQUEÑAS GTPASAS Y SUS PROTEÍNAS EFECTORAS SE ENCUENTRAN EXPRESADAS EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN

Las pequeñas GTPasas de la familia Rho regulan la dinámica de actina en células somáticas. Hipotetizamos que estas proteínas podrían también tener un rol en el espermatozoide de ratón. Para probar esta hipótesis, evaluamos la presencia de pequeñas GTPasas pertenecientes a la familia de las Rho así como algunas de sus proteínas efectoras relacionadas con su función de regular la polimerización de actina. Dentro de la familia Rho, solo se demostró que CDC42 está presente en el espermatozoide maduro del ratón (Baltierrez-Hoyos et al., 2012b). Como se muestra en la Figura 12, se observó que los espermatozoides de ratón también expresan las proteínas RHOA, RHOC y RAC1. No se detectó la presencia de RHOB, donde como control, se utilizó un extracto de la línea celular HEK293 para determinar que el anticuerpo utilizado es capaz de reconocer a esta proteína. También detectamos las proteínas efectoras ROCK1, PAK1, LIMK1, LIMK2 (solo la isoforma específica de testículo de 52000 M_r) (Ikebe et al., 1998) y COFILIN. Todas las proteínas

presentaron el peso molecular esperado. En el caso de LIMK1 detectamos además la presencia de una banda inespecífica de menor peso molecular con este anticuerpo utilizado.

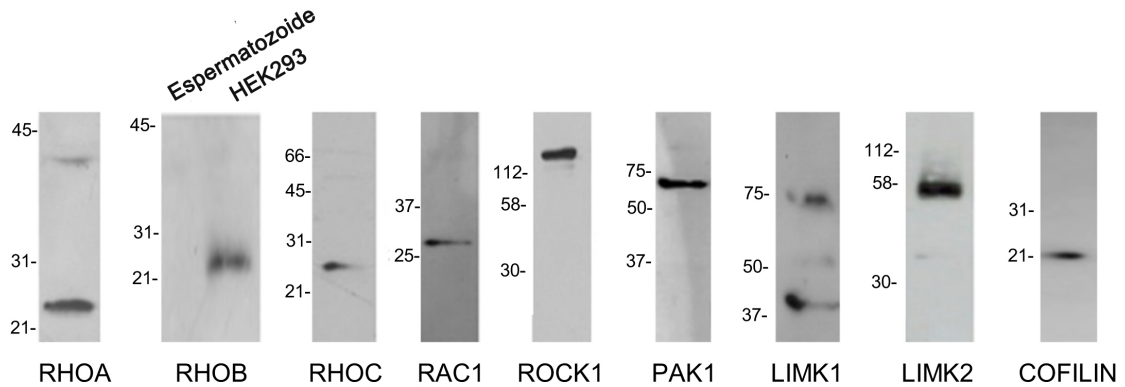


Figura 12. Todos los componentes de la vía RHO/RAC que conducen a la polimerización de actina se encuentran presentes en el espermatozoide maduro de ratón. Las proteínas del espermatozoide de ratón fueron analizadas por SDS-PAGE al 10-15% e inmunotransferidas usando anticuerpos contra las pequeñas GTPasas RHOA, RHOB, RHOC, RAC1 y las proteínas efectoras ROCK1, PAK1, LIMK1, LIMK2 y COFILIN. En los experimentos para RHOB (la proteína no fue detectada), se procesaron células HEK293 en paralelo como controles adecuados. Cada calle contenía $2-5 \times 10^6$ de espermatozoides excepto para LIMK1 (se cargó la proteína equivalente a 40×10^6 de espermatozoides).

Estos resultados indican que todos los componentes necesarios para la vía de señalización activa que conduce a la polimerización de actina están presentes en el espermatozoide de ratón.

LIMK1 ES FOSFORILADA EN THR508 DURANTE LA CAPACITACIÓN

En otros tipos celulares, diferentes proteínas efectoras son estimuladas a través de la activación de Rho, Rac y Cdc42. En el caso de RhoA/C, la proteína efectora es ROCK1, mientras que para Rac y Cdc42, las proteínas efectoras son las quinasas de la familia PAK (principalmente PAK1 pero también en algunos sistemas celulares, ocurre a través de PAK4). A su vez, tanto ROCK1 y PAK1 fosforilan y activan a LIMK1 (en Thr508) y LIMK2 (en Thr505). Con el objeto de estudiar la activación de las quinasas LIM río abajo de la activación de las pequeñas GTPasas, observamos que luego de 90 min de capacitación *in vitro*, LIMK1 es fosforilada en Thr508 (**Figura 13A**). En estudios cinéticos, esta fosforilación fue detectada a los 10 min de

incubación bajo condiciones capacitantes (**Figura 13B**). LIMK1 fosforilada (pLIMK1) fue solamente detectada en la fracción insoluble en Triton (**Figura 13B**). El peso molecular de LIMK1 es 70000 Mr. En el caso de LIMK2, hay una isoforma específica de testículo de 52000 Mr (Takahashi et al., 2002a). Debido al peso molecular observado de la forma fosforilada de LIMK (72000 Mr), concluimos que en el espermatozoide de ratón, durante la capacitación, LIMK1 es fosforilada (en Thr508) y no LIMK2. Como se muestra en la Figura 13C LIMK1 fosforilada (pLIMK) fue detectada en la pieza media del flagelo del espermatozoide, así como en el capuchón acrosomal.

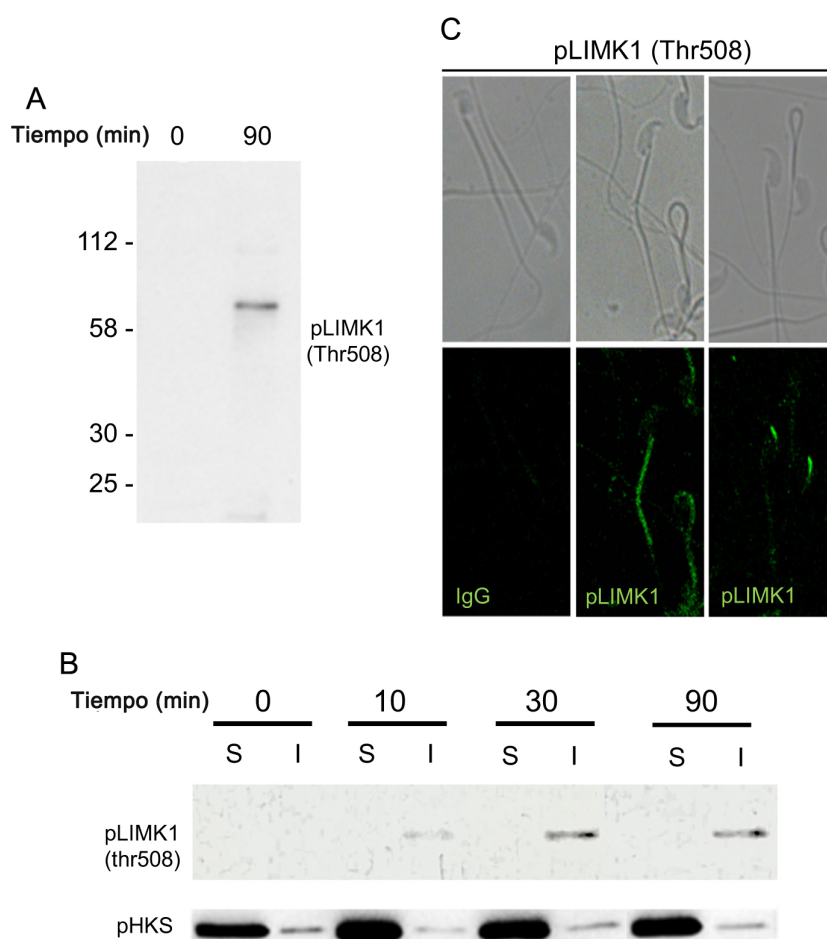


Figura 13. LIMK1 es fosforilada en Thr508 durante la capacitación. **(A)** Espermatozoides de ratón fueron incubados durante 90 min en condiciones capacitantes. Los extractos proteicos fueron analizados por SDS-PAGE al 10% e inmunotransferidos con el anticuerpo anti-pLIMK1/2 (Thr508/505). **(B)** Espermatozoides de ratón fueron incubados durante 90 min en condiciones capacitantes. En los tiempos indicados, el contenido soluble en Triton (S) e insoluble en Triton (I) del extracto de proteínas fue analizado por SDS-PAGE al 10% e inmunotransferido con el anticuerpo anti-pLIMK1/2 (Thr508/505). Como control de carga se utilizó la pHKS (constitutivamente fosforilada en Tyr). Cada calle contenía 5×10^6 de espermatozoides. **(C)** Inmunofluorescencia indicando la localización de pLIMK1 (Thr508) en la pieza media y en la región acrosomal del espermatozoide luego de 90 min de incubación en condiciones capacitantes. Los paneles superiores corresponden a las imágenes de campo

claro de los paneles de fluorescencia que se muestran en la parte inferior. Se llevó a cabo un control negativo incubando a los espermatozoides con IgG. Imágenes representativas de 4 experimentos independientes.

LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE AMPC/PKA ES ESENCIAL PARA LA FOSFORILACIÓN DE LIMK1

La presencia de Ca^{2+} , BSA y HCO_3^- en el medio de cultivo es esencial para que se inicien los eventos de fosforilación asociados con la capacitación (Visconti et al., 1995b). Además, los resultados que mostramos previamente sugieren que LIMK1 es activada por fosforilación en Thr durante la capacitación. Para investigar las vías de señalización que llevan a la fosforilación de LIMK1, realizamos experimentos omitiendo estos componentes críticos en el medio de cultivo. LIMK1 no fue fosforilada en ausencia de BSA y HCO_3^- (condiciones no capacitantes; NC) (**Figura 14A**). Cuando estos componentes fueron omitidos separadamente, tampoco se observó fosforilación, excepto en el medio carente de BSA, donde se observó una reducción en los niveles de pLIMK1 (**Figura 14B**). Considerando que uno de los blancos principales que activa el HCO_3^- durante la capacitación es la adenilato ciclasa atípica ADCY10, evaluamos si el AMPc y la PKA se encuentran involucradas en la activación de LIMK1. Cuando PKA fue inhibida por la adición del inhibidor específico H89, los niveles de pLIMK1 disminuyeron a niveles no detectables. Además, cuando los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones no capacitantes pero en presencia de dbAMPc y IBMX, los niveles de pLIMK1 fueron restaurados (**Figura 14C**). Como control, estas condiciones experimentales fueron evaluadas observando el nivel de fosforilación de proteínas en residuos Tyr, que depende de la activación de PKA. Tal como era de esperarse, la incubación en un medio carente de HCO_3^- , BSA o Ca^{2+} no permitió que ocurra el aumento en los niveles de proteínas fosforiladas en residuos Tyr, solo en presencia de los tres compuestos se logró el patrón característico de fosforilación (**Figura 14D**). En condiciones capacitantes en presencia de H89 se inhibió la fosforilación, la cual se recuperó en condiciones no capacitantes con el agregado de dbAMPc/IBMX (**Figura 14E**). En conjunto, estos resultados demuestran que la activación de PKA es esencial para la fosforilación de LIMK1.

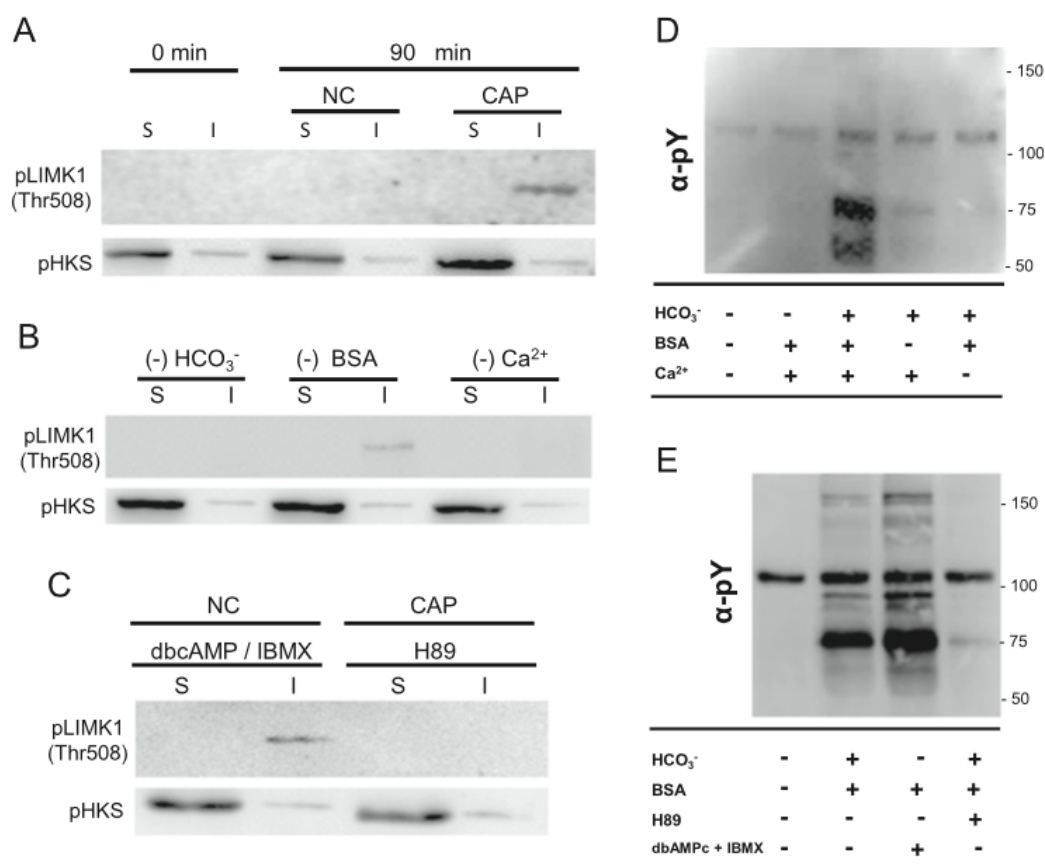


Figura 14. La fosforilación de LIMK1 en Thr 508 disminuye drásticamente en condiciones no capacitantes o en presencia de inhibidores de la PKA, lo que sugiere que este proceso se encuentra fuertemente asociado con la capacitación. Los espermatozoides fueron incubados bajo distintas condiciones durante 90 min. El contenido soluble en Triton (S) e insoluble en Triton (I) del extracto de proteínas fue analizado por SDS-PAGE al 10% e inmunotransferido con el anticuerpo anti-pLIMK1/2 (Thr508/505). Como control de carga se utilizó la pHKS (constitutivamente fosforilada en Tyr). Cada calle contenía 5×10^6 de espermatozoides. **(A)** Condiciones capacitantes (CAP) o no capacitantes (NC: medio carente de BSA y HCO_3^-). **(B)** Incubación en medio carente de HCO_3^- , BSA o Ca^{2+} por separado. **(C)** En condiciones no capacitantes con la adición de dbAMPc/IBMX (1 mM y 0,2 mM, respectivamente) o en condiciones capacitantes en presencia de 30 μM de H89. **(D)** Como control, una fracción de las muestras utilizadas en A y B fueron utilizadas para detectar anti-pY. **(E)** Como control, una fracción de las muestras utilizadas en C fueron utilizadas para detectar anti-pY. Imágenes representativas de 5 experimentos independientes.

LA ACTIVACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE RHOA/C Y RAC1 SON ESENCIALES PARA LA FOSFORILACIÓN DE LIMK1

Para saber cuál o cuáles de las pequeñas GTPasas se encuentran directamente involucradas en la activación de LIMK1 usamos inhibidores específicos de las vías de señalización de Rho/ROCK1 y Rac/PAK1. Ninguno de los inhibidores utilizados en estos estudios afectó la viabilidad de las células durante la incubación. En presencia de C4 (un inhibidor específico de la GTPasa Rho) así como con Y27132 (un inhibidor

específico de la quinasa ROCK1), observamos niveles reducidos de pLIMK1 de manera dosis dependiente (**Figura 15A**). En presencia de un inhibidor específico de Rac1 (CAS1177865-17-6), también se observaron niveles reducidos de pLIMK1. Sin embargo, no se observaron diferencias cuando usamos un inhibidor específico de PAK1 (IPA-3) (**Figura 15B**). Estos resultados sugieren que ambas, RhoA/C y Rac1, participan en la fosforilación de LIMK1 a través de la activación de ROCK1 pero no de PAK1. La ausencia de inhibidores farmacológicos específicos para las otras proteínas de la familia PAK no permite que por el momento podamos determinar cuál de ellas es la responsable de transducir los efectos de la activación de Rac1. Dado que con 2 μ g/ml del inhibidor de Rho y con 50 μ M del inhibidor de Rac1 observamos el mayor efecto en la disminución de la fosforilación de LIMK1 decidimos continuar utilizando aquellas concentraciones para los siguientes experimentos.

Debido a que observamos que la activación de PKA es esencial para la fosforilación de LIMK1 y que también demostramos que ambas, Rho y Rac, están involucradas en la cascada de señalización que lleva a la fosforilación de LIMK1, nos propusimos evaluar el orden en el que ocurren estos eventos. Para ello, los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes en presencia de dbAMPc/IBMX y/o los inhibidores de Rho y Rac. Estos resultados se muestran en la Figura 15C. La adición de dbAMPc aumentó los niveles de pLIMK1. El agregado de ambos inhibidores juntos, Rho (C4) y Rac (CAS1177865-17-6), bloqueó la fosforilación de LIMK1 incluso en aquellos espermatozoides tratados también con dbAMPc e IBMX. Interesantemente, el agregado de dbAMPc aumentó los niveles de pLIMK1 cuando cada uno de estos inhibidores fueron usados de manera separada (**Figura 15D**), sugiriendo que los efectos de Rho y Rac en la fosforilación de LIMK1 ocurren a través de dos vías de señalización independientes. En presencia de inhibidores de una de las vías, la estimulación con AMPc permeable puede compensar los niveles de pLIMK a través de la otra vía presente.

En conjunto, estos experimentos sugieren que la fosforilación de LIMK1 depende de una vía de señalización dependiente de AMPc/PKA y de Rho/Rac. Además, esto es también consistente con el experimento que muestra que los espermatozoides incubados bajo condiciones capacitantes en presencia de dbAMPc/IBMX y H89, poseen niveles de pLIMK1 reducidos a niveles similares a los

observados cuando los inhibidores de Rho y Rac se encuentran presentes (**Figura 15C**).

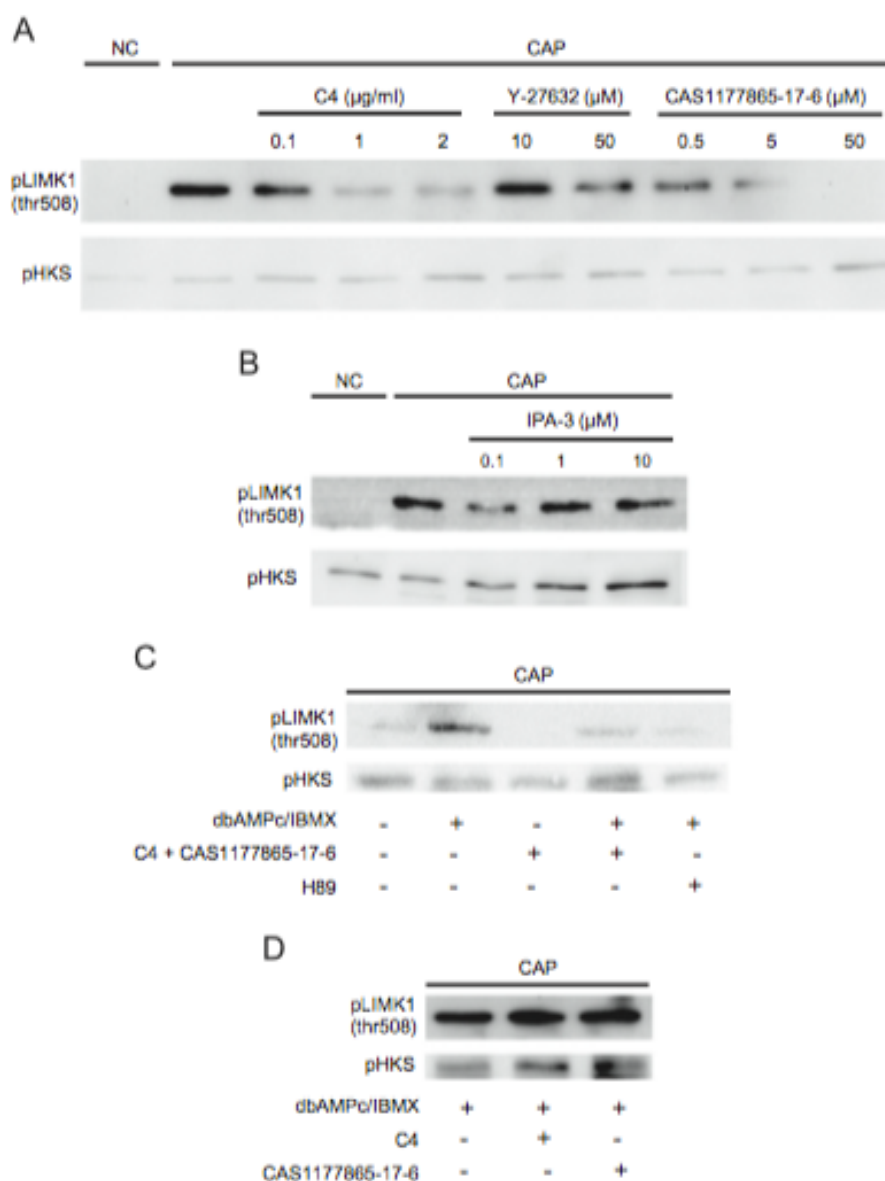


Figura 15. La inhibición de RHO/ROCK1 y RAC mediante el uso de inhibidores específicos reduce los niveles de pLIMK1 (Thr508). Espermatozoides de ratón fueron incubados en condiciones capacitantes (CAP) y no capacitantes (NC) durante 90 min. El contenido insoluble en Triton (I) de los extractos de proteínas fue analizado por SDS-PAGE al 10% e inmunotransferido con el anticuerpo anti-pLIMK1/2 (Thr508/505). Cada calle contenía 5×10^6 de espermatozoides. **(A)** Los espermatozoides fueron incubados en presencia o ausencia de concentraciones crecientes del inhibidor de RHO (C4), el inhibidor de ROCK1 (Y27632) o el inhibidor de RAC (CAS1177865-17-6). **(B)** Los espermatozoides fueron incubados en presencia o ausencia de concentraciones crecientes del inhibidor de PAK1 (IPA-3). **(C)** Los espermatozoides fueron incubados en condiciones capacitantes en presencia o ausencia tanto de CAS1177865-17-6 (50 μM) como de C4 (2 μg/ml), dbAMPc/IBMX (1mM y 0,2 mM, respectivamente) y H89 (30 μM). **(D)** Los espermatozoides fueron incubados en condiciones capacitantes en presencia de CAS1177865-17-6 (50 μM) o C4 (2 μg/ml) y dbAMPc/IBMX (1mM y 0,2 mM, respectivamente). Como control de carga, se utilizó la pHKS

(constitutivamente fosforilada en Tyr). Se utilizó DMSO como vehículo de control en CAP y NC. Imágenes representativas de 5 experimentos independientes.

COFILIN ES FOSFORILADA EN SER3 POR LIMK1 DURANTE LA CAPACITACIÓN

Una vez que LIMK1 es fosforilada, se activa y subsecuentemente fosforila a Cofilin en Ser3. Dependiendo del estado de fosforilación de Cofilin, promueve la polimerización de actina o la despolimerización de la actina-F. Como muestra la Figura 16A y B, se observó que durante la capacitación del espermatozoide de ratón, Cofilin se fosforila en Ser3 (pCofilin) de manera transitoria, alcanzando un máximo a los 10 min y luego, aproximadamente a los 30 min disminuye a niveles basales .

Luego, evaluamos la presencia de pCofilin y Cofilin total en las fracciones solubles e insolubles en Triton X100 y se observó que mientras Cofilin estaba distribuida en ambas fracciones, pCofilin fue principalmente observada en la fracción soluble (**Figura 16C**). Esto se corresponde con reportes previos que demostraron que pCofilin no se une a los filamentos de actina (Ghosh et al., 2004; Meberg and Bamburg, 2000; Song et al., 2006).

Cuando los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones no capacitantes durante 10 min, los niveles de pCofilin fueron menores que los de las células incubadas en condiciones capacitantes (**Figura 16D**). En forma similar, los niveles de pCofilin disminuyeron en los espermatozoides que fueron incubados bajo condiciones capacitantes por 10 min en presencia de 30 μ M de H89, un inhibidor de PKA. En contraste, cuando los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones no capacitantes pero en presencia de dbAMPc e IBMX, la fosforilación fue restaurada (**Figura 16D**). En conjunto, estos resultados sugieren que la fosforilación de Cofilin ocurre río abajo de la activación de la vía de señalización de AMPc/PKA.

Luego, la localización de Cofilin y su forma fosforilada en el espermatozoide de ratón fue evaluada por inmunofluorescencia. Cofilin fue localizada en la pieza media y en la cabeza del espermatozoide. Igualmente, pCofilin mostró una localización similar luego de 10 min de incubación en condiciones capacitantes (**Figura 16E**).

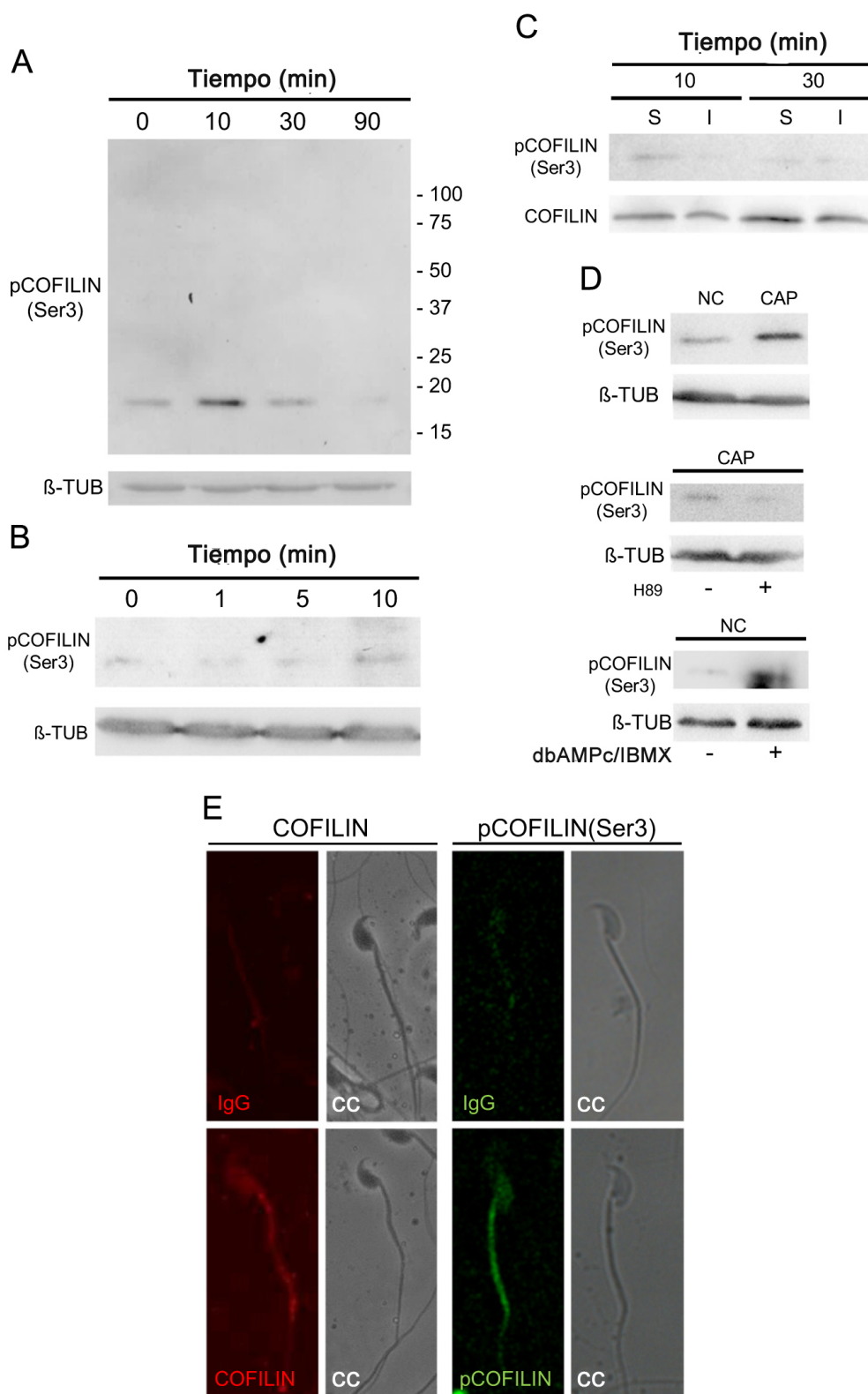


Figura 16. COFILIN es fosforilada en Ser3 durante la capacitación. Espermatozoides de ratón fueron incubados durante tiempos diferentes en condiciones capacitantes. En los tiempos indicados, las proteínas extraídas fueron separadas y analizadas por SDS-PAGE al 15% e inmunotransferidas con el anticuerpo anti-pCOFILIN (Ser3). Cada calle contenía 5×10^6 de espermatozoides. Como control de carga se utilizó anti-β-Tubulina (β-TUB). **(A y B):** El nivel de COFILIN fosforilada en Ser3 aumentó transitoriamente (dentro de los primeros 10

min de incubación y disminuyó después de 30 min). **(C)** Espermatozoides de ratón fueron incubados durante 10 y 30 min en condiciones capacitantes. El contenido soluble en Triton (S) e insoluble en Triton (I) del extracto de proteínas fue analizado por SDS-PAGE al 15% e inmunotransferido con el anticuerpo anti-pCOFILIN (Ser3). Cada calle contenía 5×10^6 de espermatozoides. Como control de carga, se utilizó anti- β -Tubulina. **(D)** Espermatozoides fueron incubados en condiciones capacitantes (CAP) y no capacitantes (NC) durante 10 min en presencia o ausencia de dbAMPc/IBMX (1 mM y 0,2 mM, respectivamente) y H89 (30 μ M). El extracto de proteínas fue analizado por SDS-PAGE al 15% e inmunotransferido con el anticuerpo anti-pCOFILIN (Ser3). Cada calle contenía 5×10^6 de espermatozoides. Como control de carga, se utilizó anti- β -Tubulina. **(E)** Inmunofluorescencia indicando la localización de COFILIN y pCOFILIN (Ser3) en la pieza media y la cabeza del espermatozoide tras 10 min de incubación en condiciones capacitantes. CC: imágenes de campo claro. El control negativo se realizó incubando los espermatozoides con IgG. Imágenes representativas de 5 experimentos independientes.

LA INHIBICIÓN DE LIMK1 DISMINUYE LA FOSFORILACIÓN DE COFILIN Y RESULTA EN BAJOS NIVELES DE POLIMERIZACIÓN DE ACTINA DURANTE LA CAPACITACIÓN

Para demostrar la participación directa de LIMK1 en la fosforilación de Cofilin, usamos un inhibidor específico de la forma activa de LIMK1 (BMS-3). La inhibición de pLIMK1 con concentraciones crecientes (1-50 μ M) de BMS-3 resultó en una disminución dosis dependiente de pCofilin luego de 10 min de incubación en condiciones capacitantes. Como control, los espermatozoides fueron también incubados por 10 min bajo condiciones no capacitantes lo que resultó en niveles disminuidos de pCofilin (**Figura 17**).

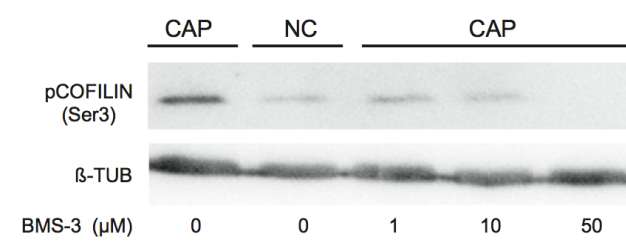


Figura 17. La inhibición de la forma activa de LIMK1 mediante un inhibidor específico resulta en una disminución de COFILIN fosforilada en Ser3. Espermatozoides de ratón fueron incubados en condiciones capacitantes (CAP) y no capacitantes (NC) durante 10 min en presencia o ausencia de distintas concentraciones de un inhibidor de pLIMK (BMS-3, 1–50 μ M). El extracto de proteínas fue analizado por SDS-PAGE al 15% e inmunotransferido con anti-pCOFILIN (Ser3). Como control de carga, se utilizó anti- β -Tubulina. Imágenes representativas de 5 experimentos independientes.

Luego decidimos evaluar si la inhibición específica de pLIMK podría afectar los niveles de polimerización de actina inducida por la capacitación. Los espermatozoides fueron incubados bajo condiciones capacitantes por 60 min, basándonos en el experimento del curso temporal previamente descrito (ver **Figura 11D**), ya que a este tiempo el espermatozoide posee el mayor nivel de polimerización de actina. En presencia de 1 ó 50 μM de BMS-3, los niveles de polimerización de actina fueron significativamente menores comparados con el control (DMSO), sugiriendo una participación directa de la vía de señalización de LIMK1 y Cofilin en el proceso de polimerización de actina (**Figura 18A**). Los menores niveles de actina-F fueron observados tanto en el flagelo como en la cabeza del espermatozoide (**Figura 18B**).

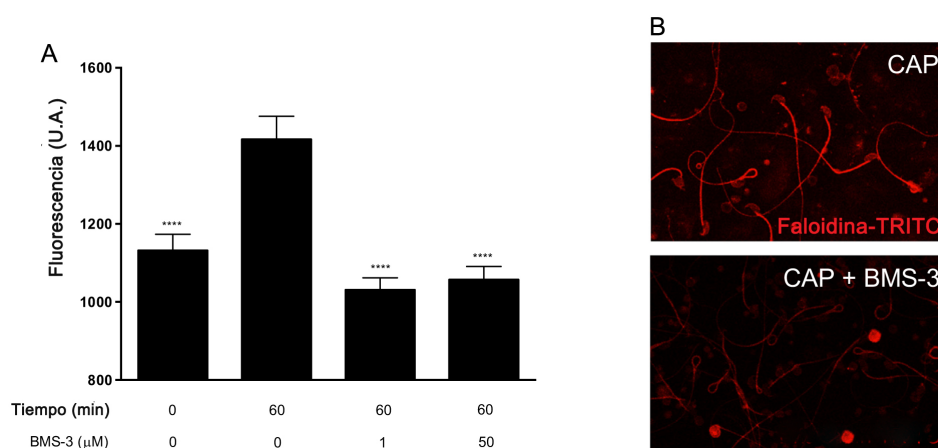


Figura 18. La inhibición de pLIMK1 produce una disminución en la polimerización de actina asociada a la capacitación. (A) Los espermatozoides de ratón fueron incubados en condiciones capacitantes en presencia o ausencia de 1 ó 50 μM de BMS-3 y la cantidad de actina-F en la cabeza del espermatozoide fue determinada después de 60 min de incubación. Los datos representan la media $\pm$ ESM de tres experimentos; **** representa diferencias significativas en comparación con los 60 min, $p < 0.001$. **(B)** Imágenes representativas de microscopía confocal de la fluorescencia de la actina-F-falloidina-TRITC. U.A. indica unidades arbitrarias.

LA ACTIVACIÓN DE LIMK1/COFILIN ES ESENCIAL PARA LA EXOCITOSIS ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN

Para investigar el rol de la vía de señalización de LIMK1/Cofilin en el proceso de EA, usamos espermatozoides transgénicos que expresan EGFP en el acrosoma y analizamos su fluorescencia por citometría de flujo. Como muestra la Figura 19A, concentraciones crecientes de BMS-3 resultaron en una fuerte disminución en el porcentaje de espermatozoides que realizaron EA luego de la estimulación con 20 μM

de progesterona. Esta inhibición fue también observada cuando la EA fue inducida con 50 μM de progesterona o con la estimulación con 10 μM de ionósforo de calcio A23187 (**Figura 19B**). En la Figura 19C-E se muestran los experimentos representativos del análisis por citometría de flujo de los espermatozoides Acr-EGFP. Estos resultados sugieren que cuando pLIMK1 es inhibida, se reduce la polimerización de actina y consecuentemente, se observa una disminución marcada en el número de espermatozoides que son capaces de realizar EA.

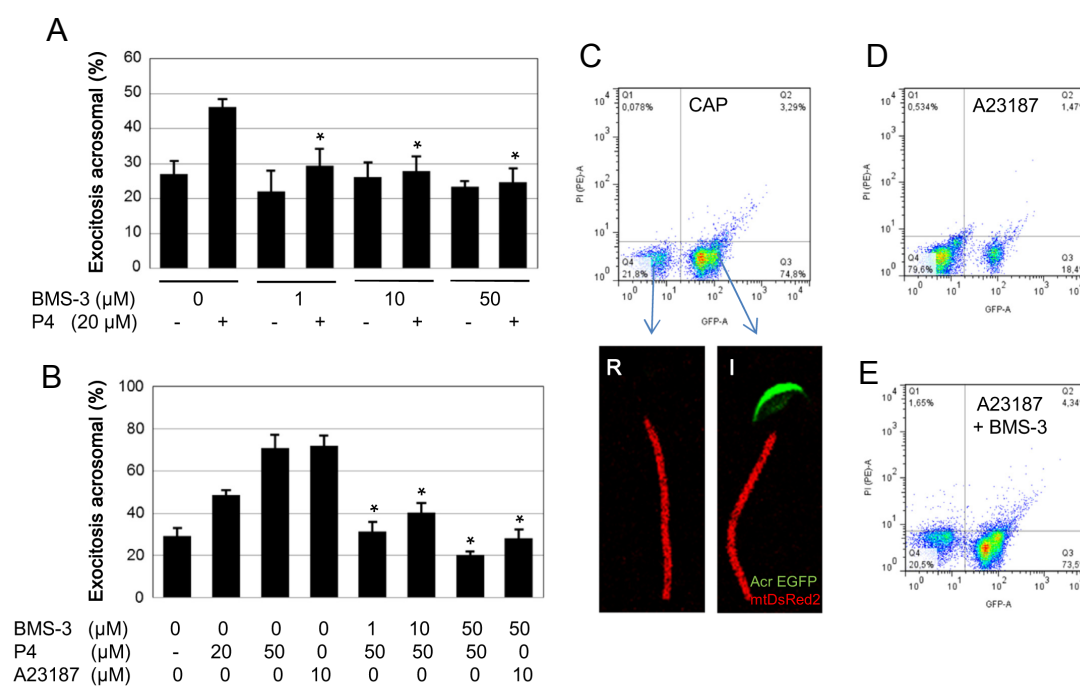


Figura 19. La inhibición de pLIMK1 produce una disminución en el porcentaje de espermatozoides que realizan la EA tras la estimulación con progesterona o ionósforo de calcio. (A) y (B) Los espermatozoides de ratón fueron incubados en condiciones capacitantes durante 90 min en presencia o ausencia de concentraciones crecientes del inhibidor de pLIMK, BMS-3. Después de 90 min, se adicionó progesterona (20 ó 50 μM) o ionósforo de calcio A23187 (10 μM) para estimular la EA. La EA fue evaluada mediante el análisis de citometría de flujo de espermatozoides Acr-EGFP. (C-E) Experimentos representativos utilizando el análisis por citometría de flujo de espermatozoides Acr-EGFP evaluado luego de la capacitación (C), luego de la capacitación en presencia de 10 μM de A23187 (D), y luego de la capacitación en presencia de 50 μM de BMS-3 y la adición de 10 μM de A23187 (E). Espermatozoides-EGFP fueron teñidos con PI para evaluar la viabilidad por citometría de flujo. Gráficas de dos dimensiones diferenciando entre espermatozoides con baja (vivos) o alta (muertos) tinción de PI (eje y) y aquellos con baja (acrosoma reaccionado) o alta (intacto) fluorescencia EGFP (eje x). El cuadrante inferior derecho representa los espermatozoides vivos con el acrosoma intacto; los cuadrantes superiores representan los espermatozoides muertos. El cuadrante inferior izquierdo representa los espermatozoides vivos reaccionados. Los ensayos de citometría fueron repetidos 5 veces. Los datos representan la media $\pm$ ESM de cinco experimentos; * representa una diferencia significativa, $p < 0,05$ comparada con la misma condición sin el inhibidor.

DISCUSIÓN

Durante la capacitación, el espermatozoide adquiere la capacidad para realizar la EA la cual es esencial para la fecundación. A nivel molecular, la capacitación está asociada con numerosos cambios que son importantes para la exocitosis incluyendo la polimerización de actina inducida por los estímulos necesarios para que ocurra la capacitación (Buffone et al., 2013; Buffone et al., 2014b). La polimerización de actina es fundamental en el control de los procesos de exocitosis en células somáticas. En el espermatozoide, la despolimerización de actina y la fusión de membranas dependen de concentraciones de calcio relativamente altas que apoyan el concepto que sostiene que los filamentos de actina constituyen la barrera final para la fusión de membranas (Finkelstein et al., 2010; Spungin et al., 1995). Por lo tanto, la comprensión de cómo la dinámica del citoesqueleto de actina es controlada durante este proceso es crítica para entender su regulación.

Reportes previos han postulado que la actina es polimerizada durante la capacitación del espermatozoide en varias especies (Brener et al., 2003b). Además, se ha propuesto que este proceso depende de la PLD (Cohen et al., 2004) cuya actividad es regulada por la comunicación cruzada entre PKA y PKC, y por la activación de la fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K). Se ha postulado que cuando los espermatozoides son estimulados con progesterona o con ZP, la red de actina-F se debe desensamblar para permitir que los espermatozoides realicen EA, y la proteína Gelsolin cuya principal función es despolimerizar filamentos de actina parece jugar un rol crítico en ese paso (Finkelstein et al., 2010).

En otros sistemas celulares, un grupo de proteínas pertenecientes a la familia de las pequeñas Rho GTPasas son conocidas por estar involucradas en controlar la dinámica de actina (Heasman and Ridley, 2008). La mayoría de los estudios se enfocaron en las clásicas Rho GTPasas, tal como RhoA, Rac1 y Cdc42. Su función específica en el espermatozoide de mamífero sigue siendo en gran parte desconocida, debido a la letalidad embrionaria observada cuando alguna de estas proteínas es eliminada mediante la generación de ratones *knockouts* (Heasman and Ridley, 2008). Además, la falta de un ratón condicional específico para delecionar proteínas en el espermatozoide hace más difícil comprender la participación de estas proteínas en

los procesos fisiológicos espermáticos. Encontramos que la mayoría de estas proteínas así como las proteínas efectoras que funcionan río abajo de su activación se expresan en el espermatozoide de ratón. En particular, la activación de Rho, Rac1 o Cdc42 llevan a la activación de LIMK1/2. En otros sistemas, LIMK integra las señales provenientes de diferentes vías de señalización que se encuentran río arriba de su activación para regular la dinámica del citoesqueleto de actina (Scott and Olson, 2007). En los testículos, LIMK1 se expresa en todas las células, mientras que LIMK2 se encuentra solamente en las espermátides elongadas, sugiriendo que LIMK1 y LIMK2 tienen funciones específicas según la célula (Acevedo et al., 2006). Además, LIMK2 posee una isoforma específica de testículo (Takahashi et al., 2002b).

Observamos que el espermatozoide de ratón expresa ambas, LIMK1 y LIMK2 en los pesos moleculares esperados. Similar a lo que sucede con muchas otras quinasas, la fosforilación en el *loop* de activación resulta en un aumento de la actividad de LIMK. Ambas, LIMK1 y LIMK2 son fosforiladas en residuos conservados de Thr (Thr508 en LIMK1 y Thr505 en LIMK2) por la quinasa Rho efectora de Rho (ROCK) y mediante la quinasa p21-activada (PAK)1 y PAK4 (por Rac/Cdc42) y estos eventos de fosforilación son requeridos para la activación de LIMK (Scott and Olson, 2007).

Describimos por primera vez que LIMK1 es fosforilada durante la capacitación del espermatozoide de ratón. La quinasa fosforilada presentó un peso molecular de 72000 Mr, sugiriendo que es LIMK1 la que es fosforilada en Thr508 y no LIMK2. Se observó un aumento en los niveles de pLIMK ya a los 10 min de incubación en condiciones capacitantes y este dependió fuertemente de la activación de la vía de señalización de AMPc/PKA. Hoy en día existe cada vez más bibliografía que sugiere que la dinámica del citoesqueleto de actina utiliza a la PKA para modular eventos asociados a la adhesión (Howe, 2004). Asimismo, se sabe que mientras algunos eventos de la organización del citoesqueleto requieren la actividad de PKA (como ser la activación de Rac1 y Cdc42; el ensamblado de los filamentos de actina), otros son inhibidos por la misma (por ejemplo la activación de RhoA). RhoA puede ser directamente fosforilada por PKA en Ser188 cerca de su extremo C-terminal, y esta modificación puede inhibir su actividad (Dong et al., 1998). Estas posibilidades necesitan ser estudiadas en el espermatozoide de ratón. Asimismo, dado que las GTPasas se regulan mediante GEFs, GAPs y GDIs, y todavía hoy en día se desconoce

cuál es la identidad de dichos factores en el espermatozoide y por tanto es un territorio a explorar a futuro.

Cuando utilizamos inhibidores específicos para la vía de señalización de Rho/ROCK, observamos una reducción dosis dependiente en los niveles de pLIMK1. La inhibición de Rac1 también resultó en una disminución en los niveles de pLIMK1. Sin embargo, cuando inhibimos a PAK1, una quinasa que actúa río abajo de la activación de Rac1 y Cdc42, no observamos ningún cambio en los niveles de pLIMK1. Una posibilidad entonces es que Rac1 esté modulando los niveles de pLIMK1 vía PAK4, en vez de utilizar la vía dependiente de PAK1 (Soosairajah et al., 2005).

El sustrato mejor caracterizado de LIMK1 es Cofilin. Miembros de la familia ADF/Cofilin de proteínas de unión a actina, se sabe que poseen un rol clave en la dinámica de los filamentos de actina mediante complejos modos de regulación. La fosforilación de Cofilin en Ser3 a través de LIMK es la forma mejor caracterizada de regulación de esta proteína. Cuando Cofilin es fosforilada se inactiva y deja de unir y clivar a la actina-F (Bamburg and Wiggan, 2002). En este trabajo, demostramos que los niveles de pCofilin aumentan transitoriamente durante la capacitación, alcanzando un máximo a los 10 min de incubación y regresando a niveles basales luego de 30 min. Interesantemente, pCofilin se localizó en la fracción soluble en Triton X-100 ya que la forma fosforilada no se une a la actina-F insoluble en detergente. Cuando la forma activa de LIMK1 fue inhibida usando inhibidores específicos (BMS-3), no se observó un aumento en pCofilin sugiriendo que esta proteína es fosforilada por LIMK1. Recientemente se describió también en espermatozoides humanos que Cofilin se fosforila de manera transitoria durante la capacitación (Megnagi et al., 2015).

Las proteínas reguladas por fosforilación son típicamente revertidas a su estado basal desfosforilado, a través de fosfatasas. Se identificaron dos tipos de fosfatasas selectivas de Cofilin: la familia de fosfatasas Slingshot (SSH1) y Chronophin (Niwa et al., 2002). Se observó que la fosfatasa PP2B (Calcineurina) desfosforila y activa a SSH1 (Soosairajah et al., 2005). Además, la actividad de SSH1 es inhibida por su fosforilación mediada por PAK4 y posiblemente otras como ROCK y MRCK α (Soosairajah et al., 2005). Otros reportes demostraron que la fosfatasa SSH1 puede también desfosforilar e inactivar a LIMK1 (Soosairajah et al., 2005). Esta múltiple regulación de estas proteínas a través de SSH1 hace muy complejo dilucidar la

regulación de Cofilin ya que los cambios en los niveles de pCofilin podrían ser generados por la desfosforilación directa por SSH1, la inactivación de LIMK mediada por SSH1, o una combinación de ambas.

Para entender la implicancia fisiológica de la inhibición de la vía de señalización de LIMK/Cofilin en la fisiología del espermatozoide, demostramos que la inhibición de pLIMK1 con BMS-3 resultó en bajos niveles de actina-F. Aún hoy desconocemos cuál es la contribución relativa de RhoA/C y Rac1 durante la capacitación. Otro aspecto importante a determinar es cómo la vía de señalización de LIMK1/Cofilin interactúa con PLD1, la cual se ha demostrado ser esencial para la polimerización de actina en el espermatozoide de bovino. Una posibilidad interesante a explorar es que pCofilin estimula la actividad de PLD1 como se ha demostrado recientemente (Han et al., 2007).

La EA inducida fue completamente inhibida en presencia del inhibidor de la forma activa de LIMK1 cuando se estimuló con concentraciones bajas o altas de progesterona así como con ionóforo de calcio. A pesar de que la hipótesis más simple es que los niveles reducidos de polimerización de actina alteran algunos de los eventos críticos que conducen a la exocitosis, como el anclaje de membranas o la fusión en sí misma, otros posibles blancos desconocidos de LIMK que funcionan río abajo de su activación también pueden ser importantes para el proceso; sin embargo esta posibilidad aún necesita ser evaluada.

Demostramos entonces, por primera vez que los reguladores principales de la dinámica de actina de células somáticas están presentes y activos también en el espermatozoide de ratón. Combinando los resultados de este trabajo con otros resultados de la literatura, proponemos un modelo con respecto a cómo LIMK1/Cofilin controla la EA en el espermatozoide de ratón (**Figura 20**). Durante la capacitación, el eflujo de colesterol conduce a la activación rápida de la ADCY10 por HCO_3^- y calcio, que resulta en un aumento de los niveles de AMPc que a su vez activa a PKA. Estos eventos rápidos promueven la activación de RhoA/C y Rac1. RhoA/C activa a ROCK1 que a su vez fosforila a LIMK1 en Thr508. La activación de Rac1 conduce a la fosforilación de LIMK1 por las quinasas PAK (posiblemente a través de PAK4). La activación de LIMK1 promueve la fosforilación transitoria de Cofilin en Ser3, la cual deja de unirse y cortar a la actina-F. Los niveles de pCofilin pueden

además ser modulados por fosfatasa tales como Chronophin y SSH1. La fosforilación de Cofilin lleva a la polimerización de actina que es esencial para que ocurra la EA.

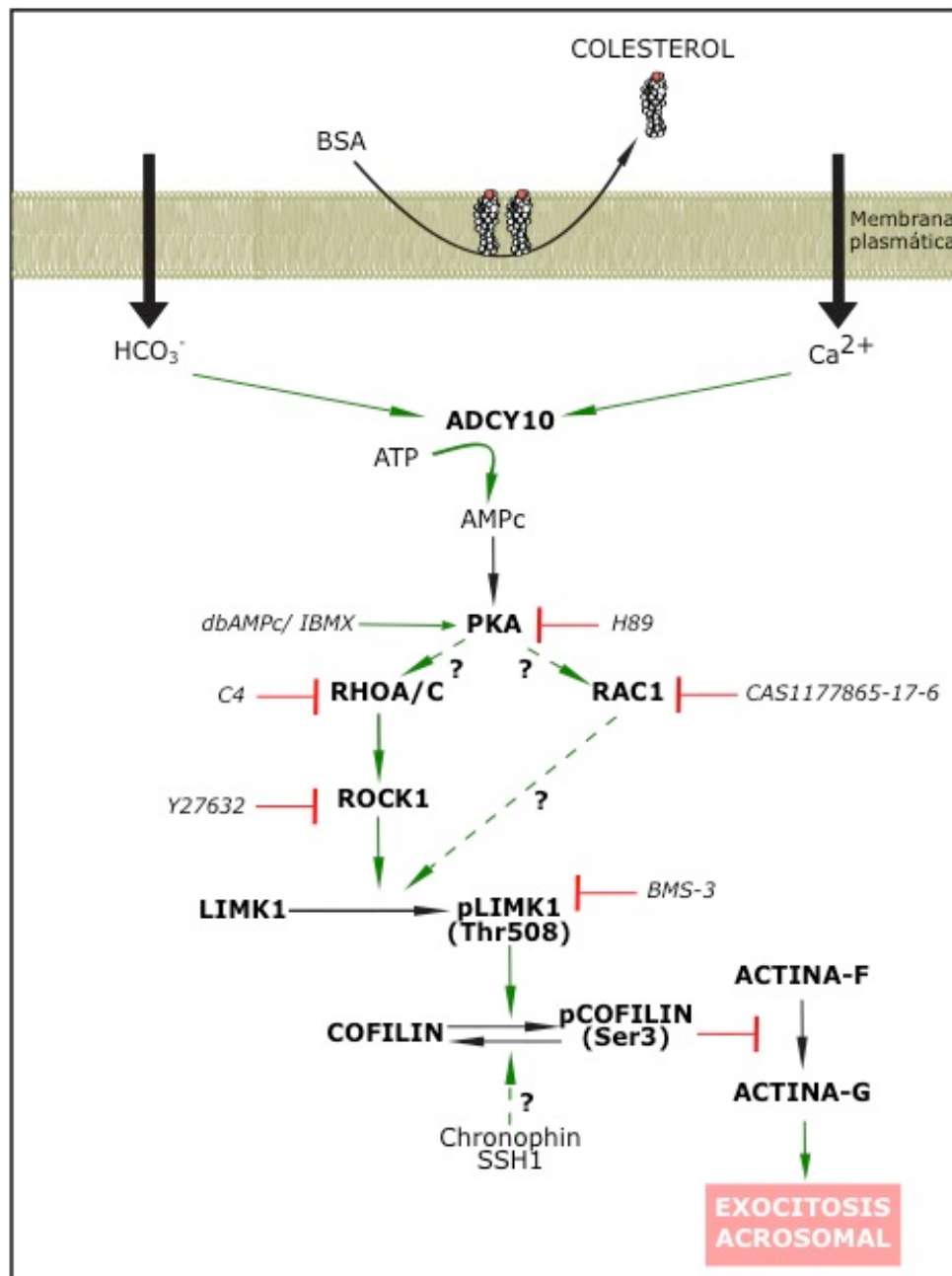


Figura 20. Modelo propuesto para la secuencia de eventos involucrados en la participación de las pequeñas GTPasas en la preparación del espermatozoide para la EA.

CONCLUSIONES

Demostramos por primera vez que los reguladores maestros de la dinámica de actina en células somáticas están presentes y activos en el espermatozoide de ratón. Durante la capacitación, la activación de la vía de señalización de AMPc/PKA y de las pequeñas GTPasas RhoA/C y Rac1 son esenciales para la activación de LIMK1 y Cofilin vía fosforilación en Thr508 y Ser3 respectivamente. La inhibición de LIMK1 resultó en niveles bajos de polimerización de actina durante la capacitación y una disminución dramática en el porcentaje de espermatozoides que realizan EA. En consecuencia, concluimos que el control de esta vía de señalización, que conduce a la polimerización de actina durante la capacitación del espermatozoide, podría ser un paso esencial para preparar al espermatozoide para realizar EA.

CAPÍTULO II – ESTUDIO DE LOS CAMBIOS ESPACIO-TEMPORALES EN EL $[Ca^{2+}]_i$ Y LA EA EN ESPERMATOZOIDES INDIVIDUALES TRAS LA ESTIMULACIÓN CON PROGESTERONA

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de los mamíferos deben primero experimentar un complejo proceso llamado capacitación en el tracto reproductor femenino para adquirir capacidad fecundante (Austin, 1951; Chang, 1951). Durante la capacitación, el espermatozoide adquiere la capacidad de desarrollar la movilidad hiperactivada y realizar la EA en respuesta a estímulos específicos (Buffone et al., 2008; Buffone et al., 2013; Suarez, 2008). Ambos procesos son absolutamente esenciales para la fecundación, la EA es obligatoria para la apropiada relocalización de proteínas específicas de fusión (Sosnik et al., 2009). La EA comparte similitudes con mecanismos secretores exocitóticos en otras células, aunque es un evento secretor controlado único e individual (Buffone et al., 2014b; Mayorga et al., 2007a).

Durante muchos años se consideró que los espermatozoides realizaban la EA tras la interacción con la ZP del ovocito. La mayor parte de nuestro conocimiento acerca de este proceso deriva de estudios realizados *in vitro* que utilizan ZP solubilizada (Cherr et al., 1986; Florman and Storey, 1982; Storey et al., 1984). Sin embargo, datos recientes reportaron *in vitro*, que la mayoría de los espermatozoides fecundantes de ratón realizan la EA antes de unirse a la ZP (Inoue et al., 2011; Jin et al., 2011). Posteriormente, estos resultados también fueron corroborados *in vivo*, ya que mediante el uso de animales transgénicos se observó que la EA ocurre en las partes altas del istmo oviductal, previo a la interacción con la ZP (La Spina et al., 2016; Muro et al., 2016). Es por ello que todavía es motivo de controversia cuál es/son los estímulos que desencadenan la EA en un contexto fisiológico. En este escenario, la progesterona podría desempeñar un papel fisiológico en la inducción de la EA ya que es secretada por las células del cúmulus luego de la ovulación y es un reconocido inductor de la EA (Osman et al., 1989; Roldan et al., 1994).

En las concentraciones encontradas en el tracto reproductor femenino, la progesterona también ha sido implicada en otros aspectos de la fisiología del

espermatozoide, tales como la capacitación, la quimiotaxis, la movilidad y la hiperactivación (Gatica et al., 2013; Lishko et al., 2011; Oren-Benaroya et al., 2008; Sagare-Patil et al., 2012; Servin-Vences et al., 2012; Strünker et al., 2011), aunque los mecanismos moleculares o las vías de señalización involucradas en estos procesos son poco conocidos. Es sabido que el efecto de la progesterona sobre el espermatozoide de los mamíferos no involucra la clásica regulación mediante receptores nucleares. Varios candidatos a receptores de membrana para la progesterona han sido postulados y se ha reportado la presencia de algunos de ellos en espermatozoides de mamíferos (Guidobaldi et al., 2008; Thomas, 2008). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la enzima hidrolasa de lípidos ABHD2 sería el receptor de progesterona, presente en el flagelo de los espermatozoides humanos y en el acrosoma en los espermatozoides murinos (Miller et al., 2016b).

Al igual que todos los procesos de exocitosis, un aumento en el Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es necesario para que ocurra la EA. La naturaleza de los canales involucrados en el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la progesterona parece ser diferente de acuerdo a la especie y puede que involucre la combinación de los canales CatSper, CaVs, canales operados por depósito (SOCs), y canales intracelulares en una compleja red de cascadas de señalización (Darszon et al., 2011). En el espermatozoide humano, se ha demostrado recientemente que la progesterona induce un influjo de Ca^{2+} mediado por canales CatSper (Lishko et al., 2011; Strünker et al., 2011) aunque en ratones, los espermatozoides carentes de CatSper experimentan la EA normalmente, lo que sugiere que en esta especie, este canal no es esencial para este proceso (Chung et al., 2011). Además, aún existe controversia acerca de dónde se almacena el Ca^{2+} en el espermatozoide. Algunos autores postulan que el acrosoma es un depósito de Ca^{2+} y que su salida del acrosoma activa los SOC's que permiten una entrada sostenida de Ca^{2+} desde el medio extracelular (De Blas et al., 2002; Herrick et al., 2005). Del mismo modo, Ho y Suarez (Ho and Suarez, 2003) han identificado la envoltura nuclear redundante en el extremo posterior de la cabeza del espermatozoide como un depósito de Ca^{2+} . En cambio, Xia y Ren (Xia and Ren, 2009) han obtenido resultados contradictorios que indican que el incremento de Ca^{2+} inducido por la ZP comienza en la cola del espermatozoide y se propaga hacia la cabeza (en dirección anterógrada; del flagelo a la cabeza). Los estudios de registro de imágenes en tiempo real del Ca^{2+} realizados por Fukami y colegas (Fukami et al., 2003) han revelado que el aumento de

Ca^{2+} inducido por la ZP o la progesterona comienza en diferentes sitios dentro de la cabeza del espermatozoide, indicando que estos agonistas desencadenan la EA a través de diferentes mecanismos. La onda anterógrada de Ca^{2+} observada por Fukami y colegas (Fukami et al., 2003) y Xia y Ren (Xia and Ren, 2009) en respuesta a la ZP soluble sugiere que un depósito de Ca^{2+} cerca de la unión entre la cola y la cabeza puede estar asociado a la EA. La dirección anterógrada de esta onda desde la base de la cabeza es similar a la dirección de la pérdida de GFP acrosomal al momento de la EA demostrada previamente (Buffone et al., 2009). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha registrado en forma simultánea la exocitosis y los cambios en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en espermatozoides individuales para analizar las respuestas a la progesterona. Recientemente, Sánchez Cárdenas y colaboradores han descubierto que el FM4-64 marca la membrana plasmática del espermatozoide humano y que su fluorescencia aumenta en la cabeza del espermatozoide tras la inducción de la EA (Sanchez-Cardenas et al., 2014). Dada sus propiedades fluorescentes, el registro de imágenes en tiempo real del FM4-64 puede combinarse en forma simultánea con el de la sonda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Fluo-4. En este trabajo, nos propusimos estudiar en forma simultánea, los cambios espacio-temporales en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la EA en espermatozoides individuales de ratón tras la estimulación con progesterona.

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVOS

El FM4-64, el Fluo-4 AM, el ácido plurónico y la laminina provinieron de Life Technologies Corporation (Invitrogen). La BSA, la concanavalina A y la progesterona fueron adquiridas de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). La ionomicina fue adquirida de Alomone Labs. (Jerusalén, Israel).

ANIMALES

Se utilizaron ratones macho CD1 maduros (de 10-12 semanas) y BDF1-Tg (CAG- mtDsRed2, Acr-EGFP) RBGS0020sb. Estos ratones transgénicos expresan la fluorescencia del EGFP y del Ds-Red2 en la vesícula acrosomal y en la pieza media, respectivamente (Hasuwa et al., 2010). Los animales fueron mantenidos a 23°C con ciclos de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad. Los procedimientos experimentales con animales fueron revisados y aprobados por el Comité Ético del Instituto de Biotecnología/UNAM, el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio IFC/UNAM (CICUAL AHC54-14) y el Instituto de Biología y Medicina Experimental.

PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES

En todos los experimentos, los espermatozoides de ratón fueron recuperados por incisiones de los cauda epididimarios en un medio Krebs-Ringer modificado (Whitten's-HEPES-buffered (WH) medium) (Guidobaldi et al., 2008). Para los experimentos en medio capacitante, se adicionaron 5 mg/ml de BSA y 24 mM de NaHCO₃. El pH se mantuvo en 7,4. Los espermatozoides móviles fueron recolectados mediante *swim-up* en el medio WH a 37°C durante 30 min.

ESTUDIOS EN CÉLULA ÚNICA

Para estudiar los cambios espacio-temporales en el [Ca²⁺]_i y la EA tras la estimulación con progesterona, en espermatozoides individuales de ratón, se

realizaron registros de imágenes en tiempo real. En la Tabla 2 se detallan las ventajas que otorga realizar dicho estudio en célula única versus el estudio a nivel poblacional.

Tabla 2. Comparación entre estudios poblacionales versus estudios en célula única.

Población	Célula única
Pérdida de información espacial	Se puede definir información espacial
Imposibilidad de explorar heterogeneidades entre un espermatozoide y otro	Se pueden explorar heterogeneidades entre un espermatozoide y otro en la población
Diferencias de volumen entre compartimentos en una célula compleja pueden afectar	Las diferencias de volumen entre compartimentos se pueden analizar por separado
La respuesta observada es un promedio extrapolado de la población (enmascarada)	La respuesta observada es individual, no es un promedio (no enmascarada)

REGISTRO DE IMÁGENES EN TIEMPO REAL DEL $[Ca^{2+}]_i$ EN ESPERMATOZOIDES INDIVIDUALES DE RATÓN

Para los registros de Ca^{2+} , las células móviles obtenidas fueron incubadas con 2 μM de Fluo-4 AM y 0,05% de ácido plurónico durante 60 min en un medio WH suplementado con BSA y $NaHCO_3$ de acuerdo con las condiciones experimentales de capacitación. Una vez cargados, los espermatozoides fueron inmovilizados sobre cubreobjetos recubiertos con laminina de ratón (1 mg/ml) o concanavalina A (1 mg/ml) para permitir los registros. Los espermatozoides no adheridos fueron removidos mediante un lavado suave y la cámara fue llenada con el medio de registro (medio WH sin suplementos). Los registros fueron realizados a 37°C utilizando un controlador de temperatura modelo 202A (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EEUU). La progesterona (concentración stock 100 mM, disuelta en DMSO) o el vehículo (DMSO) preparados en el medio de registro, fueron aplicados cuidadosamente utilizando una micropipeta. Los espermatozoides fueron visualizados con un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse Ti-U, Melville N.Y., EEUU) y un objetivo de fluorescencia de inmersión en aceite (Nikon plan Apo TIRF DIC H/N2 60x/1.45 NA). Como fuente de luz se utilizó un iluminador de fibra pre-centrado Nikon Intensilight-CHGFI (Nikon, Melville N.Y., EEUU). Para la excitación y recolección de la emisión del Fluo-4, se utilizó el set de filtros GFP 96343, D: 495, Exc: 470/ 40, Barrier 525/ 50 (Nikon, Melville, N.Y.). Las imágenes de la fluorescencia se

obtuvieron con una cámara Andor Ixon 3 EMCCD modelo DU-8970-C00#B (Andor Technology. Belfast, Reino Unido) bajo los protocolos escritos en el programa Andor iQ 1.10.2 Versión 4.0. Para estos experimentos registramos 1 imagen cada 2 ó 5 seg con un tiempo de exposición/iluminación de 50 miliseg por períodos de 5-30 min. Para aquellos experimentos en los que requerimos imágenes con resolución más rápida, los espermatozoides fueron expuestos a la luz en forma continua durante 1 min y se obtuvieron 8-10 imágenes/seg.

REGISTRO DE IMÁGENES EN TIEMPO REAL DE ESPERMATOZOIDEOS DE RATONES TRANSGÉNICOS REALIZANDO LA EXOCITOSIS ACROSOMAL

Espermatozoides de los ratones transgénicos fueron incubados en medio de registro conteniendo 10 μ M de FM4-64 durante 5 min. Para las mediciones de FM4-64 el colorante estuvo presente en el medio extracelular a lo largo de los experimentos. Los registros se realizaron como se ha descrito anteriormente. Para la excitación y recolección de la emisión del FM4-64, se utilizó el set de filtros Wide Green 11007v2, D: 565 dcxt, Exc: 535/50, Em: 590 lvp2 (Chroma Technology Corporation. Bellows Falls, EEUU). Para el GFP se utilizó el mismo set de filtros descrito anteriormente para el Fluo-4. El intervalo de tiempo para cambiar entre los cubos de los filtros del FM4-64/GFP fue de 400 miliseg. Las imágenes fueron obtenidas cada 2 ó 5 seg con un tiempo de exposición/iluminación de 50 miliseg por períodos de 30 min.

REGISTRO DE IMÁGENES EN TIEMPO REAL DEL $[Ca^{2+}]_i$ Y LA EXOCITOSIS ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDEOS INDIVIDUALES DE RATÓN

Para el registro de imágenes en tiempo real alternado de Ca^{2+} /EA, los espermatozoides de ratón cargados con Fluo-4 AM fueron expuestos durante 5 min a medio de registro que contenía 10 μ M de FM4-64. Los registros de Fluo-4 y FM4-64 se llevaron a cabo según lo explicado anteriormente. El intervalo de tiempo para cambiar entre los cubos de los filtros del Fluo-4/FM4-64 fue de 400 miliseg. Las imágenes fueron obtenidas cada 2 ó 5 seg con un tiempo de exposición/iluminación de 50 miliseg por períodos de 5-30 min. Para el registro de imágenes en tiempo real

simultáneo de Ca^{2+} /EA, los registros se realizaron a 37°C utilizando un controlador de temperatura Bipolar TC-202 (Medical Systems Corp; Greenvale, N.Y.). Los espermatozoides fueron visualizados con un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE 300 (Melville N.Y., EEUU) y un objetivo de fluorescencia de inmersión en aceite Nikon Plan Apo 60x/1.40 NA. La iluminación para la fluorescencia fue suministrada por un LED Cian Luxeon V Star Lambertian par #LXHL-LE5C (Lumileds Lighting LLC, San Jose, EEUU). Para la emisión dual del Fluo-4 y FM4-64 (Ca^{2+} /EA, respectivamente), se utilizó un divisor de imágenes Optosplit II (Cairn Research, Kent, Reino Unido). Para la excitación de ambos fluoróforos (Fluo-4 y FM4-64) se utilizó un filtro D485/25X (Chroma Technology Corporation. Bellows Falls, EEUU). La emisión dual fue lograda utilizando un espejo dicróico 610LP y fue recolectada con filtros HQ535/50 y ET610LP (Chroma Technology Corporation. Bellows Falls, EEUU) para el Fluo-4 y el FM4-64 respectivamente. Las imágenes de la fluorescencia fueron grabadas en una cámara Andor EMCCD (DV887, Andor iXon). Las imágenes fueron obtenidas de a 2 por seg con un tiempo de exposición/iluminación de 2 miliseg por períodos de 5 min.

ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES

Durante todos los experimentos se obtuvieron imágenes de 16 bits y las películas fueron procesadas y analizadas utilizando macros escritos en Image J (Versión 1.4.3.67, National Institute of Health). En cada película, las regiones de interés (ROIs) fueron dibujadas sobre cada espermatozoide para su cuantificación. Se generó un gráfico de la intensidad de fluorescencia de cada espermatozoide en función del tiempo en Origin 6.0 (Microcal Software, Northampton, Mass, EEUU). La fluorescencia se encuentra expresada como $(F-F_0)/F_0$. Cuando el brillo y el contraste fueron ajustados, esto se hizo por igual en todas las imágenes o películas tomadas en las mismas condiciones.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos numéricos son presentados como la media $\pm$ el ESM. Todas las pruebas fueron de dos colas con una significación estadística evaluada a un nivel de $p < 0,05$. Los resultados obtenidos fueron comparados por un ANOVA de una sola vía

con el test de comparaciones múltiples de Tukey, a excepción de las Figuras 21 y 26 en las que se utilizó la prueba t de Student. El análisis estadístico se llevó adelante utilizando un programa estadístico estándar (Graphpad software, EEUU).

RESULTADOS

LA PROGESTERONA PROMUEVE UN AUMENTO EN EL $[Ca^{2+}]_i$ EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN

Con el objeto de establecer las condiciones óptimas para realizar nuestros estudios sobre el efecto de la progesterona en el aumento de calcio, realizamos experimentos en célula única. En una primera serie de experimentos observamos que la progesterona fue capaz de promover un aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ en el espermatozoide de ratón, como se informó previamente en otros reportes (Hirohashi et al., 2015; Kobori et al., 2000; Roldan et al., 1994). Este esteroide indujo un aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ en algunos espermatozoides y en diferentes momentos (**Figura 21A**). Los trazos de fluorescencia en la Figura 21B ilustran las respuestas en el $[Ca^{2+}]_i$ promovidas por la progesterona en los 3 espermatozoides de la Figura 21A, que mostraron diferentes patrones en términos de amplitud y cinética. El porcentaje de espermatozoides que respondió a 40 μ M y 100 μ M de progesterona fue de $24,5 \pm 4,3\%$ y $41,1 \pm 5,4\%$ respectivamente, lo cual fue estadísticamente diferente en comparación al vehículo ($11,3 \pm 3,6\%$) (**Figura 21C**). Al utilizar 100 μ M de progesterona, un mayor número de células exhibió una respuesta en el calcio, y es por esto que continuamos nuestros experimentos utilizando esta concentración. En términos generales, observamos una gran variabilidad en la respuesta a progesterona, tanto en el momento en que esta ocurre como en la forma o patrón con que lo hace.

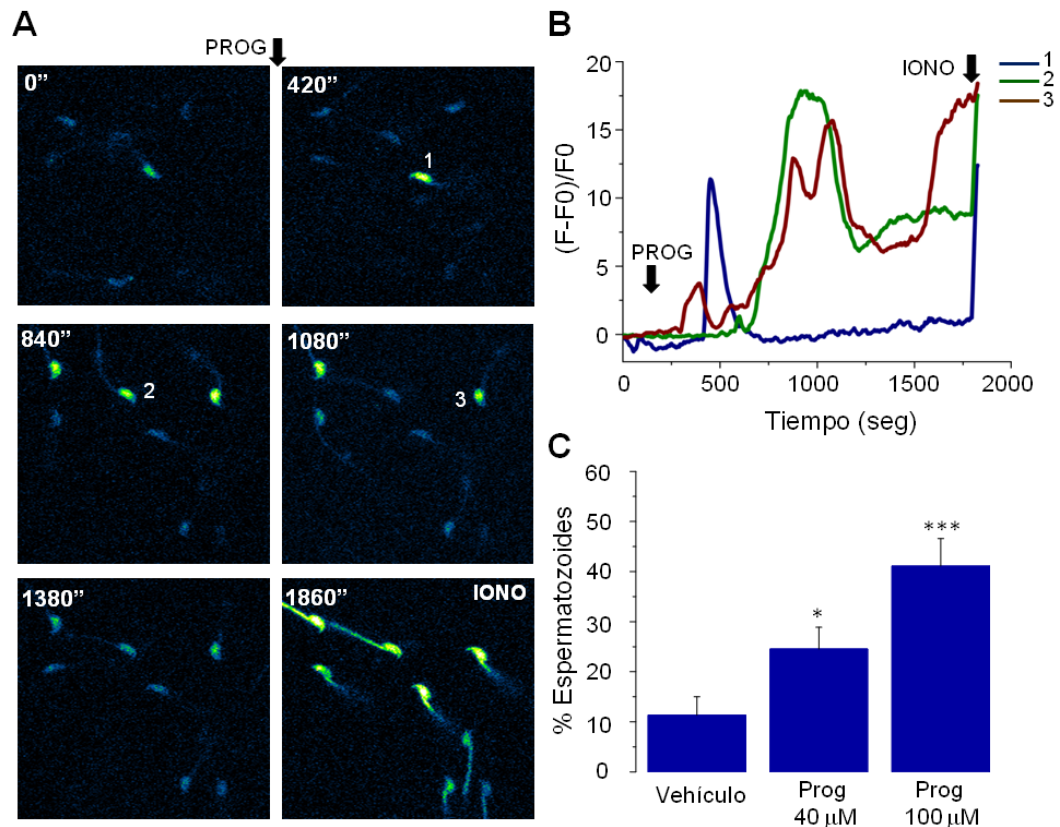


Figura 21. La progesterona promueve un aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ en espermatozoides de ratón cargados con Fluo-4 AM. **A)** Secuencia de imágenes mostrando espermatozoides expuestos a 40 μM de progesterona (PROG) y registrados durante 30 min. Los espermatozoides mostraron un aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ en diferentes momentos durante el experimento. Al final del registro, se adicionó ionomicina (IONO) como control de viabilidad. **B)** Cambios en la fluorescencia correspondientes a los espermatozoides 1, 2 y 3 del campo registrado en A. **C)** Porcentajes de espermatozoides que muestran un aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta al vehículo, con agregado de 40 μM y 100 μM de progesterona. Las flechas negras indican el momento en que se aplicaron la progesterona y la ionomicina. Estos resultados fueron obtenidos mediante el análisis de 319 espermatozoides de 25 ratones; * y *** representan diferencias estadísticamente significativas de $p < 0,05$, y $p < 0,001$, respectivamente, en comparación con el vehículo.

PRINCIPALES PATRONES DE CAMBIOS EN EL $[Ca^{2+}]_i$ INDUCIDOS POR LA PROGESTERONA

En virtud de la variabilidad observada en los aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por progesterona, se procedió a realizar un estudio detallado de los mismos. La estimulación por progesterona resultó en principalmente cinco patrones diferentes de aumento del $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza del espermatozoide: sostenido, transitorio inmediato, oscilatorio, transitorio tardío y gradual (**Figura 22A**). La Figura 22B ilustra secuencias de imágenes representativas de cada uno de estos patrones. La

mayoría de los espermatozoides manifestaron el patrón sostenido (28%) y el transitorio tardío (27%) en respuesta a 100 μ M de progesterona (**Figura 22C**).

La respuesta promedio a la progesterona de cada patrón fue normalizada con la respuesta máxima a la ionomicina (para minimizar la variación entre los experimentos) y comparada con la respuesta inicial basal. La magnitud de la respuesta de cada patrón fue estadísticamente diferente a la respuesta basal a excepción de la respuesta de incremento gradual. Además, cuando se compararon todos los patrones entre sí, la respuesta transitoria tardía fue estadísticamente diferente a las respuestas de aumento oscilatorio, sostenido y gradual (**Figura 22D**).

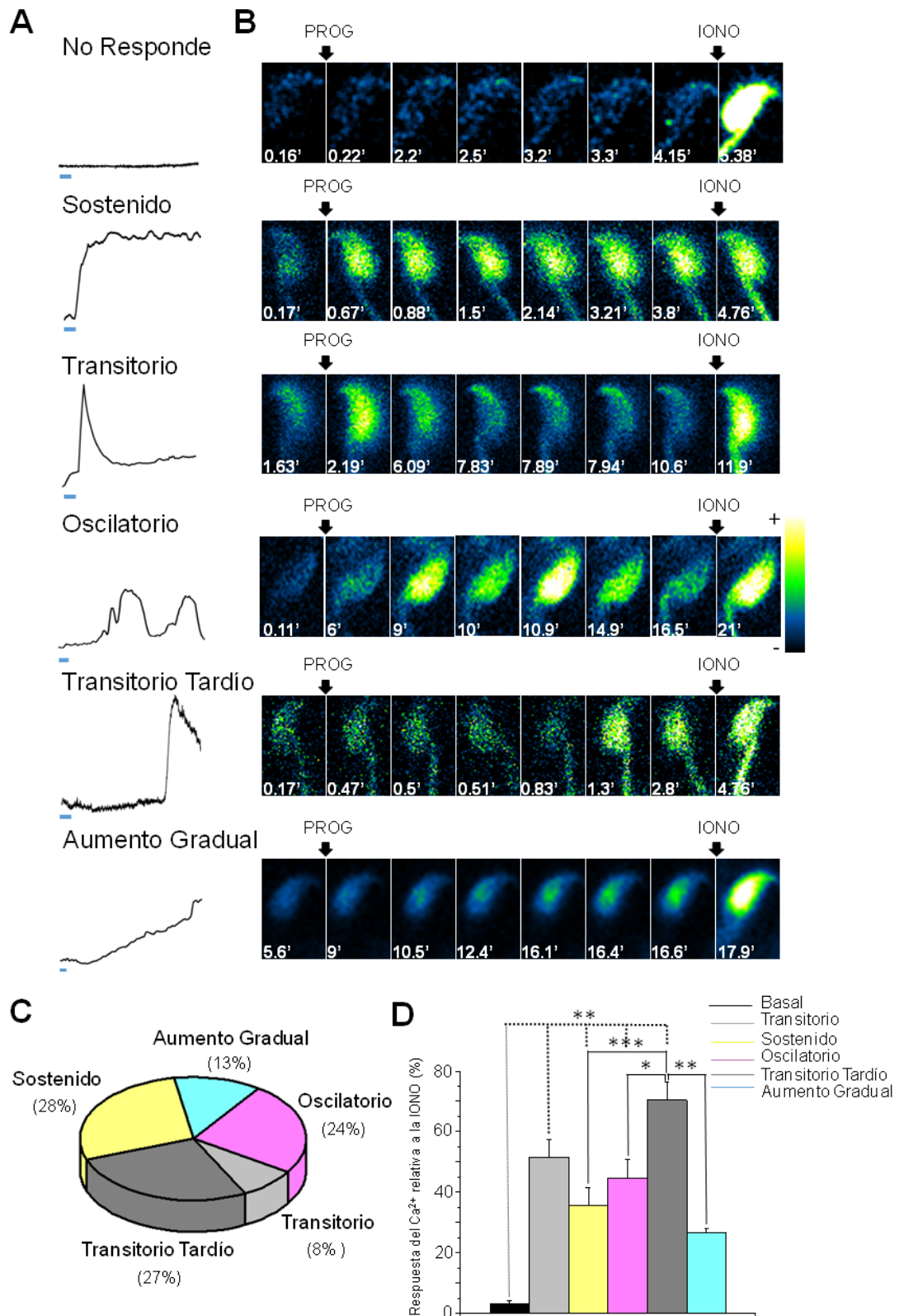


Figura 22. Los espermatozoides de ratón poseen diferentes patrones de aumento del $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la progesterona. A) Gráficos que representan los diferentes patrones de aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ observados en la cabeza de los espermatozoides como resultado de la adición de 100 μM de progesterona (PROG). De acuerdo con la respuesta en el calcio, los patrones de incremento fueron clasificados como sostenido, transitorio, oscilatorio, transitorio tardío y gradual. La barra debajo de los trazos representa la escala de tiempo = 1

min. **B)** Imágenes representativas a lo largo del tiempo de espermatozoides cargados con Fluo-4 AM tras la adición de 100 μM de progesterona y 10 μM de ionomicina (IONO). **C)** Porcentaje de espermatozoides que manifiestan cada uno de los patrones observados. Estos resultados fueron obtenidos mediante el análisis de 184 espermatozoides a partir de 10 ratones. **D)** Comparación del aumento en el calcio en respuesta a la progesterona normalizado con la respuesta a la ionomicina. Estos resultados fueron obtenidos mediante el análisis de 184 espermatozoides de 10 ratones; *, ** y *** representan diferencias estadísticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$, respectivamente.

EN LA MAYORÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES, LA PROGESTERONA ELEVÓ EL $[\text{Ca}^{2+}]_i$ PRIMERO EN EL FLAGELO Y LUEGO ESTA ELEVACIÓN SE PROPAGÓ EN DIRECCIÓN ANTERÓGRADA

Los experimentos sobre la direccionalidad y cinética de los cambios en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provocados por la progesterona fueron llevados a cabo sobre cubreobjetos recubiertos con laminina, lo que permitió inmovilizar y por tanto visualizar cambios en la cabeza del espermatozoide y ocasionalmente en la pieza media, pero no en la pieza principal del flagelo. Estos experimentos revelaron tres direcciones de la propagación de calcio diferentes: anterógrada (de la pieza media del flagelo hacia la cabeza), retrógrada (de la cabeza a la pieza media del flagelo) y otras (no determinadas con precisión). Las ROIs evaluadas en estas células se representan en la Figura 23A. En la Figura 23B se muestran secuencias de imágenes representativas de un espermatozoide en el cual la progesterona indujo un aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se propagó en dirección anterógrada. El aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se nota primero en la pieza media anterior (AMP) (véase el panel $t = 116.3''$) seguido de su propagación en dirección posterior a anterior (véase el panel $t = 117''$). Los trazos en el tiempo correspondientes a cada una de las ROIs demarcadas en este experimento se ilustran en la Figura 23C. Los retrasos temporales de las diferentes áreas analizadas (calculados como el tiempo promedio que tardó en aumentar el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en dicha área, considerando como tiempo cero seg al momento de la adición de la progesterona) se muestran en la Figura 23D. En la Figura 23E se muestra una secuencia representativa de imágenes correspondientes a un espermatozoide que exhibe un aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con dirección de propagación retrógrada. En este caso la progesterona elevó primero el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la región post acrosomal (PA) (véase el panel $t = 133.6''$) seguido de una propagación en dirección anterior a posterior (véase el panel $t = 212''$). Los trazos en el tiempo correspondientes a cada una de las ROIs demarcadas de este experimento se ilustran en la Figura 23F. Los retrasos temporales de las diferentes

áreas analizadas se muestran en la Figura 23G. La direccionalidad anterógrada ocurrió con mayor frecuencia que la propagación retrógrada (85% vs. 10% respectivamente).

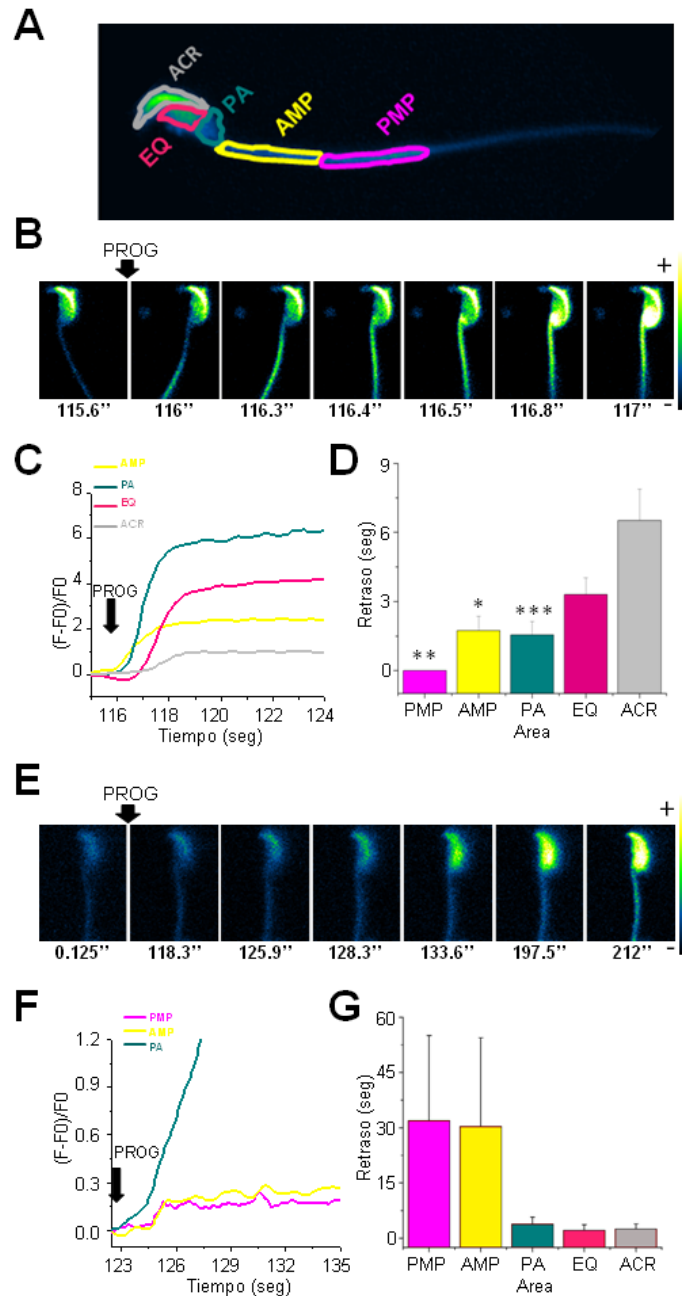


Figura 23. Direccionalidad de la propagación del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la progesterona en los espermatozoides de ratón inmovilizados con laminina. A) Diagrama representativo de las diferentes zonas del espermatozoide evaluadas en este experimento. PMP, pieza media posterior; AMP, pieza media anterior; PA, región post acrosomal; EQ, segmento ecuatorial; ACR, acrosoma. **B)** Imágenes representativas a lo largo del tiempo de espermatozoides cargados con Fluo-4 AM tras la adición de 100 μ M de progesterona presentando una dirección anterógrada de la ola de propagación del aumento de $[Ca^{2+}]_i$. **C)** Gráfica temporal de los cambios en la fluorescencia del Fluo-4 en cada una de las

zonas evaluadas en el espermatozoide mostrado en B. **D)** Retrasos del aumento de calcio en las áreas analizadas en espermatozoides con dirección anterógrada de la propagación del aumento del $[Ca^{2+}]_i$ (n= 25). Los resultados se expresan como la media $\pm$ ESM. *, ** y *** representan diferencias estadísticamente significativas de $p<0,05$, $p<0,01$ y $p<0,001$, respectivamente comparados con el retraso en ACR. **E)** Imágenes representativas a lo largo del tiempo de espermatozoides cargados con Fluo-4 AM tras la adición de 100 μ M de progesterona exhibiendo una dirección retrógrada en la propagación del aumento del $[Ca^{2+}]_i$. **F)** Gráfica temporal de los cambios en la fluorescencia del Fluo-4 en cada una de las áreas evaluadas del espermatozoide que se muestra en E. **G)** Retrasos del aumento de calcio en las áreas analizadas en espermatozoides con una dirección retrógrada de la propagación del aumento del $[Ca^{2+}]_i$ (n= 25). Los resultados se expresan como la media $\pm$ ESM. Las comparaciones entre todas las áreas no fueron estadísticamente diferentes.

Para analizar las características de la propagación de los cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la progesterona en la pieza principal del flagelo, los espermatozoides fueron adheridos a cubreobjetos recubiertos con concanavalina A, la cual inmoviliza la mayor parte de esta zona (**Figura 24A**). Las ROIs evaluadas en estas células se representan en la Figura 24A. La Figura 24B muestra una secuencia representativa de imágenes obtenidas durante estos experimentos. La progesterona primero aumentó el $[Ca^{2+}]_i$ en la pieza principal anterior (APP) (véase el panel $t = 24.6''$), que luego se propagó en dirección tanto anterior como posterior, hacia la cabeza (H) y la pieza principal posterior (PPP). Los trazos en el tiempo correspondientes a este experimento se ilustran en la Figura 24C. Los retrasos temporales de las diferentes áreas analizadas se muestran en la Figura 24D.

Dado que las diferencias de propagación de los cambios observados en el $[Ca^{2+}]_i$ podrían deberse a un artefacto de difusión de la progesterona, el mismo protocolo experimental fue llevado a cabo utilizando ionomicina, un potente y ampliamente utilizado inductor no fisiológico del aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ y de la EA. La estimulación con ionomicina resultó en un fuerte incremento en el $[Ca^{2+}]_i$ en $t = 92.4''$ (**Figura 24E**), pero a diferencia de lo observado con la progesterona, no hubo un punto de iniciación preferencial para la elevación en el $[Ca^{2+}]_i$ ya que este aumentó uniformemente en toda la célula. Los trazos de fluorescencia correspondientes a este experimento se ilustran en la Figura 24F. Curiosamente, también se ha observado que ciertas regiones de la pieza media del espermatozoide reflejaron un segundo y sustancial aumento en el calcio. El motivo de este segundo aumento inducido por la ionomicina es desconocido y requerirá más investigación al respecto. Los retrasos

observados entre regiones con la ionomicina fueron mínimos comparados con aquellos documentados con la progesterona, y se resumen en la Figura 24G.

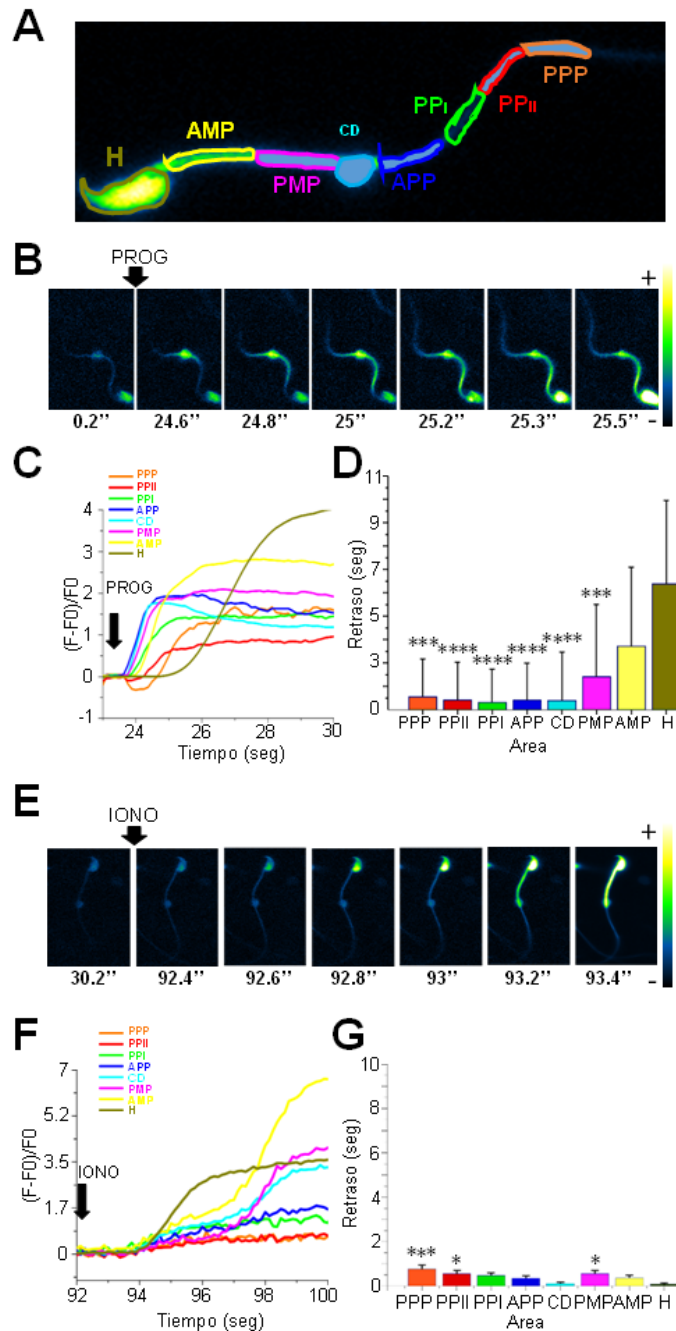


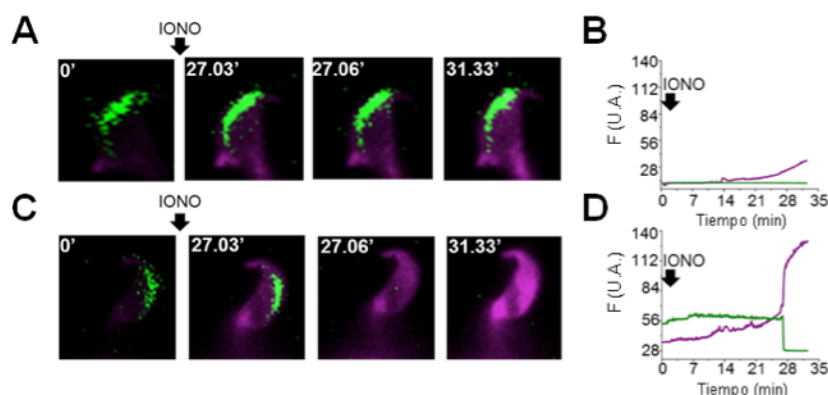
Figura 24. Direccionalidad de la propagación del aumento de $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la progesterona en espermatozoides de ratón inmovilizados con concanavalina-A. **A)** Diagrama representativo de las diferentes áreas del espermatozoide evaluadas en los espermatozoides adheridos a cubreobjetos recubiertos con concanavalina-A. PPP, pieza principal posterior; PPPII, pieza principal posterior II; PPPI, pieza principal posterior I; APP, pieza principal anterior; CD, gota citoplasmática; PMP, pieza media posterior; AMP, pieza media anterior; H, cabeza. **B y E)** Imágenes representativas a lo largo del tiempo de espermatozoides marcados con Fluo-4 AM tras la adición de 100 μ M de progesterona o 10 μ M de ionomicina como control, respectivamente. **C y F)** Gráfica temporal de los cambios en la

fluorescencia en cada una de las áreas del espermatozoide mostradas en B y E, respectivamente. **D y G)** Retrasos del aumento de calcio en las áreas analizadas en espermatozoides estimulados con progesterona o ionomicina respectivamente (n= 8). *, ** y *** representan diferencias estadísticamente significativas de $p < 0,05$, $p < 0,001$ y $p < 0,0001$, respectivamente, comparadas con la cabeza (H).

LA EA DEL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN PUEDE MONITOREARSE UTILIZANDO EL COLORANTE FM4-64

En nuestro laboratorio utilizamos el ratón transgénico que contiene EGFP en el acrosoma como método para estudiar la EA tanto en población por citometría de flujo como también en célula única. Sin embargo, las características espectrales fluorescentes de esta proteína no son compatibles con la utilización del colorante de calcio Fluo-4. Se ha demostrado recientemente que el colorante FM4-64 puede utilizarse para detectar la EA en espermatozoides individuales humanos (Sánchez-Cárdenas et al., 2014) y sus características de fluorescencia son compatibles con el registro simultáneo de la fluorescencia del Fluo-4. Por lo tanto, validamos el uso del FM4-64 como un método alternativo para detectar la EA en espermatozoides individuales de ratón. Para validar el uso de este colorante, detectamos simultáneamente la fluorescencia del EGFP y del FM4-64 en espermatozoides transgénicos EGFP expuestos a 10 μM de ionomicina. Aquellos espermatozoides que se mantuvieron intactos durante el análisis a juzgar por la presencia del EGFP acrosomal, no aumentaron su fluorescencia del FM4-64 (**Figura 25A-B**). En cambio, aquellos espermatozoides que realizaron la EA mostraron la pérdida del EGFP y un aumento en la fluorescencia del FM4-64 (**Figura 25C-D**). Encontramos una correlación total entre los resultados de ambos métodos para medir la EA (n= 3 ratones, 46 células analizadas). El porcentaje de espermatozoides adheridos a los cubreobjetos recubiertos con laminina que experimentó la EA inducida con progesterona e ionomicina fue del $8\% \pm 2$ y 73 ± 25 , respectivamente (n= 10, 368 células analizadas para la progesterona y n= 5, 105 células analizadas para la ionomicina). El porcentaje de células que realizó EA espontánea fue de $0,5 \pm 0,5$ (n= 4, 81 células analizadas). Hubo un retraso de $4,6 \pm 0,7$ seg entre la pérdida de EGFP y el aumento en la fluorescencia del FM4-64 (n= 3 ratones, 8 espermatozoides reaccionados). La validación del FM4-64 como un indicador de la EA en el espermatozoide de ratón nos permitió visualizar simultáneamente el aumento en los

niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y el proceso de exocitosis en respuesta a la progesterona, cuyos resultados se mostrarán en las figuras subsiguientes.



LA PROGESTERONA DESENCADENA UN AUMENTO TRANSITORIO EN EL $[Ca^{2+}]_i$ QUE PROMUEVE LA EA EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN

Posteriormente, procedimos a examinar los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ y EA en espermatozoides cargados simultáneamente con FM4-64 y Fluo-4 AM adheridos a cubreobjetos recubiertos con laminina (**Figura 26**) y registramos durante 30 min tras la estimulación con progesterona o ionomicina.

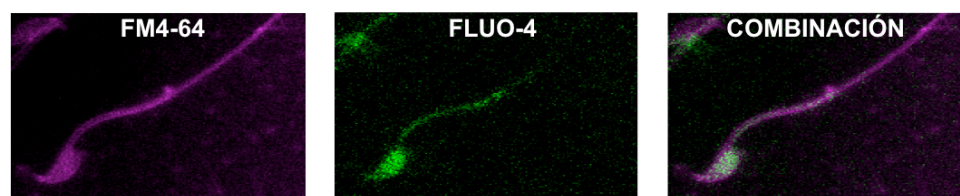


Figura 26. Imágenes de fluorescencia de espermatozoides marcados con FM4-64 y Fluo-4 AM.

La Figura 27A muestra imágenes representativas de un experimento en el cual la progesterona indujo la EA en un solo espermatozoide (a juzgar por la tinción del FM4-64) a pesar de que varias células mostraron una respuesta en el $[Ca^{2+}]_i$ (a $t = 75''$ y $350''$). A diferencia de lo sucedido con la progesterona, la ionomicina aumentó el $[Ca^{2+}]_i$ en la mayoría de los espermatozoides ($t = 70''$). Sin embargo, sólo un espermatozoide estimulado con ionomicina realizó la EA a $t = 650''$ y no fue hasta $t = 1600''$ que varios espermatozoides iniciaron la EA (**Figura 27B**). La Figura 27C ilustra con mayor magnificación que el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ promovido por la progesterona ($t = 75''$) precedió al aumento en la fluorescencia del FM4-64 ($t = 85''$). Cuando la tinción del FM4-64 se hizo evidente, se observó una disminución gradual en la fluorescencia del Fluo-4, mientras que la fluorescencia del FM4-64 permaneció inalterada (**Figura 27C y D**). Por otro lado, la estimulación con ionomicina reveló que un aumento sostenido en el $[Ca^{2+}]_i$ precedió a la iniciación de la EA por un período de tiempo más largo. Curiosamente, la ionomicina no promovió la pérdida de fluorescencia del Fluo-4 en toda la cabeza, tal como se observó con la progesterona (**Figura 27E y F**). Los espermatozoides que realizaron la EA tras la adición de progesterona comenzaron a perder la fluorescencia del Fluo-4 14 seg después de la iniciación de la EA. Por el contrario, los experimentos utilizando ionomicina mostraron que sólo una pérdida local en la fluorescencia del Fluo-4 sucede recién 50 seg después de la iniciación de la EA. Sólo una pequeña área que se asemeja al acrosoma se vació de calcio tras la EA (véase la flecha en **Figura 27E**). Los trazos correspondientes a este experimento se muestran en la Figura 27F.

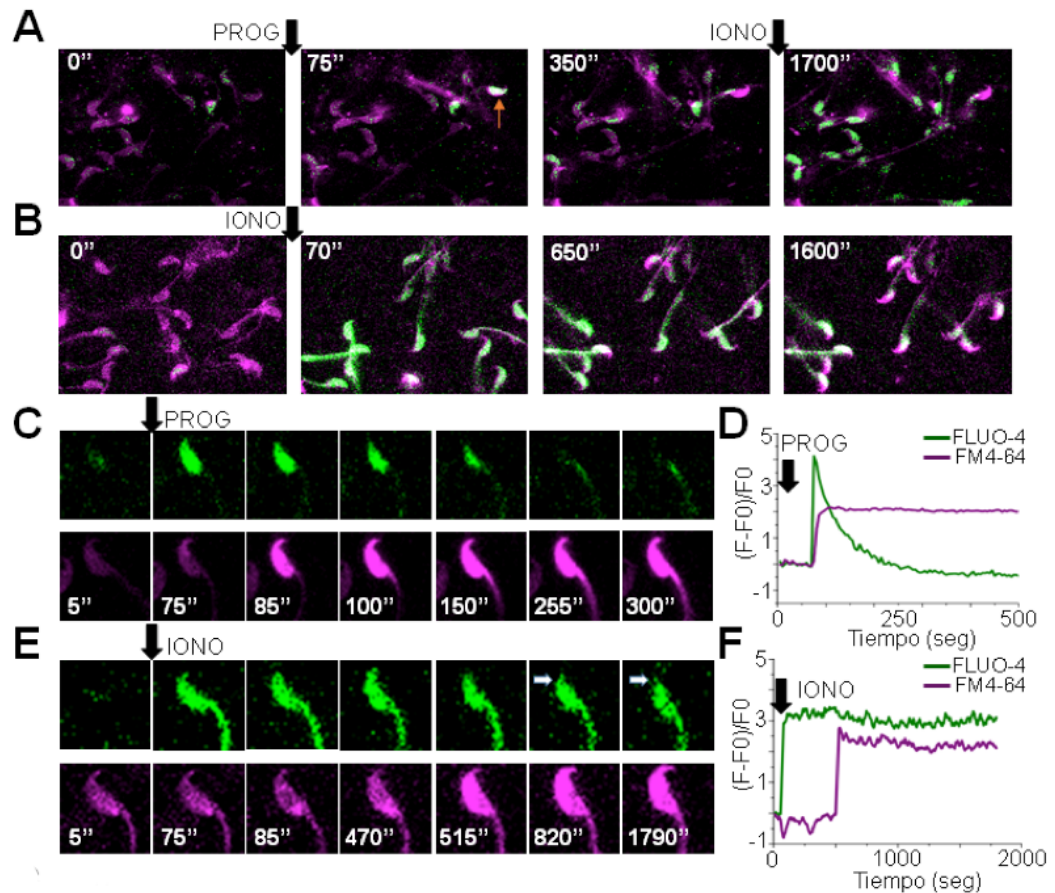


Figura 27. Mediciones alternadas del $[Ca^{2+}]_i$ y la EA en espermatozoides de ratón. A y B) Fluorescencia del Fluo-4 y del FM4-64 de espermatozoides expuestos a progesterona (PROG) o ionomicina (IONO) respectivamente. La flecha en el panel correspondiente a los 75'' indica un espermatozoide que incrementó su $[Ca^{2+}]_i$ y realizó la EA (en el panel correspondiente a los 350''). **C)** Imágenes representativas de la fluorescencia alternada del Fluo-4 y el FM4-64 de un espermatozoide experimentando una respuesta a la progesterona. **D)** Cambios en la fluorescencia del Fluo-4 y el FM4-64 observados en el espermatozoide mostrado en C. **E)** Imágenes de la fluorescencia alternada del Fluo-4 y el FM4-64 de un espermatozoide representativo respondiendo a la ionomicina. **F)** Cambios observados en la fluorescencia del Fluo-4 y el FM4-64 durante los registros del espermatozoide que se muestra en E.

Como se ha indicado anteriormente, los espermatozoides de ratón manifestaron cinco patrones diferentes en el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ en la cabeza, en respuesta a la progesterona (**Figura 22B**). Sin embargo, el patrón específico de aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ que fue asociado a la iniciación de la EA en todas las células analizadas fue el transitorio inmediato (**Figura 27D**, $n = 8$ ratones, 21 células reaccionadas). Análisis adicionales revelaron que la mayoría de los espermatozoides realizaron la EA en respuesta a la progesterona durante los primeros 5-10 min posteriores a la estimulación ($75\% \pm 11,1$) (**Figura 28**). En contraste, la mayoría de los

espermatozoides realizaron la EA en respuesta a la ionomicina sólo después de pasados 20 min desde su adición. La progesterona indujo la EA en un menor número de células, pero se inició más rápido después del aumento en el $[Ca^{2+}]_i$. En cambio, la ionomicina desencadenó la EA en más espermatozoides pero esta comenzó más tarde luego del incremento en el $[Ca^{2+}]_i$.

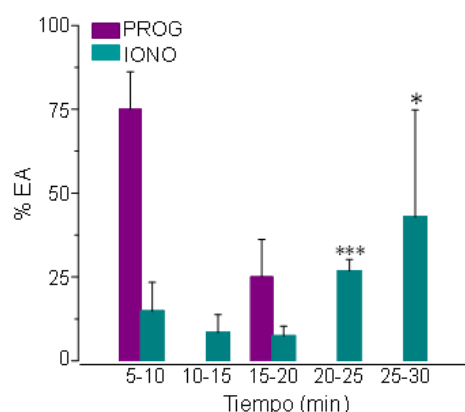


Figura 28. Porcentaje de EA estimulado por progesterona o ionomicina a diferentes tiempos, para la población de espermatozoides que reaccionó. El tiempo de la EA fue establecido como el tiempo en el que la fluorescencia del FM4-64 se incrementó significativamente. $n = 8$ ratones, 21 células reaccionadas y $n = 4$ ratones, 43 células reaccionadas para experimentos con progesterona e ionomicina respectivamente. * y *** representan diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas a la progesterona y a la ionomicina de $p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente.

La dinámica entre el $[Ca^{2+}]_i$ y la EA fue examinada más a fondo en los espermatozoides estimulados ya sea con progesterona o ionomicina. Los parámetros analizados fueron: F4 (demora para el incremento en la fluorescencia del Fluo-4), FM (demora para el incremento en la fluorescencia del FM4-64), DF4 (demora para la disminución en la fluorescencia del Fluo-4), PTF4 (demora para la pérdida total de la fluorescencia del Fluo-4 en la cabeza). La Figura 29 resume los datos obtenidos a partir de los experimentos que utilizaron estimulación con progesterona o ionomicina.

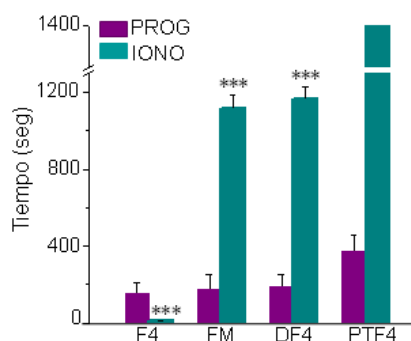


Figura 29. Tiempo promedio en el cual ocurrieron los procesos indicados tras la estimulación con progesterona o ionomicina: F4 (retraso para el incremento en la fluorescencia del Fluo-4), FM (retraso para el incremento en la fluorescencia del FM4-64), DF4 (retraso para la disminución en la fluorescencia del Fluo-4), PTF4 (retraso para la pérdida total de la fluorescencia del Fluo-4 en la cabeza). $n= 8$ ratones, 21 células reaccionadas y $n= 4$ ratones, 43 células reaccionadas para experimentos con progesterona e ionomicina respectivamente. *** representa diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas a la progesterona y a la ionomicina de $p < 0,001$.

Los resultados del análisis anterior indican que la relación temporal entre el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ y la EA es muy diferente dependiendo del agonista aplicado. En promedio, la ionomicina aumentó el $[Ca^{2+}]_i$ antes ($2,5 \pm 0,6$ seg) que la progesterona (155 ± 54 seg), pero notablemente la mayoría de las células experimentaron la EA antes con la progesterona (172 ± 76 seg) que con la ionomicina (1117 ± 68 seg) (**Figura 28 y 29**).

UN AUMENTO CON DIRECCIÓN ANTERIOR-POSTERIOR EN EL $[Ca^{2+}]_i$ PROMOVIDO POR LA PROGESTERONA INDUCE LA EA EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATÓN

Los experimentos detallados previamente se realizaron a una velocidad de adquisición de ~ 1 imagen/5 seg, donde el fotodaño celular fue minimizado. Sin embargo, para resolver espacialmente el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ que conduce a la iniciación de la EA, fue necesaria una resolución temporal más elevada. Por este motivo, los experimentos fueron llevados a cabo utilizando un divisor de imágenes para registrar simultáneamente las fluorescencias del Fluo-4 y el FM4-64 y aumentando la velocidad de adquisición de imágenes a 2 imágenes por seg, minimizando así el daño al espermatozoide.

Analizamos la direccionalidad de la propagación del aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ en aquellos espermatozoides que realizaron EA. Las definiciones de anterógrada (de la

cola a la cabeza) y retrógrada (de la cabeza a la cola) utilizadas en esta Figura son las mismas que las utilizadas en la Figura 23. Sin embargo, aunque pudimos observar claramente la direccionalidad de la propagación de la onda de calcio, no pudimos realizar el análisis regional detallado que se exhibe en la Figura 23, ya que la cantidad de imágenes adquiridas por seg en estos experimentos fue la mínima para reducir el daño celular.

En la Figura 30A se muestra un ejemplo de un espermatozoide donde el incremento en el $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la progesterona se propaga desde el área anterior de la cabeza del espermatozoide a la zona posterior. Los trazos de fluorescencia correspondientes al experimento se ilustran en la Figura 30B. Esta dirección del aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ ocurre en el 83% de las células que realizan EA. Por otro lado, en el 17% de las células que realizan la EA, la progesterona inició el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ en la zona posterior de la cabeza (véase la **Figura 30C**). Los trazos de fluorescencia correspondientes a este experimento se ilustran en la Figura 30D. Estos resultados se resumen en la Figura 30E.

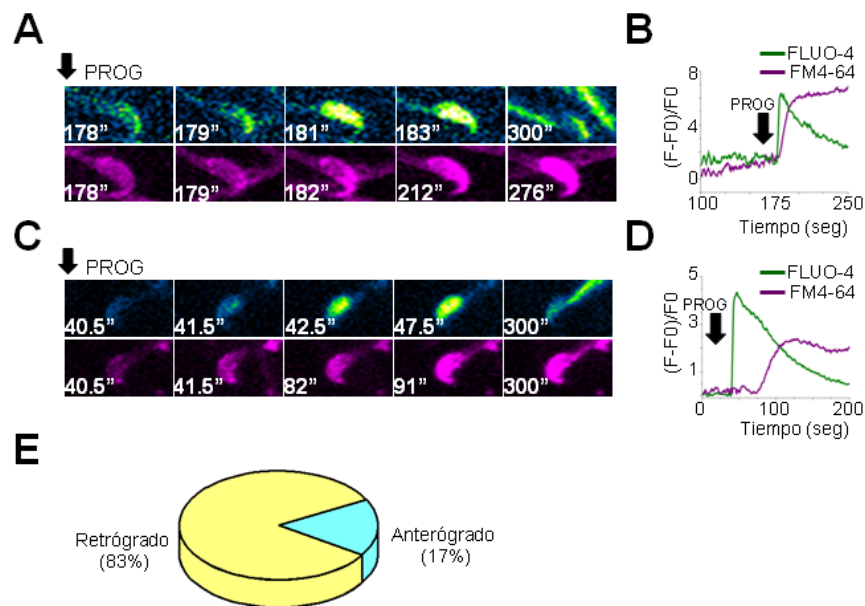


Figura 30. Registros simultáneos del $[Ca^{2+}]_i$ y la EA. **A)** Imágenes del Fluo-4 y el FM4-64 de un ejemplo representativo de una célula realizando la EA en la cual la progesterona inició el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ en la zona anterior de la cabeza. Los trazos de fluorescencia del Fluo-4 y el FM4-64 correspondientes se muestran en **B**. **C)** Imágenes del Fluo-4 y el FM4-64 de un espermatozoide representativo realizando la EA en el cual la progesterona incrementa el $[Ca^{2+}]_i$ en el área posterior de la cabeza y se propaga hacia la zona anterior. Los trazos de fluorescencia del Fluo-4 y el FM4-64 correspondientes se muestran en **D**. **E)** Porcentaje de

espermatozoides que sufrieron la EA con propagación anterógrada o retrógrada (n= 4 ratones, 17 células reaccionadas).

DISCUSIÓN

Una característica fundamental y común a los inductores fisiológicos y farmacológicos de la EA tales como la progesterona o la ZP, es que provocan elevaciones multicomponentes del Ca^{2+} intracelular (Darszon et al., 2011; Lishko et al., 2012; Marín-Briggiler et al., 2003; Meizel et al., 1997). Sin embargo, la relación espacio-temporal entre el aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la EA inducida por progesterona no ha sido completamente establecida en los espermatozoides de ratón. En este estudio, demostramos por primera vez que un patrón específico en el aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ originado en la cabeza del espermatozoide desencadena de manera eficiente la EA inducida por progesterona.

La progesterona ha sido implicada no sólo en la EA, sino también en varias funciones del espermatozoide tales como la capacitación, la hiperactivación y la quimiotaxis (Baldi et al., 2009; Barboni et al., 1995; Suarez and Ho, 2003). La concentración de progesterona necesaria para estos eventos varía según la especie, pero usualmente se encuentra en el rango micromolar, a excepción de la quimiotaxis que se encuentra en el rango picomolar (Gatica et al., 2013; Oren-Benaroya et al., 2008). La función específica estimulada por la progesterona probablemente esté vinculada con su concentración, la distribución de sus receptores y el patrón espacio-temporal en los cambios del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que estimule. Se ha reportado que el fluido folicular humano contiene aproximadamente entre 5-10 μM de progesterona libre (Westergaard et al., 2004), sin embargo, su concentración efectiva podría ser cinco veces mayor, considerando la globulina que une corticosteroides contenida en el fluido folicular (Miska et al., 1994).

Sólo un subconjunto de espermatozoides de ratón respondió con un aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras ser estimulados con progesterona. Las respuestas fueron variadas: lentas y sostenidas, rápidas, ya sea mantenidas o transitorias, y oscilatorias (**Figura 22**). Entre los tipos de aumento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducidos por la progesterona en el espermatozoide de ratón, el 8% exhibió un patrón transitorio inmediato, que para nuestra sorpresa fueron los únicos espermatozoides capaces de desencadenar la EA. Estas cifras son consistentes con otros reportes que señalan que una reducida fracción de células realiza la exocitosis tras la estimulación con progesterona

(Hirohashi et al., 2015; Kobori et al., 2000; Roldan et al., 1994). El bajo porcentaje de espermatozoides reaccionados puede estar relacionado también con el hecho que durante la capacitación sólo una pequeña fracción de los mismos ha realizado los eventos moleculares necesarios para poder llevar a cabo la EA (Buffone et al., 2014a).

A diferencia de lo que reportamos aquí para el espermatozoide de ratón, las observaciones de la EA y los cambios en el $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por progesterona en el espermatozoide humano revelaron que un segundo aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ precede a la EA y la pérdida de la fluorescencia del Fluo-4. La presencia del segundo pico de $[Ca^{2+}]_i$ es la señal para iniciar la EA en la mayoría de las células (Sánchez-Cárdenas et al., 2014). En los espermatozoides humanos, el aumento de calcio inducido por la progesterona no se inicia en la misma región en todos los espermatozoides. Al utilizar ionomicina, el espermatozoide inicia el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ sin preferencia alguna en cuanto a las diferentes regiones de la cabeza del espermatozoide tanto en ratones como en humanos (Sánchez-Cárdenas et al., 2014). Por el contrario, en el ratón, el aumento de calcio inducido por un estímulo más fisiológico como la progesterona comienza en la región anterior de la cabeza del espermatozoide. Se ha obtenido una conclusión similar en los espermatozoides murinos en cuanto al sitio de inicio de la EA promovida ya sea por la ZP o por ionóforo de Ca^{2+} (Buffone et al., 2009). En humanos, de forma similar a lo que hemos observado en el ratón, la mayoría de los espermatozoides que experimentan oscilaciones en el $[Ca^{2+}]_i$ tras la adición de progesterona, no realizan EA.

A la fecha, aún existe controversia respecto del origen del aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ que conduce a la EA. Algunos reportes sostienen que el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la ZP comienza en el flagelo del espermatozoide (Xia and Ren, 2009), mientras que otros sólo describen la dinámica del Ca^{2+} en la cabeza del espermatozoide sin analizar lo que ocurre en el flagelo (Fukami et al., 2001). Nuestros estudios indican consistentemente que sólo el aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ originado en la cabeza del espermatozoide es capaz de promover la EA en respuesta a la progesterona. Se sabe que el Ca^{2+} se encuentra almacenado en dos organelas principales: en el acrosoma y en vesículas de la envoltura nuclear redundante (Correia et al., 2015; De Blas et al., 2002; Ho and Suarez, 2003). La elevación inicial y transitoria del Ca^{2+} activa una PLC δ sensible al Ca^{2+} que hidroliza el PIP2 para producir DAG e IP3 (Fukami et al., 2001). La ausencia de PLC δ 4/ATLII inhibe significativamente la liberación del $[Ca^{2+}]_i$ inducido

por ZP o progesterona (Fukami et al., 2003). Tanto el acrosoma como la envoltura nuclear redundante poseen receptores IP3, que son esenciales para la liberación de Ca^{2+} inducida por IP3. Como aún no existen inhibidores específicos para bloquear en forma selectiva la liberación de Ca^{2+} de estos reservorios, no ha sido posible determinar cuál(es) depósito(s) de Ca^{2+} es(son) el(los) responsable(s) de la liberación de este catión en los últimos pasos de la EA.

De acuerdo con nuestros hallazgos, sólo el espermatozoide de ratón que exhibe un incremento transitorio en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a la progesterona realiza la EA en cuestión de seg. Los espermatozoides que exhiben una elevación persistente en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ no realizan exocitosis. Esto coincide con nuestra observación de que los espermatozoides estimulados con ionomicina inmediatamente aumentaron su $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en forma sostenida pero, curiosamente, no realizaron la exocitosis hasta 20 min más tarde. Es notable que en esta situación, la mayoría de las células realizó la EA. Las bases moleculares de esta diferencia son actualmente desconocidas. Sin embargo, es posible que un rápido descenso del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sea importante para permitir la exocitosis de forma eficiente. En el caso de la progesterona, la disminución observada en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede ser causada por una rápida absorción dentro de los depósitos de calcio presentes en la cabeza del espermatozoide y el eflujo hacia el medio extracelular, y no por la pérdida del colorante durante la exocitosis causada por la vesiculización de la membrana plasmática, dado que la adición de ionóforo de Ca^{2+} a aquellas células que manifestaron este patrón transitorio e iniciaron de manera eficiente la EA resultó en un nuevo incremento en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (véase la **Figura 22**). En relación a esta hipótesis, se ha demostrado recientemente que la ATPasa de calcio SPCA1 es fundamental para volver a llenar los depósitos de Ca^{2+} en la cabeza del espermatozoide humano tras la adición de progesterona (Harper et al., 2005). Estas posibilidades necesitan ser examinadas más a fondo en el futuro.

El efecto de la progesterona en el espermatozoide no parece involucrar la regulación clásica mediante receptores nucleares. Se ha reportado la presencia de algunos receptores de progesterona no-genómicos en la membrana del espermatozoide de mamífero, incluyendo el canal de calcio CatSper (Guidobaldi et al., 2008; Morgan et al., 2008; Thomas, 2008; Thomas et al., 2009). Observaciones preliminares han indicado que un complejo, único en el espermatozoide humano, formado por un receptor de esteroides y un canal de Cl^- , podría estar involucrado en

la EA inducida por progesterona (Wistrom and Meizel, 1993). En otros estudios, se ha propuesto que un receptor de tipo GABA participa en este proceso en los espermatozoides de ratón (Shi and Roldan, 1995). Siguiendo esta idea, también se ha propuesto que un rápido eflujo de Cl^- es necesario para la EA mediada por progesterona en seres humanos (Turner and Meizel, 1995). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la identidad del receptor involucrado en la EA murina inducida por progesterona es la hidrolasa de lípidos ABHD2 (Miller et al., 2016b). Con las nuevas herramientas disponibles se espera que en el futuro cercano se revelen con mayor detalle los mecanismos mediante los cuales la progesterona desencadena la EA.

CONCLUSIONES

La progesterona produce diferentes respuestas en el Ca^{2+} intracelular en el espermatozoide de ratón, pero sólo un aumento transitorio específico en el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ originado en la cabeza del espermatozoide promueve la EA. Los resultados enfatizan la importancia de estudiar los diferentes aspectos de la fisiología del espermatozoide en células individuales utilizando métodos de registro de imágenes en tiempo real.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Teniendo en cuenta la hipótesis en la cual el citoesqueleto de actina prepara al espermatozoide durante la capacitación para poder realizar la EA (por un lado, estabilizando estadios intermedios de exocitosis y por el otro, funcionando como una barrera para el desarrollo de la EA, hasta que llegue a la célula el estímulo adecuado) y que una vez preparado para responder al estímulo, el espermatozoide requiere de un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ para que el proceso se lleve a cabo (véase **Figura 31**), en este trabajo de Tesis nos propusimos estudiar dos eventos puntuales que modulan la EA en el espermatozoide de ratón.

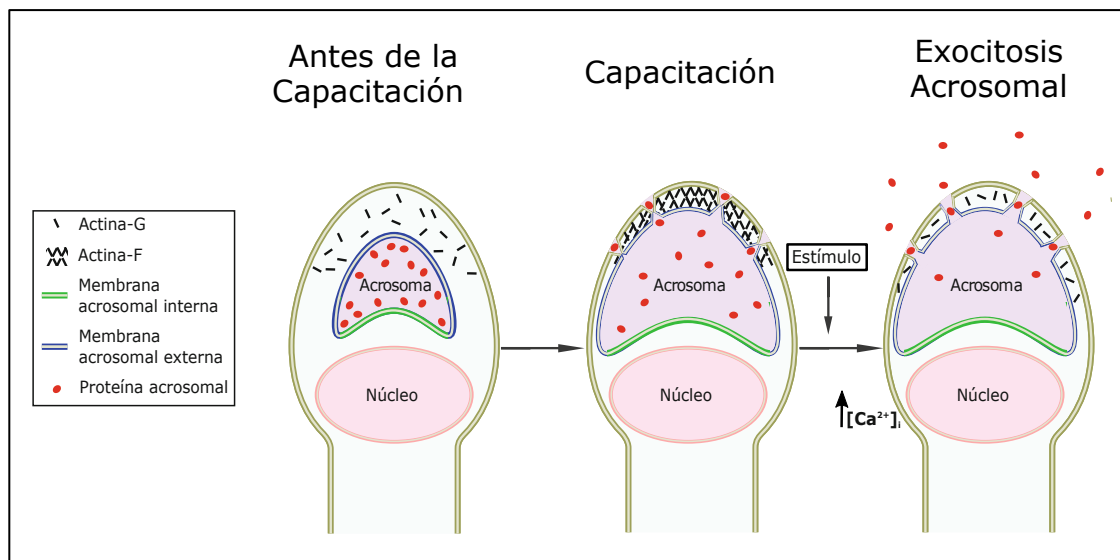


Figura 31. Modelo que esquematiza la hipótesis propuesta para esta Tesis, en la cual el citoesqueleto de actina de actina prepara al espermatozoide para la EA durante la capacitación y un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ es requerido para la progresión fisiológica de este proceso.

El primero de ellos consistió en estudiar la participación de la vía de señalización de las pequeñas GTPasas de la familia Rho en la modulación de estos procesos. Demostramos que dicha vía se encuentra involucrada en la regulación del citoesqueleto de actina durante la capacitación y por tanto, en la preparación del espermatozoide para la EA. Una vez listo el espermatozoide para responder al estímulo de la EA, el segundo evento que estudiamos consistió en determinar cómo debe ser el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ que dispara la EA. Encontramos que a pesar de que la progesterona estimula 5 diferentes patrones de aumento del $[Ca^{2+}]_i$, solo cuando este

aumento es un transitorio inmediato a la adición de la progesterona se produce la EA (véase **Figura 32**).

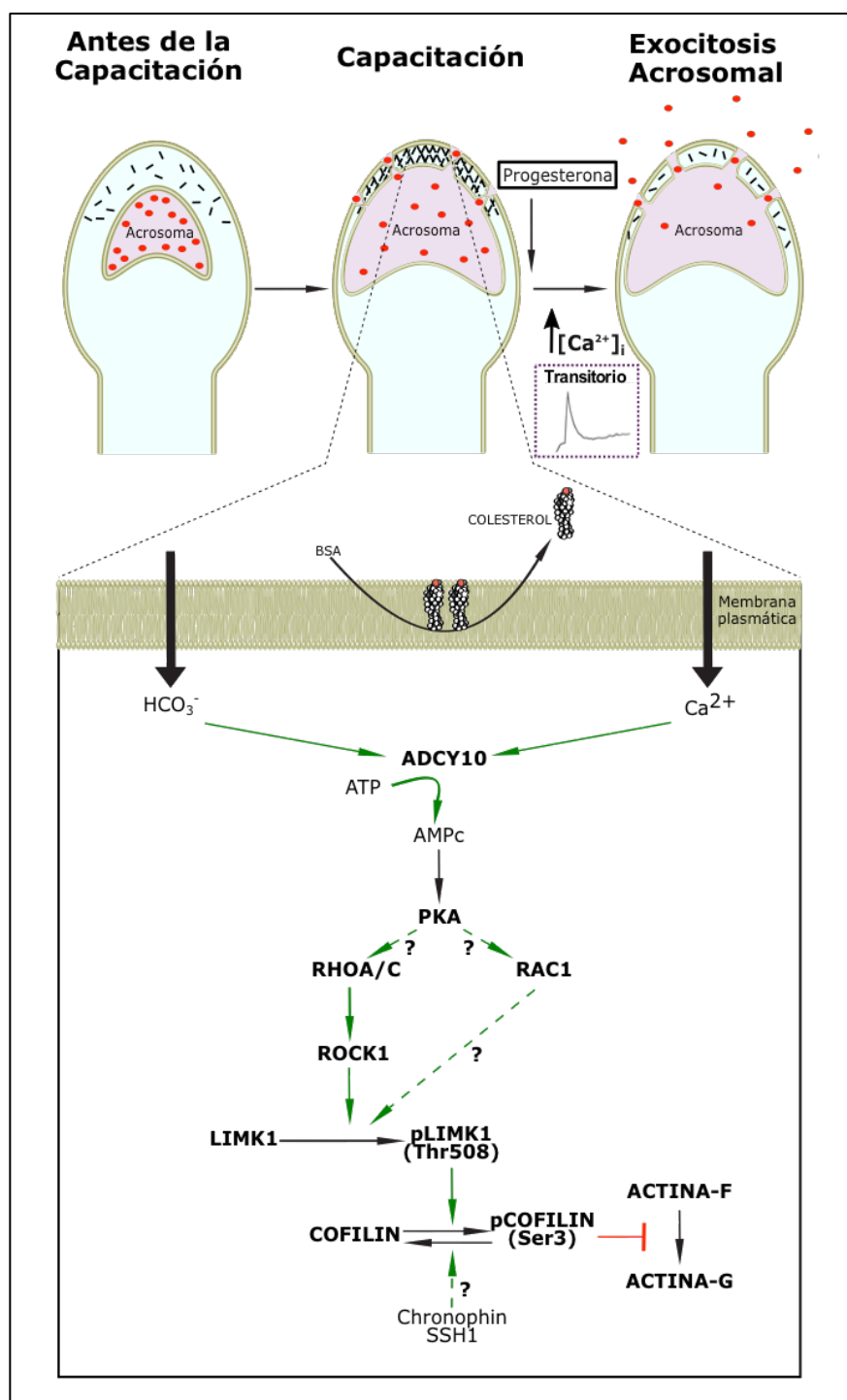


Figura 32. Modelo propuesto para la dinámica del citoesqueleto de actina y para el aumento del $[Ca^{2+}]_i$ que modulan la EA en el espermatozoide de ratón, considerando la participación de las pequeñas GTPasas de la familia Rho en la preparación del espermatozoide para la EA y el patrón específico de aumento del $[Ca^{2+}]_i$ originado en la cabeza del espermatozoide inducido con progesterona que dispara la EA. Modelo diseñado en base a los resultados encontrados en el marco de esta Tesis.

Perspectivas a futuro

Dado que demostramos que la vía de señalización de las pequeñas GTPasas controla la polimerización de actina durante la capacitación en el espermatozoide de ratón, las proteínas involucradas en la modulación de esta cascada de señales regulan un paso esencial para preparar al espermatozoide para realizar EA. En esta Tesis focalizamos nuestra investigación en las quinasas que participan en esta vía pero dilucidar el papel de las fosfatasas en la regulación de la polimerización de actina es fundamental para comprender cómo es controlado este proceso. Es por esto que hoy en día nos encontramos profundizando nuestro estudio en las fosfatasas que regulan los niveles de pCOFILIN y pLIMK1, ya que el efecto funcional final es determinado por un balance entre los niveles de dichas proteínas fosforiladas versus desfosforiladas. Tal como detallamos en la discusión del Capítulo I, la familia de fosfatasas Slingshot (SSH1) podrían estar modulando los niveles de fosforilación tanto de COFILIN como de LIMK1 en el espermatozoide.

Por otro lado, dado que en este trabajo cuando inhibimos a la quinasa PAK1 (que actúa río abajo de la activación de Rac1 y Cdc42) no observamos ningún cambio en los niveles de pLIMK1, aún desconocemos qué miembro de la familia PAK estaría involucrada en mediar el efecto de Rac1 y Cdc42 en el espermatozoide de ratón. Una posibilidad entonces es que Rac1 esté modulando los niveles de pLIMK1 vía PAK4, en vez de vía PAK1 (Soosairajah et al., 2005) y hoy en día estamos haciendo experimentos para dilucidar esto.

Además, aún desconocemos cómo se transducen las señales entre la PKA y las pequeñas GTPasas, dado que no se han estudiado todavía los GEFs y GAPs que modulan la activación de las mismas en el espermatozoide. La activación de la PKA durante la capacitación espermática es crítica. Sin embargo, la misma se encuentra solamente presente en el flagelo del espermatozoide, por lo tanto una posibilidad sería que los cambios en la cabeza estén gobernados por los cambios en el potencial de membrana, que se generan en el flagelo pero se distribuyen a toda la célula. Este mecanismo sería muy novedoso. Asimismo, dado que se ha demostrado que la hiperpolarización es suficiente y necesaria para la EA (De La Vega-Beltran et al., 2012), sería altamente probable que esto implique cambios en el citoesqueleto de actina.

Hoy en día parece evidente que existen cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina durante la capacitación y la EA. Sin embargo, no está claro cómo es que estos cambios conducen a la exocitosis. Es posible que la red de actina controle el anclaje de la MAE y la MP, y al mismo tiempo impida la progresión de la exocitosis hasta recibir el estímulo apropiado, al igual que se observa en ciertas células somáticas y tal como se plantea en la hipótesis de esta Tesis (**Figura 31**). Sin embargo, dadas las propiedades únicas del acrosoma, esta posibilidad necesita ser corroborada experimentalmente. Existen tres limitaciones importantes para el estudio del citoesqueleto de actina y sus proteínas asociadas en el espermatozoide de mamífero: (i) Dado que no existen formas eficientes de generar ratones *knockout* espermatozoide-específicos, no es posible utilizar esta tecnología para estudiar el rol de estas proteínas en el espermatozoide maduro, ya que la mayor parte de estos *knockout* son letales en la etapa embrionaria. (ii) Otro problema con el enfoque transgénico es que la actina y sus proteínas asociadas son muy importantes durante la espermatogénesis, por lo que cualquier alteración en la función de estas proteínas puede potencialmente tener alteraciones muy concretas durante este proceso y por lo tanto, generar espermatozoides maduros con importantes alteraciones morfológicas y/o funcionales. (iii) Además, la mayor parte de nuestro conocimiento sobre la actina en el espermatozoide de mamífero proviene de experimentos que utilizan células fijadas (como la tinción con faloidina) o lisadas (ultracentrifugación para separar la actina-G y la F). Las nuevas tecnologías, tales como los ratones transgénicos que contienen GFP-Lifeact (una proteína que puede unirse a la actina-F sin alterar su función) o la nueva sonda SiR-actin (que se une a la actina-F en células vivas) pueden ser útiles para estudiar los cambios en el citoesqueleto de actina en tiempo real utilizando células vivas.

De acuerdo con nuestros hallazgos mostrados en el Capítulo II, es necesario un incremento transitorio en el $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la progesterona para que se produzca la EA. Tal como desarrollamos en la discusión correspondiente esto implica que se requiere un rápido descenso del $[Ca^{2+}]_i$ para permitir la exocitosis de forma eficiente, el cual podría ser causado por el llenado de los depósitos de Ca^{2+} en la cabeza del espermatozoide vía la ATPasa de calcio SPCA1. Sería muy interesante evaluar esta posibilidad en el futuro. Asimismo aún desconocemos cuál es el reservorio de calcio involucrado en la EA y cuáles son los canales iónicos que

participan en este proceso. Por el momento, no existen herramientas farmacológicas adecuadas para poder discernir la participación de los dos reservorios de calcio presentes en la cabeza del espermatozoide: el acrosoma y la membrana nuclear redundante. Ambos poseen la misma expresión de canales y transportadores relacionados con la dinámica del calcio. Una estrategia posible para diferenciar estos dos reservorios podría ser la utilización de métodos de registro de imágenes en tiempo real con células vivas usando sistemas de mayor resolución temporal.

Finalmente, dado que la despolimerización de la actina-F requiere de un aumento del $[Ca^{2+}]_i$ sería importante estudiar la relación entre la liberación de calcio y el citoesqueleto de actina. Los resultados de esta Tesis enfatizan la importancia de estudiar ambos procesos en células individuales utilizando métodos de registro de imágenes en tiempo real.

Los estudios desarrollados en esta Tesis ayudarán a profundizar nuestro conocimiento sobre la EA. Estos resultados tendrán impacto en la infertilidad humana, en el desarrollo de nuevos métodos anticonceptivos o en su aplicación en producción de animales de interés comercial. Asimismo, el modelo de exocitosis espermática es también extensible a otros fenómenos de exocitosis, y por lo tanto, puede tener impacto en otros sistemas como el endócrino o el digestivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, K., Moussi, N., Li, R., Soo, P. and Bernard, O. (2006). LIM Kinase 2 is widely expressed in all tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **54**, 487–501.
- Alvau, A., Battistone, M. A., Gervasi, M. G., Navarrete, F. A., Xu, X., Sánchez-Cárdenas, C., De la Vega-Beltran, J. L., Da Ros, V. G., Greer, P. A., Darszon, A., et al. (2016). The tyrosine kinase FER is responsible for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation in murine sperm. *Development* **143**, 2325–33.
- Amann, K. J. and Pollard, T. D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15009–15013.
- Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S. and Mizuno, K. (2001). LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem. J.* **354**, 149–159.
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M. and Florman, H. M. (1999). Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6757–62.
- Aunis, D. and Bader, M. F. (1988). The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. *J. Exp. Biol.* **139**, 253–66.
- Austin, C. R. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. B.* **4**, 581–596.
- Austin, C. R. (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature* **170**, 326.
- Avenarius, M. R., Hildebrand, M. S., Zhang, Y., Meyer, N. C., Smith, L. L. H., Kahrizi, K., Najmabadi, H. and Smith, R. J. H. (2009). Human Male Infertility Caused by Mutations in the CATSPER1 Channel Protein. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 505–510.
- Avidan, N., Tamary, H., Dgany, O., Cattani, D., Pariente, A., Thulliez, M., Borot, N., Moati, L., Barthelme, A., Shalmon, L., et al. (2003). CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur. J. Hum. Genet.* **11**, 497–502.
- Baibakov, B., Gauthier, L., Talbot, P., Rankin, T. L. and Dean, J. (2007). Sperm binding to the zona pellucida is not sufficient to induce acrosome exocytosis. *Development* **134**, 933–943.
- Bailey, J. L. (2010). Factors regulating sperm capacitation. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **56**, 334–48.
- Baker, M. A., Hetherington, L. and Aitken, R. J. (2006). Identification of SRC as a key PKA-stimulated tyrosine kinase involved in the capacitation-associated hyperactivation of murine spermatozoa. *J. Cell Sci.* **119**, 3182–92.
- Baldi, E., Casano, R., Falsetti, C., Krausz, C., Maggi, M. and Forti, G. (1991). Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. *J. Androl.* **12**, 323–30.
- Baldi, E., Luconi, M., Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L. and Forti, G. (2009). Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: Facts and fictions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **308**, 39–46.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**, 227.
- Baltierrez-Hoyos, R., Roa-Espitia, A. L., Hernandez-Gonzalez, E. O., Baltierrez-Hoyos, R., Roa-Espitia, A. L. and Hernández-González, E. O. (2012a). The association between CDC42 and

- caveolin-1 is involved in the regulation of capacitation and acrosome reaction of guinea pig and mouse sperm. *Reproduction* **144**, 123–134.
- Baltierrez-Hoyos, R., Roa-Espitia, A. L. and Hernandez-Gonzalez, E. O.** (2012b). The association between CDC42 and caveolin-1 is involved in the regulation of capacitation and acrosome reaction of guinea pig and mouse sperm. *Reproduction* **144**, 123–134.
- Bamburg, J. R. and Wiggan, O. P.** (2002). ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* **12**, 598–605.
- Barboni, B., Mattioli, M. and Seren, E.** (1995). Influence of progesterone on boar sperm capacitation. *J. Endocrinol.* **144**, 13–8.
- Bernstein, B. W. and Bamburg, J. R.** (2011). ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol. Author* **20**, 187–195.
- Bhandari, B., Bansal, P., Talwar, P. and Gupta, S. K.** (2010). Delineation of downstream signalling components during acrosome reaction mediated by heat solubilized human zona pellucida. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**, 7.
- Bhilawadikar, R., Zaveri, K., Mukadam, L., Naik, S., Kamble, K., Modi, D. and Hinduja, I.** (2013). Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate. *J Assist Reprod Genet* **30**, 513–523.
- Blackmore, P. F., Beebe, S. J., Danforth, D. R. and Alexander, N.** (1990). Progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone. Novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J. Biol. Chem.* **265**, 1376–80.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. and Plastino, J.** (2014). Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility. *Physiol. Rev.* **94**,.
- Boatman, D. E. and Robbins, R. S.** (1991). Bicarbonate: carbon-dioxide regulation of sperm capacitation, hyperactivated motility, and acrosome reactions. *Biol. Reprod.* **44**, 806–13.
- Branham, M. T., Mayorga, L. S. and Tomes, C. N.** (2006). Calcium-induced acrosomal exocytosis requires cAMP acting through a protein kinase A-independent, Epac-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 8656–8666.
- Branham, M. T., Bustos, M. A., De Blas, G. A., Rehmann, H., Zarelli, V. E. P., Treviño, C. L., Darszon, A., Mayorga, L. S. and Tomes, C. N.** (2009). Epac activates the small G proteins Rap1 and Rab3A to achieve exocytosis. *J. Biol. Chem.* **284**, 24825–24839.
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J. and Breitbart, H.** (2003a). Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation. **845**, 837–845.
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J. and Breitbart, H.** (2003b). Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol. Reprod.* **68**, 837–845.
- Brenker, C., Zhou, Y., Müller, A., Echeverry, F. A., Trötschel, C., Poetsch, A., Xia, X.-M., Bönigk, W., Lingle, C. J., Kaupp, U. B., et al.** (2014). The Ca²⁺-activated K⁺ current of human sperm is mediated by Slo3. *Elife* **3**, e01438.
- Buffone, M. G., Foster, J. A. and Gerton, G. L.** (2008). The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 511–522.
- Buffone, M. G., Rodriguez-Miranda, E., Storey, B. T. and Gerton, G. L.** (2009). Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *J. Cell. Physiol.* **220**, 611–620.

- Buffone, M. G., Ijiri, T. W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H. K. and Gerton, G. L.** (2013). Heads or Tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol. Reprod.* **79**, 4–18.
- Buffone, M. G., Wertheimer, E. V., Visconti, P. E. and Krapf, D.** (2014a). Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochim Biophys Acta* **4**, 2610–2620.
- Buffone, M. G., Hirohashi, N. and Gerton, G. L.** (2014b). Unresolved questions concerning mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Biol. Reprod.* **90**, 112.
- Burgoyne, R. D. and Morgan, A.** (2003). Secretory Granule Exocytosis ROBERT. *Physiol. Rev.* **83**, 581–612.
- Busso, D., Cohen, D. J., Maldera, J. A., Dematteis, A. and Cuasnicu, P. S.** (2007). A novel function for CRISP1 in rodent fertilization: involvement in sperm-zona pellucida interaction. *Biol. Reprod.* **77**, 848–54.
- Cabello-Agüeros, J. F., Hernández-González, E. O. and Mújica, A.** (2003). The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. *Cell Motil. Cytoskeleton* **56**, 94–108.
- Camatini, M., Colombo, A. and Bonfanti, P.** (1991). Identification of spectrin and calmodulin in rabbit spermiogenesis and spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* **28**, 62–69.
- Campellone, K. G. and Welch, M. D.** (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 237–51.
- Carlson, A. E., Westenbroek, R. E., Quill, T., Ren, D., Clapham, D. E., Hille, B., Garbers, D. L. and Babcock, D. F.** (2003). CatSper1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. *PNAS* **100**, 14864–14868 ?
- Cassimeris, L., McNeill, H. and Zigmond, S. H.** (1990). Chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes contain two populations of actin filaments that differ in their spatial distributions and relative stabilities. *J. Cell Biol.* **110**, 1067–1075.
- Castellani-Ceresa, L., Mattioli, M., Radaelli, G., Barboni, B. and Brivio, M. F.** (1993). Actin polymerization in boar spermatozoa: Fertilization is reduced with use of cytochalasin D. *Mol. Reprod. Dev.* **36**, 203–211.
- Chang, M. C.** (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* **168**, 697–698.
- Chavez, J. C., Ferreira, J. J., Butler, A., De La Vega Beltran, J. L., Trevino, C. L., Darszon, A., Salkoff, L. and Santi, C. M.** (2014). SLO3 K⁺ Channels Control Calcium Entry through CATSPER Channels in Sperm. *J. Biol. Chem.* **289**, 32266–32275.
- Chávez, J. C., Hernandez-González, E. O., Wertheimer, E., Visconti, P. E., Darszon, A. and Treviño, C. L.** (2012). Participation of the {Cl⁻}/HCO₃⁻ exchangers {SLC}26A3 and {SLC}26A6, the {Cl⁻} channel {CFTR}, and the regulatory factor {SLC}9A3R1 in mouse sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **86**, 1–14.
- Chen, W.-Y., Yuan, Y.-Y., Shi, Q.-X. and Zhang, X.-Y.** (2000). Effect of protein kinase C on guinea pig sperm acrosome reaction induced by progesterone. *Acta Pharmacol Sin* **21**, 787–791.
- Cherr, G. N., Lambert, H., Meizel, S. and Katz, D. F.** (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosome reaction: completion on the zona pellucida and induction by homologous soluble zonae pellucidae. *Dev. Biol.* **114**, 119–31.
- Chhabra, E. S. and Higgs, H. N.** (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1110–1121.

- Chiquete-Felix, N., Hernández, J. M., Méndez, J. A., Zepeda-Bastida, A., Chagolla-López, A. and Mújica, A.** (2009). In guinea pig sperm, aldolase A forms a complex with actin, WAS, and Arp2/3 that plays a role in actin polymerization. *Reproduction* **137**, 669–678.
- Chowdhury, H. H., Popoff, M. R. and Zorec, R.** (1999). Actin cytoskeleton depolymerization with Clostridium spiroforme toxin enhances the secretory activity of rat melanotrophs. *J. Physiol.* **521 Pt 2**, 389–395.
- Chowdhury, H. H., Popoff, M. R. and Zorec, R.** (2000). Actin cytoskeleton and exocytosis in rat melanotrophs. *Pflugers Arch.* **439**, R148-9.
- Chung, J.-J., Navarro, B., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. and Clapham, D. E.** (2011). A novel gene required for male fertility and functional CATSPER channel formation in spermatozoa. *Nat. Commun.* **2**, 153.
- Chung, J. J., Shim, S. H., Everley, R. A., Gygi, S. P., Zhuang, X. and Clapham, D. E.** (2014). Structurally distinct Ca²⁺ signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell* **157**, 808–822.
- Clarke, G. N. and Yanagimachi, R.** (1978). Actin in mammalian sperm heads. *J. Exp. Zool.* **205**, 125–132.
- Cohen, G., Rubinstein, S., Gur, Y. and Breitbart, H.** (2004). Crosstalk between protein kinase A and C regulates phospholipase D and F-actin formation during sperm capacitation. *Dev. Biol.* **267**, 230–241.
- Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspat, I., Dort, J., Mashiacht, S., Eisenbach, M. and Adler, J.** (1995). Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Physiology* **92**, 11039–11043.
- Correia, J., Michelangeli, F. and Publicover, S.** (2015). Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction* **150**, R65–R76.
- Costello, S., Michelangeli, F., Nash, K., Lefievre, L., Morris, J., Machado-Oliveira, G., Barratt, C., Kirkman-Brown, J. and Publicover, S.** (2009). Ca²⁺-stores in sperm: Their identities and functions. *Reproduction* **138**, 425–437.
- Dam, A. H. D. M., Feenstra, I., Westphal, J. R., Ramos, L., van Golde, R. J. T. and Kremer, J. A. M.** (2007). Globozoospermia revisited. *Hum. Reprod. Update* **13**, 63–75.
- Dan, J. . C. .** (1952). Studies on the Acrosome . I . Reaction to Egg-Water and Other Stimuli Author (s): J . C . Dan Published by: Marine Biological Laboratory Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1538405> Accessed : 21-06-2016 01 : 21 UTC. *Biol. Bull.* **103**, 54–66.
- Darszon, A., Treviño, C. L., Wood, C., Galindo, B., Rodríguez-Miranda, E., Acevedo, J. J., Hernandez-González, E. O., Beltrán, C., Martínez-López, P. and Nishigaki, T.** (2007). Ion channels in sperm motility and capacitation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **65**, 229–44.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C. and Treviño, C. L.** (2011). Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiol. Rev.* **91**, 1305–1355.
- Davis, B. K.** (1981). Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7560–4.
- De Blas, G., Michaut, M., Treviño, C. L., Tomes, C. N., Yunes, R., Darszon, A. and Mayorga, L. S.** (2002). The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 49326–49331.
- De Blas, G. A., Roggero, C. M., Tomes, C. N. and Mayorga, L. S.** (2005). Dynamics of SNARE

- assembly and disassembly during sperm acrosomal exocytosis. *PLoS Biol.* **3**, e323.
- De La Vega-Beltran, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Krapf, D., Hernandez-González, E. O., Wertheimer, E., Treviño, C. L., Visconti, P. E. and Darszon, A.** (2012). Mouse sperm membrane potential hyperpolarization is necessary and sufficient to prepare sperm for the acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* **287**, 44384–44393.
- De las Heras, M. A., Valcarcel, A., Perez, L. J. and Moses, D. F.** (1997). Actin localization in ram spermatozoa: Effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore-induced acrosomal exocytosis. *Tissue Cell* **29**, 47–53.
- Delgado-Buenrostro, N. L., Herna, E. O., Segura-nieto, M. and Mu, A.** (2005a). Actin Polymerization in the Equatorial and Postacrosomal Regions of Guinea Pig Spermatozoa During the Acrosome Reaction Is Regulated by G Proteins. **210**, 198–210.
- Delgado-Buenrostro, N. L., Hernández-González, E. O., Segura-Nieto, M. and Mújica, A.** (2005b). Actin polymerization in the equatorial and postacrosomal regions of guinea pig spermatozoa during the acrosome reaction is regulated by G proteins. *Mol. Reprod. Dev.* **70**, 198–210.
- Demarco, I. A., Espinosa, F., Edwards, J., Sosnik, J., De La Vega-Beltran, J. L., Hockensmith, J. W., Kopf, G. S., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2003). Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem.* **278**, 7001–9.
- Dong, J. M., Leung, T., Manser, E. and Lim, L.** (1998). cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J. Biol. Chem.* **273**, 22554–62.
- Ducummon, C. C. and Berger, T.** (2006). Localization of the Rho GTPases and some Rho effector proteins in the sperm of several mammalian species. *Zygote* **14**, 249–257.
- Eddy, E. M.** (2006). The spermatozoon. *J. D. Neill, ed. Knobil Neill's - Physiol. Reprod.* 3–53.
- Ehre, C.** (2004). Barrier Role of Actin Filaments in Regulated Mucin Secretion from Airway Goblet Cells. *AJP Cell Physiol.* **288**, C46-56.
- Escoffier, J., Navarrete, F., Haddad, D., Santi, C. M., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2015). Flow cytometry analysis reveals that only a subpopulation of mouse sperm undergoes hyperpolarization during capacitation. *Biol. Reprod.* **92**, 121.
- Esposito, G., Jaiswal, B. S. B. S., Xie, F., Krajnc-Franken, M. A. M., Robben, T. J. A. A., Strik, A. M., Kuil, C., Philipsen, R. L. A., van Duin, M., Conti, M., et al.** (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2993–8.
- Etkovitz, N., Rubinstein, S., Daniel, L. and Breitbart, H.** (2007). Role of PI3-kinase and PI4-kinase in actin polymerization during bovine sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **77**, 263–273.
- Fiedler, S. E., Bajpai, M. and Carr, D. W.** (2008). Identification and characterization of RHOA-interacting proteins in bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* **78**, 184–192.
- Finkelstein, M., Etkovitz, N. and Breitbart, H.** (2010). Role and regulation of sperm gelsolin prior to fertilization. *J. Biol. Chem.* **285**, 39702–39709.
- Flaherty, S. P., Winfrey, V. P. and Olson, G. E.** (1988). Localization of actin in human, bull, rabbit, and hamster sperm by immunoelectron microscopy. *Anat. Rec.* **221**, 599–610.
- Florman, H. and Ducibella, T.** (2006). Fertilization in mammals. *Knobil Neill's Physiol.*
- Florman, H. M. and Storey, B. T.** (1982). Mouse gamete interactions: the zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. *Dev. Biol.* **91**, 121–30.
- Fol, H.** (1876). Sur les phénomènes intimes de la division cellulaire.

- Fornés, M. W., Barbieri, A., Sosa, M. A. and Bertini, F.** (1991). First observations on enzymatic activity and protein content of vesicles separated from rat epididymal fluid. *Andrologia* **23**, 347–51.
- Foster, J. A., Friday, B. B., Maulit, M. T., Blobel, C., Winfrey, V. P., Olson, G. E., Kim, K. S. and Gerton, G. L.** (1997). AM67, a secretory component of the guinea pig sperm acrosomal matrix, is related to mouse sperm protein sp56 and the complement component 4-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 12714–22.
- Freeman, E. A., Jani, P. and Millette, C. E.** (2002). Expression and potential function of Rho family small G proteins in cells of the mammalian seminiferous epithelium. *Cell Commun Adhes* **9**, 189–204.
- Frenette, G. and Sullivan, R.** (2001). Protasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. *Mol. Reprod. Dev.* **59**, 115–21.
- Frenette, G., Lessard, C. and Sullivan, R.** (2002). Selected proteins of "protasome-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol. Reprod.* **67**, 308–13.
- Frenette, G., Légaré, C., Saez, F. and Sullivan, R.** (2005). Macrophage migration inhibitory factor in the human epididymis and semen. *Mol. Hum. Reprod.* **11**, 575–82.
- Frenette, G., Girouard, J., D'Amours, O., Allard, N., Tessier, L. and Sullivan, R.** (2010). Characterization of two distinct populations of epididymosomes collected in the intraluminal compartment of the bovine cauda epididymis. *Biol. Reprod.* **83**, 473–80.
- Fukami, K., Nakao, K., Inoue, T., Kataoka, Y., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Nakamura, K., Katsuki, M., Mikoshiba, K., Yoshida, N., et al.** (2001). Requirement of Phospholipase Cdelta 4 for the Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction. *Science (80-.).* **292**, 920–923.
- Fukami, K., Yoshida, M., Inoue, T., Kurokawa, M., Fissore, R. A., Yoshida, N., Mikoshiba, K. and Takenawa, T.** (2003). Phospholipase Cδ4 is required for Ca²⁺ mobilization essential for acrosome reaction in sperm. *J. Cell Biol.* **161**, 79–88.
- Gadella, B. M., Tsai, P.-S., Boerke, A. and Brewis, I. A.** (2008). Sperm head membrane reorganisation during capacitation. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 473–80.
- Galantino-Homer, H. L., Visconti, P. E. and Kopf, G. S.** (1997). Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* **56**, 707–19.
- Gasman, S., Chasserot-Golaz, S., Malacombe, M., Way, M. and Bader, M.-F.** (2004). Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells: A Role for Subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced Actin Filaments. *Mol. Biol. Cell* **15**, 520–531.
- Gatica, L. V., Guidobaldi, H. A., Montesinos, M. M., Teves, M. E., Moreno, A. I., Uñates, D. R., Molina, R. I. and Giojalas, L. C.** (2013). Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Mol. Hum. Reprod.* **19**, 559–69.
- Geyer, C. B., Inselman, A. L., Sunman, J. A., Bornstein, S., Handel, M. A. and Eddy, E. M.** (2009). A missense mutation in the Capza3 gene and disruption of F-actin organization in spermatids of repro32 infertile male mice. *Dev. Biol.* **330**, 142–152.
- Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D. S. and Condeelis, J. S.** (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* **304**, 743–746.
- Goley, E. D. and Welch, M. D.** (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 713–26.

- Goley, E. D., Ohkawa, T., Mancuso, J., Woodruff, J. B., D'Alessio, J. a, Cande, W. Z., Volkman, L. E. and Welch, M. D.** (2006). Dynamic nuclear actin assembly by Arp2/3 complex and a baculovirus WASP-like protein. *Science* (80-.). **314**, 464–467.
- Griffiths, G. S., Galileo, D. S., Reese, K. and Martin-Deleon, P. A.** (2008). Investigating the role of murine epididymosomes and uterosomes in GPI-linked protein transfer to sperm using SPAM1 as a model. *Mol. Reprod. Dev.* **75**, 1627–36.
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., Anastasía, A. and Giojalas, L. C.** (2008). Progesterone from the Cumulus Cells Is the Sperm Chemoattractant Secreted by the Rabbit Oocyte Cumulus Complex. *PLoS One* **3**, e3040.
- Gupta, S. K. and Bhandari, B.** (2011). Acrosome reaction: relevance of zona pellucida glycoproteins. *Asian J. Androl.* **13**, 97–105.
- Hamner, C. E.** (1962). EFFECT OF THE FEMALE REPRODUCTIVE TRACT ON SPERM METABOLISM IN THE RABBIT AND FOWL undergo change ' capacitation ' by reproductive opened investigation ,. *J Reprod Fertil* **5**, 143–150.
- Han, L., Stope, M. B., de Jesús, M. L., Oude Weernink, P. A., Urban, M., Wieland, T., Rosskopf, D., Mizuno, K., Jakobs, K. H. and Schmidt, M.** (2007). Direct stimulation of receptor-controlled phospholipase D1 by phospho-cofilin. *EMBO J.* **26**, 4189–202.
- Harper, C., Wootton, L., Michelangeli, F., Lefièvre, L., Barratt, C. and Publicover, S.** (2005). Secretory pathway Ca(2+)-ATPase (SPCA1) Ca(2)+ pumps, not SERCAs, regulate complex [Ca(2+)](i) signals in human spermatozoa. *J. Cell Sci.* **118**, 1673–1685.
- Hasuwa, H., Muro, Y., Ikawa, M., Kato, N., Tsujimoto, Y. and Okabe, M.** (2010). Transgenic Mouse Sperm that Have Green Acrosome and Red Mitochondria Allow Visualization of Sperm and Their Acrosome Reaction in Vivo. *Exp. Anim* **59**, 105–107.
- Heasman, S. J. and Ridley, A. J.** (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 690–701.
- Heid, H.** (2002). Novel Actin-Related Proteins Arp-T1 and Arp-T2 as Components of the Cytoskeletal Calyx of the Mammalian Sperm Head. *Exp. Cell Res.* **279**, 177–187.
- Hernández-González, E. O., Lecona-Valera, A. N., Escobar-Herrera, J. and Mújica, A.** (2000). Involvement of an F-actin skeleton on the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. *Cell Motil. Cytoskeleton* **46**, 43–58.
- Hernández-González, E. O., Sosnik, J., Edwards, J., Acevedo, J. J., Mendoza-Lujambio, I., López-González, I., Demarco, I., Wertheimer, E., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2006). Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J. Biol. Chem.* **281**, 5623–33.
- Hernández-González, E. O., Treviño, C. L., Castellano, L. E., de la Vega-Beltrán, J. L., Ocampo, A. Y., Wertheimer, E., Visconti, P. E., Darszon, A., José, L., Ocampo, A. Y., et al.** (2007). Involvement of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem.* **282**, 24397–24406.
- Herrick, S. B., Schweissinger, D. L., Kim, S.-W., Bayan, K. R., Mann, S. and Cardullo, R. A.** (2005). The acrosomal vesicle of mouse sperm is a calcium store. *J. Cell. Physiol.* **202**, 663–671.
- Hertwig, O.** (1875). Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. *W. Engelmann.* **1**,.
- Hess, K. C., Jones, B. H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T. S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J. H., Kopf, G. S., Suarez, S. S., et al.** (2005). The “soluble” adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* **9**, 249–259.

- Hildebrand, M. S., Avenarius, M. R., Fellous, M., Zhang, Y., Meyer, N. C., Auer, J., Serres, C., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Beckmann, J. S., et al. (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur. J. Hum. Genet.* **18**, 1178–1184.
- Hirohashi, N. (2016). Site of Mammalian Sperm Acrosome Reaction. In *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, pp. 145–158.
- Hirohashi, N., Gerton, G. L. and Buffone, M. G. (2011). Video imaging of the sperm acrosome reaction during in vitro fertilization. *Commun. Integr. Biol.* **4**, 471–476.
- Hirohashi, N., La Spina, F. A., Romarowski, A. and Buffone, M. G. (2015). Redistribution of the intra-acrosomal EGFP before acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Reproduction* **149**, 657–663.
- Ho, H.-C. and Suarez, S. S. (2003). Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biol. Reprod.* **68**, 1590–1596.
- Howe, A. K. (2004). Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1692**, 159–174.
- Howell, S. L. and Tyhurst, M. (1979). Interaction between insulin-storage granules and F-actin in vitro. *Biochem J* **178**, 367–371.
- Howes, E. a, Hurst, S. M. and Jones, R. (2001). Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. *J. Androl.* **22**, 62–72.
- Hutt, D. M., Baltz, J. M. and Ngsee, J. K. (2005). Synaptotagmin VI and VIII and syntaxin 2 are essential for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Biol. Chem.* **280**, 20197–20203.
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M. and Okabe, M. (2010). Fertilization : a sperm ' s journey to and interaction with the oocyte. **120**,.
- Ikebe, C., Ohashi, K. and Mizuno, K. (1998). Identification of testis-specific (Limk2t) and brain-specific (Limk2c) isoforms of mouse LIM-kinase 2 gene transcripts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 307–12.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A. and Okabe, M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**, 234–238.
- Inoue, N., Satouh, Y., Ikawa, M., Okabe, M. and Yanagimachi, R. (2011). Acrosome-reacted mouse spermatozoa recovered from the perivitelline space can fertilize other eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 20008–20011.
- Itach, S. B. S., Finklestein, M., Etkovitz, N. and Breitbart, H. (2012). Hyper-activated motility in sperm capacitation is mediated by Phospholipase D-dependent actin polymerization. *Dev. Biol.* **362**, 154–161.
- Jaiswal, J. K., Rivera, V. M. and Simon, S. M. (2009). Exocytosis of Post-Golgi Vesicles Is Regulated by Components of the Endocytic Machinery. *Cell* **137**, 1308–1319.
- Jenkins, G. M. and Frohman, M. A. (2005). Phospholipase D: A lipid centric review. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2305–2316.
- Jin, J., Jin, N., Zheng, H., Ro, S., Tafolla, D., Sanders, K. M. and Yan, W. (2007). Catsper3 and Catsper4 Are Essential for Sperm Hyperactivated Motility and Male Fertility in the Mouse. *Biol. Reprod.* **77**, 37–44.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S. A., Chiba, K. and Hirohashi, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4892–

4896.

- Jones, R., James, P. S., Howes, L., Bruckbauer, A. and Klennerman, D. (2007). Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. *Asian J. Androl.* **9**, 438–44.
- José, O., Hernández-Hernández, O., Chirinos, M., González-González, M. E., Larrea, F., Almanza, A., Felix, R., Darszon, A. and Treviño, C. L. (2010). Recombinant human ZP3-induced sperm acrosome reaction: Evidence for the involvement of T- and L-type voltage-gated calcium channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **395**, 530–534.
- Kalab, P., Visconti, P., Leclerc, P. and Kopf, G. S. (1994). p95, the major phosphotyrosine-containing protein in mouse spermatozoa, is a hexokinase with unique properties. *J. Biol. Chem.* **269**, 3810–7.
- Kang-Decker, N., Mantchev, G. T., Juneja, S. C., McNiven, M. a and van Deursen, J. M. (2001). Lack of acrosome formation in Hrb-deficient mice. *Science* **294**, 1531–1533.
- Kim, K. S. and Gerton, G. L. (2003). Differential release of soluble and matrix components: Evidence for intermediate states of secretion during spontaneous acrosomal exocytosis in mouse sperm. *Dev. Biol.* **264**, 141–152.
- Kim, K. S., Cha, M. C. and Gerton, G. L. (2001). Mouse sperm protein sp56 is a component of the acrosomal matrix. *Biol. Reprod.* **64**, 36–43.
- Kirichok, Y. and Lishko, P. V (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol. Hum. Reprod.* **17**, 478–499.
- Kirichok, Y., Navarro, B. and Clapham, D. E. (2006). Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca²⁺ channel. *Nature* **439**, 737–740.
- Kirkman-Brown, J. C., Punt, E. L., Barratt, C. L. R. and Publicover, S. J. (2002). Zona pellucida and progesterone-induced Ca²⁺ signaling and acrosome reaction in human spermatozoa. *J. Androl.* **23**, 306–315.
- Kobori, H., Miyazaki, S. and Kuwabara, Y. (2000). Characterization of intracellular Ca(2+) increase in response to progesterone and cyclic nucleotides in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* **63**, 113–20.
- Krapf, D., Arcelay, E., Wertheimer, E. V, Sanjay, A., Pilder, S. H., Salicioni, A. M. and Visconti, P. E. (2010). Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **285**, 7977–7985.
- La Spina, F. A., Puga Molina, L. C., Romarowski, A., Vitale, A. M., Falzone, T. L., Krapf, D., Hirohashi, N. and Buffone, M. G. (2016). Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev. Biol.* **411**, 172–182.
- Laemmli, U. K. (1970). Piezoelectric effect and growth control in bone. *Group* **227**, 680–685.
- Lee, J. S., Kwon, W. S., Rahman, M. S., Yoon, S. J., Park, Y. J. and Pang, M. G. (2015). Actin-related protein 2/3 complex-based actin polymerization is critical for male fertility. *Andrology* **3**, 937–946.
- Légaré, C., Bérubé, B., Boué, F., Lefièvre, L., Morales, C. R., El-Alfy, M. and Sullivan, R. (1999). Hamster sperm antigen P26h is a phosphatidylinositol-anchored protein. *Mol. Reprod. Dev.* **52**, 225–33.
- Lelkes, P. I., Friedman, J. E., Rosenheck, K. and Oplatka, A. (1986). Destabilization of actin filaments as a requirement for the secretion of catecholamines from permeabilized chromaffin cells. *FEBS Lett.* **208**, 357–63.

- Li, G., Rungger-Brändle, E., Just, I., Jonas, J. C., Aktories, K. and Wollheim, C. B.** (1994). Effect of disruption of actin filaments by Clostridium botulinum C2 toxin on insulin secretion in HIT-T15 cells and pancreatic islets. *Mol Biol Cell* **5**, 1199–1213.
- Li, S., Papale, L. A., Kintner, D. B., Sabat, G., Barrett-Wilt, G. A., Cengiz, P. and Alisch, R. S.** (2015). Hippocampal increase of 5-hmC in the glucocorticoid receptor gene following acute stress. *Behav. Brain Res.* **286**, 236–240.
- Lin, Y.-N., Roy, A., Yan, W., Burns, K. H. and Matzuk, M. M.** (2007). Loss of zona pellucida binding proteins in the acrosomal matrix disrupts acrosome biogenesis and sperm morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6794–805.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L., Fedorenko, A. and Kirichok, Y.** (2010). Acid Extrusion from Human Spermatozoa Is Mediated by Flagellar Voltage-Gated Proton Channel. *Cell* **140**, 327–337.
- Lishko, P. V., Botchkina, I. L. and Kirichok, Y.** (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature* **471**, 387–91.
- Lishko, P. V., Kirichok, Y., Ren, D., Navarro, B., Chung, J.-J. and Clapham, D. E.** (2012). The Control of Male Fertility by Spermatozoan Ion Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 453–457.
- Liu, D. Y. and Baker, H. W.** (1997). Protein kinase C plays an important role in the human zona pellucida-induced acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 1037–43.
- Livera, G., Xie, F., Garcia, M. A., Jaiswal, B., Chen, J., Law, E., Storm, D. R. and Conti, M.** (2005). Inactivation of the Mouse Adenylyl Cyclase 3 Gene Disrupts Male Fertility and Spermatozoon Function. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1277–1290.
- Longo, F. J., Krohne, G. and Franke, W. W.** (1987). Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: A novel class of cytoskeletal elements. *J. Cell Biol.* **105**, 1105–1120.
- Lopez, C. I., Pelletán, L. E., Suhaiman, L., De Blas, G. A., Vitale, N., Mayorga, L. S. and Belmonte, S. A.** (2012). Diacylglycerol stimulates acrosomal exocytosis by feeding into a PKC- and PLD1-dependent positive loop that continuously supplies phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1821**, 1186–1199.
- López-González, I., Torres-Rodríguez, P., Sánchez-Carranza, O., Solís-López, A., Santi, C. M., Darszon, A. and Treviño, C. L.** (2014). Membrane hyperpolarization during human sperm capacitation. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 619–29.
- Ma, F., Wu, D., Deng, L., Secrest, P., Zhao, J., Varki, N., Lindheim, S. and Gagneux, P.** (2012). Sialidases on mammalian sperm mediate deciduous sialylation during capacitation. *J. Biol. Chem.* **287**, 38073–9.
- Maier, B., Medrano, S., Sleight, S. B., Visconti, P. E. and Scrable, H.** (2003). Developmental Association of the Synaptic Activity-Regulated Protein Arc with the Mouse Acrosomal Organelle and the Sperm Tail 1. *Biol. Reprod.* **68**, 67–76.
- Malacombe, M., Bader, M. F. and Gasman, S.** (2006). Exocytosis in neuroendocrine cells: New tasks for actin. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**, 1175–1183.
- Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F., Walker, M. O. and Lacy, P. E.** (1971). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system. *Diabetes* **20**, 257–65.
- Malaisse, W. J., Herchuelz, A., Levy, J., Sener, A., Pipeleers, D. G., Devis, G., Somers, G. and Obberghen, E. V.** (1976). The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XIX. The insulinotropic effect of glyceraldehyde. *Mol. Cell. Endocrinol.* **4**, 1–12.

- Mannowetz, N., Naidoo, N. M., Sara Choo, S.-A., Smith, J. F. and Lishko, P. V** (2013). Slo1 is the principal potassium channel of human spermatozoa. *Elife* **2**,.
- Marín-Briggiler, C. I., Gonzalez-Echeverría, F., Buffone, M., Calamera, J. C., Tezón, J. G. and Vazquez-Levin, M. H.** (2003). Calcium requirements for human sperm function in vitro. *Fertil. Steril.* **79**, 1396–403.
- Martens, S. and McMahon, H. T.** (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 543–556.
- Martínez-López, P., Santi, C. M., Treviño, C. L., Ocampo-Gutiérrez, A. Y., Acevedo, J. J., Alisio, A., Salkoff, L. B. and Darszon, A.** (2009). Mouse sperm K⁺ currents stimulated by pH and cAMP possibly coded by Slo3 channels. *Biochem Biophys Res Commun.* **381**, 204–209.
- Martínez-Menárguez, J. A., Geuze, H. J. and Ballesta, J.** (1996). Evidence for a nonlysosomal origin of the acrosome. *J. Histochem. Cytochem.* **44**, 313–20.
- Matter, K., Dreyer, F. and Aktories, K.** (1989). Actin involvement in exocytosis from PC12 cells: studies on the influence of botulinum C2 toxin on stimulated noradrenaline release. *J. Neurochem.* **52**, 370–6.
- Mayorga, L. S., Tomes, C. N. and Belmonte, S. A.** (2007a). Acrosomal exocytosis, a special type of regulated secretion. *IUBMB Life* **59**, 286–292.
- Mayorga, L. S., Tomes, C. N. and Belmonte, S. A.** (2007b). Critical Review Acrosomal Exocytosis , a Special Type of Regulated Secretion Fusion of Biological Membranes. **59**, 286–292.
- Meberg, P. J. and Bamburg, J. R.** (2000). Increase in neurite outgrowth mediated by overexpression of actin depolymerizing factor. *J. Neurosci.* **20**, 2459–2469.
- Megnagi, B., Finkelstein, M., Shabtay, O. and Breitbart, H.** (2015). The role and importance of cofilin in human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Cell Tissue Res.* **362**, 665–675.
- Meizel, S., Turner, K. O. and Nuccitelli, R.** (1997). Progesterone triggers a wave of increased free calcium during the human sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* **182**, 67–75.
- Michaut, M., De Blas, G., Tomes, C. N., Yunes, R., Fukuda, M. and Mayorga, L. S.** (2001). Synaptotagmin V I P a r t i c i p a t e s i n t h e A c r o s o m e R e a c t i o n o f H u m a n S p e r m a t o z o a. **529**, 521–529.
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y., Lishko, P. V, et al.** (2016a). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via the sex hormone progesterone. *Science* **352**, 555–9.
- Miller, M. R., Mannowetz, N., Iavarone, A. T., Safavi, R., Gracheva, E. O., Smith, J. F., Hill, R. Z., Bautista, D. M., Kirichok, Y. and Lishko, P. V** (2016b). Unconventional endocannabinoid signaling governs sperm activation via sex hormone progesterone. *Science* **352**, 555–559.
- Miranda, P. V, Allaire, A., Sosnik, J. and Visconti, P. E.** (2009). Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mouse sperm. *Biol. Reprod.* **80**, 897–904.
- Miska, W., Fehl, P. and Henkel, R.** (1994). Biochemical and Immunological Characterization of the Acrosome Reaction-Inducing Substance (ARIS) of HFF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 125–129.
- Moore, G. D., Ayabe, T., Visconti, P. E., Schultz, R. M. and Kopf, G. S.** (1994). Roles of heterotrimeric and monomeric G proteins in sperm-induced activation of mouse eggs. *Development* **120**, 3313–3323.

- Moreno Fierros, L., Hernandez, E. O., Salgado, Z. O., Mujica, A., Moreno-Fierros, L., Hernández, E. O., Salgado, Z. O., Mújica, A., Moreno Fierros, L., Hernandez, E. O., et al.** (1992). F-actin in guinea pig spermatozoa: Its role in calmodulin translocation during acrosome reaction. *Mol. Reprod. Dev.* **33**, 172–181.
- Morgan, D. J., Weisenhaus, M., Shum, S., Su, T., Zheng, R., Zhang, C., Shokat, K. M., Hille, B., Babcock, D. F. and McKnight, G. S.** (2008). Tissue-specific PKA inhibition using a chemical genetic approach and its application to studies on sperm capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20740–5.
- Muallem, S., Kwiatkowska, K., Xu, X. and Yin, H. L.** (1995). Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J. Cell Biol.* **128**, 589–98.
- Muallen, S., Kwiatkowska, K., Xu, X. and Yin, H. L.** (1995). Actin filament dissassembly is a sufficient trigger for exocytosis in non-excitable cells. *J. Cell Biol.* **128**, 589–598.
- Mullins, R. D., Heuser, J. a and Pollard, T. D.** (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6181–6186.
- Muro, Y., Buffone, M. G., Okabe, M. and Gerton, G. L.** (2012). Function of the acrosomal matrix: zona pellucida 3 receptor (ZP3R/sp56) is not essential for mouse fertilization. *Biol. Reprod.* **86**, 1–6.
- Muro, Y., Hasuwa, H., Isotani, A., Miyata, H., Yamagata, K., Ikawa, M., Yanagimachi, R. and Okabe, M.** (2016). Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. *Biol. Reprod.* **94**, 80–80.
- Nemoto, T., Kojima, T., Oshima, A., Bito, H. and Kasai, H.** (2004). Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* **279**, 37544–37550.
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K. and Uemura, T.** (2002). Control of actin reorganization by slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108**, 233–246.
- Norman, J. C., Price, L. S., Ridley, A. J., Hall, A. and Koffer, A.** (1994). Actin filament organization in activated mast cells is regulated by heterotrimeric and small GTP-binding proteins. *J. Cell Biol.* **126**, 1005–1015.
- O'Brien, D. A., Welch, J. E., Fulcher, K. D. and Eddy, E. M.** (1994). Expression of mannose 6-phosphate receptor messenger ribonucleic acids in mouse spermatogenic and Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **50**, 429–35.
- Ocampo, J., Mondragón, R., Roa-Espitia, A. L., Chiquete-Félix, N., Salgado, Z. O. and Mújica, A.** (2005). Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the guinea pig sperm nuclear matrix. *Tissue Cell* **37**, 293–308.
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S. and Mizuno, K.** (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* **275**, 3577–3582.
- Oikonomopoulou, I., Patel, H., Watson, P. F. and Chantler, P. D.** (2009). Relocation of myosin and actin, kinesin and tubulin in the acrosome reaction of bovine spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**, 364–77.
- Okabe, M.** (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development* **140**, 4471–9.
- Oliphant, G. and Brackett, B. G.** (1973). Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.* **9**, 404–4.

- Orci, L., Gabbay, K. H. and Malaisse, W. J.** (1972). Pancreatic Beta-Cell Web: Its Possible Role in Insulin Secretion. *Science* (80-). **175**, 1128–1130.
- Oren-Benaroya, R., Orvieto, R., Gakamsky, A., Pinchasov, M. and Eisenbach, M.** (2008). The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone. *Hum. Reprod.* **23**, 2339–2345.
- Orta, G., Ferreira, G., José, O., Treviño, C. L., Beltrán, C. and Darszon, A.** (2012). Human spermatozoa possess a calcium-dependent chloride channel that may participate in the acrosomal reaction. *J. Physiol.* **590**, 2659–75.
- Osman, R. A., Andria, M. L., Jones, A. D. and Meizel, S.** (1989). Steroid induced exocytosis: The human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**, 828–833.
- Paranko, J., Longo, F., Potts, J., Krohne, G. and Franke, W. W.** (1988). Widespread occurrence of calicin, a basic cytoskeletal protein of sperm cells, in diverse mammalian species. *Differentiation* **38**, 21–27.
- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Handrow, R. R., Sims, M. M. and First, N. L.** (1989). Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* **40**, 1020–5.
- Pelletier, R.-M., Trifaro, J.-M., Carbajal, M. E., Okawara, Y. and Vitale, M. L.** (1999). Calcium-dependent actin filament-severing protein scinderin levels and localization in bovine testis, epididymis, and spermatozoa. *Biol. Reprod.* **60**, 1128–1136.
- Pendleton, A. and Koffer, A.** (2001). Effects of latrunculin reveal requirements for the actin cytoskeleton during secretion from mast cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **48**, 37–51.
- Porat-Shliom, N., Milberg, O., Masedunskas, A. and Weigert, R.** (2013). Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 2099–2121.
- Prevost, J. L. and Dumas, J. A.** (1824). Nouvelle théorie de la génération.
- Publicover, S., Harper, C. V. and Barratt, C.** (2007). $[Ca^{2+}]_i$ signalling in sperm — making the most of what you've got. *Nat. Cell Biol.* **9**, 235–242.
- Puga Molina, L. C., Pinto, N. A., Torres Rodríguez, P., Romarowski, A., Vicens Sanchez, A., Visconti, P. E., Darszon, A., Treviño, C. L. and Buffone, M. G.** (2016). Essential Role of CFTR in PKA-Dependent Phosphorylation, Alkalinization, and Hyperpolarization During Human Sperm Capacitation. *J. Cell. Physiol.*
- Qi, H., Moran, M. M., Navarro, B., Chong, J. A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I. S., Quill, T. A. and Clapham, D. E.** (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1219–1223.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L. and Clapham, D. E.** (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603–609.
- Rodríguez, F., Bustos, M. A., Zanetti, M. N., Ruete, M. C., Mayorga, L. S. and Tomes, C. N.** (2011). alpha-SNAP prevents docking of the acrosome during sperm exocytosis because it sequesters monomeric syntaxin. *PLoS One* **6**, e21925.
- Rogers, B. J. and Russellt, D.** (1989). D Inhibits Hamster Eggs by Guinea Penetration of Pig and Human Spermatozoa. *J. Androl.* **10**, 275–82.
- Roggero, C. M., De Blas, G. A., Dai, H., Tomes, C. N., Rizo, J. and Mayorga, L. S.** (2007). Complexin/syntaxin interplay controls acrosomal exocytosis. *J. Biol. Chem.* **282**, 26335–26343.

- Roldan, E. R. and Dawes, E. N. (1993). Phospholipase D and exocytosis of the ram sperm acrosome. *Biochim. Biophys. Acta* **1210**, 48–54.
- Roldan, E. R., Murase, T. and Shi, Q. X. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. *Science* **266**, 1578–81.
- Rotfeld, H., Hillman, P., Ickowicz, D. and Breitbart, H. (2014). PKA and CaMKII mediate PI3K activation in bovine sperm by inhibition of the PKC/PP1 cascade. *Reproduction* **147**, 347–56.
- Ruknudin, A. and Silver, I. A. (1990). Ca²⁺ uptake during capacitation of mouse spermatozoa and the effect of an anion transport inhibitor on Ca²⁺ uptake. *Mol. Reprod. Dev.* **26**, 63–68.
- Sagare-Patil, V., Galvankar, M., Satiya, M., Bhandari, B., Gupta, S. K. and Modi, D. (2012). Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int. J. Androl.* **35**, 633–644.
- Saling, P. M., Sowinski, J. and Storey, B. T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucidae in vitro: Sequential relationship to the acrosome reaction. *J. Exp. Zool.* **209**, 229–238.
- Sanchez-Cardenas, C., Servin-Vences, M. R., Jose, O., Trevino, C. L., Hernandez-Cruz, A. and Darszon, A. (2014). Acrosome Reaction and Ca²⁺ Imaging in Single Human Spermatozoa: New Regulatory Roles of [Ca²⁺]_i. *Biol. Reprod.* **91**, 67–67.
- Sánchez-Cárdenas, C., Servín-Vences, M. R., José, O., Treviño, C. L., Hernández-Cruz, A. and Darszon, A. (2014). Acrosome reaction and Ca²⁺ imaging in single human spermatozoa: new regulatory roles of [Ca²⁺]_i. *Biol. Reprod.* **91**, 67.
- Sánchez-Carranza, O., Torres-Rodríguez, P., Darszon, A., Treviño, C. L. and López-González, I. (2015). Pharmacology of hSlo3 channels and their contribution in the capacitation-associated hyperpolarization of human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **466**, 554–9.
- Santi, C. M., Martínez-lópez, P., de la Vega-Beltrán, J. L., Butler, A., Alisio, A., Darszon, A., Salkoff, L., Vega-beltrán, J. L. De, Butler, A., Darszon, A., et al. (2011). The SLO3 sperm-specific potassium channel plays a vital role in male fertility. *FEBS Lett.* **584**, 1041–1046.
- Satouh, Y., Inoue, N., Ikawa, M. and Okabe, M. (2012). Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J. Cell Sci.* **125**, 4985–90.
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M. and Salkoff, L. (1998). Slo3, a Novel pH-sensitive K⁺ Channel from Mammalian Spermatocytes*. *J. Biol. Chem.* **273**, 3509–3516.
- Schuh, K., Cartwright, E. J., Jankevics, E., Bundschu, K., Liebermann, J., Williams, J. C., Armesilla, A. L., Emerson, M., Oceandy, D., Knobloch, K. P., et al. (2004). Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J. Biol. Chem.* **279**, 28220–28226.
- Scott, R. W. and Olson, M. F. (2007). LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med.* **85**, 555–568.
- Servin-Vences, M. R., Tatsu, Y., Ando, H., Guerrero, A., Yumoto, N., Darszon, A. and Nishigaki, T. (2012). A caged progesterone analog alters intracellular Ca²⁺ and flagellar bending in human sperm. *Reproduction* **144**, 101–109.
- Shi, Q. X. and Roldan, E. R. (1995). Evidence that a GABAA-like receptor is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.* **52**, 373–81.
- Signorelli, J. R., Díaz, E. S., Fara, K., Barón, L. and Morales, P. (2013). Protein phosphatases decrease their activity during capacitation: a new requirement for this event. *PLoS One* **8**, e81286.

- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G. M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M. L., Jensen, T. K., Jørgensen, N., Swan, S. H., Sapra, K. J., et al. (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiol. Rev.* **96**, 55–97.
- Snabes, M. C. and Boyd, A. E. (1982). Increased filamentous actin in islets of langerhans from fasted hamsters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **104**, 207–211.
- Somers, G., Blondel, B., Orci, L. and Malaisse, W. J. (1979). Motile Events in Pancreatic Endocrine Cells*. *Endocrinology* **104**, 255–264.
- Song, X., Chen, X., Yamaguchi, H., Mouneimne, G., Condeelis, J. S. and Eddy, R. J. (2006). Initiation of cofilin activity in response to EGF is uncoupled from cofilin phosphorylation and dephosphorylation in carcinoma cells. *J. Cell Sci.* **119**, 2871–2881.
- Sontag, J. M., Aunis, D. and Bader, M. F. (1988). Peripheral actin filaments control calcium-mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. *Eur. J. Cell Biol.* **46**, 316–26.
- Soosairajah, J., Maiti, S., Wiggan, O., Sarmiere, P., Moussi, N., Sarcevic, B., Sampath, R., Bamburg, J. R. and Bernard, O. (2005). Interplay between components of a novel LIM kinase–slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J.* **24**, 473–486.
- Sosnik, J., Miranda, P. V., Spiridonov, N. A., Yoon, S., Fissore, R. A., Johnson, G. R. and Visconti, P. E. (2009). Tssk6 is required for Izumo relocalization and gamete fusion in the mouse. *J. Cell Sci.* **15**, 2741–2749.
- Sosnik, J., Buffone, M. G. and Visconti, P. E. (2010). Analysis of CAPZA3 localization reveals temporally discrete events during the acrosome reaction. *J. Cell. Physiol.* **224**, 575–580.
- Spungin, B., Margalit, I. and Breitbart, H. (1995). Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 6)**, 2525–35.
- Stock, C. E. and Fraser, L. R. (1987). The acrosome reaction in human sperm from men of proven fertility. *Hum. Reprod.* **2**, 109–19.
- Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *Int. J. Dev. Biol.* **52**, 427–437.
- Storey, B. T., Lee, M. A., Muller, C., Ward, C. R. and Wirtshafter, D. G. (1984). Binding of mouse spermatozoa to the zonae pellucidae of mouse eggs in cumulus: evidence that the acrosomes remain substantially intact. *Biol. Reprod.* **31**, 1119–1128.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N. D., Weyand, I., Seifert, R. and Kaupp, U. B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature* **471**, 382–386.
- Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum. Reprod. Update* **14**, 647–657.
- Suarez, S. S. and Ho, H. C. (2003). Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **49**, 351–6.
- Suarez, S. S. and Pacey, A. A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum. Reprod. Update* **12**, 23–37.
- Südhof, T. C. and Rothman, J. E. (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**, 474–7.
- Takahashi, H., Koshimizu, U. and Miyazaki, Jun-ichi and Nakamura, T. (2002a). Impaired Sperm matogenic Ability of Testicular Germ Cells in Mice Deficient in the LIM-K

- in a se 2 Ge n e. **272**, 259–272.
- Takahashi, H., Koshimizu, U., Miyazaki, J., Nakamura, T. and Miyazaki, Jun-ichi and Nakamura, T.** (2002b). Impaired spermatogenic ability of testicular germ cells in mice deficient in the LIM-kinase 2 gene. *Dev. Biol.* **241**, 259–72.
- Tamblyn, T. M.** (1983). A bovine seminal plasma inhibitor of actin-stimulated myosin adenosine triphosphatase. *Biol Reprod* **29**, 725–732.
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Minetti, F., Forti, G., Muratori, M. and Baldi, E.** (2014). The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Hum. Reprod.* **29**, 418–28.
- Tanaka, H., Yoshimura, Y., Nishina, Y., Nozaki, M., Nojima, H. and Nishimune, Y.** (1994). Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Lett.* **355**, 4–10.
- Tateno, H., Krapf, D., Hino, T., Sánchez-Cárdenas, C., Darszon, A., Yanagimachi, R. and Visconti, P. E.** (2013). Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18543–8.
- Thomas, P.** (2008). Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Front. Neuroendocrinol.* **29**, 292–312.
- Thomas, P., Tubbs, C. and Garry, V. F.** (2009). Progesterin functions in vertebrate gametes mediated by membrane progesterin receptors (mPRs): Identification of mPR α on human sperm and its association with sperm motility. *Steroids* **74**, 614–621.
- Tomes, C. N.** (2015). The proteins of exocytosis: lessons from the sperm model. *Biochem. J.* **465**, 359–370.
- Tomes, C. N., De Blas, G. A., Michaut, M. A., Farr??, E. V., Cherhitin, O., Visconti, P. E. and Mayorga, L. S.** (2005). alpha-SNAP and NSF are required in a priming step during the human sperm acrosome reaction. *Mol. Hum. Reprod.* **11**, 43–51.
- Töpfer-Petersen, E., Friess, A. E., Stoffel, M. and Schill, W. B.** (1990). Boar sperm membranes antigens. II. Reorganization of an integral membrane antigen during capacitation and acrosome reaction. *Histochemistry* **93**, 491–5.
- Toshimori, K.** (2009). Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* **204**, 5–94.
- Treviño, C. L., Santi, C. M., Beltrán, C., Hernández-Cruz, a, Darszon, a and Lomeli, H.** (1998). Localisation of inositol trisphosphate and ryanodine receptors during mouse spermatogenesis: possible functional implications. *Zygote* **6**, 159–72.
- Turner, K. O. and Meizel, S.** (1995). Progesterone-Mediated Efflux of Cytosolic Chloride During the Human Sperm Acrosome Reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 774–780.
- van Obberghen, E., Somers, G., Devis, G., Vaughan, G. D., Malaisse-Lagae, F., Orci, L. and Malaisse, W. J.** (1973). Dynamics of insulin release and microtubular-microfilamentous system. I. Effect of cytochalasin B. *J. Clin. Invest.* **52**, 1041–1051.
- Virtanen, I., Badley, R. A., Paasivuo, R. and Lehto, V. P.** (1984). Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J. Cell Biol.* **99**, 1083–1091.
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D., Olds-Clarke, P. and Kopf, G. S.** (1995a). Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation

- and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* **121**, 1139–1150.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D., Olds-Clarke, P. and Kopf, G. S.** (1995b). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **121**, 1129–37.
- Visconti, P. E., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J. L., Acevedo, J. J. and Darszon, A.** (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl.* **13**, 395–405.
- Vitale, M. L., Seward, E. P. and Trifaró, J. M.** (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* **14**, 353–363.
- Vogl, A. W., Genereux, K. and Pfeiffer, D. C.** (1993). Filamentous actin detected in rat spermatozoa. *Tissue Cell* **25**, 33–48.
- von Bülow, M., Heid, H., Hess, H. and Franke, W. W.** (1995). Molecular nature of calicin, a major basic protein of the mammalian sperm head cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **219**, 407–413.
- von Bülow, M., Rackwitz, H. R., Zimbelmann, R. and Franke, W. W.** (1997). CP beta3, a novel isoform of an actin-binding protein, is a component of the cytoskeletal calyx of the mammalian sperm head. *Exp. Cell Res.* **233**, 216–224.
- Walensky, L. D. and Snyder, S. H.** (1995). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. *J. Cell Biol.* **130**, 857–869.
- Wang, J. L., Easom, R. A., Hughes, J. H. and McDaniel, M. L.** (1990). Evidence for a role of microfilaments in insulin release from purified β -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 424–430.
- Wertheimer, E. V., Salicioni, A. M., Liu, W., Trevino, C. L., Chavez, J., Hernández-González, E. O., Darszon, A. and Visconti, P. E.** (2008). Chloride is essential for capacitation and for the capacitation-associated increase in tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **283**, 35539–50.
- Wertheimer, E., Krapf, D., de la Vega-Beltrán, J. L., Sánchez-Cárdenas, C., Navarrete, F., Haddad, D., Escoffier, J., Salicioni, A. M., Levin, L. R., Buck, J., et al.** (2013). Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J. Biol. Chem.* **288**, 35307–20.
- Westbrook-Case, V. A., Winfrey, V. P. and Olson, G. E.** (1994). A domain-specific 50-kilodalton structural protein of the acrosomal matrix is processed and released during the acrosome reaction in the guinea pig. *Biol. Reprod.* **51**, 1–13.
- Westergaard, L. G., Erb, K., Laursen, S. B., Rasmussen, P. E., Rex, S., Westergaard, C. G. and Andersen, C. Y.** (2004). Concentrations of gonadotrophins and steroids in pre-ovulatory follicular fluid and serum in relation to stimulation protocol and outcome of assisted reproduction treatment. *Reprod. Biomed. Online* **8**, 516–23.
- Wistrom, C. A. and Meizel, S.** (1993). Evidence suggesting involvement of a unique human sperm steroid receptor/Cl⁻ channel complex in the progesterone-initiated acrosome reaction. *Dev. Biol.* **159**, 679–90.
- Witke, W., Sharpe, A. H., Hartwig, J. H., Azuma, T., Stossel, T. P. and Kwiatkowski, D. J.** (1995). Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin. *Cell* **81**, 41–51.
- Wolf, D. E., Hagopian, S. S. and Ishijima, S.** (1986). Changes in sperm plasma membrane lipid diffusibility after hyperactivation during in vitro capacitation in the mouse. *J. Cell Biol.* **102**, 1372–7.

- Xia, J. and Ren, D.** (2009). Egg coat proteins activate calcium entry into mouse sperm via CATSPER channels. *Biol. Reprod.* **80**, 1092–8.
- 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.** (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev. Biol.* **296**, 353–362.
- Yagi, A. and Paranko, J.** (1992). Localization of actin, alpha-actinin, and tropomyosin in bovine spermatozoa and epididymal epithelium. *Anat. Rec.* **233**, 61–74.
- Yanagimachi, R.** (1969). In vitro capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* **18**, 275–286.
- Yanagimachi, R.** (1989). Sperm capacitation and gamete interaction. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **38**, 27–33.
- Yanagimachi, R.** (1994a). *Mammalian fertilization*. Knobil E., New York: Raven Press.
- Yanagimachi, R.** (1994b). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* **2**, 371–372.
- Yanagimachi, R., Kamiguchi, Y., Mikamo, K., Suzuki, F. and Yanagimachi, H.** (1985). Maturation of spermatozoa in the epididymis of the Chinese hamster. *Am. J. Anat.* **172**, 317–30.
- Yudin, A. I., Cherr, G. N., Vandevoort, C. A. and Overstreet, J. W.** (1998). Rearrangement of the PH-20 protein on the surface of macaque spermatozoa following exposure to anti-PH-20 antibodies or binding to zona pellucida. *Mol. Reprod. Dev.* **50**, 207–220.
- Yunes, R., Tomes, C., Michaut, M., De Blas, G., Rodriguez, F., Regazzi, R. and Mayorga, L. S.** (2002). Rab3A and calmodulin regulate acrosomal exocytosis by mechanisms that do not require a direct interaction. *FEBS Lett.* **525**, 126–130.
- Zanetti, N. and Mayorga, L. S.** (2009). Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction. *Biol. Reprod.* **81**, 396–405.
- Zeng, Y., Clark, E. N. and Florman, H. M.** (1995). Sperm membrane potential: hyperpolarization during capacitation regulates zona pellucida-dependent acrosomal secretion. *Dev. Biol.* **171**, 554–63.
- Zepeda-Bastida, A., Chiquete-Felix, N., Uribe-Carvajal, S. and Mujica, A.** (2011). The acrosomal matrix from guinea pig sperm contains structural proteins, suggesting the presence of an actin skeleton. *J. Androl.* **32**, 411–9.
- Zhao, L., Burkin, H. R., Shi, X., Li, L., Reim, K. and Miller, D. J.** (2007). Complexin I is required for mammalian sperm acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* **309**, 236–244.